AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale SIReNa
(Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Biologie et écologie des forêts et des agrosystèmes »

par **Mélanie ROLAND**

Étude fonctionnelle de facteurs de maturation tardifs des protéines fer-soufre chloroplastiques chez *A. thaliana*

Soutenance le 27 novembre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :	**Mme Sandrine OLLAGNIER DE CHOUDENS**	**Directrice de recherche, CEA, Grenoble**
	Mme Béatrice PY	**Directrice de recherche, CNRS, Marseille**
Examinateurs :	**Mr Claude DIDIERJEAN**	**MCF, Université de Lorraine, Nancy**
	Mr Frédéric GAYMARD	**Directeur de recherche, INRA, Montpellier**
	Mr Nicolas ROUHIER	**Pr, Université de Lorraine, Nancy** **Directeur de thèse**
	Mr Jérémy COUTURIER	**MCF, Université de Lorraine, Nancy** **Co-directeur de thèse**

UMR INRA/UL 1136, Interactions Arbres/Micro-organismes
Faculté des sciences, Boulevard des aiguillettes
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Remerciements

Bien que je considère que les remerciements n'aient pas lieu d'être trouvés au début d'un manuscrit de thèse, et auraient plutôt leur place à la fin de celle-ci, j'ai l'honneur de m'essayer à cette pratique pour l'écriture de mon mémoire. Ainsi, je voulais commencer par remercier les docteurs Béatrice Py, Claude Didierjean, Frédéric Gaymard, et Sandrine Ollagnier de Choudens d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail dans le cadre de l'obtention du titre de docteur.

Je souhaite également remercier ceux qui m'ont accompagnée tout du long, m'ont permis d'assister à plusieurs colloques ou autres « summerschool », et ainsi de réaliser le rêve d'aller aux USA, mes deux directeurs de thèse, Nicolas et Jérémy. Malgré une thésarde casse-pieds, vous n'avez jamais abandonné, et pour ça je vous tire mon chapeau ! Nicolas, je voulais te remercier vivement pour l'efficacité et la qualité de tes corrections, que ce soit pour l'écriture de papiers, ou pour des travaux plus imposants tels que ce manuscrit. Merci également de la confiance dont tu as fait preuve à mon égard en me laissant gérer certains aspects de mon projet, et encadrer pleinement 2 stagiaires de M1. Jérémy, je ne t'ai jamais ménagé alors que de ton coté tu as toujours su faire preuve de justesse à mon égard, et ça je t'en suis profondément reconnaissante. Pour le nombre de fois où tu as servi de « correcteur-test », toutes ces fois où tu m'as dit qu'il ne fallait pas avoir honte et qu'il fallait mettre mon travail en avant, ta confiance pour me refiler des cours à donner, les discussions sur l'après thèse, les fois où tu m'as rappelé qu'il y a une vie en dehors du labo, m'avoir mis le pied à l'étrier en acceptant d'être mon tuteur de stage en M1, milles fois merci !

Evidemment, il y a toute une équipe qui participe à la partie « cadre de travail » d'un doctorant pendant ses plus ou moins 3 ans de thèse. C'est donc tout naturellement que je voudrais remercier l'ensemble des personnes grâce à qui il est agréable de se rendre au laboratoire chaque matin (en espérant n'oublier personne) : Alexis, Mr organisation qui a toujours un mot gentil, Anna, toujours partante pour sortir boire un coup ou aller à un concert (Vhf5cuXiLTA), Annick pour nos discussions concernant l'insertion professionnelle et pour ton implication sur les stages tous chercheurs, Antonio, son apprentissage du français et ses interludes musicaux (3AtDnEC4zak), Arnaud, le professeur fraîchement nommé, Blaguechetta le mec adorable aux jeux de mots pourris, « Benji » le gars discret en apparence capable de sortir les blagues les plus graveleuses que j'ai jamais entendues, « Ben le ouf » le scientifique passionné, Claudine souriante chaque matin, Corinne en qui j'ai trouvé une super acolyte de bureau qui déteste Notilus et adore le cheval et les cookies (PlrxMv3XEJ0), Delphine et sa positude constante, Elena qui a été un peu comme une mère au labo en donnant des conseils avisés et en nous forçant à rentrer chez nous certains soirs, Eric (« Monsieur le DU ») et l'attention discrète mais précieuse qu'il porte à chacun, Jean-Michel l'homme dont la femme est aussi la maîtresse, Jean-Pierre le discret sympathique, J2P le meilleur voisin de bureau au monde (vous me flattez ?), Julien mon partenaire hot/te (rOPoP4YWgmk), Kévin et ses recettes maison de milieux bleu, l'adorable Martine toujours à nous râler dessus pour qu'on prenne rapidement nos billets de trains, les crystallographes « touche à tout » Mathieu et Thomas, Matthieu le doctorant en garde alternée avec le 2e étage, Mélanie dont la conversation est toujours agréable, Muriel pour les nombreuses pauses midi et les interludes « courses de champis » pendant ces longues heures de double hybride en levure, Raphaël toujours prêt à rendre service, Rodnay le

passionné des recherches aux noms sexy avec un goût prononcé pour la musique d'un autre genre (HUylpu7sk1Y), Sylvie madame boulet comme tu t'appelles toi-même, Tiphaine la mangeuse de pomme invétérée, et Vuong qui nous fait découvrir le Vietnam à sa façon. Merci également à l'équipe du Dr Christian Dubos à l'INRA de Montpellier de m'avoir accueillie le temps de « jouer » un peu avec des mutants de plantes et de faire 2-3 images sympathiques au microscope confocal.

Je tiens à remercier plus particulièrement mes collègues de galère, les autres doctorants du labo, qui ont été d'un soutien important. Johnny, le mec qui fait flipper les jeunes doctorants qui restent tard le soir au labo (gros Jacky va !) et qui m'a transmis le flambeau des protéines Fe-S, passer après un tel drogué de travail n'a pas été évident mais ta rigueur m'a beaucoup servi à me débrouiller une fois parti ! Valette, le mec dont la thèse a achevé le grand Johnny Halliday quoi (8Sc4Pb7d1Nk) … Tes plus de 1 m 85 et ton estomac d'ogre ne t'empêchent pas d'être quelqu'un d'attachant dont la descente de GET27 m'aura bien épatée ! Flavien, le mec drogué au café ou au Redbull en permanence pour pouvoir enchaîner manipe sur manipe et montrer qu'il peut faire mieux que les autres, heureusement que la thèse termine bientôt je n'sais pas comment tu fais, chapeau ! Merci à Thomas (Totominou) pour toutes ces soirées passées à vérifier que je reparte du labo (bon en vrai, c'est parce qu'on relançait des manipes à 17h), vainqueur régional de MT180, grand chasseur et excellent partenaire de tennis, c'est quand même dommage que l'Allemagne t'ait accaparé, les choses sont bien différentes sans toi (FQlAEiCb8m0). Enfin, merci à ma comparse Elodie, inspecteur Sylvestre pour les intimes, pour ta bonne humeur quasi à toute épreuve surtout les vendredis, c'est pas tous les jours qu'on rencontre une princesse comme toi, si t'en étais une de chez Disney tu serais Raiponce, la fille la plus badass du grand écran à mes yeux !

Je souhaitais remercier tout particulièrement mes deux padawans, Mathilde et Loïck, que j'ai eu la tâche d'encadrer pendant deux mois chacun, heureusement pas en même temps, je n'aurai pas survécu à votre volonté et à votre intérêt pour le sujet (surtout quand l'un de vous lance une phényl sépharose le vendredi… mxvEjC28MJ8). J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes, pour ma part vous voir progresser en cours de stage a été l'un des aspects les plus gratifiants du doctorat.

J'adresse une pensée toute particulière à Lauralie, avec qui j'ai partagé l'ensemble de mes expériences dans la recherche depuis le master. Certes pas au sein de la même équipe cette fois, mais au sein de la même unité et sur le même laps de temps ce qui nous a permis de nous soutenir l'une l'autre dans les moments clés, merci infiniment pour ça (_r88ao7VFE4).

Certes, la thèse implique de nombreuses de personnes d'un point de vue professionnel, mais son bon déroulement implique également les êtres qui nous accompagnent au quotidien et qu'on appelle famille, amis ou encore chéri.

À ma maman, j'adresse mes remerciements les plus profonds, ainsi que toute ma tendresse et mon admiration, tu es la personne la plus forte que je connaisse, malgré tous tes combats tu t'es toujours battue pour nous et c'est grâce à ça que j'ai eu l'opportunité de faire autant d'années d'étude (YgP2whwA2Wg). Merci à mon petit

frère Aurélien, d'être venu me tenir compagnie sur tes vacances et d'avoir souvent géré en tant que « grand », mais tu as aussi droit de profiter de ta jeunesse et j'espère bientôt pouvoir te rendre la pareille. Merci au reste de ma famille d'avoir essayé tant bien que mal de comprendre ce que je faisais et à quoi ça pouvait mener, ce n'est pas toujours évident de répondre à ces questions mais votre intérêt est vraiment touchant (et non, je ne fais pas médecine, docteur n'est « qu'un titre » universitaire).

Un grand merci à Joé (EcU0qbV70rU) et Davy, aux amis « du lycée » (Coco, Cyndie, Damien, Flo, Julien, Mathieu B., Mathieu P. et Mélissa, nSDgHBxUbVQ), à ceux de la fac (Emilie, Gwendo, Mehdi, Mo', Mulot et Quentin), et à tous ceux non cités pour les week-ends, les soirées jeux de société, le groupe de musique, la plongée, les rares soirées karaoké, les escape game, les soirées de nouvel-an, et surtout merci d'avoir compris les nombreux « bah je quitte seulement le boulot donc j'aurai du retard… » et les « pas le temps je dois bosser », en se débrouillant bien on rattrapera tout ce temps-là bien assez vite !

Enfin, je voulais exprimer toute ma gratitude à mon partenaire de vie, Steven, qui n'a cessé de m'apporter son soutien depuis 5 ans et qui a particulièrement assuré ces 3 derniers mois (merci à monsieur JR Gros-Desormeaux pour ça d'ailleurs), c'est un tel exploit qu'on te décernera surement une médaille un de ces jours… Merci d'être une si belle personne (uKDxJYSkcHA).

Table des matières

Table des matières

Introduction ---------- 1

Chapitre 1 : Nature et fonction des centres Fe-S ---------- 3

1. Diversité des centres Fe-S ---------- 3

2. Mécanismes moléculaires associés aux centres Fe-S ---------- 4

3. Maturation des protéines à centre Fe-S ---------- 8

Chapitre 2 : Machineries d'assemblage de centres fer-soufre chez les procaryotes ---------- 9

1. Maturation de la nitrogénase par le système bactérien NIF chez *Azotobacter vinelandii* ---------- 9

2. Assemblage de centres Fe-S par la machinerie ISC chez *E. coli* ---------- 11

3. Maturation des protéines à centre Fe-S en conditions de stress par la machinerie bactérienne SUF ---------- 13

4. Protéines impliquées dans la maturation de protéines à centre Fe-S non codées par les opérons *isc* et *suf* ---------- 14

Chapitre 3 : Assemblage de centres Fe-S au sein de l'organisme eucaryote *Arabidopsis thaliana* ---------- 20

1. Assemblage de centres Fe-S par la machinerie mitochondriale ISC ---------- 22

2. Maturation des protéines Fe-S cytosoliques et nucléaires par la machinerie CIA ---------- 27

3. Rôle et maturation des protéines à centre Fe-S chloroplastiques ---------- 30

4. Contexte et objectifs de ma thèse ---------- 53

Matériel et méthodes ---------- 55

Chapitre 1 : Techniques de biologie moléculaire ---------- 57

1. Amplification de la séquence d'intérêt par réaction en chaîne par polymérase ou PCR ---------- 57

2. Digestion de l'insert et du plasmide ---------- 57

3. Ligature de l'insert et du plasmide ---------- 58

4. Sélection de plasmides recombinants dans *E. coli* ---------- 58

5. PCR sur colonies ---------- 58

6. Extraction de plasmide, digestion contrôle et séquençage ---------- 59

Chapitre 2 : Techniques de caractérisation biochimique ---------- 59

1. Production de protéines en système hétérologue d'*E. coli* ---------- 59

1.1. Transformation de souches productrices ---------- 62

1.2. Production de protéines recombinantes dans *E. coli* ---------- 63

1.3. Purification de protéines recombinantes ---------- 65

2. Analyse de protéines à centre Fe-S ---------- 67

2.1. Reconstitution de centre Fe-S en anaérobiose ---------- 68

2.2. Caractérisation d'holoprotéines après reconstitution ---------- 69

2.3. Transfert *in vitro* de centre Fe-S en anaérobiose ---------- 70

Chapitre 3 : Recherche de partenaires ---------- 71

1. Double hybride en levure ---------- 71

1.1. Co-transformation de levures ---------- 71

1.2. Détection des interactions protéine-protéine par croissance sur milieu sélectif ---------- 73

2. Complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC) ---------- 73

2.1. Préparation des plasmides ---------- 74

2.2. Préparation et transformation du matériel végétal ---------- 74

Résultats ---------- 77

Chapitre 1 : Redondance fonctionnelle des protéines NFU au sein du chloroplaste ---------- 79

1. Caractérisation biochimique de NFU1 et recherche de partenaires par double hybride en levure ---------- 79

2. Détermination des cibles de NFU2 par approches protéomiques et comparaison d'interactions avec NFU1 et NFU3 ---------- 119

Chapitre 2 : Caractérisation des protéines IBA57.2 et SUFA1 d'*Arabidopsis thaliana* ---------- **145**

1. Etude des interactions entre SUFA1, IBA57.2 et NFU1 par complémentation de fluorescence bimoléculaire en protoplastes d'*A. thaliana* ---------- 145

2. Caractérisation biochimique des protéines IBA57.2 et SUFA1 seules ou en complexe ---------- 147

2.1. Etude des protéines IBA57.2 et SUFA1 ---------- 147

2.2. Caractérisation du complexe IBA57.2-SUFA1 ---------- 151

3. Caractérisation fonctionnelle des protéines IBA57.2 et SUFA1 par identification de partenaires en double hybride en levure ---------- 153

3.1. Etude des interactions avec les protéines de la machinerie chloroplastique SUF ---------- 153

3.2. Etude des interactions entre les protéines IBA57.2 et SUFA1 et des cibles chloroplastiques potentielles ---------- 156

4. Transfert de centre Fe-S entre NFU1 et SUFA1 *in vitro* ---------- 158

Conclusions générales ---------- **161**

1. Quelle place pour les protéines ATC, IBA57 et NFU au sein de la machinerie d'assemblage de centres Fe-S chloroplastique SUF ? ---------- 163

2. Maturation des protéines Fe-S chloroplastiques par les protéines de transfert ATC, IBA57 et NFU : spécificité ou redondance ? ---------- 166

Annexes ---------- **171**

Références bibliographiques ---------- **177**

Introduction

Chapitre 1 : Nature et fonction des centres Fe-S

1. Diversité des centres Fe-S

Bien que les centres fer-soufre (Fe-S) fassent partie des plus anciens constituants du vivant, leur existence n'est connue que depuis le début des années 1960. En effet, l'étude de bactéries fixatrices d'azote, d'organismes végétaux et de lysats mitochondriaux a permis d'isoler des protéines colorées impliquées dans des réactions d'oxydoréduction (Crane et al., 1957; Mortenson et al., 1962; Pietro et Lang, 1958). L'étude de ces protéines a révélé dans un premier temps qu'elles étaient capables de lier du fer, à l'origine de leur nom de ferrédoxines (Fdx). En 1966, l'étude des ferrédoxines par résonance paramagnétique électronique (EPR), une technique apparue quelques années plus tôt, a permis d'élaborer le premier modèle structural de centre Fe-S (Brintzinger et al., 1966). Depuis, de nombreuses protéines à centre Fe-S ont été identifiées, notamment grâce à l'amélioration constante des techniques spectroscopiques (Beinert et al., 1997; Bonomi et Rouault, 2014). Les études réalisées ont ainsi montré que les centres Fe-S sont un assemblage d'atomes de fer et de soufre liés entre eux de façon covalente et retrouvés dans des proportions différentes, les plus représentés étant les centres [2Fe-2S] rhombiques et [4Fe-4S] cubiques (Figure 1). Les autres types de cofacteurs Fe-S seraient des dérivés des centres [4Fe-4S], par perte d'un atome de fer pour les centres [3Fe-4S], ou par assemblage de deux centres [4Fe-4S] pour les centres [8Fe-7S] présents dans les nitrogénases et également appelés « P-cluster » (Johnson et al., 2005).

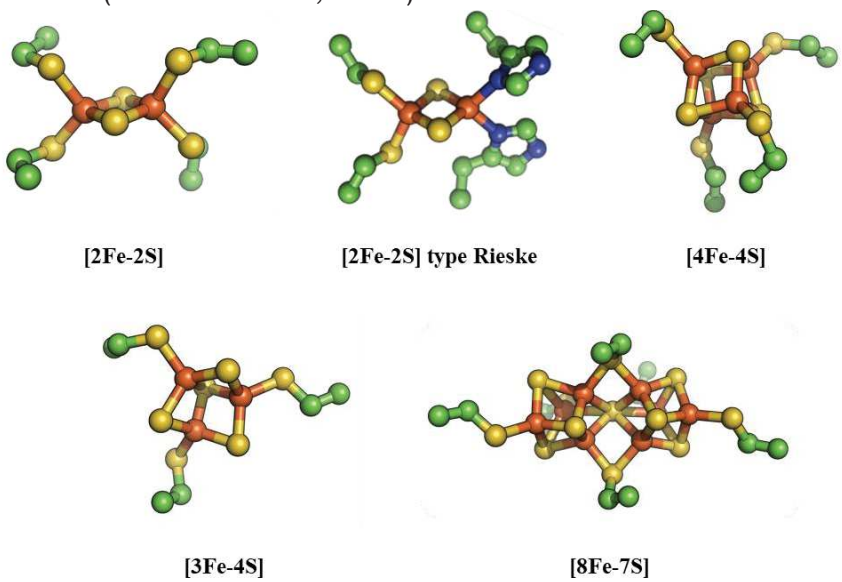


Figure 1: Structures de divers centres Fe-S biologiques. D'autres centres Fe-S plus complexes existent. Ceux-ci sont principalement dérivés des centres de type [4Fe-4S] et sont parfois associés à d'autres métaux comme le nickel, le zinc ou le molybdène. A l'exception du centre [2Fe-2S] de type Rieske, chaque cofacteur est représenté en liaison avec une protéine par des cystéines. Les atomes sont matérialisés par le code couleur suivant: orange - fer, jaune - soufre, bleu - azote, vert - carbone. Figure adaptée de Przybyla-Toscano, 2017.

Les centres précédemment nommés sont liés aux protéines par leurs atomes de fer, chacun étant capable d'établir 4 liaisons de valence dont une partie est impliquée dans la liaison d'atomes de soufre inorganique au sein du centre. De façon prédominante, ces atomes de fer sont liés aux protéines par les fonctions thiol de cystéines. D'autres acides aminés interviennent toutefois dans la fixation de centres

Fe-S comme les histidines (protéine Rieske de la cytochrome-c oxydoréductase, Gurbiel et al., 1991), et plus rarement les aspartates (Fumarate and Nitrate Reduction Regulatory, FNR, Gruner et al., 2011), arginines (biotine synthase, Fuchs et al., 2010), ou glutamines (dihydropyrimidine déshydrogénase, Dobritzsch et al., 2001). Enfin, il existe des centres Fe-S plus complexes, associés à des atomes métalliques, tels que le cuivre, le nickel ou le zinc, au sein de protéines comme la monoxyde de carbone (CO) déshydrogénase et l'acétyl-coA synthase (Drennan et Peters, 2003). Outre des métaux, des molécules entières peuvent être couplées aux centres Fe-S, c'est le cas des sirohèmes pour la sulfite réductase, ou de l'homocitrate pour le centre Mo-[7Fe-8S] de la nitrogénase (Drennan et Peters, 2003).

2. Mécanismes moléculaires associés aux centres Fe-S

Le rôle premier des centres Fe-S est relatif au transfert d'électrons et concernerait environ 50 % des protéines à centre Fe-S chez les bactéries (Fontecave, 2006). Cette fonction dépend de la capacité des atomes de fer à osciller entre un état réduit Fe^{2+} et oxydé Fe^{3+} par gain ou perte d'un électron. Les atomes de soufre inorganique du centre Fe-S sont quant à eux figés dans un état S^{2-} (Johnson et al., 2005). Un seul électron est échangé par centre et par réaction à l'exception des centres [8Fe-7S], agissant comme deux centres [4Fe-4S], et transférant *a priori* deux électrons simultanément (Barupala et al., 2016; Johnson et al., 2005). En règle générale, l'aptitude d'une molécule à transférer des électrons est associée à un potentiel d'oxydo-réduction (Bak et Elliott, 2014). Pour les protéines à centre Fe-S ce potentiel varie en fonction du type de centre, de ses ligands protéiques, et du pH environnant, expliquant que les protéines Fe-S couvrent un large champ de potentiels de réduction (Bak et Elliott, 2014). Parmi les protéines à centre Fe-S dont les ligands ne sont pas uniquement des cystéines, certaines ont la capacité de coupler un transfert de protons au transfert d'électrons. Ceci est le cas des protéines de type Rieske présentes au sein des chaînes respiratoires et photosynthétiques de transfert d'électrons (protéine Rieske de *Thermus thermophilus*, Hsueh et al., 2010). Les chaînes de transfert d'électrons respiratoires et photosynthétiques sont l'illustration idéale du rôle des protéines à centre Fe-S en tant que passeurs d'électrons. Par exemple, la phase lumineuse de la photosynthèse, qui consiste en la conversion d'eau et de dioxyde de carbone (CO_2) en oxygène (O_2) et en molécules organiques complexes telles que le glucose, est directement dépendante de 5 protéines à centre Fe-S (Johnson, 2016). En effet, au cours de la photolyse de l'eau par le photosystème II, des électrons sont libérés et permettent la réduction de plastoquinone en plastoquinol. Ces électrons sont alors transférés au niveau du cytochrome b_6f, un second complexe protéique incluant notamment la protéine de type Rieske, petC (photosynthetic electron transfer C, Schneider et al., 2004). Les électrons présents sur le centre [2Fe-2S] de petC sont pris en charge par la plastocyanine et adressés au photosystème I dont les sous-unités PsaA, PsaB et PsaC sont capables de lier des centres [4Fe-4S] à raison d'un centre Fe-S pour un hétérodimère PsaA/PsaB et deux centres Fe-S par monomère de PsaC (Golbeck, 2003; Johnson, 2016). Enfin, les électrons sont transférés vers le centre [2Fe-2S] de ferrédoxines. C'est à partir de ferrédoxines sous forme réduites que la ferrédoxine-$NADP^+$ réductase permet la formation de NADPH qui sera utilisé lors de la conversion de CO_2 en glucose par les enzymes du cycle de Calvin-Benson (figure 2, Johnson, 2016).

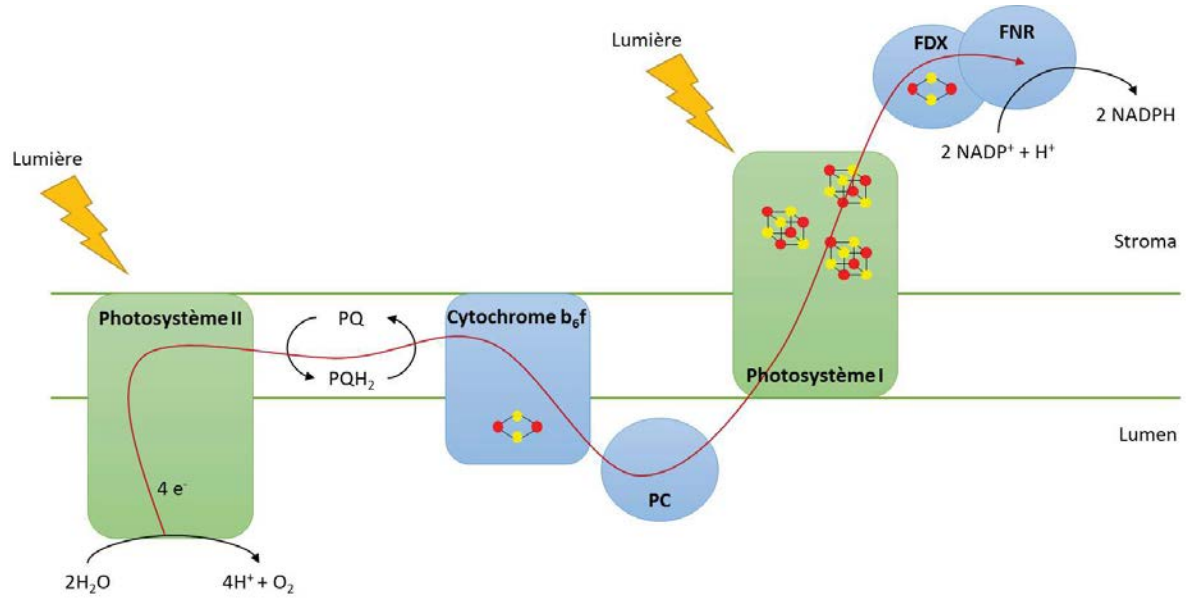


Figure 2: Représentation schématique de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique au niveau des thylakoïdes. Afin d'avoir une représentation simplifiée, le transfert de protons et leur devenir n'apparaissent pas sur ce schéma. Les complexes protéiques chlorophylliens sont représentés en vert et le transfert d'électrons est représenté par une flèche rouge. Les abréviations utilisées sont les suivantes : PQ : plastoquinone, PQH_2 : plastoquinol, PC : plastocyanine, FDX : ferrédoxine et FNR : ferrédoxine-$NADP^+$ réductase.

Cependant, les protéines Fe-S interviennent dans d'autres processus biologiques dont le fonctionnement n'est pas exclusivement lié au transfert d'électrons ou de protons. Ainsi, certains centres Fe-S permettent la liaison et/ou l'activation de substrats selon 4 mécanismes majeurs (Johnson et al., 2005).

Les deux premiers font intervenir des centres Fe-S n'étant liés que sur 3 atomes de fer à des cystéines, un 4e atome de fer libre servant à la liaison et à l'activation du substrat soit par catalyse redox dans le cas des protéines à radical S-adénosine-L-méthionine (SAM, Broderick et al., 2018), soit non redox dans le cas des hydratases/déshydratases (Barupala et al., 2016). Pour les protéines à radical SAM, l'atome de fer libre est lié aux groupements amine et carboxyle d'une SAM dont il permet le clivage réductif par le centre Fe-S (Figure 3). Ce mécanisme permet l'obtention d'une méthionine et d'un radical 5'-déoxyadénosyl (5'-dA•) utilisés en tant que substrats dans des réactions catalysées par un second centre Fe-S, dit « auxiliaire » (Figure 3, Lanz et Booker, 2015). Plus de 60 protéines à radical SAM sont répertoriées à ce jour et elles interviennent dans de nombreuses voies métaboliques (Johnson et al., 2005). Dans le cas des hydratases et déshydratases, l'atome de fer disponible est coordonné à des molécules d'eau. Celui-ci réagit comme un acide de Lewis avec son substrat, qui est activé *via* des réactions d'hydratation/déshydratation. L'exemple le plus connu pour ce processus est l'aconitase, impliquée dans l'isomérisation du citrate en isocitrate (Lloyd et al., 1999).

Un troisième mécanisme de liaison/activation de substrats fait intervenir des centres Fe-S au sein desquels sont incorporés un ou plusieurs atomes métalliques (Johnson et al., 2005). Le centre Fe-[Ni-3Fe-4S] de la CO déshydrogénase en est un bon exemple. Ce groupement prosthétique permet la conversion réversible entre CO et CO_2 *via* la liaison du substrat à l'atome de nickel du centre Fe-S (Fesseler et al., 2015).

Enfin, un quatrième mécanisme permet l'activation de substrats par liaison d'un groupement prosthétique métallique à un centre [4Fe-4S]. Les deux cofacteurs sont notamment reliés par une cystéine comme c'est le cas pour les sirohèmes présents dans la sulfite réductase et la nitrite réductase (Crane et Getzoff, 1996). Dans ces protéines, la réduction du substrat se fait *via* sa liaison avec l'atome de fer hémique.

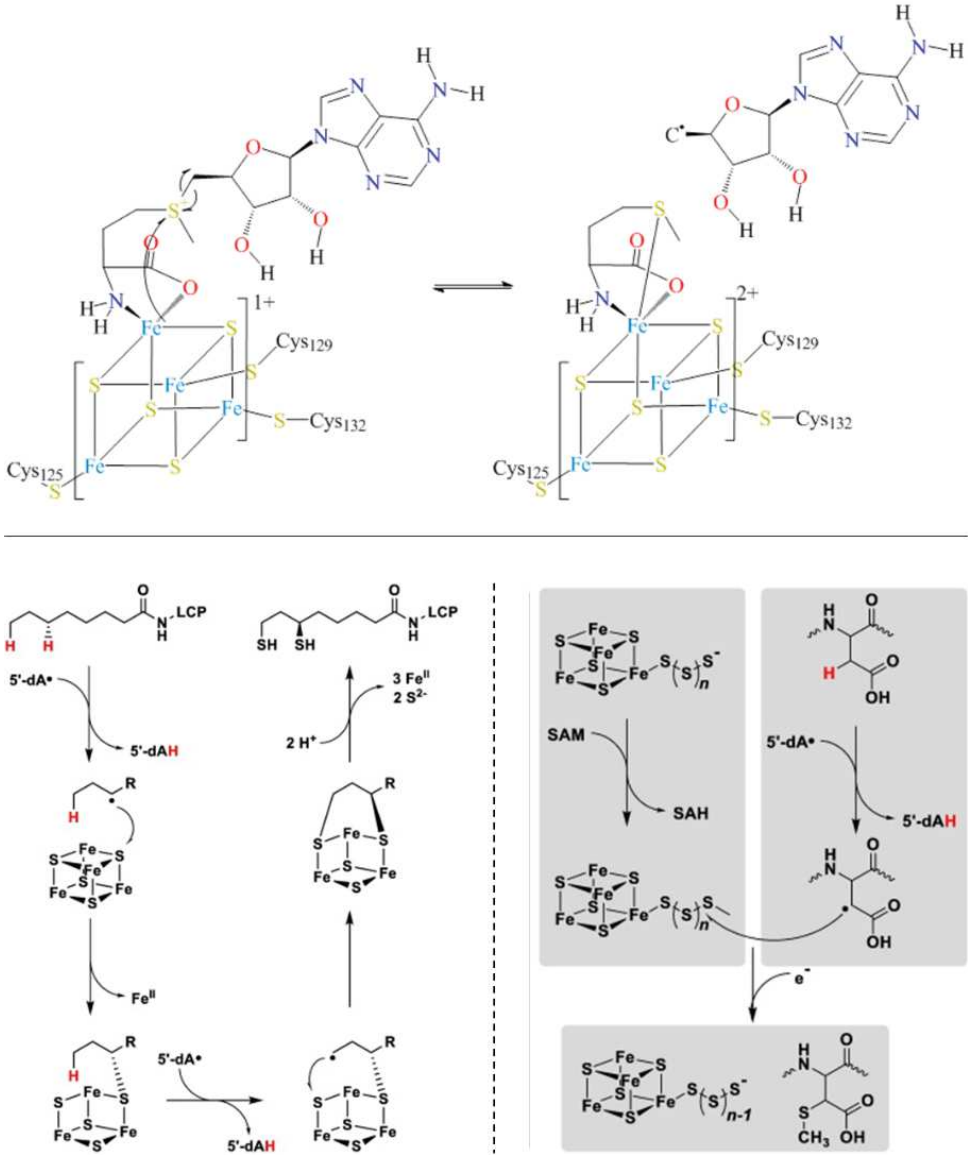


Figure 3 : Réactions catalysées par les protéines Fe-S à radical SAM. En haut, mécanisme général d'activation de la SAM par un centre Fe-S (www.sfld.rbvi.ucsf.edu). En bas à gauche, insertion des atomes de soufre dans l'acide lipoïque à partir d'un centre Fe-S auxiliaire présent dans la lipoate synthase. En bas à droite insertion d'atomes de soufre sous forme d'une fonction méthylthiol dans différentes molécules à partir d'un centre Fe-S auxiliaire présent dans les méthylthiotransférases. 5'-dA• : radical 5'-déoxyadénosyl, 5'-dAH : 5'-déoxyadénosine, Cys : Cystéine, LCP : Lipoyl carrier protein, SAM : S-adénosyl-L-méthionine, et SAH : S-adénosylhomocystéine. Figures adaptées de Lanz et Booker, 2015.

Pour les protéines à radical SAM, certains centres Fe-S auxiliaires sont responsables de l'insertion de soufre au sein d'un substrat mais deux types de mécanismes peuvent être distingués (Figure 3). Ainsi, la biotine synthase et la lipoate synthase sont responsables de l'insertion d'un ou deux atomes de soufre au sein d'un substrat organique, alors que les méthylthiotransférases MiaB et RimO catalysent la liaison d'un groupement méthylthio sur un atome de carbone du substrat (Lanz et

Booker, 2015). Bien que ces mécanismes concernent tous deux le soufre, le centre Fe-S catalytique n'y est pas impliqué de façon identique. Dans le cas de la biotine synthase et de la lipoate synthase, le soufre apporté au substrat provient directement du centre Fe-S et requiert une étape de régénération, alors que le centre [4Fe-4S] de MiaB et de RimO reste intact au cours de la réaction (Lanz et Booker, 2015; McCarthy et Booker, 2017).

Il est également intéressant de mentionner le cas de l'aconitase IRP1 (pour iron regulatory protein 1) chez les animaux car elle possède un rôle distinct en absence de son cofacteur. Ainsi, l'holoforme de l'aconitase cytosolique IRP1 remplit sa fonction d'isomérase, tandis que l'apoforme, enzymatiquement inactive, joue un rôle de régulateur post-transcriptionnel dans l'homéostasie du fer (Pantopoulos, 2004; Volz, 2008). En effet, lors d'une carence en fer ou d'un stress oxydant, le centre [4Fe-4S] présent sur IRP1 est dégradé d'abord partiellement sous la forme d'un centre [3Fe-4S] puis complètement. Sous cette forme, la protéine se fixe sur des éléments de réponse au fer (iron responsible element, IRE) présents au niveau de certains ARN messagers (ARNm) codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer. Lors de la liaison à un IRE localisé à l'extrémité 5', comme dans le cas des gènes codant les ferritines, IRP1 réprime leur traduction alors que s'il s'agit d'un IRE situé à l'extrémité 3', comme dans le cas des gènes codant les récepteurs de la transferrine, IRP1 stabilise l'ARNm ciblé. Il s'agit ici d'une régulation post-transcriptionnelle des voies d'import, d'utilisation et de stockage du fer (Pantopoulos, 2004; Volz, 2008).

Chez les procaryotes, certaines protéines Fe-S possèdent un rôle de senseur par le biais d'un centre Fe-S. La protéine SoxR par exemple intervient dans la réponse au stress oxydant induit par l'ion superoxyde. Lors de ce stress, SoxR est activée par oxydation de son centre [2Fe-2S], ce qui conduit, par l'intermédiaire du facteur de transcription SoxS, à l'expression de gènes impliqués dans l'élimination du superoxyde et la réparation des dommages oxydatifs (Kiley et Beinert, 2003). La protéine Fumarate and Nitrate Reduction Regulatory (FNR) possède un rôle régulateur vis-à-vis du mode de vie aérobie/anaérobie de certaines bactéries (Zhang et al., 2012). En conditions limitantes en oxygène, la protéine FNR incorpore un centre [4Fe-4S] au sein d'un dimère. Il s'agit de la forme active de la protéine qui réprime l'expression de gènes relatifs à la respiration aérobie tout en activant d'autres gènes associés à un mode de vie anaérobie. Lorsque la concentration en oxygène du milieu augmente, une forme monomérique, inactive, liant un centre [2Fe-2S] au niveau de cystéines persulfurées est formée, modifiant de la sorte l'expression des gènes placés sous son contrôle (Zhang et al., 2012). Enfin, l'expression de l'opéron *isc* chez *E. coli* est régulée par l'une des protéines de cet opéron, IscR. Cette protéine, maturée par les protéines d'échafaudage, incorpore un centre [2Fe-2S] sensible aux niveaux de centres Fe-S cellulaires. Ainsi, quand la cellule contient suffisamment de centres Fe-S, la protéine IscR est sous holoforme et réprime l'expression de l'opéron. A l'inverse, lorsque les besoins en centres Fe-S augmentent, et selon les conditions environnantes, IscR se retrouve sous apoforme et induit l'expression soit de l'opéron *isc*, soit de l'opéron *suf* (Giel et al., 2013; Kiley et Beinert, 2003; Roche et al., 2013).

Enfin, plusieurs familles de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN possèdent des centres Fe-S (Puig et al., 2017). Ces protéines appartiennent à la

famille des polymérases (Pol δ), des primases (PriL), des ADN glycosylases (Endonucléase III, MutY) ou encore à celle des ADN hélicases (DinG, XPD). Les premières études avaient suggéré un rôle purement structural à ce type de centre Fe-S puisque l'absence de centre [4Fe-4S] déstabilise la structure protéique (Puig et al., 2017). Plus récemment, des expériences d'électrochimie ont montré que l'oxydation du centre sous forme $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ au sein de telles protéines augmente l'affinité de liaison à l'ADN en comparaison avec la même protéine liant un centre Fe-S réduit, $[4Fe\text{-}4S]^{+}$. Par ailleurs, l'ADN ayant la capacité de permettre le transfert de charge sur de longues distances, un électron cédé par une première protéine pourrait être récupéré par une autre protéine située plus loin sur un même brin d'ADN. Ainsi, le centre Fe-S de la protéine qui reçoit un électron par transfert de charge passerait sous forme réduite et se détacherait du brin d'ADN. Lorsqu'une région d'ADN est endommagée, le transfert de charge n'est plus possible entre deux protéines flanquant cette région. Elles demeurent sous forme oxydées, liées à l'ADN ce qui permettrait de localiser la lésion à réparer (O'Brien et al., 2017; Tse et al., 2017).

3. Maturation des protéines à centre Fe-S

Les protéines Fe-S pouvant être reconstituées *in vitro* par l'ajout de fer, de soufre et d'un réducteur, le processus d'incorporation de centre Fe-S a tout d'abord été considéré comme étant spontané. La question se posait alors de savoir comment le fer et le soufre étaient acheminés aux protéines sans causer de dégâts à l'échelle cellulaire, tous deux présentant une forte toxicité sous forme libre. La découverte de gènes bactériens impliqués dans la maturation de la nitrogénase chez la bactérie diazotrophe *Azotobacter vinelandii* a notamment permis de valider l'existence de systèmes de maturation. Ainsi, il est désormais clair que les protéines sont synthétisées sous apoforme par la machinerie ribosomique avant d'acquérir un centre Fe-S par maturation post-traductionnelle, assurée par des machineries d'assemblage protéiques dédiées (Dos Santos et Dean, 2014).

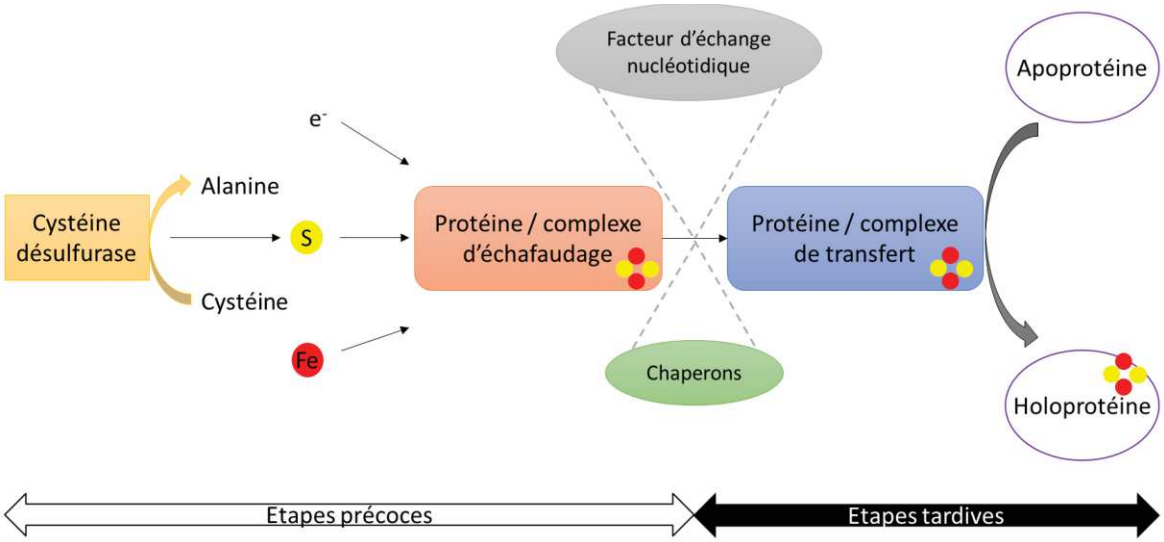


Figure 4: Représentation schématique simplifiée du mécanisme de maturation des protéines à centre Fe-S par les machineries d'assemblage. Deux étapes sont identifiées ici, avec dans un premier temps l'assemblage *de novo* du centre Fe-S sur une protéine ou un complexe d'échafaudage, et dans un second temps, l'acheminement de ce centre vers une protéine acceptrice finale *via* l'action de facteurs appartenant à plusieurs familles protéiques et remplissant différentes fonctions : chaperons, échange nucléotidique, transfert de centres Fe-S.

Le mode de fonctionnement des machineries d'assemblage de centres Fe-S peut être globalement décrit selon deux étapes majeures. Dans un premier temps des atomes de fer et de soufre sont couplés pour former un centre Fe-S au sein d'une protéine ou d'un complexe d'échafaudage. Le centre Fe-S ainsi préformé est ensuite incorporé dans une apoprotéine cible à l'aide de plusieurs protéines aux fonctions variées. Les protéines de transfert sont responsables de la prise en charge d'un centre Fe-S seules ou au sein d'un complexe protéique pour son transfert vers une protéine acceptrice (Figure 4). Néanmoins, la libération du centre Fe-S assemblé sur les protéines ou complexe d'échafaudage peut également dépendre de chaperons, qui permettent l'interaction entre protéines d'échafaudage et de transfert ainsi que de facteurs d'échange nucléotidique (Braymer et Lill, 2017; Przybyla-Toscano et al., 2018).

Chapitre 2 : Machineries d'assemblage de centres fer-soufre chez les procaryotes

Trois machineries capables d'assembler des centres [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] primaires existent chez les procaryotes. Plusieurs de ces machineries peuvent coexister chez un même organisme, auquel cas leur expression est modulée en fonction des conditions environnantes. Dans ce chapitre, il ne sera pas fait mention de certains facteurs de maturation spécifiques, notamment les protéines HydE, F, G qui permettent la maturation des centres Fe-S complexes présents dans les hydrogénases (Peters et al., 2015).

1. Maturation de la nitrogénase par le système bactérien NIF chez *Azotobacter vinelandii*

Il s'agit là de la première machinerie d'assemblage de centre Fe-S identifiée. Sa caractérisation a débuté à la fin des années 1970 et les recherches menées à l'époque avaient surtout pour but de comprendre le mécanisme de fonctionnement de la nitrogénase. En réduisant l'azote atmosphérique (N_2) sous forme d'ammoniaque (NH_3), cette protéine octroie le caractère diazotrophe aux bactéries fixatrices d'azote et notamment à l'organisme modèle *Azotobacter vinelandii* (Dos Santos et Dean, 2014). La nitrogénase est une enzyme complexe possédant deux composants : une dinitrogénase réductase, qui fixe un centre [4Fe-4S] au sein d'un dimère et une dinitrogénase, correspondant à un hétérotétramère incorporant 2 centres [8Fe-7S] et 2 cofacteurs Mo-Fe (Seefeldt et al., 2009).

L'identification des gènes responsables de la maturation de la nitrogénase a été possible grâce à l'étude de mutants déficients pour la fixation d'azote (Nitrogen fixation) et à l'organisation fréquente de ces gènes en opéron. La mutation des gènes *nifS* et *nifU* conduit à une réduction d'activité de chaque sous-unité de la nitrogénase et donc à une réduction de croissance diazotrophe (Jacobson et al., 1989). La purification de la protéine NifS a montré qu'il s'agit d'une enzyme dimérique, dépendante du phosphate de pyridoxal (PLP), et capable d'abstraire l'atome de soufre de la L-cystéine, formant de la L-alanine (Zheng et al., 1994). A l'issue de cette réaction, le soufre libéré est lié à la cystéine catalytique de l'enzyme sous forme de groupement persulfure (SH). D'un point de vue biochimique, le cofacteur PLP lié à NifS au niveau de son site actif interagit avec la L-cystéine de sorte à former un

intermédiaire cétimine. *In fine*, cet intermédiaire est hydrolysé sous forme de PLP libre et de L-alanine après attaque nucléophile de l'atome de soufre par la cystéine catalytique de la cystéine désulfurase (Zheng et al., 1994). Ces analyses désignent ainsi NifS comme étant une cystéine désulfurase impliquée dans l'apport de soufre pour l'assemblage des groupements prosthétiques de la nitrogénase (Zheng et al., 1994, 1993). A partir de ce constat, il a été proposé que NifU aurait un rôle complémentaire à NifS en apportant le fer ou en ayant un rôle d'assemblage de cofacteurs Fe-S. NifU est une protéine à 3 domaines (Beynon et al., 1987). La caractérisation biochimique de la protéine a montré qu'il s'agit d'un dimère, capable de lier plusieurs centres Fe-S. Ainsi, le domaine N-terminal de la protéine est un domaine de type IscU qui fixe de manière transitoire un centre [2Fe-2S] par monomère dont le couplage réductif peut mener à la conversion en un centre [4Fe-4S] sur un dimère (Smith et al., 2005). Un domaine ferrédoxine-like est présent au niveau du domaine central de la protéine, et lie un centre [2Fe-2S] sur chaque monomère NifU. Ce centre Fe-S possède la particularité de pouvoir transférer des électrons et d'être stable même en présence d'agents chélateurs de métaux (Fu et al., 1994). Le troisième et dernier domaine à l'extrémité C-terminale présente une homologie de séquence avec les protéines NFU et est capable de lier un centre [4Fe-4S] par dimère (Smith et al., 2005). Il a été montré que les centres Fe-S transitoires présents au niveau des domaines N et C-terminaux sont assemblés par l'intermédiaire de la cystéine désulfurase NifS *in vitro*. Ces deux domaines sont également capables de transférer un centre [4Fe-4S] à la dinitrogénase réductase et seraient donc complémentaires pour la maturation de la nitrogénase (Smith et al., 2005). De plus, la délétion de l'un ou l'autre de ces domaines dans la protéine d'*A. vinelandii* conduit à un phénotype de croissance intermédiaire en conditions de fixation d'azote, indiquant la nécessité d'avoir les 2 domaines fonctionnels (Dos Santos et al., 2004). Un troisième gène initialement annoté *orf6* a été ignoré car son inactivation ne causait pas de phénotype, mais il est impliqué dans la maturation du centre [4Fe-4S] de la dinitrogénase réductase avec NifS et NifU (Jacobson et al., 1989). Le gène *orf6* code pour une protéine de transfert de type A (ou ATC pour A-Type Carrier) proche de l'isoforme IscA présente chez *E. coli*, lui valant le nouveau nom ^{NIF}IscA. Cette protéine contient 3 cystéines conservées permettant la liaison d'un centre [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] au sein d'un homodimère (Krebs et al., 2001). Des expériences plus poussées, ont montré que le type de centre présent sur ^{NIF}IscA dépend des conditions environnantes, le centre [2Fe-2S] pouvant être le produit de dégradation oxydative d'un centre [4Fe-4S], et la conversion inverse correspond au couplage réductif de 2 centres [2Fe-2S] (Mapolelo et al., 2012a). Il a d'abord été proposé que ^{NIF}IscA soit une protéine d'échafaudage alternative à NifU dans le cadre de la maturation de la nitrogénase (Krebs et al., 2001). L'observation d'un transfert de centre [4Fe-4S] depuis NifU vers ^{NIF}IscA, et de ^{NIF}IscA vers la dinitrogénase réductase, a conforté la notion de protéine de transfert décrite pour les protéines d'*E. coli* (Jacobson et al., 1989; Mapolelo et al., 2012a; Vinella et al., 2009). Toutefois, la capacité de ^{NIF}IscA à lier un atome de fer sous forme FeII ou FeIII au sein d'un dimère, lui vaut un rôle hypothétique dans le stockage et le transport de fer ou la réparation de centres Fe-S. Un tel rôle reste à prouver *in vivo* et s'il existe, il est improbable que ^{NIF}ISCA serve de donneur de fer pour l'assemblage de centre Fe-S sur NifU (Mapolelo et al., 2012b). Chez *A. vinelandii*, l'opéron *nif* contient de nombreux autres gènes

(*nifHDKTYENXiscA*^{nif}*nifUSV cysE1*^{nif}*nifWZMF*) dont je ne décrirai pas la fonction mais qui sont impliqués dans différentes étapes de la synthèse et l'insertion de l'ensemble des cofacteurs présents au sein de la nitrogénase (Rubio et Ludden, 2008).

Le fait que la maturation de nombreuses protéines à centres Fe-S, telles que l'aconitase n'était pas affectée par l'absence de composants de la machinerie NIF a permis l'identification des machineries d'assemblage générales, présentées ci-après (Dos Santos et al., 2007; Jacobson et al., 1989).

2. Assemblage de centres Fe-S par la machinerie ISC chez *E. coli*

A partir des premiers travaux réalisés sur *A. vinelandii*, et le séquençage des premiers génomes, la recherche de protéines homologues au sein d'autres organismes s'est faite sans recourt systématique à la mutagénèse. L'analyse du génome d'*E. coli* (Blattner et al., 1997) a permis l'identification de séquences homologues à celles codées par l'opéron *nif*, renommées *iscA*, *iscS* et *iscU* par rapport à leur présence dans un opéron appelé *isc* (Iron-Sulfur Cluster) présent chez *E. coli*. Cet opéron code aussi pour deux protéines chaperons, HscB et HscA, ainsi que deux gènes codant pour une Fdx et une protéine impliquée dans le stockage de fer, IscX (Zheng et al., 1998). L'ensemble de l'opéron est sous le contrôle de la protéine IscR (mentionnée précédemment), dont la séquence codante est localisée directement en amont de *iscS*. La protéine IscU ne comporte que le premier domaine ainsi nommé pour NifU (Smith et al., 2005; Zheng et al., 1998).

La caractérisation fonctionnelle des protéines codées par l'opéron *isc* a permis de montrer que la délétion des gènes *iscS*, *iscU*, *hscA*, *hscB* et *fdx* chez *E. coli* réduit l'activité enzymatique de plusieurs protéines Fe-S, impactant fortement le développement bactérien. Le mutant *iscS* présente le plus fort phénotype en accord avec le rôle central et en amont joué par la protéine IscS. A l'inverse, la mutation des gènes *iscR* et *iscX* n'induit aucun phénotype particulier, et le mutant *iscA* montre une réponse intermédiaire à celle du mutant *iscU* par exemple, suggérant un rôle secondaire dans la maturation des protéines Fe-S d'*E. coli* pour IscR, IscX et IscA (Tokumoto et Takahashi, 2001). Il a toutefois été montré qu'IscA participe à la maturation d'IspG et IspH, deux protéines [4Fe-4S] essentielles de la voie de synthèse des isoprénoïdes (Vinella et al., 2009). L'absence de phénotype plus marqué pour le mutant *iscA* est donc liée à une redondance fonctionnelle, notamment avec SufA et ErpA (voir plus loin).

Ces données physiologiques ont été par la suite renforcées par des études biochimiques. La protéine IscS est une cystéine désulfurase dimérique, impliquée dans l'apport de soufre au cours de l'assemblage de centres Fe-S. Chaque monomère composant le dimère IscS serait en interaction directe avec un monomère IscU au niveau des sites actifs de chaque protéine (Prischi et al., 2010). La protéine d'échafaudage IscU serait capable de lier un ou deux centres [2Fe-2S] au sein d'un dimère, et le couplage réductif de deux centres [2Fe-2S] mène à la formation d'un [4Fe-4S] sur un dimère IscU (Chandramouli et al., 2007). Les protéines IscS et IscU forment d'ailleurs un complexe avec 3 partenaires différents sur un même site de fixation. La Fdx serait impliquée d'une part dans la réduction des fonctions persulfure S–SH (S^0) sur la protéine IscS sous forme sulfure (S^{2-}) pour la formation de centre Fe-

S sur IscU, et d'autre part dans le couplage réductif de 2 centres [2Fe-2S] en un unique centre [4Fe-4S] sur la protéine d'échafaudage (Chandramouli et al., 2007; Yan et al., 2013). Le centre [2Fe-2S] de la Fdx est lui-même réduit *via* une ferrédoxine réductase dépendante du NADPH (Yan et al., 2015). Les protéines IscX et CyaY, l'homologue bactérien de la frataxine qui ne fait pas partie de l'opéron *isc*, sont capables de lier du fer dont elles réguleraient l'apport pour l'assemblage de centres Fe-S sur IscU (Layer et al., 2006; Pastore et al., 2006; Roche et al., 2015). Des études menées *in vitro* démontrent un effet inhibiteur des protéines IscX et CyaY sur l'assemblage de centres Fe-S par le complexe IscS-IscU (Iannuzzi et al., 2011; Kim et al., 2014; Prischi et al., 2010). Contrairement à l'isoforme humaine dont la mutation cause l'ataxie de Friedrich à l'origine du nom de frataxine pour « Friedreich ataxia protein », l'absence de CyaY chez *E. coli* n'induit aucun phénotype macroscopique (Campuzano et al., 1996; Roche et al., 2015). Néanmoins, la mutation simultanée des deux gènes cause un défaut d'activité pour plusieurs protéines Fe-S, indiquant une fonction complémentaire, éventuellement partiellement redondante, dans la maturation des protéines Fe-S *in vivo* (Roche et al., 2015). Plus récemment, des analyses *in vitro* ont mis en évidence une régulation double d'IscS par les protéines IscX et CyaY. A faible concentration en fer, IscX interagirait avec IscS pour empêcher son inhibition par CyaY, alors qu'à des concentrations en fer plus élevées, CyaY bloquerait la formation de centres Fe-S en prenant la place d'IscX et en inhibant l'activité de la cystéine désulfurase (Adinolfi et al., 2018). Ces résultats sont corroborés par l'observation d'après laquelle la frataxine occupe une fonction différente selon les organismes, servant d'inhibiteur d'IscS chez les procaryotes et d'activateur de la cystéine désulfurase chez les eucaryotes. Ce rôle serait inhérent des cystéine désulfurases dont les propriétés diffèrent chez ces organismes et impliquent ainsi une régulation variable (Bridwell-Rabb et al., 2012).

Après maturation, IscU sous holoforme interagit avec les chaperons/co-chaperons HscA et HscB pour le transfert du centre Fe-S vers un partenaire. HscA est une protéine homologue aux Hsp70 (Heat Shock Proteins of 70 kDa) et possède une activité d'hydrolyse de l'ATP nécessaire au transfert de centre Fe-S (Bonomi et al., 2008; Chandramouli et Johnson, 2006; Iametti et al., 2015). Elle contient un domaine de fixation de substrat à l'extrémité C-terminale qui reconnaît et lie IscU, notamment grâce à une séquence peptidique LPPVK (Cupp-Vickery et al., 2004a; Seaton et Vickery, 1994). Bien qu'HscB interagisse directement avec IscU et HscA, son rôle exact dans le transfert de centre Fe-S reste incertain (Iametti et al., 2015). La dernière protéine codée par l'opéron *isc* est IscA, qui fait partie des protéines ATC et possède donc 3 cystéines conservées. *In vitro*, cette protéine de transfert est capable de recevoir un centre [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] d'IscU et de les transférer respectivement à la ferrédoxine et à la biotine synthase, BioB (Ollagnier de Choudens et al., 2004; Ollagnier-de-Choudens et al., 2001). La résolution de la structure tridimensionnelle d'IscA d'*E. coli* montre qu'il s'agit d'un tétramère regroupant deux dimères, dont chacun permettrait la liaison d'un centre [2Fe-2S] (Cupp-Vickery et al., 2004b).

3. Maturation des protéines à centre Fe-S en conditions de stress par la machinerie bactérienne SUF

Plusieurs protéines ATC sont présentes chez *E. coli*, la protéine SufA mentionnée plus haut est l'une d'entre elles. Il s'agit d'une protéine dimérique, capable de lier un centre [2Fe-2S] ou un centre [4Fe-4S] et, comme pour IscA, ces centres sont transférés *in vitro* à Fdx ou BioB respectivement (Chahal et Outten, 2012; Ollagnier-de-Choudens et al., 2004; Wada et al., 2005). Le nom de cette seconde protéine fait référence à la position du gène associé sur un opéron codant 6 gènes impliqués dans une seconde machinerie d'assemblage de centre Fe-S chez *E. coli* appelée *suf* pour « Sulfur mobilization ». L'opéron *suf* code pour les gènes *sufABCDSE* dont seul le gène *sufD* n'est pas primordial dans un fond génétique *Δisc* (Butland et al., 2008). Il s'agirait donc d'une voie d'assemblage de centre Fe-S alternative à ISC chez *E. coli* exprimée en conditions de stress oxydant (Takahashi et Tokumoto, 2002).

SufS code pour une cystéine désulfurase PLP-dépendante fonctionnellement différente de IscS, et dont l'activité de désulfuration de la cystéine est stimulée par SufE, une protéine de transfert de soufre. Par ailleurs, l'activité cystéine désulfurase de SufS en présence de SufE est améliorée par l'ajout du complexe $SufBC_2D$, SufE interagissant directement avec SufB pour le transfert d'atomes de soufre (Layer et al., 2007; Outten et al., 2003). Les caractéristiques structurales de SufS et SufE suggèrent que ces protéines forment un environnement confiné vis-à-vis du milieu environnant, de sorte à mieux protéger l'atome de soufre transféré. Des comparaisons entre les associations SufS-SufE et IscS-IscU en présence de peroxyde d'hydrogène ont d'ailleurs confirmé cette hypothèse en montrant une meilleure activité cystéine désulfurase pour les protéines SUF en conditions oxydantes (Blanc et al., 2014; Dai et Outten, 2012). $SufBC_2D$ représente le complexe d'échafaudage de centre Fe-S de la machinerie SUF. Celui-ci est constitué des protéines SufB, SufC et SufD avec une stœchiométrie de 1 :2 :1 (Hirabayashi et al., 2015). Après purification anaérobie, le complexe contiendrait un centre [2Fe-2S] ainsi qu'une molécule de $FADH_2$, un réducteur, qui apporte les électrons nécessaires à l'assemblage d'un centre [4Fe-4S] par reconstitution *in vitro* (Hirabayashi et al., 2015; Wollers et al., 2010). Le cofacteur oxydé FAD n'est quant à lui pas lié au complexe d'échafaudage et serait donc libéré après oxydation de sorte à être réduit à nouveau par un système flavine réductase. Bien que SufB et SufD soient homologues, SufB a longtemps été considérée comme étant le domaine d'assemblage du centre Fe-S, d'autant plus qu'il est possible de reconstituer un centre Fe-S *in vitro* sur un complexe $SufB_2C_2$. Contrairement à SufD, SufB possède 4 cystéines conservées dont 3 au sein d'un domaine CxxCxxxC, fréquemment retrouvé parmi les protéines Fe-S (Pérard et Ollagnier de Choudens, 2017). SufB est également la sous-unité du complexe $SufBC_2D$ qui reçoit le soufre issu de SufS par l'intermédiaire de SufE pour l'assemblage d'un centre Fe-S (Layer et al., 2007). L'étude récente de la structure du complexe d'échafaudage bactérien démontre qu'il s'agit d'un hétérodimère SufB-SufD sur lequel chaque sous-unité est reliée à un monomère SufC. Au cours de la biogénèse du centre Fe-S, un atome de soufre est cédé de SufE à SufB pour l'assemblage d'un centre Fe-S à l'interface entre SufB et SufD (Hirabayashi et al., 2015). La liaison de centre Fe-S serait assurée par une cystéine et un acide glutamique sur SUFB ainsi qu'une histidine sur SufD (Yuda et al., 2017). L'exposition des résidus de SufB et SufD impliqués dans la fixation du

cofacteur est dépendante de l'activité ATPase des deux sous-unités SufC qui forment un dimère tête-bêche en ouvrant ainsi le site d'assemblage du centre Fe-S (Hirabayashi et al., 2015; Yuda et al., 2017). Le centre [4Fe-4S] finalement formé sur $SufBC_2D$ est transféré à des protéines cibles au travers de protéines de transfert telles que SufA (Chahal et al., 2009; Chahal et Outten, 2012).

Il est à noter que certaines bactéries gram$^+$, telles que *Bacilus subtilis,* ne possèdent que la machinerie SUF pour l'assemblage de protéines à centre Fe-S (Albrecht et al., 2010). L'opéron *suf* de *B. subtilis* code pour 5 gènes dans l'ordre suivant : *sufCDSUB* parmi lesquels la protéine SufU présente des homologies avec IscU. Son rôle n'est pas clair car il a été suggéré qu'il s'agit d'une protéine d'échafaudage de centre [4Fe-4S] dont l'approvisionnement en soufre dépend directement de SufS (Albrecht et al., 2010) mais il a été montré plus récemment que SufU interviendrait plutôt dans le transfert de soufre de SufS vers $SufBC_2D$ (Pérard et Ollagnier de Choudens, 2017; Yokoyama et al., 2018). SufU remplacerait donc SufE chez certains organismes, ce qui est corroboré par le fait que les 2 protéines ne sont jamais retrouvées ensembles chez un même organisme.

4. Protéines impliquées dans la maturation de protéines à centre Fe-S non codées par les opérons *isc* et *suf*

En plus des protéines codées par les opérons *isc* et *suf*, plusieurs protéines de transfert communes à plusieurs machineries sont codées par le génome bactérien. On dénombre 7 protéines de ce type chez *E. coli* : ErpA, NfuA, YgfZ, GrxD/Grx4, BolA, IbaG/YrbA et Mrp/ApbC.

La première de ces protéines, ErpA (figure 5), fait partie de la famille des protéines ATC. Le mutant de délétion *ΔerpA* n'est pas capable de croître sur une source de carbone non fermentable ce qui lui vaut le nom de « essential respiratory protein A » (Loiseau et al., 2007). Comme SufA et IscA, ErpA possède 3 cystéines conservées, essentielles à son fonctionnement, et est impliquée dans la maturation de protéines Fe-S appartenant à la voie de biosynthèse des isoprénoïdes *in vivo*. Après reconstitution *in vitro*, ErpA incorpore majoritairement un centre [2Fe-2S] mais également un centre [4Fe-4S] transférable à la protéine IspG (Loiseau et al., 2007). Contrairement à SufA et IscA qui sont des protéines ATC de classe II et interagissent avec les complexes d'échafaudage, ErpA est une protéine ATC de classe I qui n'interagit pas avec les protéines d'assemblage mais plutôt avec des protéines cibles telles que IspG et IspH (Vinella et al., 2009). En dépit du rôle attribué aux différentes classes de protéines ATC, il semble que la surexpression de la protéine IscA, mais pas SufA, compense l'absence d'ErpA pour la maturation de certaines protéines Fe-S *in vivo* (Pinske et Sawers, 2012; Vinella et al., 2009). Les études les plus récentes sur ErpA montrent que la protéine peut recevoir un centre Fe-S de NfuA. *In vivo* les deux protéines ont d'ailleurs un rôle dans la maturation de l'aconitase AcnB et des complexes respiratoires I et II, qui correspondent respectivement à la NADH :ubiquinone oxydoréductase, formée par les protéines NuoA à NuoN, et à la succinate déshydrogénase, Sdh (Py et al., 2018).

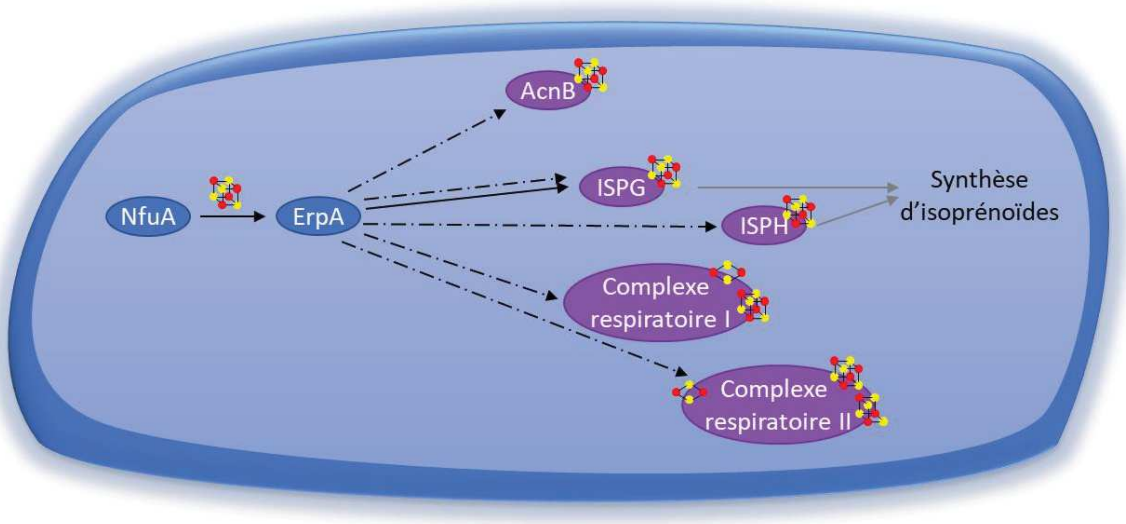


Figure 5: Schéma récapitulatif du rôle de la protéine ErpA dans la maturation de protéines Fe-S chez *E. coli*. Les protéines en bleu sont des protéines de transfert et les protéines en violet sont des protéines cibles. Différents fléchages sont utilisés pour matérialiser le lien entre différentes protéines. Ainsi, les flèches pleines représentent des interactions et des transferts de centres Fe-S validés *in vitro*, alors que les flèches pointillées indiquent des associations fonctionnelles caractérisées *in vivo*. *In vitro*, la protéine ErpA peut lier un centre [2Fe-2S] ou [4Fe-4S].

NfuA est également une protéine de transfert codée en dehors des opérons *isc*, *nif* et *suf*. Chez *E. coli*, il s'agit d'une protéine à deux domaines avec un domaine N-terminal ATC, impliqué dans l'interaction avec les protéines partenaires et dépourvu des cystéines habituellement conservées pour cette famille. A l'extrémité C-terminale, NfuA possède un domaine homologue au domaine C-terminal de la protéine NifU d'*A. vinelandii* qui contient un motif CxxC pour la fixation d' un centre [4Fe-4S] au sein d'un dimère (Angelini et al., 2008). *In vitro*, NfuA peut recevoir ce centre des unités d'échafaudage IscU-HscB-HscA et $SUFBC_2D$ et le transférer aux protéines ATC ou à des protéines cibles telles que les aconitases AcnA et AcnB (Py et al., 2012). Le mutant de délétion *ΔnfuA* est plus sensible au stress oxydant et aux conditions de carence en fer, ce qui indique que la protéine interviendrait dans des conditions environnementales particulières (Angelini et al., 2008). L'expression de la protéine en conditions de stress expliquerait d'ailleurs que NfuA intervienne *in vitro* dans la régénération du centre [4Fe-4S] de LipA sans que le mutant ne présente de défaut en acide lipoïque. Dans le cas présent, c'est la protéine d'échafaudage IscU qui assurerait cette fonction en l'absence de NfuA (McCarthy et Booker, 2017). D'un point de vue fonctionnel, NfuA interviendrait dans la maturation et/ou la réparation d'un large éventail de protéines [4Fe-4S] que sont AcnB, IspG, IspH, les protéines de complexes respiratoires NuoG et Sdh ainsi que la protéine à radical SAM MiaB, impliquée dans la méthylthiolation des ARNt (figure 6, Boutigny et al., 2013; Burschel et al., 2019; Py et al., 2012).

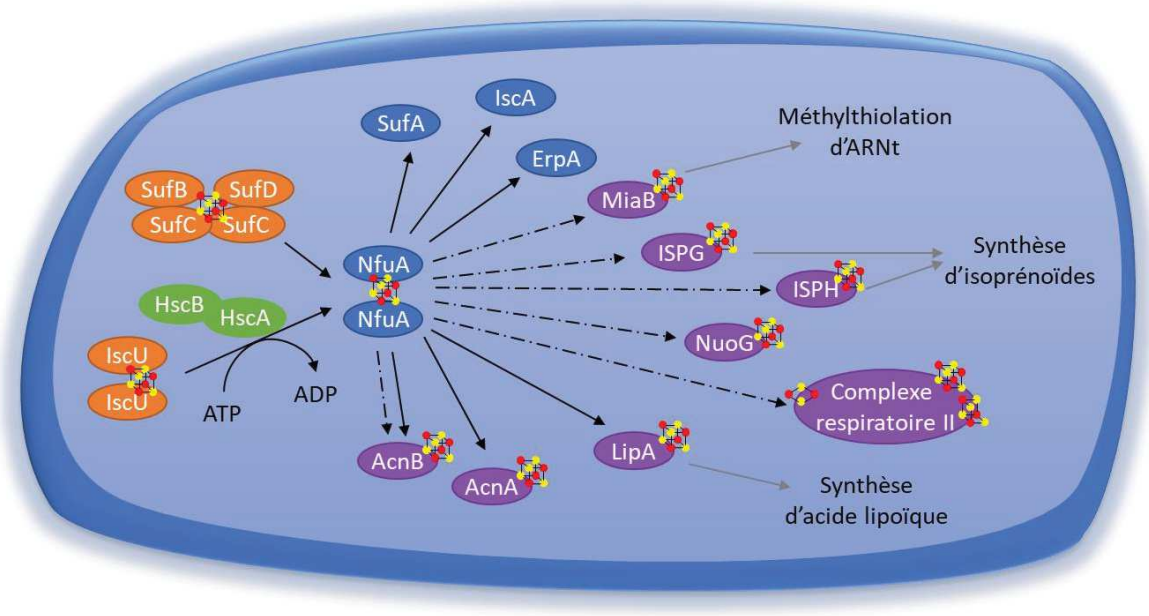


Figure 6: Schéma récapitulatif du rôle de la protéine NfuA dans la maturation de protéines Fe-S chez *E. coli*. La protéine étant plus exprimée en conditions de stress, il est probable que la maturation des protéines à centre Fe-S indiquées ci-dessus soit dépendante d'autres acteurs des machineries d'assemblage en conditions standards de croissance. Les protéines en orange sont des protéines d'échafaudage, les protéines en vert sont des chaperons, les protéines en bleu sont des protéines de transfert et celles en violet sont des protéines cibles. Les flèches pleines représentent des interactions et des transferts de centres Fe-S validés *in vitro*, alors que les flèches pointillées indiquent des associations fonctionnelles caractérisées *in vivo*.

Un défaut de maturation de la protéine MiaB se traduit par une diminution du ratio entre ARNt modifié et non modifié. A l'exception de *ΔnfuA,* deux mutants de délétion ont un défaut de méthylthiolation d'ARN chez *E. coli*. Le premier est le mutant *ΔygfZ* pour lequel l'activité de MiaB est fortement inhibée (Waller et al., 2010). La protéine codée par le gène *ygfZ*, qui est l'orthologue d'IBA57 chez la levure, a été initialement caractérisée lors d'un projet de génomique structurale, la protéine présentant des similarités avec des enzymes appartenant au système de clivage de la glycine (GCS). Ces enzymes sont folate-dépendantes et bien qu'YgfZ ne partage que peu d'acides aminés conservés au niveau du site de fixation du folate des enzymes GCS, elle semble tout de même interagir avec le folate (Teplyakov et al., 2004; Waller et al., 2010). En plus d'un défaut d'activité de MiaB, l'activité de plusieurs protéines Fe-S (figure 7, diméthylsulfoxyde réductase, fumarase et Sdh) est diminuée pour le mutant *ΔygfZ,* en particulier en conditions de stress oxydant (Waller et al., 2010). En dehors des ressemblances avec les enzymes GCS, YgfZ possède un motif KGCY/F-x-GQE-xxx-R/K conservé parmi les homologues eucaryotes et bactériens. L'ensemble de ces données et l'incapacité d'une forme YgfZ mutée au niveau de la cystéine conservée à restaurer le phénotype sauvage du mutant suggèrent l'importance de ce résidu pour le fonctionnement d'YgfZ dans des étapes de maturation ou de réparation de protéines Fe-S (Hasnain et al., 2012). Le second fond génétique dans lequel la modification en ARNt est réduite de façon exacerbée par rapport au simple mutant *ΔnfuA* est le double mutant *ΔnfuA/ΔgrxD* (Boutigny et al., 2013). Cette observation indique que NfuA et GrxD remplissent des fonctions additionnelles dans l'adressage de centre Fe-S vers MiaB. Bien que GrxD puisse former un complexe avec MiaB, aucun transfert *in vitro* n'a été détecté entre les 2 protéines (Boutigny et al., 2013).

De ce fait, l'interaction entre GrxD et MiaB ne correspondrait pas à un transfert et la nature de celle-ci reste donc à déterminer.

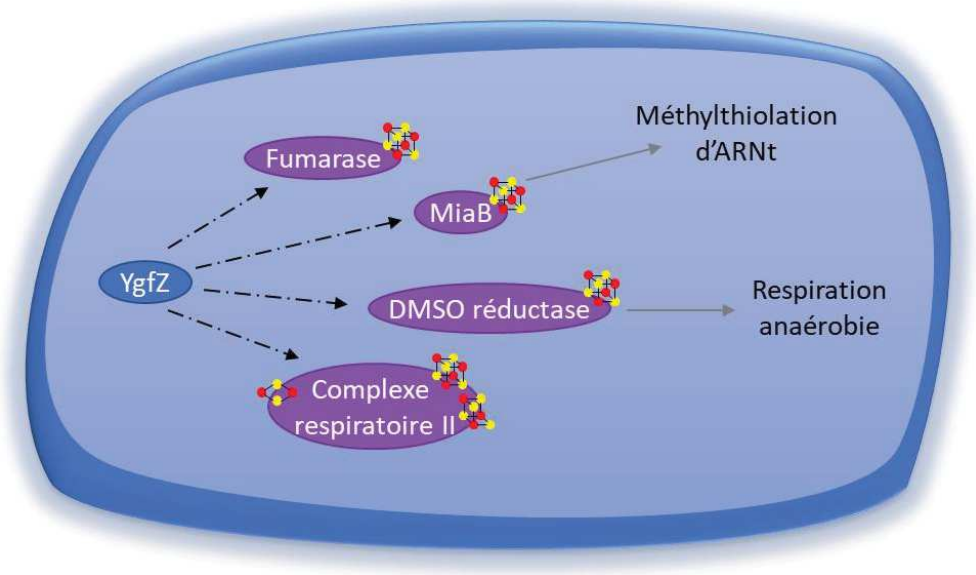


Figure 7: Schéma récapitulatif du rôle de la protéine YgfZ dans la maturation de protéines Fe-S chez *E. coli*. Les protéines en bleu sont des protéines de transfert et celles en violet sont des protéines cibles. Les flèches pointillées indiquent que les associations entre protéines cibles et YgfZ sont le fruit d'une caractérisation fonctionnelle *in vivo*.

En terme de classification, GrxD ou Grx4 fait partie des glutarédoxines (GRXs), qui sont des protéines habituellement impliquées dans la réduction de ponts disulfure par un mécanisme dépendant du glutathion (Li et Outten, 2012). GrxD fait partie des GRXs de classe II, aussi appelées glutarédoxines monothiol du fait qu'elles ne possèdent qu'une cystéine conservée au sein d'un motif CGFS. Ces GRXs de classe II seraient plutôt impliquées dans le transfert de centres Fe-S, au détriment de l'activité thiol réductase (Couturier et al., 2015). En effet, GrxD peut lier un centre [2Fe-2S] au sein d'un homodimère, deux des ligands du centre Fe-S étant du glutathion (Iwema et al., 2009). Bien que des études de criblage d'interactions génétiques aient montré que GrxD est associée à la machinerie SUF chez *E. coli*, i*n vitro*, l'homodimère GrxD reçoit un centre Fe-S de IscU et peut le transférer à des protéines [2Fe-2S] telles que la ferrédoxine (Butland et al., 2008; Vranish et al., 2016). Des études de caractérisation fonctionnelle supplémentaires permettront d'élucider le rôle de GrxD *in vivo*. GrxD peut aussi fixer un centre [2Fe-2S] au sein d'un hétérodimère en association avec une protéine de la famille des BolA, dont le rôle serait potentiellement différent de celui d'un homodimère de Grx (figure 8, Yeung et al., 2011).

Les protéines BolA sont au nombre de 2 chez *E. coli* et sont appelées BolA et IbaG/YrbA. Le terme BolA vient de l'espagnol pour le mot balle, qui renvoie au phénotype observé pour des mutants de surexpression de la protéine et dont l'aspect devient plus sphérique (Aldea et al., 1988). Les protéines BolA sont d'ailleurs associées à des phénomènes de réponses aux stress (Guinote et al., 2014). Par exemple la surexpression de l'isoforme IbaG (Influenced by acid gene) chez *E. coli* améliore sa résistance en condition de stress acide (Guinote et al., 2012). Chacune des protéines BolA et IbaG peut former un hétérodimère avec GrxD, à la fois sous

apo- et holo-formes, et les doubles mutants *ΔgrxD/ΔbolA* et *ΔgrxD/ΔibaG* entraînent tous deux une diminution d'activité de la succinate déshydrogénase qui contient 3 centres Fe-S dont un centre [2Fe-2S] (Burschel et al., 2019; Dlouhy et al., 2016; Yeung et al., 2011). Bien que BolA et IbaG fassent partie de la même famille protéique, elles ne partagent que 23% d'identité et n'ont pas exactement la même fonction *in vivo*. Ainsi, le mutant de délétion *ΔbolA* présente une quantité réduite de NuoG, une des sous-unités du complexe respiratoire I, capable d'incorporer un centre [2Fe-2S] et deux centres [4Fe-4S] chez *E. coli* (Yakovlev et al., 2007). De plus, l'analyse de la membrane plasmique du mutant *ΔbolA* par EPR indique l'absence de signal du centre [2Fe-2S] de NuoG, *a priori* impliqué dans la stabilité de la protéine, alors que celui-ci est toujours présent dans la souche *ΔibaG* (Burschel et al., 2019).

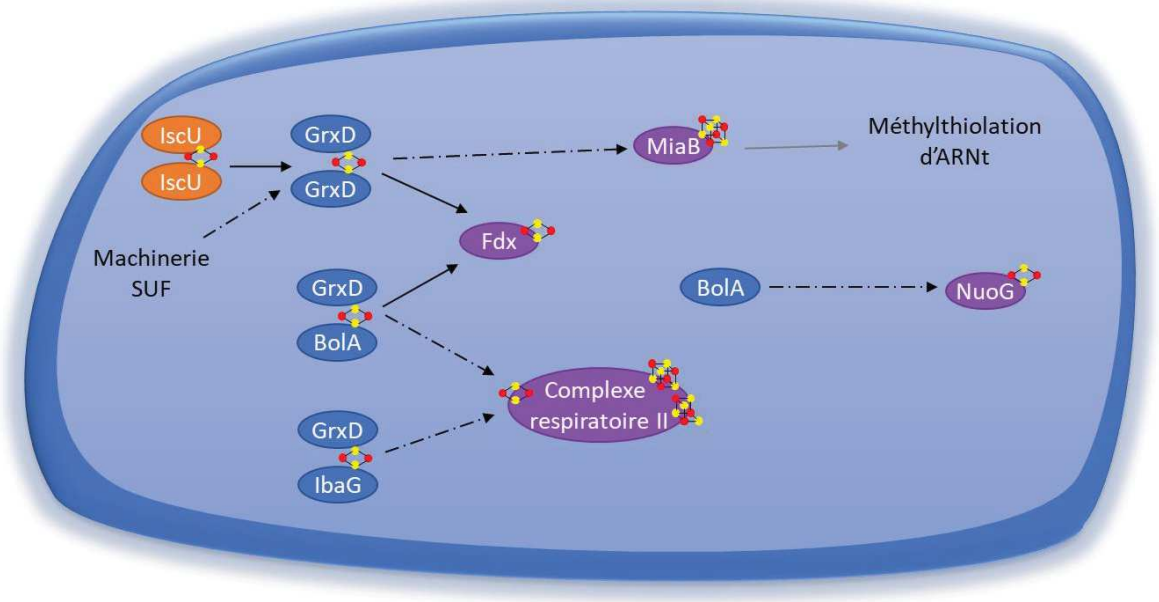


Figure 8: Schéma récapitulatif du rôle des protéines GrxD, BolA et IbaG dans la maturation de protéines Fe-S chez *E. coli*. Les protéines en orange sont des protéines d'échafaudage, celles en bleu sont des protéines de transfert et les protéines en violet sont des protéines cibles. Différents fléchages sont utilisés pour matérialiser le lien entre différentes protéines. Ainsi, les flèches pleines représentent des interactions et des transferts de centres Fe-S validés *in vitro*, alors que les flèches pointillées indiquent des associations fonctionnelles caractérisées *in vivo*.

Enfin, Mrp ou ApbC (pour metG related protein ou alternative pyrimidine biosynthetic pathway) est une protéine de transfert d'abord identifiée chez le genre *Salmonella* dont le mutant de délétion *ΔapbC* présente un défaut de synthèse de thiamine (Petersen et Downs, 1996). Mrp possède un domaine walker A et un motif CxxC qui lui confèrent respectivement une activité ATPase et la capacité de lier un centre [4Fe-4S] au sein d'un dimère. Chacune de ces fonctions est importante pour l'activité d'ApbC puisque la mutation des domaines associés mime dans une certaine mesure le phénotype du mutant de délétion chez *S. enterica*, à savoir un défaut de synthèse de thiamine et du catabolisme de tricarballylate, une voie métabolique absente chez *E. coli* (Boyd et al., 2009). D'un point de vue fonctionnel, Mrp interviendrait également dans la maturation de centres [4Fe-4S] de la NADH:ubiquinone oxydoréductase chez *E. coli* (figure 9, Burschel et al., 2019).

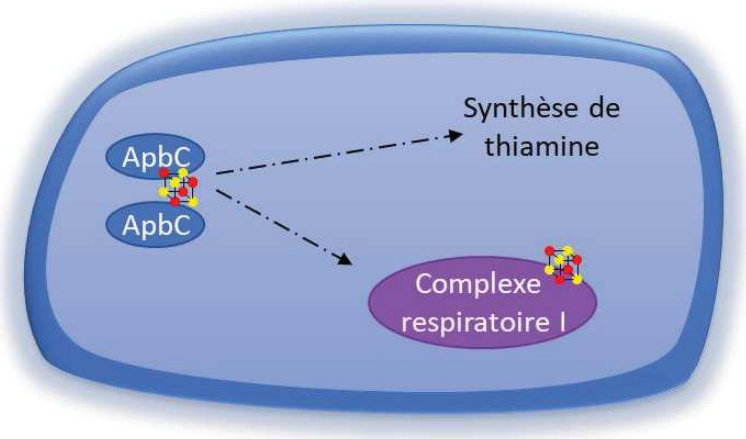


Figure 9: Schéma récapitulatif du rôle de ApbC dans la maturation de protéines Fe-S chez *E. coli*. Les protéines en bleu sont des protéines de transfert et les protéines en violet sont des protéines cibles. Les flèches pointillées indiquent des associations fonctionnelles caractérisées *in vivo*.

L'ensemble des données existantes au sujet de la maturation de centres Fe-S chez la bactérie gram- *E. coli* permet de dresser le modèle présenté en figure 10. En fonction des conditions cellulaires, l'une des machineries ISC ou SUF fournirait un centre Fe-S à plusieurs protéines de transfert permettant la maturation d'une même protéine cible (Py et al., 2018; Roche et al., 2013).

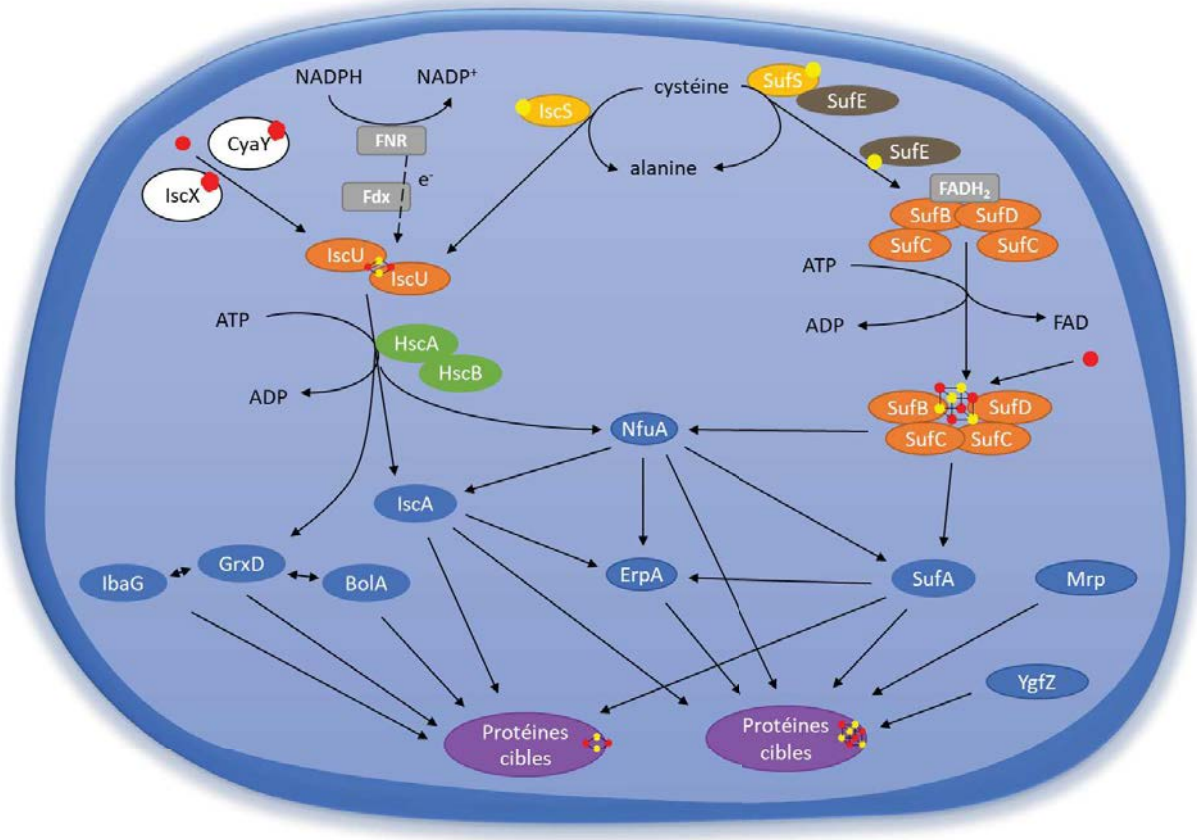


Figure 10: Modèle pour la maturation de protéines à centre Fe-S par les machineries d'assemblage ISC et SUF chez *E. coli*. Les étapes tardives de la maturation de centres Fe-S ont été simplifiées ici, et ce modèle montre chacune des protéines impliquées dans la maturation de centres Fe-S alors que leur expression dépend des conditions cellulaires. En blanc, les protéines impliquées dans l'apport de fer ; en jaune, les cystéine désulfurases ; en marron, les protéines de transfert de soufre ; en gris, les protéines et cofacteurs donneurs d'électrons pour l'assemblage de centres Fe-S ; en orange, les protéines d'échafaudage ; en vert, les protéines chaperons ; en bleu, les protéines de transfert et en violet, les protéines réceptrices de centres Fe-S.

Chapitre 3 : Assemblage de centres Fe-S au sein de l'organisme eucaryote *Arabidopsis thaliana*

Les machineries d'assemblage de centres Fe-S sont au nombre de 3 chez les eucaryotes. Elles sont nommées ISC, SUF et CIA (pour cytosolic iron-sulfur cluster assembly) et interviennent respectivement dans la maturation de protéines mitochondriales, chloroplastiques et cytosoliques ou nucléaires. La machinerie CIA est spécifique des eucaryotes tandis que les machineries ISC et SUF sont rémanentes de l'origine endosymbiotique des mitochondries et des chloroplastes retrouvés au sein des cellules eucaryotes (Py et al., 2012; Richards et Van der Giezen, 2006; Vinella et al., 2009). Ces trois machineries étant conservées chez les eucaryotes, je m'appuierai sur l'ensemble des études, y compris celles menées chez des organismes non-photosynthétiques, pour décrire, bâtir des modèles ou émettre des hypothèses concernant l'assemblage de centres Fe-S dans les cellules végétales. Quel que soit le système décrit, j'utiliserai principalement la nomenclature des protéines de plantes afin de clarifier le propos et le tableau 1 indique les correspondances entre les noms de protéines issues des organismes modèles.

	Fonction	E. coli	S. cerevisiae	H. sapiens	A. thaliana
Machinerie ISC	Cystéine désulfurase	IscS	Nfs1	NFS1	NFS1
	Activateur de la cystéine désulfurase	- Acp	Isd11 Acp1	ISD11 ACP	ISD11 ACP
	Régulation de l'entrée de fer	IscX CyaY	- Yfh1	- FXN	- FH
	Donneur d'électrons	Fdx FNR	Yah1 Arh1	FDX1/FDX2 FDXR	mFDX1/2 mFDR
	Protéine d'échafaudage	IscU	Isu1/2	ISCU	ISU1/2/3
	Protéine chaperon	HscA	Ssq1, Ssc1	HSPA9	HSCA1/2
	Protéine co-chaperon	HscB	Jac1	HSCB	HSCB
	Facteur d'échange nucléotidique	-	Mge1	GRPEL1/2	MGE1a/b
	Protéine de transfert	GrxD IscA ErpA YgfZ NfuA BolA/IbaG ApbC	Grx5 Isa1 Isa2 Iba57 Nfu1 Bol1/3 Ind1	GLRX5 ISCA1 ISCA2 IBA57 NFU1 BOLA1/3 IND1	GRXS15 ISCA1a/b ISCA2 IBA57.1 NFU4/5 BOLA4 INDH
Transporteur ABC		-	Atm1	ABCB7	ATM3
Machinerie CIA	Donneur d'électrons	- -	Tah18 Dre2	NDOR1 CIAPIN1	TAH18 DRE2
	Protéine d'échafaudage	- -	Nbp35 Cfd1	NBP35 CFD1	NBP35 -
	Protéine de transfert	- - - - - - - -	Nar1 Met18 Cia1 Cia2 Fra2 Grx3/4 Lto1 Yae1	IOP1 MMS19 CIA1 CIA2B BOLA2 GLRX3 ORAOV1 YAE1D1	NAR1 MET18 CIA1 AE7 BOLA2 GRXS17 LTO1 YAE1/2/3
Machinerie SUF	Cystéine désulfurase	SufS	-	-	NFS2
	Transfert de soufre/activateur de la cystéine désulfurase	SufE	-	-	SUFE1/2/3
	Protéine d'échafaudage	SufB SufC SufD	- - -	- - -	SUFB SUFC SUFD
	Protéine de transfert	GrxD IscA ErpA YgfZ NfuA BolA/IbaG ApbC	- - - - - - -	- - - - - - -	GRXS14/16 SUFA1 IBA57.2 NFU1/2/3 BOLA4 HCF101

Tableau 1 : Liste des protéines impliquées dans la maturation de centres Fe-S au sein des 3 machineries d'assemblage identifiées chez les eucaryotes et *E. coli*.

1. Assemblage de centres Fe-S par la machinerie mitochondriale ISC

De façon concordante avec l'hypothèse selon laquelle les mitochondries sont le fruit de l'endosymbiose d'α-protéobactéries, la machinerie mitochondriale ISC est globalement composée de protéines homologues à celles codées par l'opéron *isc* d'*E. coli* ainsi qu'aux protéines « non-ISC, non-SUF » présentées dans le chapitre 2 (figure 12, Braymer et Lill, 2017). Il existe toutefois des spécificités importantes, notamment au niveau du complexe d'assemblage avec l'existence de protéines supplémentaires. De plus, une des particularités des eucaryotes photosynthétiques est que certaines familles de gènes sont plus étendues que pour les organismes n'appartenant pas à la lignée verte (Balk et Schaedler, 2014).

Chez les eucaryotes, l'assemblage de centres Fe-S par la protéine ISU est réalisé au sein d'un complexe regroupant 6 protéines. Ce complexe est articulé autour d'un dimère NFS1 pour lequel chaque monomère interagit avec une unité ISD11 associée à une protéine ACP, un monomère FH, et un monomère ISU interagissant lui-même avec une ferrédoxine (Boniecki et al., 2017; Fox et al., 2019). Au sein de ce complexe d'échafaudage mitochondrial, les 3 cystéines conservées sur ISU sont à proximité de la cystéine catalytique de NFS1, la frataxine interagit également avec NFS1 au niveau de son site actif de façon attenante à ISU et la ferrédoxine flanque ISU du côté opposé à la frataxine (figure 11). Cette organisation permettrait l'acheminement simultané de fer, de soufre et d'électrons au niveau du site d'assemblage de centres Fe-S sur ISU (Boniecki et al., 2017).

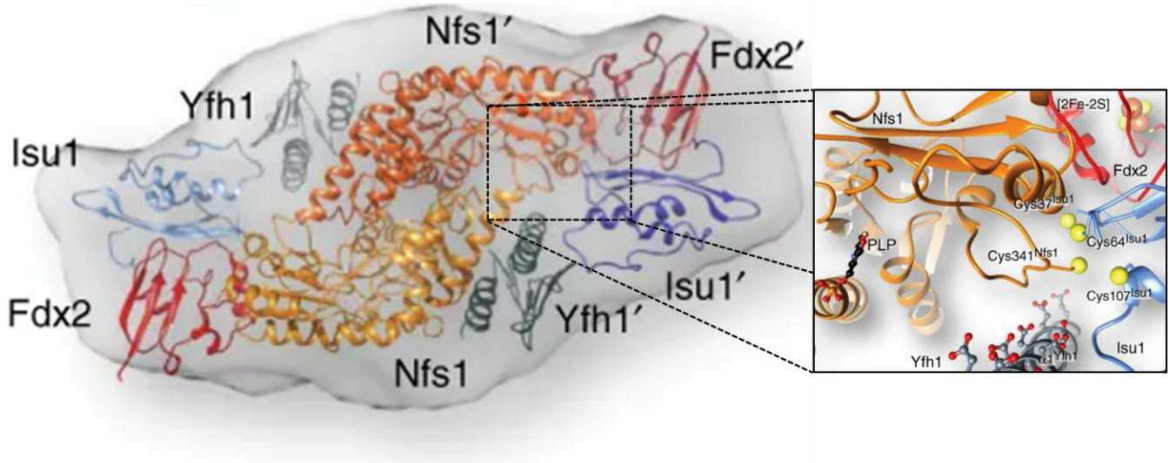


Figure 11: Structure 3D du complexe d'assemblage mitochondrial chez le champignon filamenteux *C. thermophilum* obtenue à partir de données cristallographiques et SAXS (Small angle X-rays scattering). Figure adaptée de Boniecki et al., 2017. Chaque protéine est représentée par un code couleur : orange pour la cystéine désulfurase NFS1, bleu pour la protéine d'échafaudage ISU, rouge pour la ferrédoxine et gris pour la frataxine. L'encadré détaille l'environnement du site actif de NFS1. Les atomes de soufre de cystéines catalytiques sont représentés par des sphères jaunes et les atomes d'oxygène présents sur l'hélice de liaison au fer α1 de la frataxine sont schématisés par des billes rouges. Le centre [2Fe-2S] de la ferrédoxine, responsable du transfert d'électrons ainsi que le cofacteur PLP impliqué dans la désulfurylation de L-cystéine par NFS1 sont également représentés.

L'assemblage de centres Fe-S sur ISCU repose, en premier lieu, sur la prise en charge d'un atome de soufre par l'activité de la cystéine désulfurase mitochondriale NFS1 (Frazzon et al., 2007). Chez les eucaryotes, la formation d'un homodimère NFS1 serait sous la dépendance des protéines ISD11 et ACP, qui sont essentielles *in vivo*, mais dont le rôle n'est pas encore clairement élucidé d'un point de vue moléculaire

(Adam et al., 2006; Van Vranken et al., 2016). La protéine ACP pour « Acyl-Carrier Protein » existe aussi chez les procaryotes et remplirait plusieurs fonctions dont la synthèse d'acides gras, alors que la protéine ISD11 (ISC biogenesis desulfurase interacting protein) aussi appelée protéine LYR n'est retrouvée que chez les eucaryotes et interagirait avec ACP par son motif L-Y-R conservé (Boniecki et al., 2017). La résolution de la structure 3D du complexe NFS1-ISD11-ACP montre l'interaction de ISD11 et ACP avec NFS1 en dehors de son site actif ce qui indique un rôle régulateur plutôt que catalytique pour les deux protéines (Boniecki et al., 2017).

Par analogie avec la machinerie humaine, les ferrédoxines d'*A. thaliana*, mFDX1 et mFDX2, plus proches de la FDX2 humaine que de FDX1 fourniraient les électrons nécessaires à la réduction de persulfide sur NFS1 en sulfide pour la synthèse du centre Fe-S sur la protéine d'échafaudage ISU (Cai et al., 2017; Gervason et al., 2019). Les FDX seraient réduites par une ferrédoxine réductase dépendante du NADPH, mFDR (Takubo et al., 2003; Webert et al., 2014).

L'origine du fer pour l'assemblage de centres Fe-S mitochondriaux reste à déterminer, toutefois la frataxine (FH) a été identifiée comme ayant une fonction de régulation de l'entrée de fer au niveau du complexe d'échafaudage (Colin et al., 2013). La caractérisation de mutants de délétion pour la frataxine indique un rôle de celle-ci dans la maturation de protéines à centres Fe-S (Babcock et al., 1997; Guillon et al., 2009). Des études montrent d'ailleurs que la frataxine incorpore du fer qu'elle pourrait céder en présence de tout ou partie du complexe d'assemblage mitochondrial (Armas et al., 2019; Cai et al., 2018). A l'inverse, d'autres études indiquent que la frataxine remplirait plutôt une fonction de régulation vis-à-vis de la cystéine désulfurase NFS1 à partir de laquelle elle stimulerait le transfert de soufre vers ISU (Colin et al., 2013; Fox et al., 2019; Gervason et al., 2019; Parent et al., 2015). De fait, le rôle moléculaire de la frataxine est encore sujet à controverse, mais il est désormais clair que cette protéine est indispensable à l'assemblage de centres Fe-S réalisé par la protéine d'échafaudage appelée ISU. Parmi les 3 isoformes *a priori* fonctionnelles retrouvées chez *A. thaliana*, ISU1 aurait un rôle constitutif alors que ISU2 et ISU3 seraient plus particulièrement exprimées au niveau des fleurs (Frazzon et al., 2007; Léon et al., 2005).

Après l'assemblage d'un centre [2Fe-2S] sur ISU, le système chaperon/co-chaperon HSCA/HSCB permet le transfert spécifique de ce centre vers GRXS15 (Braymer et Lill, 2017; Mühlenhoff et al., 2003; Uzarska et al., 2013; Xu et al., 2009). Chez les eucaryotes, il a été montré que le domaine C-terminal de la protéine de type J, HSCB, interagit avec ISU au niveau des mêmes acides aminés que NFS1, indiquant que les étapes d'assemblage et de transfert ne peuvent avoir lieu de façon simultanée (Majewska et al., 2013). Une fois le complexe holo-ISU/HSCB formé, le domaine J d'HSCB permet l'interaction avec la protéine HSCA, une ATPase de type Hsp70, formant elle-même un complexe avec GRXS15. Au sein du complexe holo-ISU/HSCB/HSCA/GRXS15, la présence d'ISCU et d'HSCB stimule l'activité ATPase d'HSCA (Dutkiewicz et al., 2003; Uzarska et al., 2013; Xu et al., 2009). La liaison d'ADP par HSCA entraîne des changements de conformation au cours desquels HSCB est détachée du complexe tandis que ISU cède son centre Fe-S à GRXS15. Chez les eucaryotes, l'intervention du facteur d'échange nucléotidique MGE1 libère l'ADP

d'HSCA, alors remplacé par de l'ATP, et entraîne enfin la dissociation du complexe protéique, libérant ainsi ISU sous apoforme et GRXS15 sous holoforme (Dutkiewicz et al., 2003; Uzarska et al., 2013).

La protéine GRXS15 incorpore un centre [2Fe-2S] au sein d'un dimère (Moseler et al., 2015). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une protéine d'échafaudage, GRXS15 remplit des fonctions essentielles au sein de la machinerie ISC, puisque le mutant de délétion est létal chez *A. thaliana* (Moseler et al., 2015; Ströher et al., 2016). GRXS15 aurait également un rôle central dans la maturation des protéines à centres Fe-S mitochondriales, qu'elles soient de type [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] (Moseler et al., 2015; Ströher et al., 2016; Uzarska et al., 2013). En particulier, elle contribuerait à la maturation de la lipoate synthase (Ströher et al., 2016). Il est important de noter que le mutant de levure *grx5Δ* ne présente pas un phénotype drastique, contrairement à ce qui est attendu du fait de sa position centrale pour la maturation des protéines Fe-S mitochondriales mais aussi cytosoliques en prenant part à la synthèse d'un intermédiaire exporté par ATM3 vers le cytosol (voir plus loin). Des différences importantes semblent donc exister entre levure et plantes à cette étape. Ceci est corroboré par le fait que les GRXS15 d'Arabidopsis et de peuplier ne complémentent pas ou très partiellement le mutant *grx5Δ* de levure (Bandyopadhyay et al., 2008; Moseler et al., 2015). La protéine GRXS15 interagit avec deux catégories différentes de protéines de transfert, les protéines BOLA et les protéines ATC (Przybyla-Toscano, 2017).

Chez les plantes, la mitochondrie contiendrait deux protéines BOLA : BOLA4 et SUFE1 qui contient un domaine BOLA dans sa région C-terminale. La présence et le rôle de SUFE1 au sein de la mitochondrie restent à être validés de mon point de vue, néanmoins les deux protéines sont capables d'interagir avec GRXS15 en double hybride en levure (Couturier et al., 2014; Xu et Møller, 2006). Un mutant de levure pour les isoformes mitochondriales Bol1 et Bol3 ne possède pas un phénotype très fort (Uzarska et al., 2016). Ces isoformes seraient capables de lier un centre [2Fe-2S] au sein d'hétérodimères GRX-BOLA et rempliraient des fonctions partiellement redondantes, dont la maturation de la lipoate synthase (Nasta et al., 2017; Uzarska et al., 2016). La protéine BOLA4, qui appartient à un clade phylogénétique différent (Couturier et al., 2014), complémente néanmoins totalement les défauts de maturation de protéines Fe-S présents dans un double mutant *bol1-bol3* de levure (Uzarska et al., 2018). Globalement, l'hypothèse est que les protéines BOLA accompagnent GRXS15 dans le transfert de centres de [2Fe-2S] vers les voies de maturation de protéines à centres [4Fe-4S]. Un rôle plus tardif est toutefois suggéré pour Bol3 en levure, qui interagirait de manière spécifique avec Nfu1 pour la maturation de certaines protéines [4Fe-4S] telles que l'aconitase ou la succinate déshydrogénase (Melber et al., 2016). En dépit des informations concernant les protéines BOLA chez la levure et l'humain, des études supplémentaires devront être réalisées pour comprendre la fonction de BOLA4 au sein de la lignée verte, d'autant plus qu'aucune interaction n'est détectée entre les isoformes mitochondriales NFU4/5 et BOLA4 par double hybride en levure (Przybyla-Toscano, 2017).

Comme énoncé ci-dessus, la protéine GRXS15 est également capable d'interagir avec chacune des protéines ATC de plante (Przybyla-Toscano, 2017). Il existe 3

isoformes chez *A. thaliana.* ISCA1a et ISCA1b semblent être des homologues fonctionnelles de la protéine Isa1 de levure et font partie des ATC de classe II, alors qu'ISCA2 serait une ATC de classe I correspondant à Isa2 (Uzarska et al., 2018; Vinella et al., 2009). Les protéines de plantes ne sont pas caractérisées à l'heure actuelle. *In vitro*, les protéines humaines existent sous forme homodimérique et peuvent recevoir un centre [2Fe-2S] de GRX5 (Banci et al., 2014). Les protéines ISCA1 et ISCA2 peuvent également former un hétérodimère qui permet la conversion de centres [2Fe-2S] en centres [4Fe-4S] par le couplage réductif de deux centres [2Fe-2S] acheminés par la GRX mitochondriale (Brancaccio et al., 2014). Des résultats similaires ont été récemment rapportés pour les isoformes de plantes lors d'une conférence sur le sujet (Azam et al., 2018). Ces observations corroboreraient ainsi les défauts de maturation observés pour l'ensemble des protéines [4Fe-4S] mitochondriales chez les simples mutants viables *isca1Δ* et *isca2Δ,* sans qu'aucune compensation ne soit possible d'une isoforme à l'autre, reflétant des fonctions complémentaires (Beilschmidt et al., 2017; Mühlenhoff et al., 2011; Sheftel et al., 2012). Des défauts similaires sont visibles pour des cellules humaines et de levure dépourvues d'IBA57, une protéine connue pour interagir avec les protéines ISCA1 et ISCA2 (Gelling et al., 2008; Mühlenhoff et al., 2011). Un mutant d'insertion pour le gène *IBA57.1* chez *A. thaliana* est létal au stade embryonnaire, démontrant l'importance de sa fonction chez les plantes (Waller et al., 2012).

Une caractérisation biochimique récente de l'isoforme humaine IBA57 a montré qu'elle pourrait participer à la coordination d'un centre [2Fe-2S] au sein d'un hétérodimère ISCA2-IBA57. Au sein de ce complexe, la fixation du centre Fe-S est assurée par la cystéine conservée du motif KGCY/F-x-GQE-xxx-R/K d'IBA57 et par les 3 cystéines conservées de ISCA2 (Gourdoupis et al., 2018). La formation de centre [4Fe-4S] sur ce complexe n'a pu être observée dans les conditions expérimentales mais n'est pas exclue. En revanche, l'appartenance d'IBA57 à un tel complexe pourrait expliquer certaines données selon lesquelles IBA57 est impliquée dans la maturation de protéines de type Rieske (Sánchez et al., 2019; Sheftel et al., 2012).

Le lien entre un complexe ISCA1/ISCA2/IBA57.1 et les protéines cibles mitochondriales à centre [4Fe-4S] serait ensuite assuré par une protéine de transfert de la famille des NFU (Melber et al., 2016; Przybyla-Toscano, 2017). Les NFU mitochondriales possèdent un domaine de fonction inconnue à l'extrémité N-terminale, commun aux isoformes eucaryotes, et un domaine NFU à l'extrémité C-terminale (Léon et al., 2003). Ce second domaine contient le motif CxxC conservé des NFU et impliqué dans la fixation de centre [4Fe-4S] au sein d'un dimère (Azam et al., 2018; Cai et al., 2016; Melber et al., 2016). Les plantes possèdent 2 isoformes, appelées NFU4 et NFU5, dont la fonction serait essentielle et redondante (Przybyla-Toscano, 2017). Chaque isoforme permet de complémenter le mutant de levure *nfu1Δ* qui présente des défauts de maturation pour plusieurs protéines à centre [4Fe-4S], confirmant un rôle conservé chez les eucaryotes (Uzarska et al., 2018). Chez l'homme, des mutations au niveau de la protéine NFU1 conduisent à des défauts de maturation des complexes respiratoires et à des diminutions très importantes d'activité d'enzymes dépendantes de l'acide lipoïque (Cameron et al., 2011; Navarro-Sastre et al., 2011). L'interaction décrite pour les protéines NFU4/NFU5 avec la lipoate

synthase pourrait expliquer pourquoi elles sont essentielles (Przybyla-Toscano, 2017).

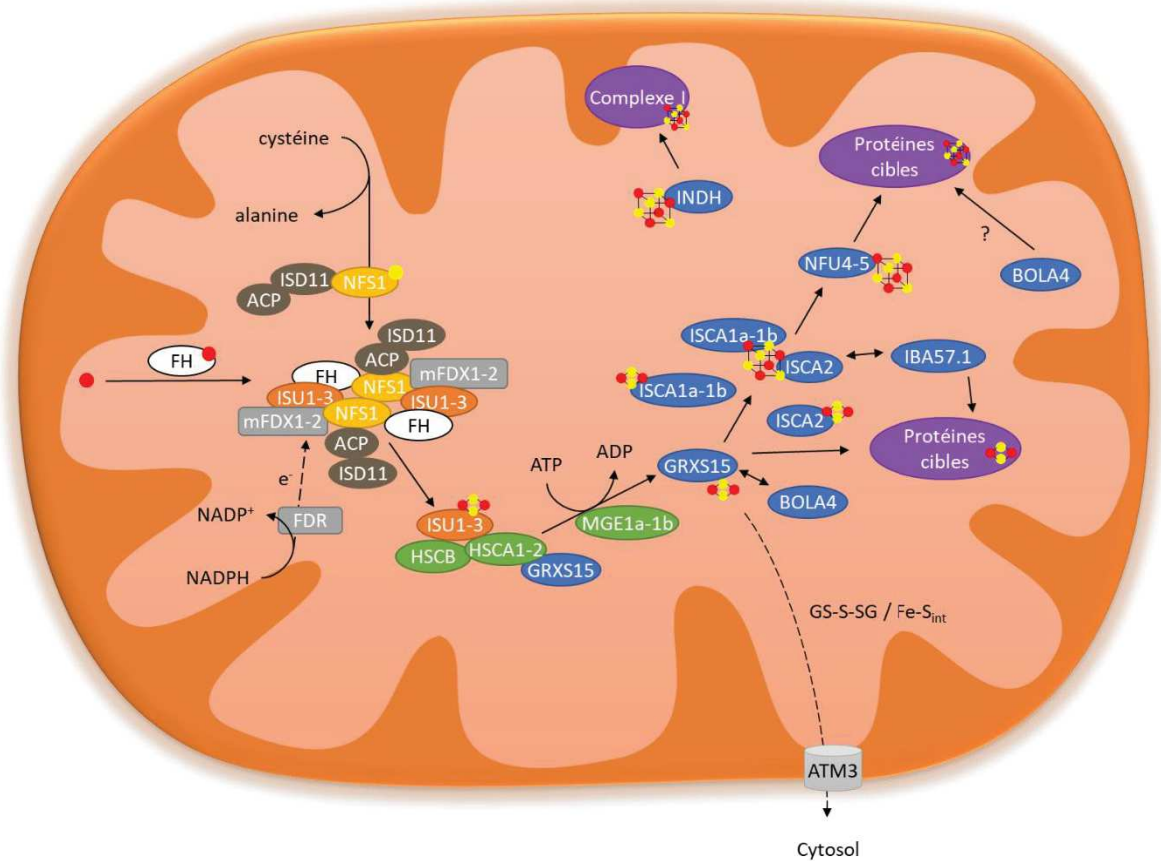


Figure 12: Modèle de la maturation des protéines à centre Fe-S mitochondriales par la machinerie ISC d'*A. thaliana*. En blanc, les protéines impliquées dans l'apport de fer ; en jaune, la cystéine désulfurase ; en marron, les protéines partenaires de la cystéine désulfurase ; en gris, les protéines impliquées dans le transfert d'électrons (ATM3 n'a pas exactement le même code couleur puisqu'il s'agit d'un transporteur transmembranaire) ; en orange, les protéines d'échafaudage ; en vert, les protéines chaperons et leurs facteurs d'échange nucléotidique; en bleu, les protéines de transfert et en violet, les protéines cibles ou protéines à centres Fe-S.

Enfin, une protéine appartenant à la famille des Mrp appelée INDH (pour iron-sulfur protein required for NADH dehydrogenase) est présente au sein des mitochondries (Bych et al., 2008a). Chez *A. thaliana* cette protéine est essentielle et interviendrait de façon spécifique dans l'assemblage du complexe respiratoire I qui contient 8 centres Fe-S (Wydro et al., 2013). La caractérisation des isoformes de l'homme et de la levure *Yarrowia lypolitica* indique que ces protéines peuvent en effet fixer un centre [4Fe-4S] *via* des cystéines conservées et transférer ce centre à une protéine cible. La diminution du niveau de certaines protéines mitochondriales ne liant pas de centre Fe-S dans le mutant *indh* suggère que le défaut d'assemblage du complexe I pourrait être aussi lié à des défauts de traduction protéique (Wydro et al., 2013), à moins que ces défauts ne soient liés à un problème de maturation d'une protéine Fe-S présente dans le complexe ribosomal. Cela serait surprenant car aucune protéine Fe-S autre que le complexe respiratoire I n'est impactée. De plus, la protéine INDH est absente chez les organismes dépourvus de ce même complexe, suggérant un lien fonctionnel fort entre les deux protéines (Bych et al., 2008a; Sheftel et al., 2009).

2. Maturation des protéines Fe-S cytosoliques et nucléaires par la machinerie CIA

La présence de protéines à centre Fe-S dans le cytosol et le noyau nécessite qu'une machinerie d'assemblage soit présente dans le compartiment cytosolique. Alors qu'une cystéine désulfurase, nommée ABA3, est présente dans le cytosol, elle n'y est cependant pas impliquée dans la maturation des protéines Fe-S (Bernard et al., 2013). L'étude de mutants viables pour les cystéine désulfurases NFS1 et NFS2, adressées respectivement à la mitochondrie et au chloroplaste, et pour le transporteur ATM3 situé au niveau de la membrane mitochondriale, montre qu'une expression réduite de NFS1 et d'ATM3 diminue l'activité de plusieurs protéines Fe-S cytosoliques, à savoir l'aldéhyde oxydase, la xanthine déshydrogénase et l'aconitase (Bernard et al., 2013, 2009). L'apport de soufre pour la maturation des protéines Fe-S cytosoliques et nucléaires dépend ainsi de la mitochondrie comme chez les autres eucaryotes (Bernard et al., 2009; Zuo et al., 2017). Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à la nature du composé exporté depuis la mitochondrie vers le cytosol par l'intermédiaire d'ATM3. Chez *A. thaliana* et *S. cerevisiae*, les transporteurs de type ATM pourraient exporter un glutathion oxydé contenant un persulfure sous forme GS-S-SG, qui servirait soit dans l'assemblage de centres Fe-S, soit dans la synthèse de cofacteurs MoCo dont l'approvisionnement en soufre dépend des mêmes voies (Schaedler et al., 2014). Plus récemment, des études en levure indiquent que la maturation de protéines Fe-S cytosoliques dépendrait de l'export d'un intermédiaire contenant à la fois du fer et du soufre alors que la synthèse de MoCo dépendrait d'un autre composé contenant uniquement du soufre (Pandey et al., 2019). Cette dernière hypothèse relance la question du composé exporté de la mitochondrie et de la provenance du fer utilisé par la machinerie CIA.

A ce jour aucun donneur de fer n'a été véritablement identifié pour la maturation des protéines Fe-S du cytosol même si l'étude des mutants de levure pour Grx3/4 suggère que les GRX de classe II cytosoliques pourraient assurer ce rôle (Mühlenhoff et al., 2010). Selon les fonds génétiques utilisés, le double mutant *grx3-grx4* est létal ou non. Dans un mutant viable, des défauts importants dans la distribution du fer intracellulaire et dans l'activité de nombreuses protéines possédant des cofacteurs ferreux sont observés (Mühlenhoff et al., 2010). De manière étrange, des plantes d'*A. thaliana* mutées pour l'orthologue GRXS17 ne présentent pas ou peu de phénotype dans des conditions standards de croissance (Knuesting et al., 2015). Des défauts de croissance forts sont néanmoins observés en réponse à la photopériode ou à des contraintes telles qu'un stress thermique, l'association des deux empêchant le développement méristématique (Cheng et al., 2011; Knuesting et al., 2015). En résumé, ces observations ne sont pas en faveur d'un rôle essentiel de GRXS17 chez les plantes comme celui joué par les protéines de levure. Néanmoins, les GRX monothiol cytosoliques sont constituées des mêmes modules, possédant toutes un domaine thiorédoxine (TRX) et 1 à 3 domaines GRX monothiol (un chez la levure, deux chez l'homme et trois chez les plantes terrestres, Couturier et al., 2009). Le domaine TRX permettrait l'interaction de GRXS17 avec la protéine DRE2, alors que les domaines GRX sont impliqués dans l'incorporation de centres [2Fe-2S], soit par la formation d'homodimère, soit au sein de complexes GRXS17-BOLA2 (Banci et al., 2015; Couturier et al., 2014; Frey et al., 2016; Knuesting et al., 2015). Que

l'holoforme de GRXS17 soit un homo- ou un hétérodimère, son centre [2Fe-2S] peut servir pour la maturation de la protéine DRE2, qui intervient dans les étapes précoces de l'assemblage de centres Fe-S au sein de la machinerie CIA (Banci et al., 2015; Frey et al., 2016; Inigo et al., 2016). Outre DRE2, GRXS17 interagirait avec d'autres protéines de la machinerie CIA ainsi que des protéines cibles cytosoliques et nucléaires, toutefois le mécanisme moléculaire associé à ces interactions reste à définir (Inigo et al., 2016). En effet, la majorité des acteurs de la machinerie CIA sont essentiels au développement de la plante alors que, comme énoncé précédemment, le mutant de délétion *grxs17* ne présente pas de phénotype dans des conditions de croissance standard, laissant en suspens la question de l'importance de GRXS17 au sein de la machinerie d'assemblage de centres Fe-S (Balk et Schaedler, 2014; Cheng et al., 2011; Inigo et al., 2016; Knuesting et al., 2015). Des études montrent la formation de centres [2Fe-2S] coordonnés par des molécules de glutathion qui pourraient d'ailleurs être l'un des composés exportés par le transporteur ATM3 depuis la mitochondrie vers le cytosol (Li et Cowan, 2015; Qi et al., 2012). Aussi, il est possible que GRXS17 intervienne dans la prise en charge de ce cofacteur pour sa redistribution vers des protéines de la machinerie CIA sans que cette fonction soit essentielle pour autant.

L'apport d'électrons pour l'assemblage *de novo* du centre Fe-S sur le complexe d'échafaudage formé par NBP35 est *a priori* assuré par les protéines TAH18 et DRE2, comme chez la levure (Netz et al., 2010). En effet, les isoformes de plantes permettent la complémentation des mutants de levure, indiquant une fonction conservée au sein du vivant pour ces deux protéines (Bernard et al., 2013). TAH18 est une diflavine réductase, capable de transférer des électrons depuis une molécule de NADPH vers DRE2 dont les 2 centres Fe-S de type [2Fe-2S] et [4Fe-4S] prennent en charge les électrons jusqu'au système d'échafaudage cytosolique (Netz et al., 2010).

Chez les eucaryotes non photosynthétiques, DRE2 délivre des électrons à un complexe d'échafaudage hétérodimérique CFD1-NBP35 qui sont deux protéines appartenant à la même famille que la protéine Mrp d'*E. coli* (Grossman et al., 2019; Stehling et al., 2018). Chez les plantes, en absence d'orthologues de CFD1, la protéine NBP35 assurerait seule la fonction d'échafaudage (Bastow et al., 2017; Bych et al., 2008b). Comme indiqué précédemment, NBP35 est apparentée à Mrp et possède donc un domaine Walker A qui lui confère une activité ATPase (Bych et al., 2008b; Grossman et al., 2019). La protéine possède un motif C-x_{13}-C-x_2-C-x_5-C strictement conservé pour les protéines NBP35 à l'extrémité N-terminale, en revanche le motif C-x_{59}-C-x_{14}-C-x_{17}-C-x_8-C-x_5-C retrouvé à l'extrémité C-terminale des isoformes de plante est caractéristique de la lignée verte (Kohbushi et al., 2009). La présence de cystéines au sein de ces deux motifs leur permet de lier des centres [4Fe-4S] avec un centre par monomère sur la partie N-terminale de la protéine et un centre coordonné par un dimère à l'extrémité C-terminale (Bych et al., 2008b; Kohbushi et al., 2009). Plusieurs études suggèrent que le transfert de centre Fe-S depuis NBP35 ou le complexe NBP35-CFD1 vers les protéines cibles requiert dans un premier temps l'intervention de la protéine NAR1, similaire aux hydrogénases bactériennes de type Fe-Fe et qui incorpore deux centres Fe-S de nature encore mal déterminée (Balk et al., 2004; Netz et al., 2010, 2007).

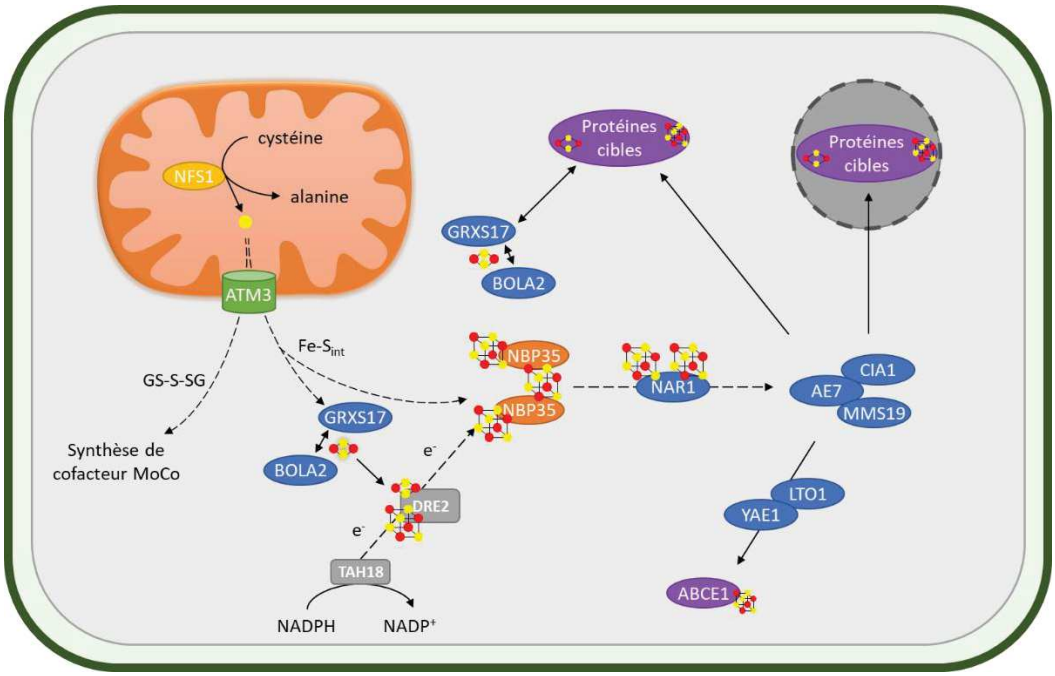


Figure 13: Maturation de protéines cytosoliques et nucléaires chez *A. thaliana*. En jaune, la cystéine désulfurase ; en gris, les protéines responsables du transfert d'électrons; en orange, les protéines d'échafaudage ; en bleu, les protéines de transfert et en violet, les protéines réceptrices de centres Fe-S. Le transporteur ABC ATM3 est représenté en vert et marque le passage de la machinerie ISC à la machinerie CIA pour le précurseur des centres Fe-S de l'ensemble des protéines Fe-S cytosoliques et nucléaires.

Ensuite, le complexe « d'adressage » CIA1-AE7-MMS19 avec une stœchiométrie 2 : 4 : 1, permettrait la reconnaissance des apoprotéines cibles et leur maturation (Luo et al., 2012; Vo et al., 2018). La protéine CIA1 de plante complémente le mutant *cia1Δ* de levure et il a été montré qu'il s'agit d'une protéine WD40 dont la particularité est d'avoir une structure en forme de « donut », et dont la fonction consisterait à coordonner l'assemblage de complexes multiprotéiques (Balk et al., 2005; Luo et al., 2012; Netz et al., 2014). La protéine AE7, également appelée CIA2, contient un domaine de fonction inconnue DUF59 à l'extrémité C-terminale qui inclut une cystéine réactive. Sachant qu'AE7 serait impliquée dans la maturation de protéines [4Fe-4S] telles que l'aconitase cytosolique et l'ADN glycosylase ROS1, il est envisagé que la cystéine présente sur le domaine DUF59 serve à l'incorporation d'un centre Fe-S au sein d'un complexe protéique encore non déterminé (Luo et al., 2012; Vo et al., 2018). La dernière protéine du complexe d'adressage, MMS19 également appelée MET18, est l'une des rares protéines qui ne soient pas essentielles. En effet, parmi l'ensemble des composants du système CIA cités jusqu'à présent, chaque mutant de délétion est associé à un phénotype létal à l'exception de *mms19* et de *grxs17* (Bastow et al., 2017; Bernard et al., 2013; Cheng et al., 2011; Duan et al., 2015; Luo et al., 2012; Netz et al., 2014). La protéine MMS19 interagit avec les mêmes cibles que celles d'AE7, aussi, il est proposé que les deux protéines interviennent de manière redondante dans l'adressage de centres Fe-S, expliquant ainsi le phénotype observé pour le mutant de délétion *mms19* (Duan et al., 2015; Stehling et al., 2012). L'ensemble protéique NBP35-NAR1-complexe d'adressage CIA est globalement impliqué dans la maturation des protéines [4Fe-4S] cytosoliques et nucléaires mais l'existence de facteurs de maturation spécifiques, impliqués dans des réactions en

aval du complexe d'adressage, a été décrite. Ainsi, les protéines de levure YAE1 et LTO1, qui possèdent des orthologues chez les plantes, auraient une fonction d'adaptateur dédié à l'adressage de centre(s) Fe-S du complexe CIA vers la protéine ABCE1 qui joue un rôle crucial dans la synthèse protéique (Paul et al., 2015).

3. Rôle et maturation des protéines à centre Fe-S chloroplastiques

La maturation des protéines à centre Fe-S au sein du chloroplaste est assurée par la machinerie SUF, globalement composée des mêmes familles protéiques que la machinerie ISC, mais dont le fonctionnement pourrait être différent. Les informations sur cette machinerie et sur un certain nombre de cibles chloroplastiques ont été compilées dans un article de revue, présenté ci-dessous et pour lequel je suis co-premier auteur, ainsi que dans les deux paragraphes suivants qui introduisent brièvement les protéines de transfert de centre Fe-S chloroplastiques, informations reprises dans les paragraphes introductifs des articles de recherche.

Au total, 10 protéines de transfert sont actuellement recensées dans la machinerie d'assemblage chloroplastique des centres Fe-S chez *A. thaliana* : un représentant de la famille des ISCA, appelée SUFA1, une protéine IBA57, IBA57.2, une isoforme MRP/NBP35, HCF101, deux GRX, GRXS14 et GRXS16, deux protéines BOLA, BOLA1 et BOLA4 ainsi que 3 NFU, NFU1, NFU2 et NFU3 (Balk et Schaedler, 2014). Parmi ces protéines de transfert, les mieux caractérisées sont NFU2, NFU3 et HCF101 toutes trois impliquées dans la maturation de protéines [4Fe-4S] (Léon et al., 2003; Lezhneva et al., 2004; Nath et al., 2016). En effet, la délétion de chacun de ces gènes est associée à un phénotype fort, c'est-à-dire pâle-nain pour *nfu2* et *nfu3* et embryo-létal pour *hcf101*, en lien avec l'implication de ces 3 protéines dans la maturation des sous-unités du PSI liant des centres Fe-S. Il a été montré plus récemment que NFU2 et NFU3 interagissent avec HCF101, qui interagit elle-même avec la sous-unité PsaC, suggérant un transfert linéaire de centre Fe-S depuis l'une des protéines NFU vers cette protéine cible (Touraine et al., 2019). Des expériences de reconstitution de centres Fe-S *in vitro* indiquent que ces protéines lieraient toutes un centre [4Fe-4S], NFU2 pouvant aussi incorporer un centre [2Fe-2S] (Gao et al., 2013; Schwenkert et al., 2010). Outre HCF101, NFU2 et NFU3 interagissent avec des protéines Fe-S chloroplastiques et il a été montré que NFU2 peut transférer un centre Fe-S *in vitro* à des cibles telles qu'APR2, une adénosine 5'-phosphosulfate réductase à centre [4Fe-4S], et la dihydroxyacide déhydratase DHAD, une protéine [2Fe-2S] dont la maturation dépend principalement de NFU2, au moins dans les racines (Gao et al., 2018, 2013).

Comme énoncé ci-dessus, BOLA1, BOLA4, GRXS14, GRXS16, IBA57.2, NFU1 et SUFA1 sont encore peu caractérisées. Ainsi, il a été montré que GRXS14, GRXS16 et SUFA1 incorporent toutes un centre [2Fe-2S] et un transfert de ce centre est possible depuis GRXS14 vers SUFA1 (Abdel-Ghany et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2008; Mapolelo et al., 2013). Des tests d'interaction ont également montré une interaction entre chaque GRX et chaque BOLA chloroplastique qui, de la même façon que les protéines mitochondriales et cytosoliques, formeraient des hétérodimères au sein desquels un centre [2Fe-2S] peut être incorporé (Couturier et al., 2014; Roret et al., 2014). Des mutants de délétion existent pour *GRXS14*, *GRXS16*, *NFU1* et *SUFA1* mais ne présentent aucun phénotype macroscopique particulier en conditions standards

de croissance (Rey et al., 2017; Touraine et al., 2019; Yabe et Nakai, 2006). Dans le cas des GRX, la diminution de l'expression de GRXS16 dans un fond génétique *Δgrxs14* induit une réduction de biomasse qui suggère qu'une redondance fonctionnelle existe entre ces deux protéines, et le mutant de surexpression de GRXS14 a permis de mettre en avant une implication de GRXS14 dans le métabolisme de la chlorophylle (Rey et al., 2017). A l'inverse, aucune étude portant sur des mutants de délétion n'est répertoriée à ce jour pour IBA57.2, BOLA1 et BOLA4. Les seules informations au sujet d'IBA57.2 concernent sa capacité à restaurer le phénotype de croissance du mutant *ΔygfZ* d'*E. coli* en conditions de stress alors qu'aucune complémentation n'est détectée pour le mutant de levure *iba57Δ,* suggérant des fonctions divergentes entre les isoformes chloroplastiques et mitochondriales (Uzarska et al., 2018; Waller et al., 2012). Une des questions de recherche principale vise donc à élucider les spécificités existantes entre ces protéines de transfert et leurs cibles c'est-à-dire les protéines Fe-S chloroplastiques répertoriées dans l'article suivant.

JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry (2018) 23:545–566
https://doi.org/10.1007/s00775-018-1532-1

MINIREVIEW

Roles and maturation of iron–sulfur proteins in plastids

Jonathan Przybyla-Toscano[1] · Mélanie Roland[1] · Frédéric Gaymard[2] · Jérémy Couturier[1] · Nicolas Rouhier[1]

Received: 18 October 2017 / Accepted: 14 December 2017 / Published online: 18 January 2018
© The Author(s) 2018, corrected publication May/2018

Abstract
One reason why iron is an essential element for most organisms is its presence in prosthetic groups such as hemes or iron–sulfur (Fe–S) clusters, which are notably required for electron transfer reactions. As an organelle with an intense metabolism in plants, chloroplast relies on many Fe–S proteins. This includes those present in the electron transfer chain which will be, in fact, essential for most other metabolic processes occurring in chloroplasts, e.g., carbon fixation, nitrogen and sulfur assimilation, pigment, amino acid, and vitamin biosynthetic pathways to cite only a few examples. The maturation of these Fe–S proteins requires a complex and specific machinery named SUF (sulfur mobilisation). The assembly process can be split in two major steps, (1) the de novo assembly on scaffold proteins which requires ATP, iron and sulfur atoms, electrons, and thus the concerted action of several proteins forming early acting assembly complexes, and (2) the transfer of the pre-formed Fe–S cluster to client proteins using a set of late-acting maturation factors. Similar machineries, having in common these basic principles, are present in the cytosol and in mitochondria. This review focuses on the currently known molecular details concerning the assembly and roles of Fe–S proteins in plastids.

Keywords Biogenesis · Iron–sulfur proteins · Plastids · Electron transfer · Photosynthesis

Introduction

Iron (Fe) and sulfur are critical elements for plant growth and development. Sulfur is notably required for cysteine and methionine synthesis, and is present in a large number of molecules, whereas Fe atoms are associated with many proteins as part of hemes, mono- or di-iron non-heme centers, or iron–sulfur (Fe–S) clusters. Chloroplasts and plastids in general, are highly demanding organelles for both elements due notably to the presence of a translation machinery and of the photosynthetic electron transfer chain. Besides, numerous metabolic pathways occurring totally or partially in this organelle are directly or indirectly dependent on the functioning of Fe–S proteins. This review is organized in three parts, describing how Fe and sulfur species get reduced and imported in chloroplasts, how the various types of Fe–S clusters are built from Fe and cysteine and incorporated into the tenths of client proteins, and finally which chloroplastic pathways/processes are dependent on these cofactors.

Supply of iron and sulfur to plastids

Iron transport

Chloroplasts, where photosynthesis and heme synthesis occur, represent the major subcellular Fe sink in plant leaves [1]. Photosynthetic organisms uptake Fe from the soil using a sophisticated pumping system that differs between Poaceae and dicotyledon species, which developed, respectively, either a phytosiderophore-dependent chelation-based strategy or a reduction-based strategy (see [2] for an overview). In *Arabidopsis thaliana*, Fe is acquired in several steps. By extruding protons via the H^+-ATPase AHA2 and coumarins via the PDR9 ABC transporter, *A. thaliana* can

The original version of this article was revised due to a retrospective Open Access order.

Jonathan Przybyla-Toscano and Mélanie Roland have equally contributed to the work.

✉ Nicolas Rouhier
nicolas.rouhier@univ-lorraine.fr

1 Université de Lorraine, Interactions Arbres-Microorganismes, UMR1136, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

2 Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, CNRS/INRA/Université Montpellier 2, SupAgro Campus, 34060 Montpellier, France

solubilize and chelate Fe^{3+} forms by lowering the soil pH. Then, the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} is performed by the ferric reductase-oxidase (FRO) family protein, FRO2, before its uptake by the plasma membrane Fe transporter named iron-regulated transporter 1 (IRT1) [2]. In the cytosol of root cells, Fe complexes are formed with organic acids (malate or citrate) or nicotianamine before being translocated to the shoots and unloaded in the cytosol of mesophyll cells [3]. After this step, little is known concerning Fe acquisition by chloroplasts, its subsequent storage, and delivery to dedicated proteins and machineries. It is possible that a voltage-dependent transport system allows Fe^{3+}-citrate complexes to pass the outer membrane of the plastid envelope [4]. Once in the chloroplastic intermembrane space, FRO7 may reduce ferric (Fe^{3+}) to ferrous iron (Fe^{2+}) via its reductase activity [5]. Several transporters located in the inner membrane of the chloroplast envelope are candidates for Fe import into the stroma (Fig. 1). The first one is named permease in chloroplast 1 (PIC1) [6]. Both knock-out and overexpression lines for this gene show abnormal chloroplast development and perturbed iron homeostasis and availability [6, 7]. The loss-of-function mutants are dwarf and chlorotic (even white), and they grow only heterotrophically. Moreover, they accumulate Fe into ferritins, the function of which is normally to protect this organelle from oxidative stress by sequestering Fe. The PIC1-overexpressing plants suffer from oxidative stress and leaf chlorosis likely due to a Fe overload in chloroplasts. Although this permease is mentioned to be part of the translocase of the outer/inner chloroplast membrane (Tic–Toc) complex in other studies, a Fe transport function is clear from the complementation of a yeast *fer3fer4* mutant which is defective in Fe uptake, leading to the conclusion that PIC1 may have a dual function [6]. Another putative Fe transporter, named NAP14 (non-intrinsic ABC protein 14), was identified from its homology with the ABC transporter FutC belonging to the FutABC iron uptake system in cyanobacteria [8]. As observed for *pic1*, a *nap14* knock-out mutant accumulates Fe in shoots,

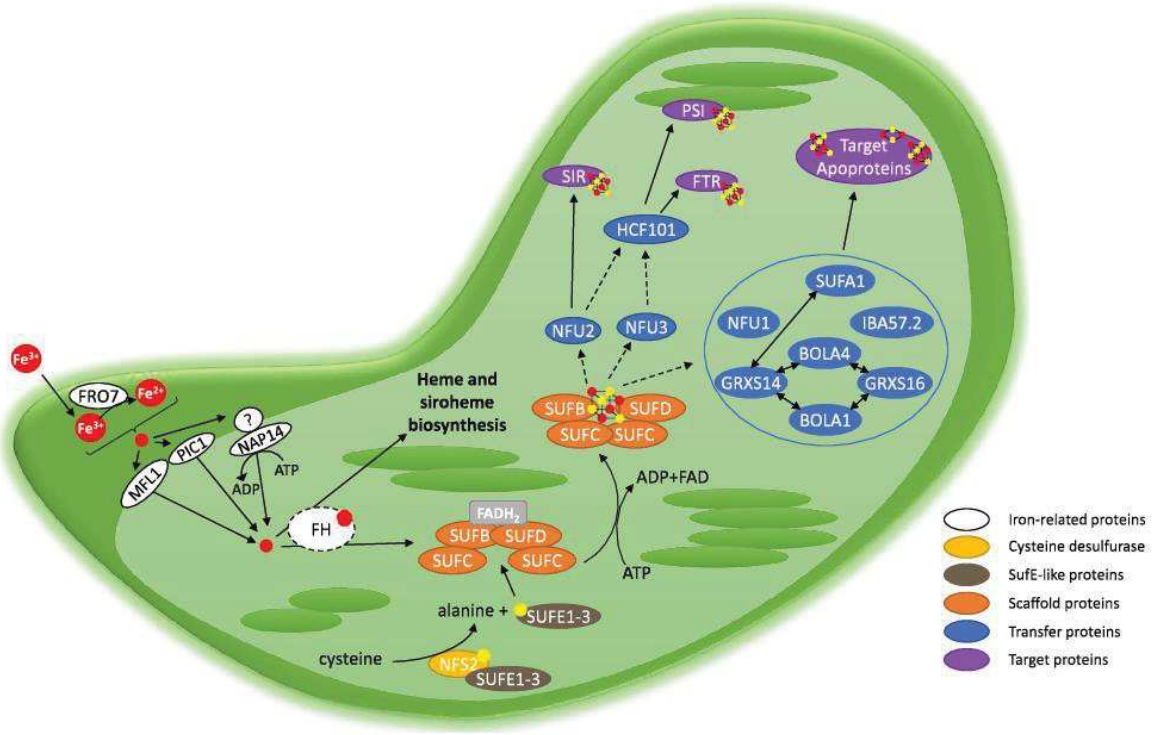


Fig. 1 Working model for iron uptake and maturation of Fe–S proteins by the SUF machinery in plastids of eukaryotic photosynthetic organisms. Besides the putative Fe transporters located at the membrane of the chloroplast envelope, which would serve for providing the required Fe atoms to the SUF machinery, this scheme integrates the 17 putative SUF components. In the absence of stronger evidence concerning the implication of frataxin, it is not integrated among SUF components and is represented by a dashed circle. The color code associated with each protein function is indicated directly on the figure. The detailed description of the maturation process and the connections between the SUF proteins are described in the text. Except NFU2, NFU3, and HFC101, all maturation factors have been grouped in a blue circle in the absence of information concerning their precise function, but two-way arrows indicate that physical interactions have been observed between some proteins

exhibits abnormal chloroplast structures, and shows deregulated levels of Fe homeostasis-related genes. However, in the absence of other Fut orthologs in *A. thaliana*, the question of whether NAP14 can work alone or in pair with other unidentified partners remains open. A third candidate transporter for Fe uptake in chloroplasts is mitoferrin-like1 (MFL1) [9]. However, although its gene expression is dependent on Fe supply and the protein is in principle located to the inner membrane of the chloroplast envelope, the growth of knockout mutants is only moderately affected. While all these proteins seem to be involved in Fe homeostasis in chloroplasts, further characterization is urgently needed to clarify their exact function and respective importance.

Sulfate import and reduction in plastids for the synthesis of cysteine, the sulfur donor of Fe–S clusters

Photosynthetic organisms use sulfate present in the soils as a primary source of sulfur. Sulfate is incorporated into the roots through an active proton/sulfate co-transport system located at the plasma membrane [10]. Once in the xylem, sulfate is transported to the shoots, unloaded into the cytosol of mesophyll cells, and then transported in the chloroplasts for its ATP-dependent reductive assimilation into sulfide (see [10] for review). The involved transporters all along these steps belong to the sulfate transporter (SULTR) family, which is composed of 12 members in *A. thaliana* that can be grouped into four classes. The SULTR3 class comprises the chloroplast-localized sulfate transporters [11]. The sulfide generated by the ferredoxin (FDX)-dependent sulfite reductase (SIR) will be used for cysteine biosynthesis by cysteine synthase, a complex of two enzymes, serine acetyltransferase (SAT) that uses acetyl-coA to form *O*-acetylserine (OAS) from serine and *O*-acetylserine-(thiol)-lyase (OAS-TL) which can substitute the acetyl moiety by sulfide to form cysteine. While the first steps of sulfate reduction into sulfide are clearly restricted to the chloroplasts, cysteine synthesis can also occur in the cytosol and in mitochondria owing to the ubiquitous expression of SAT and OAS-TL and exchange of sulfide across organelle membranes [10].

The biogenesis of Fe–S proteins in chloroplasts by the SUF machinery

Several dozen of proteins containing Fe–S clusters are found in various subcellular compartments in the model plant *A. thaliana* as in other plants. Accordingly, in plant cells, three assembly machineries exist in plastids, in mitochondria, and in the cytosol, the latter being dedicated to the maturation of Fe–S proteins found both in the cytosol and in the nucleus. Whereas the chloroplastic sulfur mobilisation (SUF) machinery is autonomous, the cytosolic iron–sulfur assembly (CIA) machinery is dependent on the mitochondrial iron–sulfur cluster (ISC) machinery as it relies on a sulfur-containing compound generated in the first steps and exported from mitochondria by an ABC transporter. We invite the readers interested in the ISC and CIA machineries in plants to refer to the following recent reviews [12, 13]. For all these machineries and in particular the chloroplastic SUF machinery, the biosynthesis and delivery of Fe–S clusters can be separated in two major steps: their de novo assembly on scaffold proteins and their incorporation into final client proteins. This second step may necessitate the exchange and possibly conversion of Fe–S clusters between scaffold proteins and maturation factors including Fe–S cluster transfer proteins and targeting/recruiting factors. Repair mechanisms may eventually account for the recycling of damaged Fe–S clusters, which could be important in chloroplasts considering the presence of reactive oxygen and nitrogen species, but this will not be discussed further as information in plants is very scarce.

The de novo Fe–S cluster assembly on scaffold protein

In chloroplasts, it seems now clear that the sole scaffold system is formed by the SUFBCD proteins (Fig. 1) [14]. The assembly of a Fe–S cluster on this scaffold complex theoretically requires the concerted action of several proteins as it requires the polypeptide backbones, ATP, Fe, and sulfur atoms and electrons. There are still many uncertainties about the involved actors in plants and the molecular details. Thus, we will often make analogies to the *Escherichia coli* SUF system, which has been better characterized. The best, not to say the only, well-characterized actors in plants of this assembly complex are proteins required for the production and transfer of the required sulfur. The NFS2 protein (formerly referred to as CpNifS) is a pyridoxal-L-phosphate (PLP)-dependent cysteine desulfurase, which catalyzes the extraction of the sulfur atoms from cysteine, producing a persulfide group on a catalytic cysteine with the concomitant release of an alanine (Fig. 1) [15]. As a class II cysteine desulfurase, similar to the bacterial SufS orthologs, the accessibility of the persulfide group is limited by the presence of a β-hairpin near the catalytic cysteine [16, 17]. For this reason, the transfer of sulfur atoms to the scaffold complex relies on an additional protein named SUFE. In *A. thaliana*, there are three SUFE proteins (SUFE1-3) targeted to chloroplasts [18]. In addition to the SUFE domain, SUFE1 has a C-terminal BOLA domain, the role of which is unknown but may prefigure a control by glutaredoxins (GRXs, see below) and SUFE3 possesses a quinolinate synthase (NadA) domain at the C-terminus, which is involved in NAD biosynthesis [18, 19]. As shown for the corresponding *E. coli* couple

[20], each SUFE protein enhances the cysteine desulfurase activity of NFS2 by accepting the persulfide group on its own catalytic cysteine, thus serving as a relay to the scaffold system [18, 19]. At the structural level, *A. thaliana* NFS2 is a dimeric protein with two distant active sites, which suggests that the functional NFS2-SUFE unit should be a heterotetramer [17]. In addition to the existence of additional domains in SUFE1 and SUFE3, the existence of three SUFE isoforms may be also linked to their expression pattern as for instance *SUFE2* is mostly expressed in flowers [18]. The central role of these proteins has been validated by genetic studies, since the study of knock-out *A. thaliana* lines proved that *NFS2*, *SUFE1*, *SUFE3,* and *SUFBCD* genes are essential [14, 18, 21, 22]. The use of RNAi lines showed that NFS2 and SUFBCD are required for the maturation of all plastidial Fe–S proteins tested so far [14, 22].

In *E. coli* as in *A. thaliana*, the scaffold complex is probably composed by three subunits, SUFB, SUFC, and SUFD, very likely in a 1:2:1 stoichiometry and will be referred to as $SUFBC_2D$ (Fig. 1) [14, 20]. It seems that NFS2, SUFEs, and SUFBCD do not form a large and stable complex as recently shown in the case of the mitochondrial ISC system in yeast and human [23, 24]. Indeed, some in vitro biochemical analyses using the bacterial SufS, SufE, and SufBCD enzymes indicated that SufS does not seem to make stable interactions with SufBCD, unlike SufE whose presence is absolutely required for an efficient Fe–S cluster reconstitution in vitro on SufBCD [20, 25]. Besides, it has been shown that the presence of SufC, but not SufD, is required for the transfer of the sulfur atoms bound to *E. coli* SufE to SufB. Upon ATP binding, the SufC ATPase would induce structural changes on SufB and SufD that are necessary for Fe–S cluster binding [26]. Some residues important for these interactions have been identified from the 3D structures and validated by mutagenesis [26, 27]. Among the numerous cysteines present in SufB, the primary sulfur acceptor would be the conserved Cys254 (*E. coli* numbering). This sulfur atom would then be transferred to Cys405, one of the Fe–S cluster ligands owing to the existence of a tunnel inside the β-helix core domain of SufB [27]. The question of which type of Fe–S clusters is bound to this complex has been investigated in detail. It was shown that *E. coli* SufB alone can assemble both $[Fe_2S_2]$ and $[Fe_4S_4]$ clusters in vitro and that a conversion from the $[Fe_4S_4]$-loaded SufB form to a stable $[Fe_2S_2]$-loaded form is possible upon exposure to air [25, 28]. However, based on the structure of an apoSufBCD complex, it was proposed that a histidine of SufD may be a Fe–S cluster ligand [26]. Consistently, a mutated variant for this histidine lost the ability to assemble a Fe–S cluster in vivo, and both SufC and SufD were required for the in vivo maturation of SufB [29]. In this cellular context, *E. coli* $SufBC_2D$ complex mostly binds a $[Fe_4S_4]$ cluster with some residual amount of linear $[Fe_3S_4]$ clusters [29]. Hence, it is very likely that the $SufBC_2D$ scaffold binds a $[Fe_4S_4]$ cluster in vivo and considering the conservation between *A. thaliana* and *E. coli* sequences, we anticipate that this mechanism should also prevail for plant proteins. However, we cannot completely rule out that $SufBC_2D$ or other forms, such as the $SufB_2C_2$ form detected with *E. coli* proteins [29], can bind other cluster types in some conditions. For instance, transcriptomic data indicate that the *SUFB*, *SUFC,* and *SUFD* genes may not be co-expressed in all organs and cell types of *A. thaliana*.

At this stage of the assembly process, there are many other crucial questions concerning the source of electrons required for the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} or of the persulfide (S^0) to a sulfide (S^{2-}), the source of Fe, and the control of its entry in the complex. In this respect, it is important to note that the $SufBC_2D$ complex was purified with a bound reduced flavin-adenine dinucleotide ($FADH_2$) molecule [29, 30]. While SufB alone can bind the flavin in vitro [30], SufD is also required in vivo [29]. It is currently believed that this $FADH_2$ provides the necessary reducing equivalents for the reduction of ferric iron. Since FAD is released from the complex upon oxidation, an external regeneration system is needed, which could be possibly an FDX or an NADPH-dependent flavin reductase.

The mechanisms and actors involved in the delivery of Fe for Fe–S cluster biosynthesis in plastids are completely unknown. The Fe–Storage proteins, ferritins, have been excluded from Fe donor candidates, because an *Arabidopsis* mutant (*fer1-3-4*) for the three ferritins found in leaves has no apparent phenotype [31], while mutant plants modified for the expression of these early biogenesis factors are either lethal or at least strongly affected. Another candidate for Fe delivery is a small acidic protein with iron-binding properties named frataxin. In the mitochondrial ISC machinery, frataxin controls iron entry in the assembly complex by activating sulfide formation by the cysteine desulfurase [32, 33]. In this complex, frataxin can interact both with the cysteine desulfurase and the ISCU scaffold protein. Except for a few organisms like *Z. mays*, there is usually a single gene coding for frataxin (FH) in plants. While frataxin was believed for a long time to be exclusively located in mitochondria, it was recently reported that *A. thaliana* FH (AtFH) and two isoforms from *Z. mays* may have a dual targeting into both mitochondria and plastids [34, 35]. According to this possible chloroplastic localization, *Arabidopsis FH*-deficient plants show a decrease in the heme content [36]. Moreover, they present a decrease in the total chlorophyll content, in the levels of two plastidial FDXs and in nitrite reductase (NIR, a siroheme-containing enzyme) activity which could explain the observed changes in the rate of the photosynthetic electron transport chain [35]. The impact on heme content would be in good agreement with the described interaction between yeast frataxin and ferrochelatase, the

terminal enzyme of heme synthesis performing porphyrin metalation [37]. All these observations suggest an impairment of the plastidial Fe–S cluster biosynthesis and/or of the heme or siroheme biosynthesis, although stronger and more direct biochemical evidence is still required.

Delivery and trafficking of preformed Fe–S clusters by maturation factors

The preformed Fe–S cluster on the SUFBC$_2$D complex, be it a [Fe_2S_2] or a [Fe_4S_4] cluster, has then to be correctly targeted to client apoproteins. This requires several other proteins referred to as maturation factors. Among these, one could differentiate the so-called Fe–S cluster transfer/carrier proteins (belonging to NFU, SUFA, GRX, and HCF101 families) from targeting factors (belonging to BOLA and IBA57 families) which, contrary to the proteins of the first group, are not able to bind Fe–S clusters by themselves, although BOLAs do it in complex with GRXs [38, 39]. It is interesting to note that all proteins of these families have mitochondrial counterparts in the ISC machinery, whereas the components forming the eukaryote-specific CIA machinery usually belong to different protein families [12]. This analogy to the mitochondrial system is the reason why some of these plastidial members, whose role in the maturation of Fe–S proteins in plastid has not been yet established, have been included in this section. The current model for these steps in the plant mitochondrial ISC machinery derives mainly from studies conducted in yeast and human and can be summarized as follows [40]. A glutaredoxin (GRXS15 in plants) is the primary transfer protein receiving a [Fe_2S_2] cluster from ISCU proteins. This cluster can be either directly inserted into [Fe_2S_2]-recipient apoproteins or used to build [Fe_4S_4] clusters on a heterocomplex formed by ISCAs and possibly IBA57. Some mechanistic and structural aspects of the cluster conversion from the [Fe_2S_2]-loaded GLRX5 form to the [Fe_4S_4]-loaded ISCA1-2 form have been recently delineated using human proteins [41, 42]. Then, the insertion of the [Fe_4S_4] clusters into client Fe–S proteins might be direct or facilitated by NFU and BOLA proteins that likely act in concert for the maturation of specific targets notably the lipoate synthase or by IND1/INDH, a close HCF101 homolog, which seems specific for the respiratory chain complex I.

The current genetic and biochemical evidence indicate that this sequence of events should be very different for the plastidial SUF machinery (Fig. 1). Although the two plastidial isoforms, named GRXS14 and GRXS16, have the ability to bind the regular [Fe_2S_2] cluster in homodimer (or in heterodimer with BOLA, see below) and to complement a yeast mutant for the mitochondrial Grx5 [43], strong genetic and physiological evidence for a similar involvement in plants is still missing. Single mutants for each of these genes have no phenotype when grown under standard conditions, whereas plants overexpressing GRXS14 have a decreased chlorophyll content [44]. Considering that several enzymes involved in chlorophyll catabolism require Fe–S clusters, this may constitute a first hint towards a role of GRXS14 in the maturation of specific client proteins in this pathway. Counterintuitive to this first observation, plants lacking GRXS14 showed accelerated chlorophyll loss compared to wild-type plants when exposed to prolonged darkness, suggesting more complex connections [44]. A redundancy may exist between both plastidial GRXs, since a double mutant with about 20% GRXS16 remaining exhibits a 20% biomass reduction in standard conditions compared to wild-type plants. However, this phenotype is not exacerbated under stress conditions. Overall, unlike the knock-out mutant of mitochondrial GRXS15 which is embryo-lethal [45], these results point either to non-essential roles of these isoforms or to a redundant function with the remaining GRXS16 level being sufficient to sustain an essential role similar to GRXS15.

Concerning BOLA proteins, several roles have been proposed, but only those connected to their participation in Fe metabolism have been really validated [46]. Their involvement in Fe–S cluster biogenesis was demonstrated from the study of *bol1/3* mutant in yeast and of human patients defective for the mitochondrial BOLA3. Both types of cells display protein lipoylation defects due to the incorrect maturation of lipoate synthase and a decrease in activity for some other [Fe_4S_4] proteins as aconitase and succinate dehydrogenase [47–49], whereas human patients also have defects in the mitochondrial respiratory complexes I and III [49]. Three isoforms with a BOLA domain are found in plant chloroplasts. As already mentioned, the C-terminal region of SUFE1 contains a BOLA domain. The two other isoforms, BOLA1 and BOLA4, comprise a single domain. Both BOLA4 and SUFE1 could also be targeted to mitochondria [21, 50]. Interactions between these plastidial BOLA proteins and GRXS14 and GRXS16 have been demonstrated both in vitro and in planta [38, 50]. These proteins can in fact form both apo-heterodimers and holo-heterodimers bridging a [Fe_2S_2] cluster [39], as also demonstrated for bacterial, yeast, and mammalian isoforms [46]. In this respect, it is interesting to note that adding BOLA to a GRX homodimer converts it to a more stable holo GRX-BOLA heterodimer. This interconversion might represent a regulatory mechanism either to shut down or activate some specific pathways by favouring one target over another. At the structural level, all BOLA isoforms have a similar well-conserved fold [39]. Two subgroups can, however, be distinguished based on the length of the β1–β2 loop referred to as the variable [C/H] loop, because it contains one of the ligands provided by BOLA either a cysteine or a histidine, the second ligand being a totally conserved histidine found in the α3–β3 loop [39, 48]. Other cysteine ligands are provided by a glutathione molecule and by the one present in the

conserved CGFS signature of the GRX partner, as in regular GRX homodimers [51]. While there is no true ortholog of yeast Bol3 in plants, the observation that Bol3 might interact with Nfu1 rather than with Grx5 in yeast could point to a different role in the late steps of the mitochondrial system [47, 48]. Although single *bol1* and *bol3* mutants do not have phenotypes and the respective molecular roles of Bol1 and Bol3 are still unclear, a connection between Bol3 and Nfu1 is also evident from the quite similar phenotype of the *bol1/3* and *nfu1* mutant cells [47].

In mitochondria, ISCA proteins are central for the maturation of [Fe_4S_4] proteins, presumably ensuring the conversion of [Fe_2S_2] centers into [Fe_4S_4] centers. In bacteria, the different A-type isoforms (IscA, SufA, ErpA) are also required for the maturation of [Fe_4S_4] proteins, even though in vitro studies demonstrated that *Azotobacter vinelandii* IscA, for example, can reversibly cycle between [Fe_2S_2] and [Fe_4S_4] forms through electron reductive coupling or oxidative cleavage [52]. Some biochemical redundancy seems to exist between them as demonstrated for the Fe–S cluster assembly of IspG and IspH, two enzymes involved in isoprenoid synthesis and also present in plant chloroplasts [53, 54]. In plastids, the only representative of this family should be SUFA1, also referred previously to as CpISCA and ISCA-I [55, 56]. As an A-type carrier protein, SUFA1 possesses the three characteristic conserved cysteines [54, 55] that allow the binding of a [Fe_2S_2] center in a dimer as observed upon in vitro Fe–S cluster reconstitution assays [55–57]. According to the ISC model, Fe–S cluster transfer experiments showed that GRXS14 can efficiently and unidirectionally transfer its [Fe_2S_2] cluster to SUFA1; however, there was no sign of a [Fe_4S_4] cluster formation [57]. Using recombinant proteins, it was shown in vitro that an apo-SufA from *E. coli* could promote the maturation of an apo-FDX from a [Fe_4S_4]-loaded $SufBC_2D$ scaffold, indicating that SUFA proteins would directly interact with the scaffold but also that it facilitates Fe–S cluster conversion. Nevertheless, knock-out mutants have no visible phenotype when grown under standard conditions, indicating that the role of SUFA1 is dispensable [55, 56]. Whether it is involved in the maturation of [Fe_2S_2] proteins, [Fe_4S_4] proteins or both remains thus to be determined.

It is getting clear that, in yeast and human mitochondria, ISCA proteins interact with IBA57 (Iron–Sulphur cluster assembly factor for Biotin synthase- and Aconitase-like mitochondrial proteins with a mass of 57 kDa). They form a complex involved in the maturation of several [Fe_4S_4] proteins including radical-*S*-adenosylmethionine (SAM) proteins, homoaconitase, aconitase, biotin synthase, and lipoic acid synthase [58, 59]. Depletion of the *E. coli* ortholog YgfZ also affects some [Fe_4S_4] proteins such as succinate dehydrogenase, fumarase, dimethylsulfoxide reductase, and MiaB, an enzyme involved in tRNA thiolation [58–60]. The two orthologs found in *A. thaliana*, IBA57.1 and IBA57.2, are, respectively, localized in mitochondria and plastids [61]. It is interesting to note that both isoforms can complement the growth defects of an *E. coli ygfZ* mutant observed on a minimal medium or upon oxidative stress [60]. This is the only physiological information obtained so far for these plant isoforms, since an *Arabidopsis iba57.1* mutant is embryo-lethal and an *iba57.2* mutant has not been described. While the exact function of IBA57 is still unknown, it is important to note that there is a conserved cysteine residue in a KGCY-x-GQE-x3-R/K motif, which is almost the only conserved motif in this protein family [62]. Moreover, consistent with the structural similarity of IBA57 with folate-dependent enzymes [63], *E. coli* YgfZ can bind tetrahydrofolate [60].

Another category of proteins strictly required for the maturation of [Fe_4S_4] clusters is the NFU family that exists in all kingdoms. In mitochondria, the study of the yeast mutant and several human patients indicates that NFU1 is required for the maturation of lipoate synthase, which affects several ketoacid dehydrogenases dependent on lipoic acid, and for the maturation of complexes I, II or III depending on the patients [49, 64]. *A. thaliana* encodes five NFU isoforms, two (NFU4 and NFU5) should be targeted to mitochondria, and three (NFU1, NFU2, and NFU3) are localized in chloroplasts [65, 66]. All these proteins share an NFU domain possessing a CXXC motif necessary for the binding of a [Fe_4S_4] in a dimer [67]. Chloroplastic isoforms have an additional NFU domain in the C-terminal extremity which does not have the cysteine residues, whereas mitochondrial isoforms have an additional N-terminal domain of unknown function (Fig. 2) [65, 68]. Loss-of-function *nfu2* and *nfu3* mutants have a dwarf phenotype with pale green leaves [69, 70]. By coupling chlorophyll fluorescence and P700 absorption measurements to western blot analyses, it was shown that this phenotype is due to the impairment of photosystem I (PSI) architecture and activity which is explained by a defect in the maturation of the three [Fe_4S_4] clusters assembled in the psaA, psaB, and psaC subunits. The only other notable and robust molecular default observed is that the SIR level and activity are decreased in *nfu2* [14, 65, 70, 71]. The fact that a double *nfu2-nfu3* mutant is lethal [69] indicates that both NFU isoforms should have partially overlapping functions. This raises also the question of their contribution relatively to the high chlorophyll fluorescence 101 (HCF101) protein, a plastidial 51 kDa protein belonging to the NTPase protein family (Fig. 2). The *hcf101 Arabidopsis* mutant plants have globally similar molecular defects, although this is exacerbated as the strongest allele is lethal at the seedling stage and the decrease in the amounts of PSI subunits is stronger, almost complete [72–74]. Besides, there is a decrease in the ferredoxin-thioredoxin reductase (FTR) levels, another [Fe_4S_4] protein [72]. Overall, in accordance with the capacity of *Arabidopsis* NFU2 and HCF101 to bind

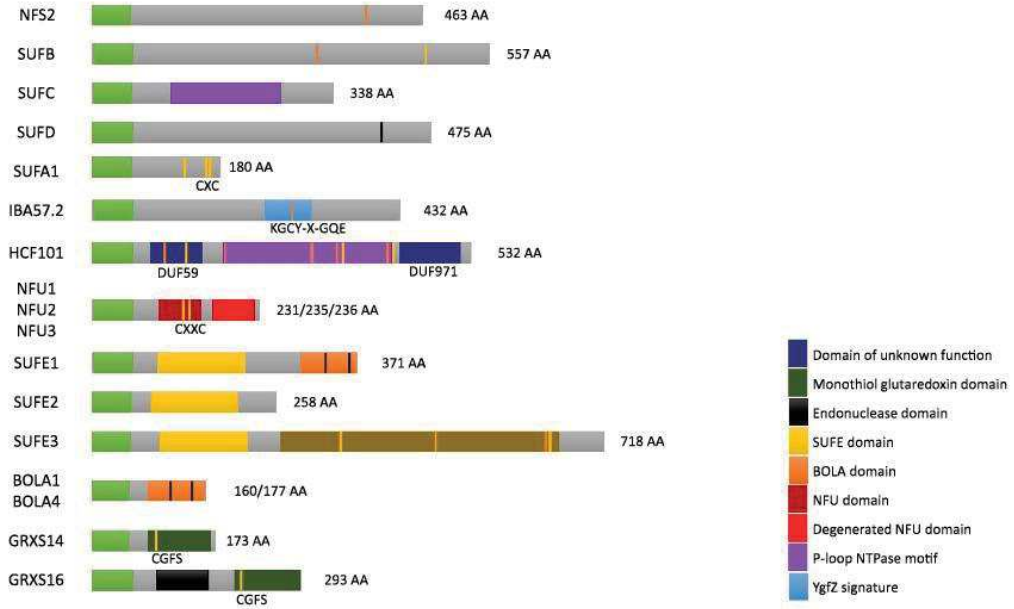


Fig. 2 Protein domain organization of SUF components. The domains (identified using pfam or the NCBI conserved domain tools) present in SUF components have been represented using the color code defined on the figure. Except for the chloroplastic targeting sequence (light green boxes), the domains are represented at scale, with the length in amino acids of the *Arabidopsis* proteins indicated. The Fe–S binding cysteine and histidine residues are represented in yellow and black, respectively, while other conserved cysteines are in orange, although their function is sometimes unclear if any

$[Fe_4S_4]$ cluster in vitro [67, 73], this indicates that all these proteins are required for the maturation of $[Fe_4S_4]$ proteins, particularly PSI subunits, and that HCF101 would act downstream of NFU2 and NFU3 (Fig. 1).

In summary, there are currently ten putative maturation factors in the SUF machinery for several dozens of plastidial client proteins. The role of some of these maturation factors still awaits confirmation not to speak about their connections and hierarchical organization. There is also an urgent need to learn more about how specificity towards target proteins is achieved and about the molecular and structural aspects of these interactions.

Functional diversity among client Fe–S proteins in plastids

Fe–S clusters in the functioning and protection of the photosynthetic electron transport chain

Among other functions, Fe–S clusters have a crucial role in electron transfer reactions, and thus, several Fe–S proteins are found in the thylakoid membrane as part of the photosynthetic electron transport chain. A Rieske-type Fe–S cluster, i.e., a $[Fe_2S_2]$ cluster ligated by two cysteines and two histidines, is found in the Rieske protein of the cytochrome b_6f complex. In the genome of eukaryotes and in some cyanobacteria, the Rieske protein is encoded by a single gene named photosynthetic electron transfer C (*petC*), whereas in most cyanobacteria, there are additional isoforms whose physiological function is still uncertain [75]. The absence of the petC proteins is lethal in the early developmental stages both in *A. thaliana* and cyanobacteria (Table 1) [75, 76]. Three low potential $[Fe_4S_4]$ clusters are attached to the thylakoid membrane but face the reducing, stromal side of PSI, and function in series. The first, referred to as F_X, is associated with a PsaA–PsaB heterodimer via cysteine residues, while the two others, named F_A and F_B, are bound to PsaC [77]. These clusters transfer electrons to FDXs, small soluble proteins, which contain a classical $[Fe_2S_2]$ cluster, e.g., rhombic cluster ligated by four cysteines. The nuclear genome of algae and plants harbours a variable number of *FDX* homologs, differentially expressed in plant organs or at different development stages or in response to different stimuli [78]. The *A. thaliana* genome contains four genes encoding four well-described plastidial *FDXs* (*Fd1* to *Fd4*) and at least two additional genes, referred to as *FdC1* and *FdC2*, encoding proteins bearing C-terminal extensions and whose functions remain elusive [79, 80]. In specific physiological situations such as

Table 1 Phenotypes of *A. thaliana* mutant lines for plastidial Fe–S proteins

Short Name	AGI number	Cluster type	Type of mutants	Mutant phenotypes	References
DHAD	At3g23940	$[Fe_2S_2]$	Knock-out	Embryo-lethal	Zhang et al. [149]
			Knock-down	Shorter root, hypersensitive to salt stress	
IPMI (LSU1)	At4g13430	$[Fe_4S_4]$	Knock-down	Pleiotropic growth abnormalities	Sureshkumar et al. [152], Knill et al. [151]
DWARF27.1	At1g03055	$[Fe_4S_4]$	Knock-down	Increase in axillary rosette branches	Waters et al. [168]
DWARF27.2	At1g64680	$[Fe_4S_4]$	Not yet described		
DWARF27.3	At4g01995	$[Fe_4S_4]$	Not yet described		
ISPG	At5g60600	$[Fe_4S_4]$	Knock-out	Albino phenotype, proplastid growth and thylakoid membrane formation affected	Gutiérrez-Nava et al. [163]
ISPH	At4g34350	$[Fe_4S_4]$	Knock-out	Albino phenotype, proplastid growth and thylakoid membrane formation affected	Gutiérrez-Nava et al. [163], Hsieh and Hsieh [165], Guevara-García et al. [164]
THIC	At2g29630	$2x\ [Fe_4S_4]$	Knock-down	Lethal (development arrested at the cotyledon stage with chlorotic phenotype)	Raschke et al. [140], Kong et al. [142]
NIR	At2g15620	$[Fe_4S_4]$, siroheme	X-ray mutagenesis	Lethal in barley unless a nitrogen source is provided	Duncanson et al. [120]
SIR	At5g04590	$[Fe_4S_4]$, siroheme	Knock-out	Lethal	Khan et al. [119]
			Knock-down	Early seedling lethal	Khan et al. [119]
SIRB	At1g50170	$[Fe_2S_2]$	Knock-out	Seedling lethal (post-germination arrest)	Saha et al. [126]
ATase1	At2g16570	$[Fe_4S_4]$	Knock-out	No phenotype	Hung et al. [144]
ATase2	At4g34740	$[Fe_4S_4]$	X-ray mutagenesis	Small and albino/pale reticulated leaves, cell division affected	Kinsman and Pyke [171], Hung et al. [144], van den Graaf et al. [146], Rosar et al. [172]
ATase3	At4g38880	$[Fe_4S_4]$	Not yet described		
APR1	At4g04610	$[Fe_4S_4]$	Not yet described		
APR2	At1g62180	$[Fe_4S_4]$	Knock-out	None but increased sensitivity to selenate tolerance	Grant et al. [173]
APR3	At4g21990	$[Fe_4S_4]$	Not yet described		
cLIP1	At5g08415	$2x\ [Fe_4S_4]$	Not yet described		
GLT1	At5g53460	$[Fe_3S_4]$	Knock-out	No phenotype but decreased chlorophyll content, growth defect under low CO_2	Lancien et al. [123]
GLU1	At5g04140	$[Fe_3S_4]$	Knock-down	Dwarf photorespiratory phenotype	Somerville and Ogren [125], Coschigano et al. [122], Lancien et al. [123]
GLU2	At2g41220	$[Fe_3S_4]$	Knock-down	No phenotype	Potel et al. [124]
DjC17	At5g23240	$[Fe_4S_4]$	Knock-out	Defective root hairs	Petti et al. [91]
DjC18	At2g42750	$[Fe_4S_4]$	Not yet described		
ndhI	AtCg01090	$2x\ [Fe_4S_4]$	Not yet described		
ndhK	AtCg00430	$[Fe_4S_4]$	Not yet described		
petC	At4g03280	rieske $[Fe_2S_2]$	Knock-out	Seedling lethal	Maiwald et al. [76]
psaA	AtCg00350	$[Fe_4S_4]$ with psaB	Not yet described		
psaB	AtCg00340	$[Fe_4S_4]$ with psaA	Not yet described		
psaC	AtCg01060	$2x\ [Fe_4S_4]$	Not yet described		

Table 1 (continued)

Short Name	AGI number	Cluster type	Type of mutants	Mutant phenotypes	References
TIC55	At2g24820	rieske [Fe_2S_2]	Knock-out	No phenotype	Boij et al. [106], Hauenstein et al. [104]
			Knock-down	No phenotype	Tanaka et al. [174]
PAO (ACD1)	At3g44880	rieske [Fe_2S_2]	Knock-out	Age- and light-dependent cell death phenotype in leaves and flowers. Stay-green phenotype in the dark	Pružinská et al. [114]
		rieske [Fe_2S_2]	Knock-down	Light-dependent lesion mimic phenotype, increased sensitivity to biotic and mechanic stresses	Greenberg and Ausubel [112], Yang et al. [175]
PTC52 (ACD1-like)	At4g25650	rieske [Fe_2S_2]	Knock-out	No phenotype	Boij et al. [106]
CMO	At4g29890	rieske [Fe_2S_2]	Not yet described		
CAO	At1g44446	rieske [Fe_2S_2]	X-ray mutagenesis	Pale green phenotype with no Chl b, highly photo-sensitive	Espineda et al. [103], Ramel et al. [107]
HCAR	At1g04620	2x [Fe_4S_4]	Knock-out	No phenotype, stay-green mutant upon dark exposure	Meguro et al. [108]
NEET	At5g51720	Neet-[Fe_2S_2]	Knock-down	Late bolting, early senescence	Nechushtai et al. [170]
SUFE3	At5g50210	[Fe_4S_4]	Knock-out	Lethal	Murthy et al. [18]
Fd1	At1g10960	[Fe_2S_2]	Knock-down	Enhanced linear electron flow	Hanke and Hase [72]
Fd2	At1g60950	[Fe_2S_2]	Knock-out	Growth arrest and inactivation of photosynthesis	Voss et al. [176]
			Knock-down	Lower biomass accumulation and retarded linear electron flow	Hanke and Hase [78]
Fd3	At2g27510	[Fe_2S_2]	Knock-down	Photoinhibition, with a reduction in maximum PSII yield following dark adaptation	Hanke and Hase [78]
Fd4	At5g10000	[Fe_2S_2]	Not yet described		
FdC1	At1g32550	[Fe_2S_2]	Not yet described		
FdC2	At4g14890	[Fe_2S_2]	EMS mutagenesis	Yellow–green leaf phenotype in rice	Li et al. [177]; Zhao et al. [178]
FTR	At2g04700	[Fe_4S_4]	Knock-out	Lethal	Wang et al. [97]
			Virus-induced silencing	Chlorosis, abnormal chloroplast development	Wang et al. [97]

All described phenotypes come from studies performed with *A. thaliana* unless otherwise stated in the "mutant phenotype" column

environmental constraints, FDXs can recycle electrons to the plastoquinone pool, contributing to the so-called cyclic electron flow [81]. The major cyclic pathway is dependent on the PGR5 (proton gradient regulation 5)/PGRL1 (PGR5-like photosynthetic phenotype 1) proteins [82]. The other involves the NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex. In higher plants, it forms a large complex associated with PSI, which is composed of 11 plastid-encoded subunits, some additional nuclear-encoded subunits, and auxiliary factors [83]. Among these, the NDH-I and NDH-K subunits bind two and one [Fe_4S_4] clusters, respectively [84]. While *Arabidopsis* knock-out mutants for *NDH-I* and *NDH-K* genes have not been characterized, tobacco knock-out mutants of *ndh* genes usually have no phenotype under standard conditions but are sensitive to environmental stresses [82].

In eukaryotic microalgae and cyanobacteria, an additional pathway directly coupled to the photosynthetic electron transport chain and involving hydrogenases allows the photoproduction of ATP at the expense of reductant synthesis in specific conditions such as the response to anaerobiosis or anoxia. *Chlamydomonas reinhardtii* contains two [FeFe]-hydrogenases, namely HYDA1 and HYDA2, which will produce molecular hydrogen H_2 from protons by accepting electrons from FDXs. These HYDA contain a complex Fe–S cluster at their active sites, the H-cluster that is essential for catalytic activity [85]. It consists of a classic [Fe_4S_4] cluster linked to a complex 2Fe sub-cluster [86]. Whereas the [Fe_4S_4] cluster is assembled by the regular SUF machinery, the sub-cluster requires specific maturation proteins, HYDE, HYDF, and HYDG, for this assembly. The HYDE and HYDG gene products are radical-SAM enzymes, whereas HYDF is a P-loop NTPase protein constituting a scaffold assembly platform. These proteins incorporate themselves [Fe_4S_4] clusters that are required for their activity.

As oxygenic photosynthesis releases massive amounts of oxygen from water, reactive oxygen species are routinely generated and damage some proteins in many physiological conditions. Thus, several proteins are implicated in the repair and protection of the photosystems and their antennae. One of these, photosystem II protein33 (PSB33), is an integral membrane protein, which contributes to the maintenance of PSII-light-harvesting complex II (LHCII) supercomplex organization in response to changing light levels [87]. Whereas the *Arabidopsis* protein is annotated as containing a Rieske-type Fe–S cluster by analogy to some bacterial counterparts, it does not have the Fe–S binding residues contrary to *C. reinhardtii* ortholog. Other *Chlamydomonas* proteins, referred to as CDJ3-5 for chloroplast-targeted DnaJ-like proteins, might be important for PSII protection. It was shown that CDJ3 and CDJ4 which interact with chloroplast ATP-bound HSP70B (heat-shock protein 70B) and are located either in the stroma or attached to thylakoids, respectively, are able to bind a [Fe_4S_4] cluster [88]. Based on the fact that HSP70B plays a role in the repair and protection of PSII (Photosystem II) from photoinhibition [89], and together with the CDJ2 paralog in the biogenesis/maintenance of thylakoid membranes [90], we could speculate that CDJ3-5 may have a similar role. However, this has not been addressed so far for *Arabidopsis* orthologs, DjC17 and DjC18. There is no biochemical information on these proteins and genetic evidence has been obtained only for DjC17, the mutation of which results in an altered root hair development and reduced hair length due to aberrant cortical cell division [91].

A multitude of ferredoxin-dependent Fe–S proteins and pathways

The formation of reducing equivalents

FDXs are soluble proteins positioned at a metabolic crossroad, controlling the electron flow necessary for CO_2 fixation, nitrogen, and sulfur assimilation but also chlorophyll metabolism to cite a few examples (Fig. 3). Their primary role is to transfer electrons to various acceptors in the stroma, in the thylakoids, and in the inner membrane, including a large variety of Fe–S proteins but also proteins containing heme and non-heme iron centers and flavoproteins [92, 93]. Among the latter category, ferredoxin-NADP reductase (FNR) may be the most important one, since it will drive most of these electrons for the regeneration of NAPDH, which will then supply in particular the Calvin–Benson cycle. It is worth nothing that a significant fraction of FNR is bound to the thylakoid membrane and it could participate to the cyclic electron flow via the PGR5-dependent pathway by interacting with PGLR1 and recruiting FDXs. Another enzyme crucial for carbon fixation and metabolism, in general, is the FTR. This key enzyme, which is almost uniquely found in photosynthetic organisms, catalyzes the reduction of most thioredoxins (TRXs) found in plastids, thus indirectly participating to the regulation of all TRX-dependent targets in a light-dependent manner [94]. FTR is a heterodimer composed of a catalytic and a variable subunit [95]. In *A. thaliana*, there is a single gene for the catalytic subunit (FTRB) but two for the variable subunits (FTRA1 and FTRA2). The function of the [Fe_4S_4] cluster found in the catalytic subunit is to aid for the reduction of a redox-active disulfide, which reduces, in turn, the TRX disulfide [96]. Given the numerous functions played by plastidial TRXs, it is not surprising that an *ftr* knock-out mutant for the catalytic subunit is lethal. However, a virus-induced gene silencing (VIGS) approach led to plants exhibiting a sectored chlorotic leaf phenotype [97]. It could be observed that these plants have (1) an abnormal chloroplast biogenesis, (2) a reduced photosynthetic performance as measured by the photochemical activities, the amount of assembled photosystems and

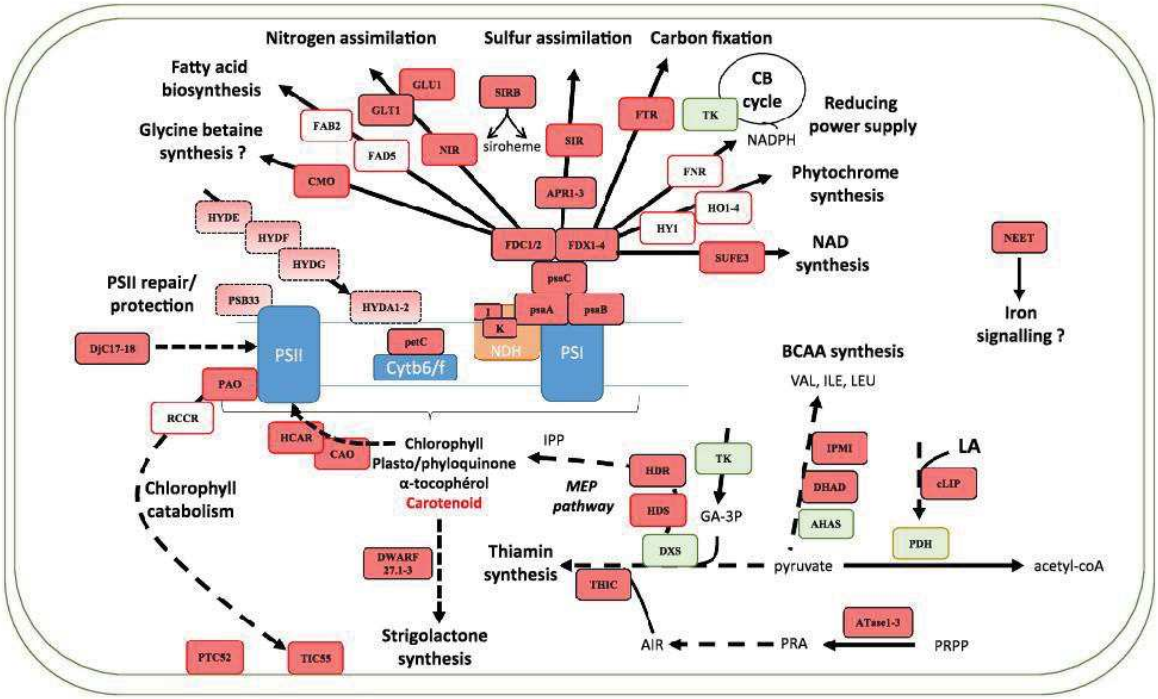


Fig. 3 Fe–S protein-dependent metabolic processes in plastids. Fe–S proteins are represented by dark red boxes. The light red boxes indicate specificities found in algae either, because they do not exist in terrestrial plants or in the case of PSB33, because only the algal isoforms should incorporate a Fe–S cluster. Known FDX-dependent enzymes have a red outline. Enzymes in green or outlined in orange use, respectively, thiamin or lipoic acid as cofactors. Note that PDH is dependent on both cofactors. For APR, DWARF, ATase, FDX, FDC, DjC, and HYDA1/2, there are several close isoforms which have not been distinguished. The nomenclature used is the one of *A. thaliana* except for algal enzymes whose name is from *C. reinhardtii*. Abbreviations for all enzyme names can be found in the text. Other abbreviations are: *LA* lipoic acid, *BCAA* branched-chain amino acids, *IPP* isopentenyl diphosphate, *GA-3P* glyceraldehyde 3-phosphate, *AIR* 5-aminoimidazole ribonucleotide, *PRA* phospho-ribosylamine, *PRPP* 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate

CO_2 assimilation rates, and (3) a defective PEP (plastid RNA polymerase)-dependent plastid gene expression, very likely because of FTR connection with TRX z [98]. Besides the redox regulation of carbon metabolism enzymes, other important functions of TRXs in chloroplasts are their participation to stress response by regenerating thiol-dependent peroxidases and methionine sulfoxide reductases [99] and to the chlorophyll metabolism by regulating several enzymes of the tetrapyrrole biosynthesis pathway [100].

Beyond tetrapyrrole: chlorophyll and phytochromobilin

Interestingly, several enzymes of the chlorophyll metabolism are FDX targets and/or possess Fe–S clusters. The 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase (HCAR) is an enzyme binding two [Fe_4S_4] clusters and an FAD [101]. Besides there are four non-heme oxygenases, namely, pheophorbide *a* oxygenase (PAO), chlorophyll *a* oxygenase (CAO), translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts 55 (TIC55), and protochlorophyllide (pchlide)-dependent translocon component of 52 kDa (PTC52) [102]. All possess a Rieske-type [Fe_2S_2] cluster and a mononuclear iron-binding domain. While the five enzymes are dependent on FDX, HCAR, CAO, and PTC52 are involved in chlorophyll synthesis, whereas PAO and TIC55 operate in its degradation. More precisely, CAO and HCAR are part of the chlorophyll cycle, the process of interconversion between chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. The balance between chlorophyll *a*/*b* is important for both the stabilization and turnover of chlorophyll in the light-harvesting complexes (LHCs) in diverse physiological situations, notably during greening and senescence when LHCII is massively synthesized or degraded. CAO is a thylakoid membrane-anchored enzyme catalyzing the two steps of chlorophyll *a*-to-chlorophyll *b* oxidation [103]. PTC52 would catalyze an analogous oxidation, but using protochlorophyllide *a* as substrate. However, PTC52 is localized at the envelope [104], suggesting that it may have another dispensable function, being part of a translocation complex for the import of the protochlorophyllide

oxidoreductase A (PORA) precursor in plastids [105]. Indeed, *A. thaliana ptc52* knock-out lines have a growth indistinguishable from wild-type plants (Table 1) [106]. On the contrary, an *Arabidopsis* mutant for *CAO*, named *chlorina1*, exhibits a pale green phenotype characterized by a chlorophyll *b* decrease [103] and is extremely sensitive to photooxidation due to the lack of chlorophyll–protein antenna complexes in PSII and to an increased production of singlet oxygen [107]. HCAR catalyzes the second half-reaction in chlorophyll *b*-to-chlorophyll *a* conversion, the first one being catalyzed by chlorophyll *b* reductases (CBR) [101]. While *hcar* mutants have no phenotype under standard growth conditions, they exhibit a stay-green phenotype after transfer to darkness (Table 1) [108].

In higher plants, chlorophyll is broken down to colourless linear tetrapyrroles in a series of reactions. One of these steps, the porphyrin ring opening of pheophorbide a, is catalyzed by PAO. This step occurs in senescent leaves and fruits, and requires FDXs and NADPH [109–111]. The PAO proteins possess a C-terminal transmembrane domain for their binding to the thylakoid membrane [104]. The *PAO* gene was identified by genetic studies and was initially referred to as accelerated cell death 1 (*ACD1*) in *Arabidopsis* [112] or *LLS1* (Lethal leaf spot 1) in maize [113]. Extinction of *PAO* in knock-out mutants or in antisense lines from different plant species leads to a light-dependent premature cell death phenotype, most likely due to cytotoxic effects of the increased pheophorbide *a* [109, 112, 114]. Similar to *hcar* mutants, *pao* mutants have a stay-green phenotype in dark [109, 114]. The product of the reaction catalyzed by PAO is red chlorophyll catabolite, which is then reduced by a FDX-dependent red chlorophyll catabolite reductase (RCCR) to yield the primary fluorescent chlorophyll catabolite (FCC), pFCC [115]. From this primary phyllobilin, a large variety of other phyllobilins is formed subsequently. Although a *tic55* mutant in *Arabidopsis* does not show any detectable phenotype, TIC55, which is localized in the inner membrane of the chloroplast envelope, is responsible for phyllobilin hydroxylation during senescence [104, 106]. This would be the last step in this subcellular compartment, and in that sense, TIC55 may contribute to chlorophyll catabolite export from plastids for their subsequent vacuolar detoxification.

A closely related molecule to chlorophyll and incidentally heme is phytochromobilin (PfB), the chromophore usually covalently bound to phytochromes of higher plants. All these molecules branch from protoporphyrin IX in the tetrapyrrole synthesis pathway. From the closed tetrapyrrole ring of heme, a heme oxygenase catalyzes the oxidative opening of this chain to yield biliverdin IXa. This molecule is then reduced into phytochromobilin by a PfB synthase. In higher plants, both types of enzymes are soluble and depend on FDXs for their activity [116, 117]. While PfB synthase is encoded by a single gene (*HY2*), the heme oxygenase is encoded by four members in *A. thaliana*, *HY1/HO1,* and *HO2-4* [118].

Macronutrient assimilation: similarities in nitrogen and sulfur assimilation pathways

The reductive assimilations of nitrogen and sulfur constitute two other chloroplastic metabolic processes, which rely on FDX-dependent Fe–S proteins. As already presented, sulfate assimilation is extremely important, because it provides cysteine, which is the source of sulfur for many molecules but also the substrate of cysteine desulfurases and a protein ligand in all plastidial Fe–S proteins known so far. Of the four enzymes/complexes, which allow forming cysteine from sulfate, two possess a Fe–S cluster. The second reaction, e.g, the transformation of adenosine 5′ phosphosulfate (APS) to sulfite, is catalyzed by adenosine 5′-phosphosulfate reductases (APR). There are three isoforms in *A. thaliana*, APR1-3, all localized in plastids. The enzymes are formed by two domains, a reductase domain, that bears a $[Fe_4S_4]$ cluster, and a GRX domain at the C-terminus, that makes these enzymes glutathione-dependent [10]. The SIR catalyzes the next step, the six electron reduction of sulfite to sulfide. This FDX-dependent enzyme incorporates a siroheme, e.g, a heme whose iron atom is liganded by the thiolate ligand of a $[Fe_4S_4]$ cluster, which is crucial for its activity. There is a single, essential, *SIR* gene in *Arabidopsis* and the protein is found exclusively in plastids. A weak allele mutant with about 25% SIR activity is viable but has a strongly retarded growth, pointing to the extreme importance of this enzyme for plant development [119].

The assimilation of inorganic nitrogen (mostly in the form of nitrate and ammonium) is another essential process for plants taking place in part in plastids. Nitrate will be reduced in two steps. The first one, catalyzed by nitrate reductase, gives nitrite, which is reduced to ammonia by a FDX-dependent nitrite reductase (NIR). As the SIR enzyme, NIR binds a siroheme that is mandatory for the six electron reduction of nitrite. This gene is also essential, since a mutant in barley does not grow in the absence of an external nitrogen source [120]. In the next steps, ammonia, including the part coming from the photorespiration process, is assimilated via glutamine synthetase (GS) which catalyzes the condensation of glutamate and ammonia into glutamine and via glutamate synthase (GOGAT) which forms two molecules of glutamate from glutamine and 2-oxoglutarate. There is evidence that NIR, GS, and GOGAT can form a complex within the chloroplast [121]. Plants possess two forms of chloroplastic GOGAT, which are dependent either on NADH or on FDX. All contain an FMN and a $[Fe_3S_4]$ cluster. In *A. thaliana*, NADH-GOGAT is encoded by a unique gene (*GLT1*), whereas two genes encode Fd-GOGAT (*GLU1* and *GLU2*),

GLU1 is the predominant form in leaves [122]. *Arabidopsis* mutants for *GLU2* and *GLT1* have no growth phenotype, although a decrease in the chlorophyll content was measured in the *glt1* mutant [123, 124]. An *Arabidopsis* mutant for *GLU1* has a respiratory phenotype, i.e, a dwarf and chlorotic phenotype in air which is no longer visible under high CO_2 conditions [122, 123, 125]. Of importance for these pathways, it is worth mentioning that sirohydrochlorin ferrochelatase (SIRB), the enzyme responsible for the last step of siroheme biosynthesis by inserting ferrous iron into the tetrapyrrole ring of sirohydrochlorin, is a [Fe_2S_2] enzyme unlike bacterial orthologs. In this essential protein, the Fe–S cluster is not mandatory for the enzymatic reaction, but it might have a regulatory role [126].

Fatty acid biosynthesis

The biosynthesis of fatty acids is another crucial pathway occurring in plastids, which depends directly or indirectly on Fe–S proteins. First, the acetyl-coenzyme A, that is used as a building block for fatty acids, is generated by the plastidial pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, its E2 subunit being lipoylated and thus dependent on the Fe–S containing lipoate synthase (see below). After the synthesis of saturated fatty acids, their conversion to unsaturated forms, which are required for membrane fluidity, is catalyzed by fatty acid desaturases. Some of them contain a di-iron center and are FDX-dependent proteins [127]. The FAB2 protein is a soluble stearoyl-ACP desaturase introducing the first double bond into stearoyl-ACP between carbons 9 and 10 to produce oleoyl-ACP (18:1 Delta9-ACP). The FAD5 protein attached to the chloroplast envelope inner membrane catalyzes the earliest step of 16:0 desaturation initiating the very rapid 16:0–16:1–16:2–16:3 desaturation of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), one of the four main classes of glycerolipids found in the photosynthetic membranes of higher plant chloroplasts with the digalactosyldiacylglycerol (DGDG), the phospholipid phosphatidylglycerol (PG), and the sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) [128]. Other plastidial linoleate/oleate desaturases (FAD4, 6, 7, 8) and the numerous FAD5-like proteins may also be dependent on FDX as they also probably contain di-iron centers.

Other metabolic processes

Additional FDX-dependent proteins are present in chloroplasts. Besides PAO, CAO, PTC52, and TIC55, the fifth non-heme oxygenase found in plants [102] is referred to as choline monooxygenase (CMO), because it was found to catalyze the oxidation of choline, the first step of glycine betaine biosynthesis in spinach [129]. However, this might not be the sole or main function, since *Arabidopsis* does not produce glycine betaine and expression of the *Arabidopsis* CMO-like gene in *E. coli* does not promote betaine synthesis [130]. This protein is unique to eukaryotic photosynthetic organisms as it is not found in cyanobacteria, supporting a recent evolution of this enzyme. No *Arabidopsis* mutant has been characterized so far, but antisense *CMO* transgenic sugar beet plants are susceptible to salt stress [131].

To conclude on this part, it is important to note that most of these enzymes are also expressed in plastids of non-photosynthetic tissues. In this context, FDXs are maintained reduced by FNR and NADPH generated in the oxidative pentose phosphate pathway, the reverse reaction compared to photosynthetic organs. A few other enzymes such as (1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate synthase (HDS), zeaxanthine epoxidase, and β-carotene 3 hydroxylase 1, 2) have been also described as FDX-dependent proteins, but they will be discussed in the next sections. However, several additional proteins or pathways are yet unidentified. It is for instance worth mentioning that studies devoted to the isolation of FDX partners by proteomic approaches led to the identification of novel putative targets at least in cyanobacteria and *Chlamydomonas* [132, 133]. In this respect, a pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO), found in many unicellular eukaryotes, decarboxylates pyruvate to acetyl-coenzyme at the expense of FDXs [134]. The *C. reinhardtii* PFO possesses three distinct [Fe_4S_4] clusters. It may also contribute to the light-independent H_2 production by passing electron to the hydrogenase [135].

Biosynthesis of lipoic acid and thiamin cofactors and their dependent pathways

Requirement of two atypical radical-SAM enzymes

Beyond their role in electron transfer, Fe–S clusters are also important for enzyme catalysis, especially during the biosynthesis of vitamin B1/thiamin and of lipoic acid. Whereas thiamin is only synthesized in chloroplasts a lipoic acid biosynthesis pathway is present in both plastids and mitochondria. This is consistent with the existence of two distinct genes encoding a mitochondrial (mLIP) and a chloroplastic (cLIP) lipoate synthase [136].

Lipoic acid is synthesized from octanoic acid and thus via the fatty acid biosynthesis pathway by the addition of two sulfur atoms into the octanoyl group bound to an acyl carrier protein (ACP) via a radical-SAM mechanism. This reaction is catalyzed by lipoic acid synthase [136]. It is important to note that lipoic acid is synthesized attached to proteins and no free lipoic acid is produced. The *E. coli* Lip5 binds two [Fe_4S_4] clusters [137]. One cluster, coordinated by cysteines present in a Cx_3Cx_2C motif common to all classical radical-SAM enzymes, is required for the formation of the activated adenosyl radical from SAM molecules. The second cluster, coordinated by a Cx_4Cx_5C motif specific of lipoic acid

synthases, was suggested to provide the sulfur atoms and thus to be degraded at each turnover of the enzyme. The presence of a Fe–S cluster has not yet been demonstrated in plant cLIP, but *Arabidopsis* cLIP possesses both cysteine motifs and is able to complement the *E. coli lip5* mutant [136]. Plants impaired in *cLIP* have not been characterized yet, but *Arabidopsis* mutants for genes involved in the synthesis of lipoic acid in mitochondria are lethal [138].

Thiamin is made of pyrimidine and thiazole heterocycles, both being synthesized in the chloroplast. The synthesis of the thiazole moiety involves a 4-methyl-5-*b*-hydroxyethylthiazole phosphate (HET-P) synthase (THI1) forming an adenylated thiazole intermediate (ADT) at the expense of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and glycine, ADT, which is then hydrolyzed to HET-P [139]. The pyrimidine heterocycle is derived from purine biosynthesis. The first step in the synthesis of the pyrimidine moiety is catalyzed by the 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine phosphate (HMP-P) synthase (THIC), a radical-SAM Fe–S enzyme that forms HMP-P from 5-aminoimidazole ribonucleotide (AIR) and SAM. In contrast to canonical radical-SAM enzymes, all THIC proteins harbour a Cx_2Cx_4C motif involved in the binding of a $[Fe_4S_4]$ cluster in their C-terminal part [140, 141]. Then, an HMP-P kinase/thiamin monophosphate (ThMP) pyrophosphorylase (TH1) phosphorylates HMP-P to HMP-PP but also condenses the latter compound to HET-P to form ThMP. This ThMP is transformed into the diphosphate form ThDP in the cytosol through the action of two consecutive enzymes before being redistributed to mitochondria and plastids. THIC is encoded by a single essential gene in *Arabidopsis* [140]. An *Arabidopsis thic* mutant is lethal at the cotyledon stage unless supplemented with thiamin [140, 142]. Another family of plastidial Fe–S enzymes is linked indirectly to thiamin biosynthesis, because they catalyze the first committed step of the de novo synthesis of purine in chloroplasts. The glutamine phosporibosyl pyrophosphate amidotransferases (ATases, also known as GPAT) catalyze the amination of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) to 5-phosphoribosylamine (PRA) with the concomitant conversion of glutamine into glutamate [143]. After four additional steps, PRA is transformed into AIR, the THIC substrate. In *Arabidopsis*, ATase is encoded by a family of three genes (*ATase1* to *ATase3*) which are expressed in various tissues at different levels [144, 145]. Whereas *E. coli* ATase does not require a Fe–S cluster as cofactor, the human enzyme uses a $[Fe_4S_4]$ cluster. Based on the conservation of the involved cysteines, the three *A. thaliana* isoforms should also bind a Fe–S cluster. Whereas *Arabidopsis ATase1* mutant has no growth phenotype mutants lacking *ATase2* exhibit strong growth retardation with bleached leaves (Table 1) [144]. In the latter mutant exhibiting a decreased capacity in chloroplast protein import, cells are smaller in size [144, 146].

A single lipoic acid-dependent enzyme but several thiamin-dependent enzymes in plastids

In plastids, the only known lipoic acid-dependent enzyme is PDH. A similar complex is found in plant mitochondria, but it uses lipoic acid synthesized in this compartment, as does another citric acid cycle enzyme, the α-ketoglutarate dehydrogenase or 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, but also two complexes involved in the amino acid metabolism, the glycine cleavage complex, and the branched-chain oxoacid dehydrogenase (BCDH) complex. On the other hand, there is a single pathway for the synthesis of ThDP which is used as a coenzyme by many enzymes of the primary metabolism, notably involved in the catabolism of sugars and amino acids, and found in the chloroplasts, mitochondria, and cytosol [139]. In plastids, besides the PDH complex, thiamin is also a cofactor for transketolase (TK) of both the Calvin–Benson cycle and the non-oxidative pentose phosphate pathway, for 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) of the methylerythritol phosphate (MEP) pathway and for acetohydroxy acid synthase (AHAS) of the branched-chain amino acid (BCAA) biosynthesis pathway [139].

The central pyruvate dehydrogenase complex PDH catalyzes the decarboxylation of pyruvate into acetyl-coA that is used in particular for fatty acid synthesis as already mentioned [128]. It consists of three subunits, E1–E3, each requiring a different cofactor. Thiamin is bound to the pyruvate dehydrogenase subunit (E1), whereas the lipoic acid is covalently attached to the dihydrolipoyl acyltransferase subunit (E2) and an FAD is bound to the dihydrolipoamide dehydrogenase subunit (E3). The attached lipoyl moiety functions as a carrier of reaction intermediates among the active sites of the components of the complex. The E3 subunit has a key regulatory role by reoxidizing the lipoamide cofactor and thus completing the catalytic cycle. The disruption of the gene encoding the E2 subunit of plastidial PDH results in an early embryo-lethal phenotype in *Arabidopsis* [147].

Branched-chain amino acid biosynthesis The AHAS protein is involved in the first steps of BCAA biosynthesis. This is a heterodimer, composed of separate catalytic and regulatory subunits, which catalyzes the conversion of two molecules of pyruvate into 2-acetolactate used for valine and leucine synthesis or of one molecule of pyruvate and one molecule of 2-oxobutanoate into 2-aceto-2-hydroxybutyrate used for isoleucine synthesis [148]. Interestingly, two Fe–S enzymes named dihydroxyacid dehydratase (DHAD) and isopropylmalate isomerase (IPMI) are also required for BCAA synthesis. DHAD catalyzes the penultimate step before the formation of isoleucine and

valine, e.g., the dehydration of 2,3-dihydroxy-3-isovalerate or 2,3-dihydroxy-3-methylvalerate to the 2-oxo acids (3-methyl-2-oxobutanoate or 3-methyl-2-oxopentanoate). In *Arabidopsis*, there is a single essential gene for DHAD [149]. However, *Arabidopsis* mutants with intermediate DHAD levels obtained by an RNAi approach indeed have reduced amounts of BCAA in roots, which cause a short root phenotype [149]. The only biochemical characterization performed so far has been done with an enzyme purified from spinach leaves. Unlike the *E. coli* enzyme, which incorporates a [Fe_4S_4] center, the spinach enzyme incorporates a [Fe_2S_2] cluster required for activity [150]. Leucine biosynthesis requires an additional Fe–S enzyme for the late reactions. The isopropylmalate isomerase catalyzes the reversible conversion of 2-isopropylmalate into 3-isopropylmalate. In plants, IPMI consists of a heterodimer composed of a large (LSU) and a small (SSU) subunit encoded by one and three genes in *A. thaliana,* respectively [151]. The genetic analyses demonstrated that *A. thaliana* knock-down mutants for the large subunit, which binds a [Fe_4S_4] center, display a severe delay in development [151, 152]. Concerning small subunits, the SSU1 protein is required for viability, unlike SSU2 and SSU3, which might be redundant, because *A. thaliana* mutants have no phenotype [151, 153]. In addition to a role in leucine biosynthesis, IPMI is involved in the biosynthesis of glucosinolates, sulfur-containing secondary metabolites, serving for defence reactions. This is consistent with the fact that an identical reaction type exists for the Met chain elongation cycle for glucosinolate formation and that *A. thaliana* mutant plants for the large subunit accumulate both Leu biosynthesis and Met chain elongation intermediates [151].

Isoprenoid biosynthesis and its derived molecules Isoprenoids are very diverse metabolites, central to plant development. We have already discussed the biosynthesis of chlorophylls, which consist of a tetrapyrrole ring with an attached isoprenoid-derived phytol chain, but many other isoprenoids are present in plastids such as α-tocopherol, phylloquinone, plastoquinone, and carotenoids to cite only the most important. Moreover, several plant hormones are derived from carotenoids. All isoprenoids are derived from a prenyl diphosphate (prenyl-PP) precursor, which is synthesized by two independent pathways, the cytosolic mevalonate (MVA) pathway, and the plastidial 2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway [154]. The latter pathway is dependent on both Fe–S and thiamin (TK and DXS)-dependent enzymes. In *E. coli*, the Fe–S proteins belonging to this MEP pathway are the only one that are completely essential. Indeed, the lethality of *sufa-isca* and *erpa* mutants observed under aerobiosis is suppressed by expressing the eukaryotic mevalonate pathway, which does not rely on Fe–S proteins [54, 155].

Besides its involvement in the Calvin–Benson cycle where it catalyzes the formation of ribose-5-phosphate and xylulose-5-phosphate from sedoheptulose-7-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate (GA-3P), TK operates in the opposite direction in the non-oxidative pentose phosphate pathway, forming GA-3P, which is then condensed to pyruvate to form 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP), a reaction catalyzed by DXP synthase (DXS). Although poorly characterized in plants, it was demonstrated that antisense tobacco plants with variable TK levels have a marked shoot weight decrease [156]. For the most affected lines, a decrease in chlorophylls and carotenoids was measured which is consistent with the importance of DXP for the MEP pathway. Surprisingly, overexpression of an *A. thaliana* chloroplastic TK in tobacco leads to chlorosis, which is annihilated by thiamin supplementation [157]. In *A. thaliana*, *DXS* is an essential gene [158]. In sense and antisense *Arabidopsis* lines exhibiting altered levels of DXS, both the chlorophylls, carotenoids, tocopherols, gibberellin, and abscisic acid contents and the growth and germination rate are slightly affected [159]. Finally, downstream of DXS, two Fe–S proteins are required to form two key intermediates in isoprenoid biosynthesis: isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). Both the 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate synthase (HDS/ISPG) and the 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase (HDR/ISPH/LytB) bind a [Fe_4S_4] cluster [160, 161], FDX being able to provide electrons to HDS [162]. Plant mutants disrupted in *ISPG* or *ISPH* gene have a severely impaired chloroplastic development that causes an albino phenotype [163–165].

At least two enzymes participating in the carotenoid biosynthesis pathways are dependent on FDXs. Without describing all the steps, the β-carotene 3 hydroxylase 1, 2 which contains a di-iron center catalyzes two successive steps, the transformation of all-trans β-carotene to β-cryptoxanthin and then to zeaxanthin. Then, the flavoprotein zeaxanthin epoxidase catalyzes the conversion of zeaxanthin to antheraxanthin and then to violaxanthin [166]. These four steps require oxygen and FDX as an electron donor. Other proteins in this pathway might, in fact, be dependent on FDXs. For instance, there are several cytochrome P450 monooxygenases participating in this pathway (and other pathways) in plastids, whose electron donors/acceptors are yet unknown.

Derived from carotenoids, strigolactones (SL) are plant hormones having diverse functions in plant growth and development. Their biosynthesis begins with the conversion of all-trans β-carotene to 9-*cis*-β-carotene, a reaction performed by a β-carotene isomerase named DWARF27. This protein, found from algae to higher plants, and first

characterized in rice is a Fe–S enzyme [167]. The *Arabidopsis* genome encodes three orthologs. An *Arabidopsis* mutant for one of these genes and a rice mutant have shoot branching phenotypes, but it remains relatively weak compared to other mutants affected in SL biosynthesis [168].

Are there other plastidial Fe–S proteins to discover?

Some Fe–S proteins, such as NEET, have been recently identified or characterized in plants. Unlike mitoNEET, which is bound to the outer membrane of mitochondria in animals owing to a membrane anchoring extension, the *Arabidopsis* NEET protein is located exclusively in the chloroplast stroma [169]. As its vertebrate counterparts, *Arabidopsis* NEET forms dimers; each monomer harbouring an atypical [Fe_2S_2] cluster coordinated by three Cys and one His [170]. While obtaining knock-out plants may have been hampered by the fact, it is an essential gene, *Arabidopsis* lines with reduced *AtNEET* transcript levels exhibit late greening, delayed bolting, and early senescence. Moreover, these plants accumulate ROS and have an altered sensitivity to Fe levels, which led to the proposal that AtNEET likely plays a role in the regulation of Fe homeostasis [170]. From its capacity to transfer its Fe–S cluster to a FDX in vitro [170], it may be hypothesized that NEET could be part of the SUF machinery and facilitate the trafficking of Fe–S clusters towards certain client proteins.

Another reason why we expect to discover novel Fe–S proteins is that some proteins may be specific to photosynthetic organisms because of their atypical structure organization or their involvement in specific plastidial functions. An interesting example in this regard is SUFE3, a chimeric protein formed by an SUFE domain fused to a quinolinate synthase domain, NADA [18]. This enzyme, which carries a [Fe_4S_4] cluster indispensable for its activity and thus crucial for NAD biosynthesis, is the sole NADA representative of *A. thaliana*. The fact that the Fe–S cluster in SUFE3 can be reconstituted using its own SUFE domain in the presence of NFS2, cysteine, and ferrous iron may render this protein independent on the SUFBCD scaffold complex [18].

Other Fe–S protein-dependent processes likely remain to be identified in plastids as in other subcellular compartments. For instance, the affinity purification strategy used for cyanobacterial and algal enzymes indicates that numerous FDX-dependent processes await identification [132, 133]. The same is true in mitochondria where the roles and partners of the two FDXs are unknown. On the other hand, novel Fe–S proteins will be undoubtedly identified in the future thanks to the dozens of annotated sequenced genomes now available for model plants and to the ever larger collections of available *Arabidopsis* mutants. The reasons why it is not trivial to isolate them is that the sensitivity of these metallic cofactors to oxygen may hamper the isolation of holoproteins and predictions of Fe–S proteins from the protein primary sequences are often impossible, because there is no universal signature for identifying Fe–S cluster ligands.

Acknowledgements The work of both laboratories is supported by the Agence Nationale de la Recherche, Grant no. ANR-2013-BSV6-0002-01. The UMR 1136 is also supported by a Grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). This publication is based upon work from COST Action CA15133, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). The authors are grateful to Pr Jean-Pierre Jacquot for its careful reading of the manuscript.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license and indicate if changes were made.

References

1. Briat J-F, Ravet K, Arnaud N et al (2010) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. Ann Bot 105:811–822. https://doi.org/10.1093/aob/mcp128
2. Brumbarova T, Bauer P, Ivanov R (2015) Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. Trends Plant Sci 20:124–133. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.004
3. Jeong J, Guerinot ML (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. Trends Plant Sci 14:280–285. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.02.006
4. Solti Á, Kovács K, Müller B et al (2016) Does a voltage-sensitive outer envelope transport mechanism contributes to the chloroplast iron uptake? Planta 244:1303–1313. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2586-3
5. Jeong J, Cohu C, Kerkeb L et al (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. PNAS 105:10619–10624. https://doi.org/10.1073/pnas.0708367105
6. Duy D, Wanner G, Meda AR et al (2007) PIC1, an ancient permease in Arabidopsis chloroplasts, mediates iron transport. Plant Cell 19:986–1006. https://doi.org/10.1105/tpc.106.047407
7. Duy D, Stübe R, Wanner G, Philippar K (2011) The chloroplast permease PIC1 regulates plant growth and development by directing homeostasis and transport of iron. Plant Physiol 155:1709–1722. https://doi.org/10.1104/pp.110.170233
8. Shimoni-Shor E, Hassidim M, Yuval-Naeh N, Keren N (2010) Disruption of Nap14, a plastid-localized non-intrinsic ABC protein in *Arabidopsis thaliana* results in the over-accumulation of transition metals and in aberrant chloroplast structures. Plant Cell Environ 33:1029–1038. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02124.x
9. Tarantino D, Morandini P, Ramirez L et al (2011) Identification of an Arabidopsis mitoferrinlike carrier protein involved in Fe metabolism. Plant Physiol Biochem 49:520–529. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.02.003
10. Takahashi H, Kopriva S, Giordano M et al (2011) Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. Annu Rev

Plant Biol 62:157–184. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103921
11. Cao M-J, Wang Z, Wirtz M et al (2013) SULTR3;1 is a chloroplast-localized sulfate transporter in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 73:607–616. https://doi.org/10.1111/tpj.12059
12. Couturier J, Touraine B, Briat J-F et al (2013) The iron–sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. Front Plant Sci 4:259. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00259
13. Balk J, Schaedler TA (2014) Iron cofactor assembly in plants. Annu Rev Plant Biol 65:125–153. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035759
14. Hu X, Kato Y, Sumida A et al (2017) The SUFBC2D complex is required for the biogenesis of all major classes of plastid Fe–S proteins. Plant J 90:235–248. https://doi.org/10.1111/tpj.13483
15. Pilon-Smits EAH, Garifullina GF, Abdel-Ghany S et al (2002) Characterization of a NifS-like chloroplast protein from Arabidopsis. implications for its role in sulfur and selenium metabolism. Plant Physiol 130:1309–1318. https://doi.org/10.1104/pp.102.010280
16. Léon S, Touraine B, Briat J-F, Lobréaux S (2002) The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. Biochem J 366:557–564. https://doi.org/10.1042/BJ20020322
17. Roret T, Pégeot H, Couturier J et al (2014) X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun 70:1180–1185. https://doi.org/10.1107/S2053230X14017026
18. Murthy NMU, Ollagnier-de-Choudens S, Sanakis Y et al (2007) Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3 functions in chloroplast iron–sulfur cluster assembly and NAD synthesis. J Biol Chem 282:18254–18264. https://doi.org/10.1074/jbc.M701428200
19. Ye H, Abdel-Ghany SE, Anderson TD et al (2006) CpSufE activates the cysteine desulfurase CpNifS for chloroplastic Fe–S cluster formation. J Biol Chem 281:8958–8969. https://doi.org/10.1074/jbc.M512737200
20. Outten FW, Wood MJ, Muñoz FM, Storz G (2003) The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe–S cluster assembly in *Escherichia coli*. J Biol Chem 278:45713–45719. https://doi.org/10.1074/jbc.M308004200
21. Xu XM, Møller SG (2006) AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in Arabidopsis. EMBO J 25:900–909. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600968
22. Van Hoewyk D, Abdel-Ghany SE, Cohu CM et al (2007) Chloroplast iron–sulfur cluster protein maturation requires the essential cysteine desulfurase CpNifS. PNAS 104:5686–5691. https://doi.org/10.1073/pnas.0700774104
23. Cory SA, Van Vranken JG, Brignole EJ et al (2017) Structure of human Fe–S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISD11 interactions. PNAS 114:E5325–E5334. https://doi.org/10.1073/pnas.1702849114
24. Boniecki MT, Freibert SA, Mühlenhoff U et al (2017) Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. Nat Commun 8:1287. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01497-1
25. Layer G, Gaddam SA, Ayala-Castro CN et al (2007) SufE transfers sulfur from SufS to SufB for iron–sulfur cluster assembly. J Biol Chem 282:13342–13350. https://doi.org/10.1074/jbc.M608555200
26. Hirabayashi K, Yuda E, Tanaka N et al (2015) Functional dynamics revealed by the structure of the SufBCD complex, a novel ATP-binding cassette (ABC) protein that serves as a scaffold for iron–sulfur cluster biogenesis. J Biol Chem 290:29717–29731. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680934
27. Yuda E, Tanaka N, Fujishiro T et al (2017) Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron–sulfur clusters. Sci Rep. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09846-2
28. Blanc B, Clémancey M, Latour J-M et al (2014) Molecular investigation of iron–sulfur cluster assembly scaffolds under stress. Biochemistry 53:7867–7869. https://doi.org/10.1021/bi5012496
29. Saini A, Mapolelo DT, Chahal HK et al (2010) SufD and SufC ATPase activity are required for iron acquisition during in vivo Fe–S cluster formation on SufB. Biochemistry 49:9402–9412. https://doi.org/10.1021/bi1011546
30. Wollers S, Layer G, Garcia-Serres R et al (2010) Iron–sulfur (Fe–S) cluster assembly the SufBCD complex is a new type of Fe–S scaffold with a flavin redox cofactor. J Biol Chem 285:23331–23341. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.127449
31. Ravet K, Touraine B, Boucherez J et al (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. Plant J 57:400–412. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x
32. Parent A, Elduque X, Cornu D et al (2015) Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. Nat Commun 6:5686. https://doi.org/10.1038/ncomms6686
33. Colin F, Martelli A, Clémancey M et al (2013) Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. J Am Chem Soc 135:733–740. https://doi.org/10.1021/ja308736e
34. Buchensky C, Sánchez M, Carrillo M et al (2017) Identification of two frataxin isoforms in *Zea mays*: structural and functional studies. Biochimie 140:34–47. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.011
35. Turowski VR, Aknin C, Maliandi MV et al (2015) Frataxin is localized to both the chloroplast and mitochondrion and is involved in chloroplast Fe–S protein function in Arabidopsis. PLoS One 10:e0141443. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141443
36. Maliandi MV, Busi MV, Turowski VR et al (2011) The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants. FEBS J 278:470–481. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07968.x
37. Söderberg C, Gillam ME, Ahlgren E-C et al (2016) The structure of the complex between yeast frataxin and ferrochelatase: characterization and pre-steady state reaction of ferrous iron delivery and heme synthesis. J Biol Chem 291:11887–11898. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701128
38. Dhalleine T, Rouhier N, Couturier J (2014) Putative roles of glutaredoxin-BolA holo-heterodimers in plants. Plant Signal Behav 9:e28564. https://doi.org/10.4161/psb.28564
39. Roret T, Tsan P, Couturier J et al (2014) Structural and spectroscopic insights into BolA-glutaredoxin complexes. J Biol Chem 289:24588–24598. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.572701
40. Braymer JJ, Lill R (2017) Iron–sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. J Biol Chem 292:12754–12763. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.787101
41. Brancaccio D, Gallo A, Piccioli M et al (2017) [4Fe–4S] cluster assembly in mitochondria and Its impairment by copper. J Am Chem Soc 139:719–730. https://doi.org/10.1021/jacs.6b09567
42. Brancaccio D, Gallo A, Mikolajczyk M et al (2014) Formation of [4Fe–4S] clusters in the mitochondrial iron–sulfur cluster assembly machinery. J Am Chem Soc 136:16240–16250. https://doi.org/10.1021/ja507822j
43. Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM et al (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. EMBO J 27:1122–1133. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.50
44. Rey P, Becuwe N, Tourrette S, Rouhier N (2017) Involvement of Arabidopsis glutaredoxin S14 in the maintenance of

chlorophyll content. Plant Cell Environ 40:2319–2332. https://doi.org/10.1111/pce.13036
45. Moseler A, Aller I, Wagner S et al (2015) The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron–sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. PNAS 112:13735–13740. https://doi.org/10.1073/pnas.1510835112
46. Li H, Outten CE (2012) Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe–2S] binding partners in iron homeostasis. Biochemistry 51:4377–4389. https://doi.org/10.1021/bi300393z
47. Melber A, Na U, Vashisht A et al (2016) Role of Nfu1 and Bol3 in iron–sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. eLife. https://doi.org/10.7554/elife.15991
48. Uzarska MA, Nasta V, Weiler BD et al (2016) Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron–sulfur proteins. eLife. https://doi.org/10.7554/elife.16673
49. Cameron JM, Janer A, Levandovskiy V et al (2011) Mutations in iron–sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. Am J Hum Genet 89:486–495. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.011
50. Couturier J, Wu H-C, Dhalleine T et al (2014) Monothiol glutaredoxin–BolA interactions: redox control of *Arabidopsis thaliana* BolA2 and SufE1. Mol Plant 7:187–205. https://doi.org/10.1093/mp/sst156
51. Couturier J, Przybyla-Toscano J, Roret T et al (2015) The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: sensing, transfer or repair functions? Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1853:1513–1527. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018
52. Mapolelo DT, Zhang B, Naik SG et al (2012) Spectroscopic and functional characterization of iron–sulfur cluster-bound forms of *Azotobacter vinelandii* NifIscA. Biochemistry 51:8071–8084. https://doi.org/10.1021/bi3006658
53. Tanaka N, Kanazawa M, Tonosaki K et al (2015) Novel features of the ISC machinery revealed by characterization of *Escherichia coli* mutants that survive without iron–sulfur clusters. Mol Microbiol. https://doi.org/10.1111/mmi.13271
54. Vinella D, Brochier-Armanet C, Loiseau L et al (2009) Iron–sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomic and genetic studies of A-type carriers. PLoS Genet 5:e1000497. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000497
55. Abdel-Ghany SE, Ye H, Garifullina GF et al (2005) Iron–sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. Involvement of the scaffold protein CpIscA. Plant Physiol 138:161–172. https://doi.org/10.1104/pp.104.058602
56. Yabe T, Nakai M (2006) Arabidopsis AtIscA-I is affected by deficiency of Fe–S cluster biosynthetic scaffold AtCnfU-V. Biochem Biophys Res Commun 340:1047–1052. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.104
57. Mapolelo DT, Zhang B, Randeniya S et al (2013) Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe–S cluster trafficking. Dalton Trans 42:3107. https://doi.org/10.1039/c2dt32263c
58. Gelling C, Dawes IW, Richhardt N et al (2008) Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. Mol Cell Biol 28:1851–1861. https://doi.org/10.1128/MCB.01963-07
59. Sheftel AD, Wilbrecht C, Stehling O et al (2012) The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe–4S] protein maturation. Mol Biol Cell 23:1157–1166. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0772
60. Waller JC, Alvarez S, Naponelli V et al (2010) A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron–sulfur clusters in all domains of life. PNAS 107:10412–10417. https://doi.org/10.1073/pnas.0911586107
61. Waller JC, Ellens KW, Alvarez S et al (2012) Mitochondrial and plastidial COG0354 proteins have folate-dependent functions in iron–sulphur cluster metabolism. J Exp Bot 63:403–411. https://doi.org/10.1093/jxb/err286
62. Hasnain G, Waller JC, Alvarez S et al (2012) Mutational analysis of YgfZ, a folate-dependent protein implicated in iron/sulphur cluster metabolism. FEMS Microbiol Lett 326:168–172. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02448.x
63. Teplyakov A, Obmolova G, Sarikaya E et al (2004) Crystal structure of the YgfZ protein from *Escherichia coli* suggests a folate-dependent regulatory role in one-carbon metabolism. J Bacteriol 186:7134–7140. https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7134-7140.2004
64. Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O et al (2011) A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe–S proteins. Am J Hum Genet 89:656–667. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.10.005
65. Léon S, Touraine B, Ribot C et al (2003) Iron–sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. Biochem J 371:823–830. https://doi.org/10.1042/bj20021946
66. Yabe T, Morimoto K, Kikuchi S et al (2004) The Arabidopsis chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron–sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I. Plant Cell 16:993–1007. https://doi.org/10.1105/tpc.020511
67. Gao H, Subramanian S, Couturier J et al (2013) *Arabidopsis thaliana* Nfu2 accommodates [2Fe–2S] or [4Fe–4S] clusters and is competent for in vitro maturation of chloroplast [2Fe–2S] and [4Fe–4S] cluster-containing proteins. Biochemistry 52:6633–6645. https://doi.org/10.1021/bi4007622
68. Py B, Gerez C, Angelini S et al (2012) Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe–S carrier. Mol Microbiol 86:155–171. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08181.x
69. Nath K, O'Donnell JP, Lu Y (2017) Chloroplastic iron–sulfur scaffold protein NFU3 is essential to overall plant fitness. Plant Signal Behav 12:e1282023. https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1282023
70. Nath K, Wessendorf RL, Lu Y (2016) A nitrogen-fixing subunit essential for accumulating 4Fe–4S-containing photosystem I core proteins. Plant Physiol 172:2459–2470. https://doi.org/10.1104/pp.16.01564
71. Touraine B, Boutin J-P, Marion-Poll A et al (2004) Nfu2: a scaffold protein required for [4Fe–4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in Arabidopsis chloroplasts. Plant J 40:101–111. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02189.x
72. Lezhneva L, Amann K, Meurer J (2004) The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe–4S]-cluster-containing complexes in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. Plant J 37:174–185. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01952.x
73. Schwenkert S, Netz DJA, Frazzon J et al (2010) Chloroplast HCF101 is a scaffold protein for [4Fe–4S] cluster assembly. Biochem J 425:207–218. https://doi.org/10.1042/BJ20091290
74. Stöckel J, Oelmüller R (2004) A novel protein for photosystem I biogenesis. J Biol Chem 279:10243–10251. https://doi.org/10.1074/jbc.M309246200
75. Schneider D, Berry S, Volkmer T et al (2004) PetC1 is the major Rieske iron–sulfur protein in the cytochrome b6f complex of *Synechocystis* sp. PCC 6803. J Biol Chem 279:39383–39388. https://doi.org/10.1074/jbc.M406288200
76. Maiwald D, Dietzmann A, Jahns P et al (2003) Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase delta-subunit of Arabidopsis. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression. Plant Physiol 133:191–202

77. Golbeck JH (2003) The binding of cofactors to photosystem I analyzed by spectroscopic and mutagenic methods. Annu Rev Biophys Biomol Struct 32:237–256. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142356
78. Hanke GT, Hase T (2008) Variable photosynthetic roles of two leaf-type ferredoxins in arabidopsis, as revealed by RNA interference. Photochem Photobiol 84:1302–1309. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00411.x
79. Voss I, Goss T, Murozuka E et al (2011) FdC1, a novel ferredoxin protein capable of alternative electron partitioning, increases in conditions of acceptor limitation at photosystem I. J Biol Chem 286:50–59. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161562
80. Hanke GT, Kimata-Ariga Y, Taniguchi I, Hase T (2004) A post genomic characterization of Arabidopsis ferredoxins. Plant Physiol 134:255–264. https://doi.org/10.1104/pp.103.032755
81. Rumeau D, Peltier G, Cournac L (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. Plant Cell Environ 30:1041–1051. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01675.x
82. Yamori W, Shikanai T (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. Annu Rev Plant Biol 67:81–106. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112002
83. Suorsa M, Sirpiö S, Aro E-M (2009) Towards characterization of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. Mol Plant 2:1127–1140. https://doi.org/10.1093/mp/ssp052
84. Peng L, Yamamoto H, Shikanai T (2011) Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. Biochim Biophys Acta Bioenerget 1807:945–953. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.10.015
85. Peters JW, Broderick JB (2012) Emerging paradigms for complex iron–sulfur cofactor assembly and insertion. Annu Rev Biochem 81:429–450. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052610-094911
86. Sawyer A, Bai Y, Lu Y et al (2017) Compartmentalisation of [FeFe]-hydrogenase maturation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J 90:1134–1143. https://doi.org/10.1111/tpj.13535
87. Fristedt R, Herdean A, Blaby-Haas CE et al (2015) PHOTOSYSTEM II PROTEIN33, a protein conserved in the plastid lineage, is associated with the chloroplast thylakoid membrane and provides stability to photosystem II supercomplexes in Arabidopsis. Plant Physiol 167:481–492. https://doi.org/10.1104/pp.114.253336
88. Dorn KV, Willmund F, Schwarz C et al (2010) Chloroplast DnaJ-like proteins 3 and 4 (CDJ3/4) from *Chlamydomonas reinhardtii* contain redox-active Fe–S clusters and interact with stromal HSP70B. Biochem J 427:205–215. https://doi.org/10.1042/BJ20091412
89. Schroda M, Vallon O, Wollman FA, Beck CF (1999) A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. Plant Cell 11:1165–1178
90. Liu C, Willmund F, Golecki JR et al (2007) The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in Chlamydomonas. Plant J 50:265–277. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03047.x
91. Petti C, Nair M, DeBolt S (2014) The involvement of J-protein AtDjC17 in root development in Arabidopsis. Front Plant Sci 5:532. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00532
92. Hanke G, Mulo P (2013) Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. Plant Cell Environ 36:1071–1084. https://doi.org/10.1111/pce.12046
93. Terauchi AM, Lu S-F, Zaffagnini M et al (2009) Pattern of expression and substrate specificity of chloroplast ferredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biol Chem 284:25867–25878. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023622
94. Chibani K, Wingsle G, Jacquot J-P et al (2009) Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on *Populus trichocarpa*. Mol Plant 2:308–322. https://doi.org/10.1093/mp/ssn076
95. Jacquot J-P, Eklund H, Rouhier N, Schürmann P (2009) Structural and evolutionary aspects of thioredoxin reductases in photosynthetic organisms. Trends Plant Sci 14:336–343. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.005
96. Dai S, Glauser DA, Bourquin F et al (2007) Structural snapshots along the reaction pathway of ferredoxin–thioredoxin reductase. Nature 448:92–96
97. Wang P, Liu J, Liu B et al (2014) Ferredoxin:thioredoxin reductase is required for proper chloroplast development and is involved in the regulation of plastid gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant 7:1586–1590. https://doi.org/10.1093/mp/ssu069
98. Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M et al (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana*. Plant Cell 22:1498–1515. https://doi.org/10.1105/tpc.109.071001
99. Vieira Dos Santos C, Rey P (2006) Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. Trends Plant Sci 11:329–334. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.05.005
100. Brzezowski P, Richter AS, Grimm B (2015) Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. Biochim Biophys Acta Bioenerget 1847:968–985. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.05.007
101. Wang X, Liu L (2016) Crystal structure and catalytic mechanism of 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase. J Biol Chem 291:13349–13359. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720342
102. Gray J, Wardzala E, Yang M et al (2004) A small family of LLS1-related non-heme oxygenases in plants with an origin amongst oxygenic photosynthesizers. Plant Mol Biol 54:39–54. https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000028766.61559.4c
103. Espineda CE, Linford AS, Devine D, Brusslan JA (1999) The AtCAO gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana*. PNAS 96:10507–10511. https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10507
104. Hauenstein M, Christ B, Das A et al (2016) A role for TIC55 as a hydroxylase of phyllobilins, the products of chlorophyll breakdown during plant senescence. Plant Cell 28:2510–2527. https://doi.org/10.1105/tpc.16.00630
105. Reinbothe S, Quigley F, Gray J et al (2004) Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley. PNAS 101:2197–2202. https://doi.org/10.1073/pnas.0307284101
106. Boij P, Patel R, Garcia C et al (2009) In vivo studies on the roles of Tic55-related proteins in chloroplast protein import in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant 2:1397–1409. https://doi.org/10.1093/mp/ssp079
107. Ramel F, Ksas B, Akkari E et al (2013) Light-induced acclimation of the Arabidopsis chlorina1 mutant to singlet oxygen. Plant Cell 25:1445–1462. https://doi.org/10.1105/tpc.113.109827
108. Meguro M, Ito H, Takabayashi A et al (2011) Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in Arabidopsis. Plant Cell 23:3442–3453. https://doi.org/10.1105/tpc.111.089714
109. Pruzinská A, Tanner G, Anders I et al (2003) Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron–sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. PNAS 100:15259–15264. https://doi.org/10.1073/pnas.2036571100
110. Hörtensteiner S, Wüthrich KL, Matile P et al (1998) The key step in chlorophyll breakdown in higher plants cleavage of

pheophorbide a macrocycle by a monooxygenase. J Biol Chem 273:15335–15339. https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15335
111. Hörtensteiner S, Kräutler B (2011) Chlorophyll breakdown in higher plants. Biochim Biophys Acta Bioenerget 1807:977–988. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.12.007
112. Greenberg JT, Ausubel FM (1993) Arabidopsis mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. Plant J 4:327–341. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020327.x
113. Gray J, Close PS, Briggs SP, Johal GS (1997) A novel suppressor of cell death in plants encoded by the Lls1 gene of maize. Cell 89:25–31. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80179-8
114. Pružinská A, Tanner G, Aubry S et al (2005) Chlorophyll breakdown in senescent Arabidopsis leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. Plant Physiol 139:52–63. https://doi.org/10.1104/pp.105.065870
115. Rodoni S, Vicentini F, Schellenberg M et al (1997) Partial purification and characterization of red chlorophyll catabolite reductase, a stroma protein involved in chlorophyll breakdown. Plant Physiol 115:677–682
116. Muramoto T, Tsurui N, Terry MJ et al (2002) Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. Plant Physiol 130:1958–1966. https://doi.org/10.1104/pp.008128
117. Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N et al (2001) The Arabidopsis HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. Plant Cell 13:425–436
118. Davis SJ, Bhoo SH, Durski AM et al (2001) The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. Plant Physiol 126:656–669. https://doi.org/10.1104/pp.126.2.656
119. Khan MS, Haas FH, Samami AA et al (2010) Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is essential for growth and development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 22:1216–1231. https://doi.org/10.1105/tpc.110.074088
120. Duncanson E, Gilkes AF, Kirk DW et al (1993) nir1, a conditional-lethal mutation in barley causing a defect in nitrite reduction. Mol Gen Genet 236:275–282. https://doi.org/10.1007/BF00277123
121. Kimata-Ariga Y, Hase T (2014) Multiple complexes of nitrogen assimilatory enzymes in spinach chloroplasts: possible mechanisms for the regulation of enzyme function. PLoS One 9:e108965. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108965
122. Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, Coruzzi GM (1998) Arabidopsis gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes. Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. Plant Cell 10:741–752
123. Lancien M, Martin M, Hsieh M-H et al (2002) Arabidopsis glt1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. Plant J 29:347–358
124. Potel F, Valadier M-H, Ferrario-Méry S et al (2009) Assimilation of excess ammonium into amino acids and nitrogen translocation in *Arabidopsis thaliana*—roles of glutamate synthases and carbamoylphosphate synthetase in leaves. FEBS J 276:4061–4076. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07114.x
125. Somerville CR, Ogren WL (1980) Inhibition of photosynthesis in Arabidopsis mutants lacking leaf glutamate synthase activity. Nature 286:257–259. https://doi.org/10.1038/286257a0
126. Saha K, Webb ME, Rigby SEJ et al (2012) Characterization of the evolutionarily conserved iron–sulfur cluster of sirohydrochlorin ferrochelatase from *Arabidopsis thaliana*. Biochem J 444:227–237. https://doi.org/10.1042/BJ20111993
127. Lindqvist Y, Huang W, Schneider G, Shanklin J (1996) Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. EMBO J 15:4081–4092
128. Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F et al (2013) Acyl-lipid metabolism. Arabidopsis Book 11:e0161. https://doi.org/10.1199/tab.0161
129. Rathinasabapathi B, Burnet M, Russell BL et al (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron–sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. PNAS 94:3454–3458
130. Hibino T, Waditee R, Araki E et al (2002) Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. J Biol Chem 277:41352–41360. https://doi.org/10.1074/jbc.M205965200
131. Yamada N, Takahashi H, Kitou K et al (2015) Suppressed expression of choline monooxygenase in sugar beet on the accumulation of glycine betaine. Plant Physiol Biochem 96:217–221. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.014
132. Hanke GT, Satomi Y, Shinmura K et al (2011) A screen for potential ferredoxin electron transfer partners uncovers new, redox dependent interactions. Biochim Biophys Acta 1814:366–374. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.09.011
133. Peden EA, Boehm M, Mulder DW et al (2013) Identification of global ferredoxin interaction networks in *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biol Chem 288:35192–35209. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.483727
134. van Lis R, Baffert C, Couté Y et al (2013) *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts contain a homodimeric pyruvate:ferredoxin oxidoreductase that functions with FDX1. Plant Physiol 161:57–71. https://doi.org/10.1104/pp.112.208181
135. Noth J, Krawietz D, Hemschemeier A, Happe T (2013) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is coupled to light-independent hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biol Chem 288:4368–4377. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429985
136. Yasuno R, Wada H (2002) The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana* 1. FEBS Lett 517:110–114. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02589-9
137. Cicchillo RM, Lee K-H, Baleanu-Gogonea C et al (2004) *Escherichia coli* lipoyl synthase binds two distinct [4Fe–4S] clusters per polypeptide. Biochemistry 43:11770–11781. https://doi.org/10.1021/bi0488505
138. Ewald R, Hoffmann C, Florian A et al (2014) Lipoate-protein ligase and octanoyltransferase are essential for protein lipoylation in mitochondria of Arabidopsis. Plant Physiol 165:978–990. https://doi.org/10.1104/pp.114.238311
139. Goyer A (2017) Thiamin biofortification of crops. Curr Opin Biotechnol 44:1–7. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.09.005
140. Raschke M, Bürkle L, Müller N et al (2007) Vitamin B1 biosynthesis in plants requires the essential iron sulfur cluster protein, THIC. PNAS 104:19637–19642. https://doi.org/10.1073/pnas.0709597104
141. Fenwick MK, Mehta AP, Zhang Y et al (2015) Non-canonical active site architecture of the radical SAM thiamin pyrimidine synthase. Nat Commun 6:6480. https://doi.org/10.1038/ncomms7480
142. Kong D, Zhu Y, Wu H et al (2008) AtTHIC, a gene involved in thiamine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Cell Res 18:566–576. https://doi.org/10.1038/cr.2008.35
143. Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. Annu Rev Plant Biol 57:805–836. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105421
144. Hung W-F, Chen L-J, Boldt R et al (2004) Characterization of Arabidopsis glutamine phosphoribosyl pyrophosphate

amidotransferase-deficient mutants. Plant Physiol 135:1314–1323. https://doi.org/10.1104/pp.104.040956
145. Ito T, Shiraishi H, Okada K, Shimura Y (1994) Two amidophosphoribosyltransferase genes of *Arabidopsis thaliana* expressed in different organs. Plant Mol Biol 26:529–533. https://doi.org/10.1007/BF00039565
146. van der Graaff E, Hooykaas P, Lein W et al (2004) Molecular analysis of "de novo" purine biosynthesis in solanaceous species and in *Arabidopsis thaliana*. Front Biosci 9:1803–1816
147. Lin M, Behal R, Oliver DJ (2003) Disruption of plE2, the gene for the E2 subunit of the plastid pyruvate dehydrogenase complex, in Arabidopsis causes an early embryo lethal phenotype. Plant Mol Biol 52:865–872
148. Binder S (2010) Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Arabidopsis Book 8:e0137. https://doi.org/10.1199/tab.0137
149. Zhang C, Pang Q, Jiang L et al (2015) Dihydroxyacid dehydratase is important for gametophyte development and disruption causes increased susceptibility to salinity stress in Arabidopsis. J Exp Bot 66:879–888. https://doi.org/10.1093/jxb/eru449
150. Flint DH, Emptage MH (1988) Dihydroxy acid dehydratase from spinach contains a [2Fe–2S] cluster. J Biol Chem 263:3558–3564
151. Knill T, Reichelt M, Paetz C et al (2009) *Arabidopsis thaliana* encodes a bacterial-type heterodimeric isopropylmalate isomerase involved in both Leu biosynthesis and the Met chain elongation pathway of glucosinolate formation. Plant Mol Biol 71:227–239. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9519-5
152. Sureshkumar S, Todesco M, Schneeberger K et al (2009) A genetic defect caused by a triplet repeat expansion in *Arabidopsis thaliana*. Science 323:1060–1063. https://doi.org/10.1126/science.1164014
153. He Y, Mawhinney TP, Preuss ML et al (2009) A redox-active isopropylmalate dehydrogenase functions in the biosynthesis of glucosinolates and leucine in Arabidopsis. Plant J 60:679–690. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03990.x
154. Vranová E, Coman D, Gruissem W (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. Annu Rev Plant Biol 64:665–700. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116
155. Loiseau L, Gerez C, Bekker M et al (2007) ErpA, an iron–sulfur (Fe–S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*. PNAS 104:13626–13631. https://doi.org/10.1073/pnas.0705829104
156. Henkes S, Sonnewald U, Badur R et al (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 13:535–551
157. Khozaei M, Fisk S, Lawson T et al (2015) Overexpression of plastid transketolase in tobacco results in a thiamine auxotrophic phenotype. Plant Cell 27:432–447. https://doi.org/10.1105/tpc.114.131011
158. Budziszewski GJ, Lewis SP, Glover LW et al (2001) Arabidopsis genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. Genetics 159:1765–1778
159. Estévez JM, Cantero A, Reindl A et al (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. J Biol Chem 276:22901–22909. https://doi.org/10.1074/jbc.M100854200
160. Seemann M, Wegner P, Schünemann V et al (2005) Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe–4S] protein. J Biol Inorg Chem 10:131–137. https://doi.org/10.1007/s00775-004-0619-z
161. Seemann M, Janthawornpong K, Schweizer J et al (2009) Isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway: in vivo Mössbauer spectroscopy identifies a $[4Fe–4S]^{2+}$ center with unusual coordination sphere in the LytB protein. J Am Chem Soc 131:13184–13185. https://doi.org/10.1021/ja9012408
162. Seemann M, Tse Sum Bui B, Wolff M et al (2006) Isoprenoid biosynthesis in plant chloroplasts via the MEP pathway: direct thylakoid/ferredoxin-dependent photoreduction of GcpE/IspG. FEBS Lett 580:1547–1552. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.082
163. de la Luz Gutiérrez-Nava M, Gillmor CS, Jiménez LF et al (2004) Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. Plant Physiol 135:471–482. https://doi.org/10.1104/pp.103.036996
164. Guevara-García A, San Román C, Arroyo A et al (2005) Characterization of the Arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. Plant Cell 17:628–643. https://doi.org/10.1105/tpc.104.028860
165. Hsieh M-H, Goodman HM (2005) The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. Plant Physiol 138:641–653. https://doi.org/10.1104/pp.104.058735
166. Bouvier F, d'Harlingue A, Hugueney P et al (1996) Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). J Biol Chem 271:28861–28867
167. Lin H, Wang R, Qian Q et al (2009) DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. Plant Cell 21:1512–1525. https://doi.org/10.1105/tpc.109.065987
168. Waters MT, Brewer PB, Bussell JD et al (2012) The Arabidopsis ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in the control of plant development by strigolactones. Plant Physiol 159:1073–1085. https://doi.org/10.1104/pp.112.196253
169. Su L-W, Chang SH, Li M-Y et al (2013) Purification and biochemical characterization of Arabidopsis At-NEET, an ancient iron–sulfur protein, reveals a conserved cleavage motif for subcellular localization. Plant Sci 213:46–54. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.001
170. Nechushtai R, Conlan AR, Harir Y et al (2012) Characterization of Arabidopsis NEET reveals an ancient role for NEET proteins in iron metabolism. Plant Cell 24:2139–2154. https://doi.org/10.1105/tpc.112.097634
171. Kinsman EA, Pyke KA (1998) Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in Arabidopsis leaves. Development 125:1815–1822
172. Rosar C, Kanonenberg K, Nanda AM et al (2012) The leaf reticulate mutant dov1 is impaired in the first step of purine metabolism. Mol Plant 5:1227–1241. https://doi.org/10.1093/mp/sss045
173. Grant K, Carey NM, Mendoza M et al (2011) Adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in Arabidopsis implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. Biochem J 438:325–335. https://doi.org/10.1042/BJ20110025
174. Tanaka R, Hirashima M, Satoh S, Tanaka A (2003) The Arabidopsis-accelerated cell death gene ACD1 is involved in oxygenation of pheophorbide a: inhibition of the pheophorbide a oxygenase activity does not lead to the "Stay-Green" phenotype in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 44:1266–1274. https://doi.org/10.1093/pcp/pcg172
175. Yang M, Wardzala E, Johal GS, Gray J (2004) The wound-inducible Lls1 gene from maize is an orthologue of the Arabidopsis Acd1 gene, and the LLS1 protein is present in non-photosynthetic tissues. Plant Mol Biol 54:175–191. https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000028789.51807.6a
176. Voss I, Koelmann M, Wojtera J et al (2008) Knockout of major leaf ferredoxin reveals new redox-regulatory adaptations in

Arabidopsis thaliana. Physiol Plant 133:584–598. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01112.x
177. Li C, Hu Y, Huang R et al (2015) Mutation of FdC2 gene encoding a ferredoxin-like protein with C-terminal extension causes yellow-green leaf phenotype in rice. Plant Sci 238:127–134. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.010
178. Zhao J, Qiu Z, Ruan B et al (2015) Functional inactivation of putative photosynthetic electron acceptor Ferredoxin C2 (FdC2) induces delayed heading date and decreased photosynthetic rate in rice. PLoS ONE 10:e0143361. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143361

4. Contexte et objectifs de ma thèse

Comme exposé ci-dessus, les mécanismes d'assemblage de centres Fe-S utilisés par les plantes sont en partie décrits sur la base d'informations obtenues chez d'autres organismes tels que les bactéries, levures et mammifères. Le laboratoire a globalement pour objectif de comparer le rôle des familles protéiques GRX, BOLA, ATC, IBA57 et NFU dans le contexte spécifique à chaque organite, que ce soit la mitochondrie ou le chloroplaste. La machinerie chloroplastique SUF et plus particulièrement les étapes tardives du processus de maturation sont les moins bien documentées (Przybyla-Toscano et al., 2018). En effet, il existe de nombreuses protéines Fe-S chloroplastiques (autour de 50) qui remplissent des fonctions cruciales dans le développement et la physiologie des plantes, mais en réalité quasiment aucune information n'est connue sur la maturation de leurs centres Fe-S. Chez *A. thaliana* les protéines de transfert ne sont pas essentielles individuellement contrairement à plusieurs isoformes mitochondriales. Cela suggère l'existence d'une certaine redondance dans les voies de maturation, au moins celles pour les protéines essentielles. Je me suis donc personnellement focalisée sur les protéines SUFA1, IBA57.2 et NFU1/2/3 de la machinerie SUF, travail effectué en collaboration avec l'équipe des docteurs Gaymard et Dubos (équipe Feros, BPMP, INRA Montpellier) qui avait initié des analyses physiologiques sur les mutants *nfu1*, *nfu2*, *nfu3* et *sufa1*. Contrairement à NFU2 et NFU3, aucune caractérisation n'avait été faite pour l'isoforme NFU1, de même que les études des protéines SUFA1 et IB57.2 restaient assez préliminaires. Je me suis attelée à effectuer la caractérisation biochimique et spectroscopique de ces protéines et à déterminer leurs partenaires à l'aide d'approches permettant la détection d'interactions *in vitro* ou *in vivo*, ceci afin d'identifier la spécificité et la redondance fonctionnelle de ces protéines, certaines appartenant à une même famille.

Matériel et méthodes

Chapitre 1 : Techniques de biologie moléculaire

Ici sont présentées les étapes permettant l'insertion d'une séquence d'intérêt dans un plasmide donné. Diverses applications sont possibles selon le plasmide, et sont détaillées dans chacune des parties concernées.

1. Amplification de la séquence d'intérêt par réaction en chaîne par polymérase ou PCR

La première étape consiste à amplifier une séquence d'acides nucléiques à l'aide d'une polymérase. La réaction est permise par le mélange d'amorces spécifiques de la séquence à amplifier, d'une matrice contenant le gène d'intérêt, d'acides nucléiques libres, et d'une polymérase. Des ADN complémentaires (ADNc) provenant de feuilles d'*A. thaliana* ont été majoritairement utilisés en guise de matrice, mais également des plasmides recombinants. Les ADNc sont obtenus par rétro-transcription d'ARN messagers (ARNm) et contiennent donc les séquences codantes des gènes, dépourvues d'introns. Les amorces sont des fragments de 15 à 18 acides nucléiques, complémentaires de la séquence à amplifier en extrémité 5' et 3' et qui incluent un site de restriction servant à digérer l'insert (cf Chapitre 1 - 1.2.). La composition du mélange PCR (polymerase chain reaction) et le programme utilisés sont détaillés tableau 2. La polymérase utilisée (« Iproof » - Biorad) est une polymérase à haute-fidélité, afin de limiter les risques de mutations au cours de l'amplification.

Produits	Concentrations finales
dNTP	0,16 mM
Tampon 5 x	1 x
Amorces	0,2 µM chacune
Matrice (ADNc)	50 ng
Polymérase	0,5 unités
H_2O UP	Qsp 50 µL

	Températures	Temps
	98°C (dénaturation)	30 sec
35x	98°C (dénaturation)	10 sec
	54°C (hybridation)	30 sec
	72°C (élongation)	30 sec/kb
	72°C (élongation terminale)	10 min

Tableau 2 : Mélange réactionnel de PCR pour l'amplification de fragments et programme associé.

Après réaction, les produits PCR sont déposés sur gel d'agarose 1 % (m/v), en parallèle d'un marqueur de taille (« Gene ruler 1kb DNA ladder » - Thermo Scientific), pour en vérifier la taille par électrophorèse. Le gel est coulé avec l'ajout de 0,0005 % de bromure d'éthidium, un agent intercalant de l'ADN, fluorescent après exposition aux ultraviolets (UV). Après migration à 100 V dans une cuve contenant du tampon TBE 1x, les fragments ADN sont révélés sur transilluminateur UV à 300 nm. Les bandes correspondant au gène d'intérêt sont découpées sur gel et purifiées à l'aide du kit « Illustra GFX PCR DNA and gel band purification » (GE Healthcare) selon les indications du fournisseur.

2. Digestion de l'insert et du plasmide

L'insertion de la séquence dans le plasmide de destination nécessite la digestion de l'insert et du plasmide par les enzymes de restriction appropriées. La totalité de l'insert et 1 à 2 µg de plasmide sont digérés séparément dans des solutions de 90 µL contenant un tampon « Fast Digest » 1x, ainsi qu'une unité de chaque enzyme de restriction « Fast Digest » (Thermo Scientific). Le mélange est incubé 1 h à 37°C puis

les produits de digestion sont purifiés selon les indications du fournisseur à l'aide du kit « Illustra GFX PCR DNA and gel band purification » (GE Healthcare). Chaque produit est élué dans un volume d'eau ultrapure de sorte à obtenir environ 60 ng/µL de plasmide et 10 ng/µL d'insert.

3. Ligature de l'insert et du plasmide

Pour un volume final de 20 µL contenant une unité de ligase « T4 DNA Ligase » (Fermentas) et un tampon « T4 DNA ligase » 1x (Fermentas), 50 à 60 ng de plasmide digéré sont mélangés avec une quantité 3 fois plus importante d'insert. Ce mélange doit permettre la ligature de l'insert dans le plasmide par association des sites digérés par les mêmes enzymes. Le mélange est chauffé à 50°C pendant 1 min avant ajout de la ligase et de son tampon de sorte à déplier les ADN pour en faciliter la ligature. Le mélange est incubé une nuit à 4°C.

4. Sélection de plasmides recombinants dans *E. coli*

La souche bactérienne *E. coli* DH5α (F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1) thermo-compétentes (50 µL) est transformée avec 7 µL de produit de ligature. Après 30 minutes sur glace, un choc thermique est appliqué à 42°C pendant 35 à 45 secondes, ce qui déstabilise la paroi. Le mélange est replacé dans la glace quelques minutes avant l'ajout de 500 µL de milieu SOC (34 mg/mL – Biobasic), un milieu riche permettant la régénération des bactéries. Après agitation à 150 rpm pendant 1 h à 37°C, les bactéries sont collectées par centrifugation pendant 1 min à 13 000 rpm. Une partie du surnageant est éliminée et le culot bactérien est remis en suspension puis étalé sur boîte de Petri contenant du LB agar (35 g/L – Sigma) et 50 µg/mL d'un antibiotique spécifique au plasmide inséré. Les bactéries sont incubées 1 nuit à 37°C.

5. PCR sur colonies

Cette étape permet de vérifier que les colonies bactériennes qui se sont développées sur milieu LB en présence d'antibiotique possèdent le plasmide ayant intégré la séquence d'intérêt. Il s'agit d'une réaction PCR où la matrice est constituée de l'ADN plasmidique contenu dans la bactérie, elle-même prélevée à l'aide d'un cure dent trempé dans le mélange présenté tableau 3. Les amorces utilisées sont soit celles flanquant la séquence d'intérêt, soit celles du plasmide. La présence du fragment d'intérêt est ensuite vérifiée sur gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium.

Produits	Concentrations finales
dNTP	0,16 mM
Tampon 5 x	1 x
Amorces	0,2 µM
$MgCl_2$	2 mM
Polymérase	1,25 unités
H_2O UP	Qsp 20 µL

	Température	Temps
	95°C (dénaturation)	2 min
35x	95°C (dénaturation)	30 sec
	54°C (hybridation)	30 sec
	72°C (élongation)	1 min/kb
	72°C (élongation terminale)	5 min

Tableau 3 : Mélange réactionnel de PCR sur colonies et programme associé.

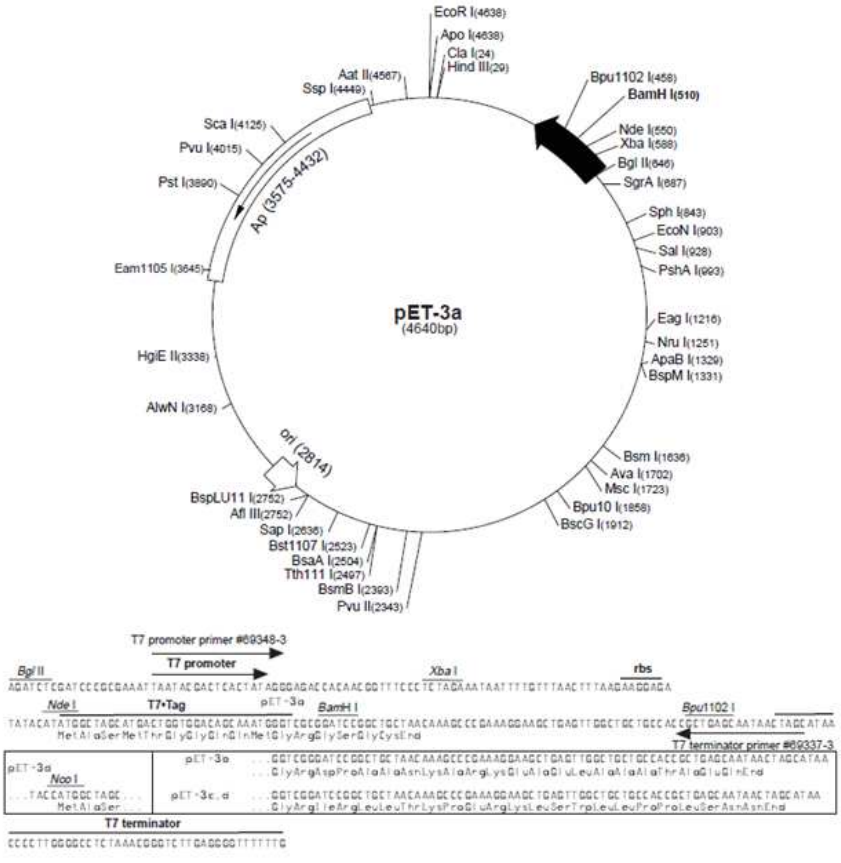
6. Extraction de plasmide, digestion contrôle et séquençage

Les clones positifs lors de l'étape de PCR sur colonies sont placés en culture liquide dans 5 mL de LB liquide (20 g/L – Sigma) contenant 50 µg/mL d'antibiotique pendant une nuit à 37°C. Le plasmide recombinant est extrait des bactéries ainsi récoltées à l'aide du kit « Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit » (GE Healthcare) selon les indications du fournisseur. Il s'agit ici de réaliser un second contrôle par digestion enzymatique sur 500 ng de plasmide purifié. Le mélange de digestion est réalisé dans un volume final de 35 µL, contenant du tampon Fast Digest 1x ainsi qu'une unité de chaque enzyme de restriction « Fast Digest » (Thermo Scientific). Après 60 minutes à 37°C, les produits de digestion sont déposés sur gel d'agarose 1 % en présence de bromure d'éthidium. Enfin, la présence et l'intégrité de la séquence d'intérêt sont vérifiées par séquençage du plasmide purifié.

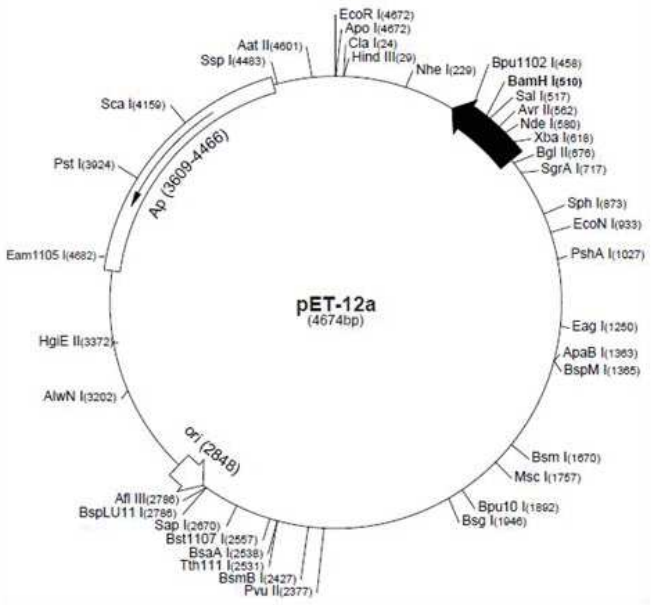
Chapitre 2 : Techniques de caractérisation biochimique

1. Production de protéines en système hétérologue d'*E. coli*

Après insertion dans un plasmide de la série pET ou pCDF de la séquence codant une protéine à produire, des bactéries sont transformées avec ce même plasmide (cartes des plasmides d'expression figure 14). Dans ces plasmides, la séquence codante est sous influence d'un promoteur fort de type T7, qui permet une production importante de la protéine d'intérêt, pouvant ainsi atteindre 40 à 50% de la proportion en protéines totales de la cellule bactérienne.

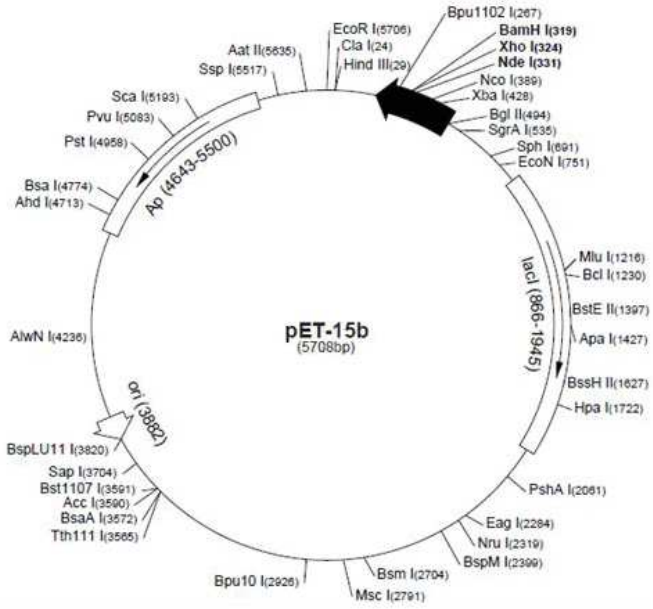


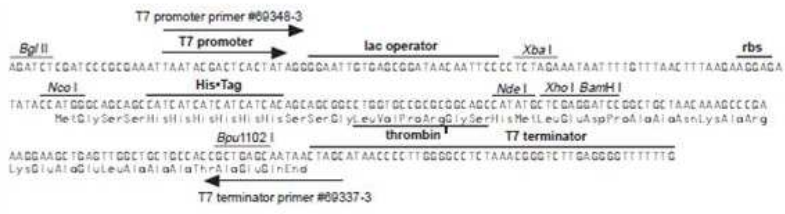
pET-3a-d cloning/expression region



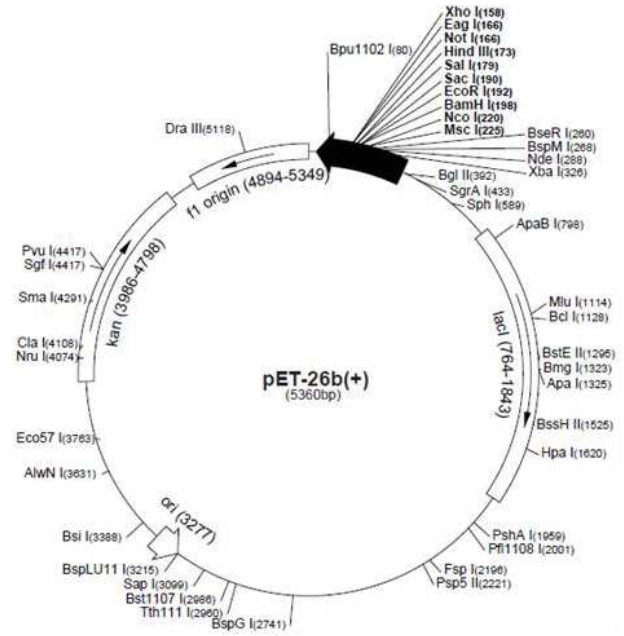


pET-12a-c cloning/expression region



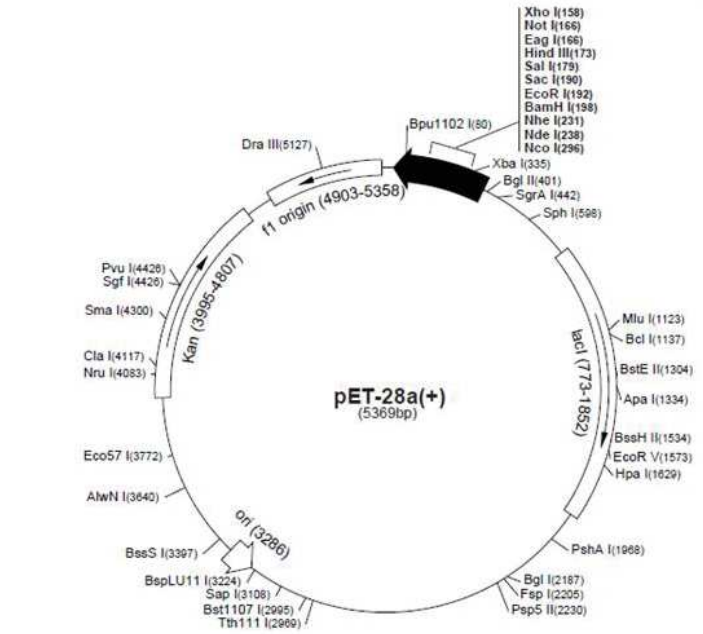


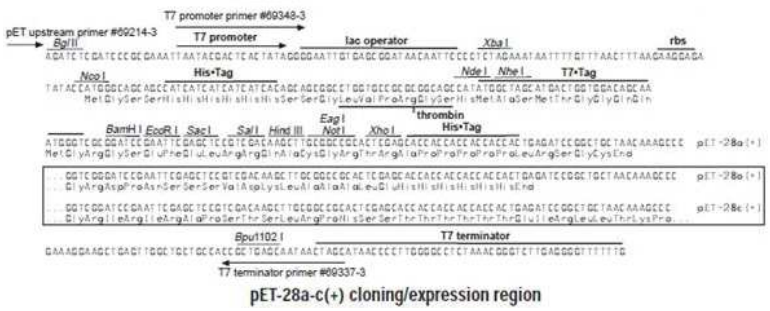
pET-15b cloning/expression region





pET-26b(+) cloning/expression region





pET-28a-c(+) cloning/expression region

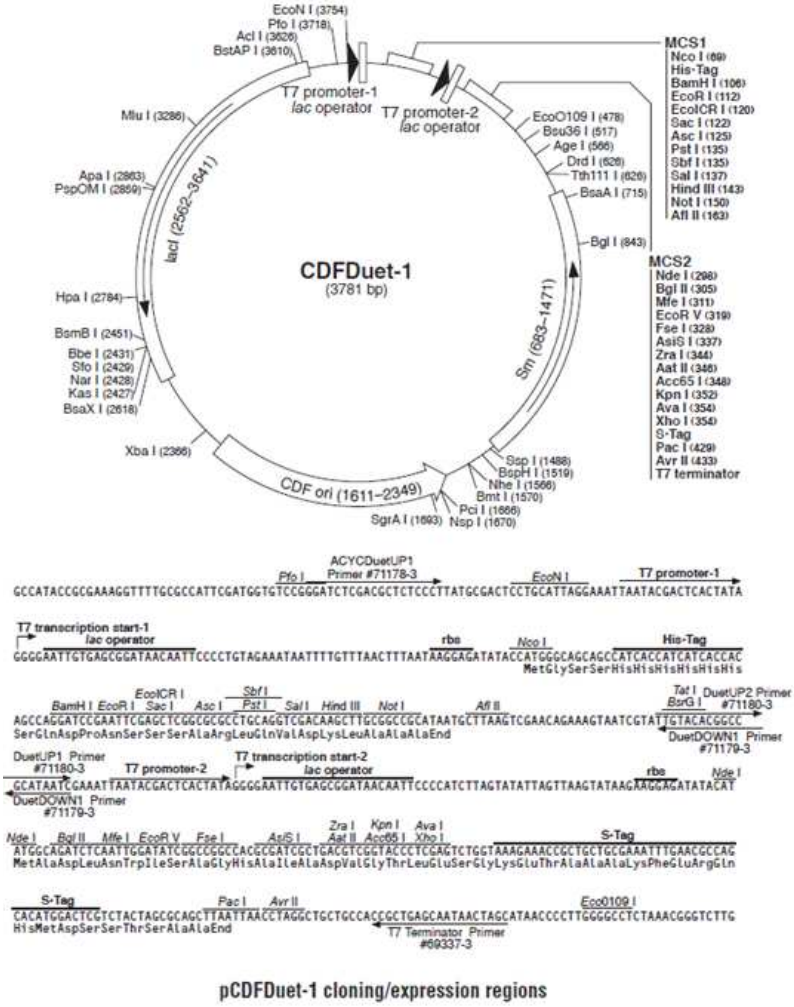


Figure 14: Cartes des plasmides utilisés pour la production de protéines. Les plasmides pET3d, 12a et 15b portent une cassette de résistance à l'ampicilline, le plasmide pCDF-Duet code une cassette de résistance à la spectinomycine, et une cassette de résistance à la kanamycine est présente sur les plasmides pET26b et pET28a. Deux de ces plasmides permettent la production d'une protéine non étiquetée (pET3d et pET12a) alors que trois autres plasmides permettent l'expression de protéines fusionnées à une étiquette polyhistidine (pET15b, pET26b et pET28a). Le plasmide pCDF-Duet a la particularité de permettre la production de deux protéines dont l'une peut être fusionnée à une étiquette polyhistidine.

1.1. Transformation de souches productrices

Nous disposons de différentes souches de production au laboratoire, les plus utilisées étant la souche BL21 (DE3) et la souche Rosetta (DE3), toutes deux « F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm ». Chacune de ces souches peut posséder un plasmide, pSBET et pRARE2 respectivement, permettant la synthèse d'ARNt reconnaissant des codons rares, et conférant une résistance à la kanamycine d'une part et au chloramphénicol d'autre part. Le terme DE3 renvoie au fond génétique de ces souches, qui contiennent un prophage λDE3 permettant la production de l'ARN polymérase T7. Lors de l'induction de ces souches avec de l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), le promoteur lacUV5 qui contrôle le gène codant l'ARN polymérase T7 est induit, permettant elle-même l'activation du promoteur T7 en amont de la séquence codant pour la protéine d'intérêt, et ainsi la transcription puis traduction de cette même protéine.

1.1.1. Les souches BL21 (DE3) et BL21 (DE3) pSBET

Nous disposons de cellules électro-compétentes pour la souche bactérienne BL21 (DE3) seule ou possédant le plasmide pSBET codant deux ARNt responsables de la reconnaissance de codons rares de l'arginine : AGG et AGA. Ainsi, 5 à 20 ng de plasmide recombinant servent à transformer 50 µL de bactéries compétentes dans une cuvette d'électroporation, composée de deux électrodes en aluminium séparées de 2 mm. Cette cuvette est placée dans un électroporateur et soumise à une décharge électrique de 2 800 V pendant 5 millisecondes, générant des micropores dans la membrane plasmique où le plasmide est incorporé par la bactérie. 500 µL de LB liquide (20 g/L - Sigma) sont ajoutés à la solution bactérienne avant 30 min d'incubation à 37°C. Enfin, 200 µL sont étalés sur boîte de Petri contenant du LB agar (35 g/L - Sigma) et les antibiotiques de sélection (50 µg/mL). Les bactéries sont incubées 1 nuit à 37°C.

1.1.2. La souche Rosetta 2 (DE3)

La souche Rosetta 2 (DE3) contient un plasmide pRARE2, codant les ARNt reconnaissant 7 codons rares : AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, et CGG. La souche disponible au laboratoire est thermo-compétente. La transformation de 50 µL de bactéries compétentes mélangées à 50 à 70 ng de plasmide recombinant se fait par choc thermique à 42°C pendant 35 à 45 secondes. Le mélange bactéries/plasmide est remis quelques minutes sur glace avant ajout de 500 µL de SOC (34 mg/mL - Biobasic) et l'ensemble est incubé 1 h à 37°C sous agitation. Enfin, les bactéries sont culotées et 300 µL de surnageant sont éliminés avant resuspension du culot bactérien et étalement sur milieu LB agar contenant des antibiotiques de sélection. Les bactéries transformées se développent sur la nuit à 37°C.

1.2. Production de protéines recombinantes dans *E. coli*

1.2.1. Test de production en petit volume

La production d'une protéine recombinante par une bactérie est testée par culture liquide dans 3 mL de LB (20 g/L) avec des antibiotiques. Après 3 à 4 h d'incubation à 37°C en agitation (150 rpm), 150 µL de solution sont conservés dans un tube eppendorf (utilisation en 1.2.4), et la production est induite par ajout d'IPTG à 100 µM. La culture est replacée à 37°C sous agitation pendant 3 h, 100 µL de culture sont culottés par centrifugation pendant 1 min à 13 400 rpm et le culot est remis en suspension dans 10 µL de tampon de dénaturation Laemmli (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,008 %, β-mercaptoéthanol 10 %). Le mélange est chauffé 10 min à 95°C et déposé sur gel de polyacrylamide dénaturant et réducteur pour électrophorèse.

1.2.2. Détection de protéines par électrophorèse

L'application d'un champ électrique permet de séparer des protéines par migration sur gel de polyacrylamide en conditions réductrices et dénaturantes. Selon le pourcentage de polymère, le polyacrylamide forme une maille plus ou moins fine et permet une séparation plus résolutive des protéines en fonction de leur poids moléculaires (voir tableau 4).

Pourcentage d'acrylamide	Gamme de séparation en Da
10	22 000 – 300 000
12	13 000 – 200 000
15	2 500 – 100 000

Tableau 4: Résolution des gels de polyacrylamide en fonction du pourcentage en polymère.

Le gel d'acrylamide est constitué de 2 parties, avec un gel dit de concentration et un gel de séparation dont la composition est détaillée dans le tableau 5.

Composés	Gel de séparation (15%)	Gel de concentration (5%)
Tris-HCl 1,5 M pH 8.85	1,875 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6.8	-	0,5 mL
H_2O distillée	2,68 mL	1,18 mL
Mélange acrylamide-bisacrylamide (29 :1) 40 %	2,81 mL	266 µL
SDS 20 %	37,5 µL	10 µL
Persulfate d'ammonium 10%	45 µL	18 µL
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	11 µL	3,2 µL

Tableau 5: Mélange pour 2 gels de polyacrylamide à 15% (0,75mm d'épaisseur).

La migration s'effectue en présence de tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, Sodium dodécyl sulfate - SDS 0,1 %). Les échantillons en solution dans du tampon de dénaturation Laemmli sont déposés dans les puits en parallèle d'un marqueur de masse moléculaire (« Precision plus unstained » - Biorad) puis la migration s'effectue à 180 V. Après 10 min de coloration dans une solution contenant 45 % d'éthanol, 10 % d'acide acétique et 2,5 g/L de bleu de Coomassie R-250, le gel est décoloré à l'aide d'une solution d'acide acétique à 7,5 % et d'éthanol à 5 %. La masse moléculaire des protéines est déduite par comparaison au marqueur.

1.2.3. Détection de protéines par Western Blot

Le western blot est une technique d'immunodétection de protéines. Les échantillons protéiques sont préalablement chauffés 10 min à 95°C puis séparés par migration à 160 V sur gel de polyacrylamide à 15 % dénaturant et réducteur. Pour être accessibles aux anticorps, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Ainsi, le gel de polyacrylamide est mis au contact d'une membrane de nitrocellulose entre deux papiers Whatman dans un tampon de transfert composé de Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 10 % (v/v). Le montage est placé pendant 1 h à 110 V dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon de transfert. Le champ électrique permet le transfert des protéines depuis le gel vers la membrane de nitrocellulose mais entraîne une augmentation de la température du système qui est donc refroidit en permanence. Après transfert, les sites libres de la membrane sont bloqués pour éviter une fixation aspécifique de l'anticorps. La membrane est transférée dans un tube de 50 mL en présence de 5 mL de solution de blocage « Odyssey blocking buffer » (Li-Cor) et de 5 mL de solution PBS composée de NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM. Les tubes sont agités pendant 45 min à température ambiante avant l'ajout de 5 µL de tween 20 (0,05%) et de sérum de lapin dilué au 1/1 000e, contenant les anticorps primaires dirigés spécifiquement

contre la protéine d'intérêt. Après une incubation de 30 min sous agitation, la membrane est lavée quatre fois pendant 1 min avec 10 mL de tampon PBS tween (solution PBS et tween 20 à 0,05 %). A cette étape la membrane est incubée 30 min avec des anticorps secondaires dilués au 1/5 000e dans 5 mL de solution de blocage, 5 mL de tampon PBS, 5 µL de tween 20 (0,05 %) et 5 µL de SDS 20 % (0,01 %). Les anticorps secondaires sont couplés à un fluorochrome détectable par imagerie infrarouge. La révélation des protéines se fait à l'aide du scanner Odyssey (Li-Cor) après 3 lavages pendant 1 min dans 10 mL de tampon PBS tween suivis de 3 lavages d'une minute dans 10 mL de tampon PBS.

1.2.4. Production en gros volume de culture

Pour les cultures en gros volume, 150 µL de bactéries non induites servent à inoculer 200 mL de LB liquide (20 g/L) contenant des antibiotiques de sélection. Les bactéries se développent pendant 1 nuit à 37°C sous agitation (150 rpm) puis le volume de culture est augmenté à 3,2 L. Après 3 à 4 h d'incubation à 37°C sous agitation (150 rpm), deux protocoles sont envisageables pour la production de protéines.

Le premier, est un protocole de production à 37°C sous agitation (150 rpm) pendant 4 h après induction par ajout d'IPTG à 100 µM. Les bactéries sont collectées à l'aide d'une étape de centrifugation de 20 min à 5 000 rpm et remises en suspension dans un tampon de purification. Les bactéries sont conservées à -20°C en attendant l'étape de purification.

Le second protocole consiste en la production de protéines à basse température pour améliorer leur solubilité. Les protéines chaperons d'*E. coli* sont induites par 2 h d'incubation à 4°C en présence de 0,5 % d'éthanol et la production des protéines recombinantes est initiée par l'ajout d'IPTG à 100 µM. Les bactéries sont incubées 16 h sous agitation (150 rpm) à 20°C puis elles sont collectées et conservées à -20°C.

1.3. Purification de protéines recombinantes

La première étape de purification consiste à lyser les bactéries par sonication 2 à 3 fois 1 min à 15 % d'amplitude (sonde de 1 cm de diamètre – Branson) pour libérer les protéines à l'extérieur des cellules. Les débris cellulaires et les protéines insolubles sont séparés des protéines solubles par centrifugation à 4°C, 30 min à 20 000 rpm. Les protéines recombinantes étant *a priori* solubles, elles se trouveraient dans le surnageant après centrifugation. On distingue 2 protocoles de purification en fonction de la présence ou non d'une étiquette polyhistidine sur la protéine recombinante mais toutes les étapes présentées ci-dessous sont effectuées à 4°C.

1.3.1. Protéines étiquetées

Il existe plusieurs types d'étiquettes pour la purification de protéines. La plus couramment utilisée au laboratoire est l'étiquette hexa-histidine (6-his) liée à l'extrémité N-terminale ou C-terminale de la protéine d'intérêt. Les chaînes polyhistidines interagissent fortement avec des ions nickel chélatés sur matrice hydrophile, permettant la fixation des protéines étiquetées sur colonne d'affinité métallique, aussi appelée IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography - Qiagen). La colonne est équilibrée avec du tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM, imidazole 10 mM, puis la fraction de protéines solubles est passée sur colonne

en récupérant ce qui passe à travers. L'imidazole permettant de décrocher les protéines étiquetées par compétition pour l'ion métallique, la colonne est lavée avec 100 à 150 mL de Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM, imidazole 20 mM de sorte à éliminer des protéines non retenues ou fixées de façon aspécifique et la protéine d'intérêt est éluée dans du Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM, imidazole 250 mM. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont déterminées par mesure d'absorbance à 280 nm. Elles sont ensuite regroupées, concentrées par ultrafiltration sous pression d'azote (cellule Amicon avec membrane YM10 – Millipore), et l'imidazole est éliminé par dialyse contre un tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM. La concentration en protéine est déterminée après mesure de l'absorbance à 280 nm, par la loi de Beer-Lambert (Absorbance = ε.l.c avec « ε » le coefficient d'extinction molaire théorique en $mol^{-1}.L.cm^{-1}$ déterminé d'après la séquence primaire de la protéine, « l » la longueur de la cuve en cm et « c » la concentration de la protéine en $mol.L^{-1}$), et la pureté de l'échantillon est analysée par dépôt de 10 µg sur gel de polyacrylamide dénaturant et réducteur.

1.3.2. Protéines non étiquetées

En absence d'étiquette polyhistidine, il est possible de séparer une protéine d'intérêt des protéines solubles totales d'*E. coli* en plusieurs étapes *via* son degré d'hydratation ou son hydrophobicité, sa masse moléculaire, et son point isoélectrique, c'est-à-dire sa charge ionique à un pH donné.

1.3.2.1. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium

Après sonication, la fraction soluble est précipitée à une saturation en sulfate d'ammonium de 40 % puis 80 % pour éliminer une partie des protéines d'*E. coli*. Le sulfate d'ammonium modifie la force ionique de la solution et entre en compétition pour les molécules d'eau avec les protéines, plus ou moins solubles en solution, en les faisant précipiter selon leur niveau d'hydratation. Le premier palier de saturation à 40 % est atteint par dissolution de sulfate d'ammonium à 226 mg/mL dans la fraction soluble. Cet extrait est ensuite centrifugé à 18 000 rpm pendant 20 min à 4°C, et le surnageant est amené à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium (soit 516 mg/mL final) et à nouveau centrifugé pendant 20 min à 4°C à 18 000 rpm. Chaque culot est repris dans 6 mL de tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM et la présence de la protéine d'intérêt est analysée par migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices.

1.3.2.2. Séparation par chromatographie d'exclusion de taille

La fraction contenant la protéine d'intérêt est utilisée lors d'une deuxième étape de purification appelée chromatographie d'exclusion de taille. Pour cela on utilise une résine constituée de billes poreuses à travers lesquelles les molécules sont séparées en fonction de leur masse moléculaire. Ainsi, les petites protéines traversent toutes les billes par leurs pores et sont ralenties, alors que les grosses protéines passent autour des billes et sortent dans le volume d'exclusion de la résine. Nous disposons de 2 résines acrylamide-agarose (ACA) au laboratoire : ACA 34 et ACA 44 (Pall-BioSepra), permettant le fractionnement résolutif de protéines allant de 350 à 20 kDa et de 130 à 10 kDa respectivement. Avant dépôt de l'extrait protéique, ces résines sont équilibrées dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM. Un profil

d'élution est établi par mesure de l'absorbance à 280 nm des fractions collectées et les fractions d'intérêt sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant et réducteur. Les fractions sont ensuite regroupées puis concentrées dans 2 à 5 mL par ultrafiltration sous pression d'azote (cellule Amicon avec membrane YM10 - Millipore) et dialysées plusieurs fois dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0 pour diminuer la concentration en NaCl de l'échantillon en vue de l'étape suivante.

1.3.2.3. Séparation par chromatographie échangeuse d'anions

La chromatographie échangeuse d'anions est réalisée sur une résine diéthylaminoéthyle (DEAE)-sépharose, composée de billes de sépharose sur lesquelles sont greffés des groupements DEAE chargés positivement à pH 8.0. La résine est équilibrée en tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0 avant dépôt de l'échantillon. Lors du passage sur colonne, les protéines chargées négativement à pH 8.0 se fixent par liaison électrostatique sur les groupements diéthylaminoéthyle et les protéines chargées positivement ne sont pas retenues. Les protéines liées sur la résine sont éluées par un gradient de NaCl de 0 à 0,4 M préparé dans 30 mM de Tris-HCl pH 8.0. Dans ce cas, les ions Cl^- entrent en compétition avec les protéines pour la fixation sur la colonne et permettent d'éluer les protéines ayant une affinité de plus en plus forte pour la résine. Les fractions collectées en sortie de colonne sont analysées de la même façon qu'après chromatographie d'exclusion de taille. Après cette étape, si la protéine est jugée suffisamment pure, elle est concentrée jusqu'à 1 ou 2 mL par ultrafiltration sous pression d'azote, puis stockée à -20°C par aliquots de concentration connue avec ou sans glycérol selon sa stabilité face à des cycles de congélation-décongélation.

1.3.2.4. Séparation par chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel

Lorsque la pureté d'une protéine est insuffisante après chromatographie échangeuse d'anions, il est possible de séparer la protéine de ses contaminants par chromatographie d'interaction hydrophobe. La résine utilisée est une phényl-sépharose sur laquelle sont fixés des groupements hydrophobes (des noyaux phénols) à l'extrémité d'une chaîne carbonée. L'ajout de 1 M de sulfate d'ammonium permet le dépliement des protéines et donc l'exposition de régions hydrophobes qui établissent des liaisons avec la matrice. Avant dépôt de l'échantillon, la colonne est équilibrée en Tris-HCl 30 mM pH 8.0, sulfate d'ammonium 1 M. Les protéines sont éluées par fractionnement avec un gradient décroissant de 1 à 0 M de sulfate d'ammonium dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0. La diminution de la concentration en sulfate d'ammonium entraîne le repliement des protéines en fonction de leur hydrophobicité et donc leur élution. Les fractions d'intérêt sont analysées de la même façon que précédemment.

2. Analyse de protéines à centre Fe-S

La plupart des protéines utilisées au cours de ma thèse sont connues pour lier un centre Fe-S. Ainsi, après purification leur capacité à lier un centre Fe-S *in vitro* a été analysée.

2.1. Reconstitution de centre Fe-S en anaérobiose

Pour la reconstitution de centre Fe-S en conditions anaérobies, les protéines sont incubées avec du fer et un réducteur. Le soufre peut être apporté directement (Li_2S) ou par action enzymatique d'une cystéine désulfurase en présence de L-cystéine. Au début de ma thèse la technique utilisée était basée sur l'utilisation de dithiothréitol (DTT) en tant que réducteur dans le mélange réactionnel. Il est cependant apparu dans certaines publications, et aussi dans nos observations, que celui-ci pouvait interférer avec la réaction de reconstitution. En effet, les centres Fe-S se lient de préférence sur les fonctions thiol des cystéines et le DTT, qui possède 2 fonctions thiol, représente un ligand supplémentaire lors de la réaction (Gao et al., 2018). Au cours de ma thèse, j'ai donc modifié le protocole de reconstitution *in vitro,* passant de celui présenté en 2.1.1. à celui présenté en 2.1.2., en omettant le DTT et en pré-réduisant la protéine avec du Tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) puis en éliminant ce dernier avant la réaction de reconstitution.

2.1.1. Reconstitution en présence d'agent réducteur

La réaction présentée ici (et en 2.1.2.) est réalisée dans un dispositif « boîte à gants » (Jacomex) où la saturation de l'air en oxygène est inférieure à 2 ppm. Dans un premier temps, 50 µM d'apoprotéine est réduite pendant 1 h en présence de 2,5 mM de DTT dans un volume de 500 µL. La reconstitution de centre Fe-S est initiée par l'ajout de 37,5 mM de Tris-HCl pH 8.0, 37,5 mM de NaCl, 2,5 mM de DTT supplémentaire (5 mM final) et 225 µM de Fe-citrate (FeIII), soit un excès de 4,5 fois par rapport à la protéine. Le mélange est homogénéisé par inversion et 225 µM de soufre sous forme de Li_2S est ajouté après 5 min (quand la solution prend une couleur rose). La réaction de reconstitution dure 1 h à température ambiante et peut être suivie par mesure du spectre d'absorption UV-visible de la protéine à intervalles de temps réguliers. L'excédent de réactif est éliminé par dessalage sur colonne G-25, équilibrée dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0, puis la protéine est concentrée par ultrafiltration en centricon (Millipore). Le spectre d'absorption UV-visible de l'holoprotéine est ensuite mesuré entre 260 et 630 nm.

Il convient de préciser qu'un protocole alternatif permet d'apporter le soufre par réaction enzymatique et donc de manière plus progressive. Dans ce cas, l'excès de Fe-citrate est de 20 fois par rapport à la concentration en protéine, soit 1 mM, et le Li_2S est remplacé par 1 mM de L-cystéine et une quantité catalytique de cystéine désulfurase d'*E. coli* (EcIscS) soit 5 µM. La réaction est suivie par spectrophotométrie pendant 1 à 2 h et est interrompue de la même façon que précédemment.

2.1.2. Reconstitution en absence d'agent réducteur

Ici, l'apoprotéine est pré-réduite en présence de TCEP et d'EDTA, un chélateur de métaux, de sorte à obtenir une protéine réduite sous apoforme. Dans un volume final de 500 µL, sont incubés 50 µM de protéine, 1 mM de TCEP et 2,5 mM d'EDTA pendant une heure avant séparation sur colonne G-25, équilibrée avec du tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0. La protéine est ensuite concentrée avant incubation pendant 1 h dans un volume final de 500 µL en présence de Tris-HCl 37,5 mM pH 8.0, NaCl 37,5 mM, Sel de Mohr (FeII) 1 mM, L-cystéine 1 mM et de la cystéine désulfurase IscS d'*E. coli* à 5 µM. Le mélange réactionnel est ensuite dessalé sur G-25 et l'holoprotéine est concentrée par ultrafiltration en centricon.

2.2. Caractérisation d'holoprotéines après reconstitution

Après vérification de la présence potentielle d'un centre Fe-S sur une protéine par enregistrement du spectre d'absorption UV-visible entre 260 et 630 nm, il s'agit de caractériser ce centre plus finement, notamment par quantification du fer et du soufre fixés sur la protéine, et par l'étude de son état d'oligomérisation sous holoforme.

2.2.1. Etude de l'état d'oligomérisation des protéines par filtration sur gel

L'état d'oligomérisation d'une protéine est déterminé par chromatographie d'exclusion de taille, ou filtration sur gel. Le système utilisé est couplé à la technologie « Akta purifier » (GE Healthcare) qui automatise le processus et permet de lire l'absorbance de l'échantillon en sortie de colonne à 3 longueurs d'ondes différentes. Les analyses se font à partir de 100 µg de protéine, déposée sur une colonne équilibrée en Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM. Nous possédons des dispositifs préparatifs et analytiques, les premiers sont utilisés en fin de purification afin d'éliminer un contaminant ou de changer de tampon, et les seconds servent à analyser des états d'oligomérisation, comme ici. Chaque dispositif est disponible dans 2 gammes de fractionnement : S-200 ou S-75 (Sephadex) dont le domaine de fractionnement s'étend de 600 000 Da à 10 000 Da et de 70 000 Da à 3 000 Da respectivement. Pour chaque colonne, une courbe de calibration est réalisée à partir des protéines globulaires suivantes : du bleu Dextran (MM = 2 000 000 Da), une thyroglobuline (MM = 669 000 Da), une apoferritine (MM = 443 000 Da), une β-amylase (MM = 200 000 Da), l'albumine de sérum bovin ou BSA (MM = 66 000 Da), une anhydrase carbonique (MM = 29 000 Da), du cytochrome C (MM = 12 400 Da) et une aprotinine (MM = 6 500 Da).

2.2.2. Dosage protéique

Le centre Fe-S pouvant représenter une contribution conséquente de l'absorbance à 280 nm de la protéine, il n'est pas possible de quantifier les concentrations des holoprotéines en utilisant la loi de Beer-Lambert. Ici, un kit de quantification protéique basé sur l'acide bicinchoninique (aussi appelé test BCA) est utilisé. Dans ce test colorimétrique, les protéines réduisent des ions cuivriques Cu^{2+} en Cu^{+} en milieu alcalin. Les ions ainsi obtenus réagissent avec l'acide bicinchoninique et forment un complexe pourpre dont l'absorbance à 562 nm est proportionnelle à la quantité de protéines. Le dosage est réalisé conformément aux instructions du fournisseur (BCAssay quantification kit – Biochem).

2.2.3. Quantification de fer présent dans les holoprotéines

La méthode de dosage du fer dérive de celle de Fish (Fish, 1988). Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur la formation, en milieu réducteur tamponné, d'un complexe tris[bathophénanthroline]-Fe(II). Pour ce dosage, une gamme étalon allant de 0 à 20 nmoles de Fe^{2+} est réalisée à l'aide d'une solution de sel de Mohr à 500 µM (formule $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$) dans un volume de 130 µL ajusté avec de l'H_2O. Les échantillons protéiques sont dilués dans le même volume avec de l'eau. La solution est précipitée par ajout de 90 µL d'acide perchlorique à 70 % (v/v) puis agitée au vortex. Les échantillons de la gamme sont incubés 15 min à température ambiante, tandis que les échantillons à doser sont incubés 10 min à température ambiante avant de culotter les protéines précipitées par centrifugation 10 min à 13 400 rpm.

Le protocole est ensuite strictement identique pour les 2 types d'échantillons dont 180 µL sont mélangés avec 144 µL de bathophénanthroline disulfate, un chélateur de fer, à 1,7 mg/mL. Le fer ferrique Fe^{3+} en solution est réduit en fer ferreux Fe^{2+} par ajout de 72 µL d'ascorbate de sodium à 38 mg/mL. La formation du complexe est catalysée par addition de 152 µL d'acétate d'ammonium à 477 mg/mL. Le mélange est homogénéisé au vortex puis incubé 30 min à température ambiante avant mesure de la différence d'absorbance entre 535 et 680 nm.

2.2.4. Quantification du soufre labile présent dans les holoprotéines

Le soufre incorporé par les protéines peut être libéré sous forme d'H_2S après précipitation acide. La réaction en milieu acide d'une molécule de N,N-diméthyl-p-phénylènediamine (DMPD, formule : $(CH_3)_2NC_6H_4NH_2$) avec H_2S permet la formation de bleu de méthylène, qui absorbe à 670 nm et permet donc la quantification colorimétrique du soufre libéré. La gamme étalon de 0 à 20 nmoles de soufre est réalisée avec une solution de Li_2S à 200 µM diluée dans un volume de 100 µL. Le milieu est acidifié par l'ajout de 300 µL d'acétate de zinc à 10 mg/mL, suivi immédiatement par l'ajout de 15 µL de soude NaOH 3 M pour éviter la perte de soufre liée à la formation d'H_2S. Le mélange est agité et incubé entre 5 et 10 min à température ambiante. 50 µL de DMPD à 20 mM dans 7,2 M d'HCl, et 50 µL de chlorure de fer ($FeCl_3$) à 30 mM dans 1,2 M d'HCl, sont ajoutés l'un à la suite de l'autre puis le mélange est agité vigoureusement et incubé 30 min à température ambiante. Les tubes sont centrifugés 5 min à 13 400 rpm avant lecture de l'absorbance du surnageant à 670 nm. Pour les échantillons protéiques, la dernière incubation dure 3 h à 4°C avant centrifugation et lecture d'absorbance à 670 nm.

2.3. Transfert *in vitro* de centre Fe-S en anaérobiose

Pour les réactions de transfert de centre Fe-S *in vitro* l'une des deux protéines possède une étiquette polyhistidine à son extrémité N- ou C-terminale et l'autre non, de sorte à pouvoir les séparer sur colonne d'affinité métallique IMAC. L'expérience se déroule en conditions anaérobies et nécessite au préalable la reconstitution de centre Fe-S sur la protéine donneuse (protocole présenté en 2.1.2.) et la préparation de l'apoprotéine acceptrice. La protéine acceptrice est pré-réduite 1 h avec un excès 20 x TCEP et 50 x EDTA puis dessalée sur G-25 équilibrée en Tris-HCl 30 mM pH 8.0. Le spectre d'absorption UV-visible de chaque protéine est enregistré, et l'holoprotéine est ajoutée à l'apoprotéine dans un volume final inférieur à 1 mL. Après 1 h d'incubation, les protéines sont séparées sur résine IMAC (Qiagen) équilibrée en Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM, imidazole 20 mM. La colonne est lavée avec 6 volumes de Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM, imidazole 20 mM, puis la protéine étiquetée est éluée avec 6 volumes de tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM, imidazole 250 mM. Les fractions sont ensuite regroupées et concentrées par ultrafiltration en centricon jusqu'à 500 µL puis dialysées en tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0 par des cycles de concentration-dilution en centricon. Chaque spectre d'absorption UV-visible est à nouveau enregistré entre 260 et 630 nm pour comparaison avec les spectres de départ, le fer et le soufre de chaque fraction sont quantifiés, et 10 µg de protéines sont déposés sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices pour valider la séparation après IMAC.

Chapitre 3 : Recherche de partenaires

1. Double hybride en levure

Cette technique est basée sur la reconstitution du facteur de transcription Gal4 dont le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation de la transcription sont exprimés séparément, chacun en fusion à une protéine d'intérêt. Si deux protéines interagissent en levure, et si leur conformation le permet, le facteur de transcription Gal4 est reconstitué et entraîne l'expression d'un gène rapporteur, *HIS3*, qui restaure l'auxotrophie pour l'histidine sur milieu sélectif (figure 15). Les plasmides utilisés sont le plasmide pGAD (plasmid Gal4 Activation Domain) et le plasmide pGBK (plasmid Gal4 Binding Domain).

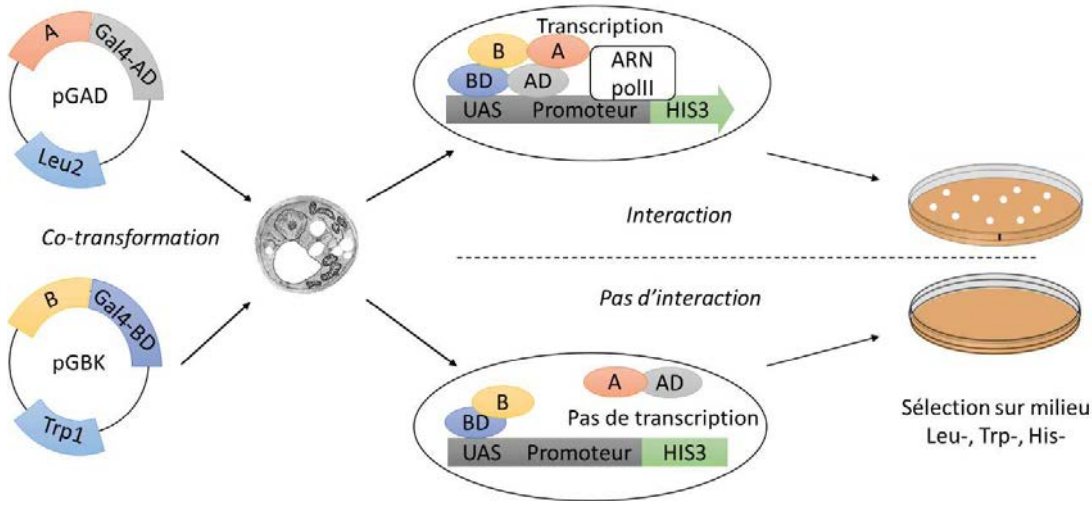


Figure 15: Principe de fonctionnement du double hybride binaire en levure (Y2H). Les levures sont co-transformées avec les plasmides pGAD et pGBK qui permettent chacun l'expression d'une protéine fusionnée à un demi facteur de transcription Gal4. Les levures ainsi transformées sont capables de se développer sur milieu Leu- Trp-. En cas d'interaction, le facteur de transcription est reconstitué et permet l'expression du gène *HIS3* qui confère aux levures la capacité de croître sur milieu His-. A l'inverse, en absence d'interaction, le facteur de transcription n'est pas reconstitué et les levures sont incapables de se développer sur milieu His-.

1.1. Co-transformation de levures

Dans un premier temps, les cellules CY306 (MATα, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *leu2-3*, *112*, *trp1-901*, *gal4-542*, *gal80-538*, 252 lys2::UAS$_{GAL1}$-TATA$_{GAL1}$-HIS3, URA3::UAS$_{GAL4,17MERS(x3)}$-TATA$_{CYC1}$-LacZ, 253 *trx1*::KanMX4, *trx2*::KanMX4; Vignols et al., 2005) sont cultivées à partir de stocks de cellules conservées dans du glycérol sur milieu YNB solide composé de 0,7 % de Yeast Nitrogen Base (YNB – MP Biomedicals), 2 % de glucose et 2 % d'agar bactériologique (Difco), complémenté avec les éléments nécessaires : leucine, tryptophane, histidine, uracile, leucine, adénine et méthionine (tableau 6). Après 5 jours de croissance à 30°C, les levures sont cultivées une nuit à 30°C sous agitation (190 rpm) dans 40 mL de milieu liquide YNB à 0,7 % contenant 2 % de glucose ainsi que les acides aminés et bases nécessaires. Lorsque la culture atteint une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 1, les levures sont collectées par centrifugation pendant 5 min à 2 000 rpm, puis lavées dans 10 mL d'eau stérile et centrifugées 5 min à 2 000 rpm. Le surnageant est éliminé et les levures sont lavées avec 10 mL d'acétate de lithium (LiAc) à 100 mM pH 7,5 puis culottées par centrifugation 5 min à 2 000 rpm. Le surnageant est éliminé et les cellules sont reprises dans 1,9 mL de LiAc 100 mM pH 7.5 pour être transformées.

Acides aminés	Concentration de la solution mère	Concentration finale
Histidine	130 mM	1,3 mM
Leucine	45 mM	0,45 mM
Lysine	100 mM	1 mM
Méthionine	100 mM	1 mM
Tryptophane	10 mM	0,1 mM
Bases	Concentration de la solution mère	Concentration finale
Adénine	30 mM	0,3 mM
Uracile	18 mM	0,18 mM

Tableau 6: Concentrations des acides aminés et bases utilisées en double hybride en levure.

Lors de la transformation, 300 ng des plasmides recombinants (cartes des plasmides présentés en figure 16) sont mélangés dans un tube de 2 mL avec 50 µL de levures et 300 µL de solution de transformation composée de PEG-4 000 40 %, Tris-HCl 100 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, et LiAc 100 mM pH 7.5. Le mélange est homogénéisé délicatement et incubé 30 min à 30°C sous agitation (190 rpm). Les levures sont transformées par un choc thermique de 20 min à 42°C puis la solution de PEG est diluée par ajout de 1 mL de YNB liquide dans chaque tube. Les levures sont collectées par centrifugation pendant 1 min à 13 400 rpm et le culot est remis en suspension dans 120 µL de YNB liquide avant étalement sur milieu YNB solide dépourvu de leucine et tryptophane pour sélectionner les transformants (0,7 % YNB, 2 % glucose, 2 % agar bactériologique, histidine, uracile, lysine, adénine et méthionine).

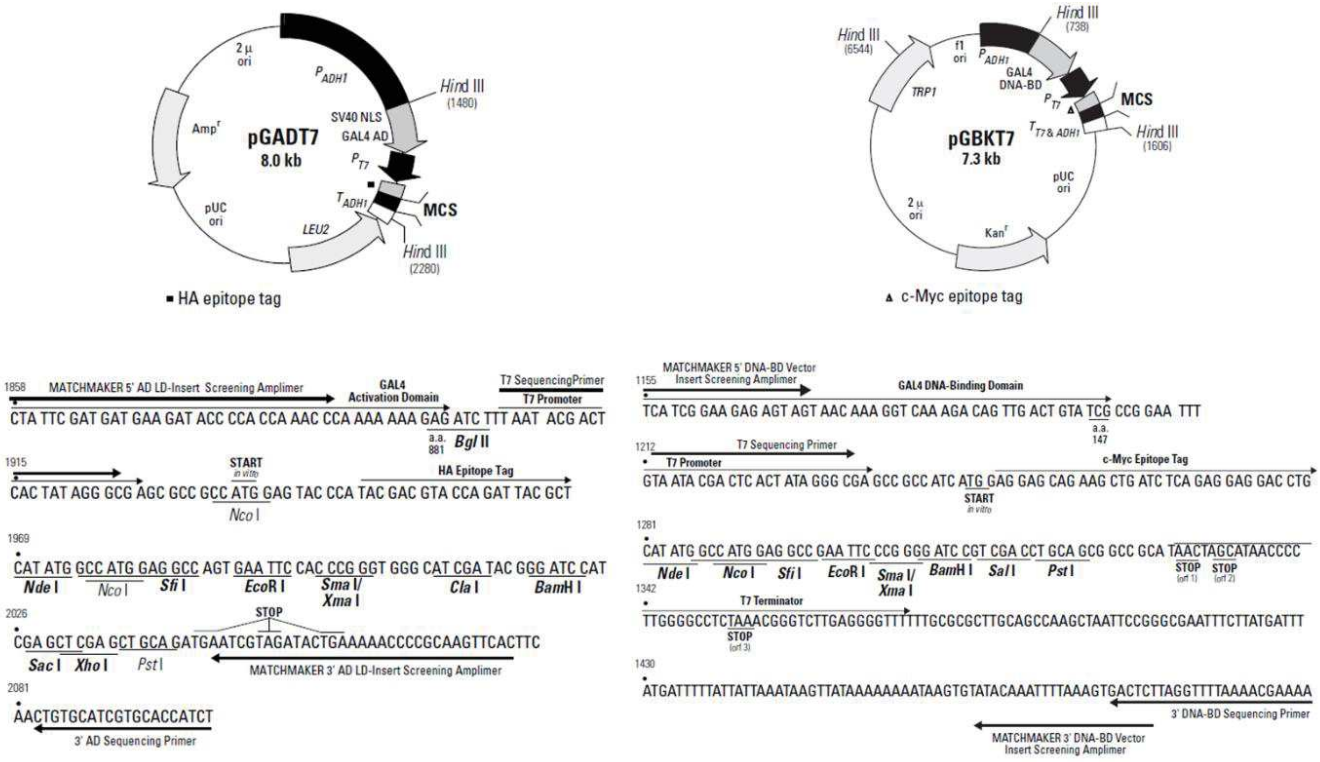


Figure 16: Cartes des plasmides utilisés pour les expériences de double hybride en levure. Le plasmide pGADT7 permet la fusion d'une protéine au domaine d'activation du facteur de transcription Gal4, une cassette de résistance à l'ampicilline sert à sa sélection en bactéries alors que les levures transformées sont détectées sur milieu dépourvu de leucine. Le plasmide pGBKT7 permet quant à lui de produire une protéine fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4, une cassette de résistance à la kanamycine permet sa sélection en bactéries alors que l'auxotrophie pour le tryptophane sert à détecter les levures transformées.

1.2. Détection des interactions protéine-protéine par croissance sur milieu sélectif

Après 5 jours de culture à 30°C, 2 transformants sont mis en culture à l'aide d'un cure-dents dans 600 µL de YNB contenant 2 % de glucose et les acides aminés et bases nécessaires (histidine, uracile, lysine, adénine et méthionine). Ces cultures sont incubées à 30°C sous agitation (190 rpm) pendant une nuit. La DO_{600} de chaque culture est mesurée après dilution 10 fois dans du YNB liquide pour en ajuster la valeur à 0,05 avant la phase de dépôt sur milieu sélectif. Les levures sont déposées par gouttes de 7 µL sur milieu YNB solide, composé de 0,7 % de YNB, 2 % de glucose et 2 % d'agar bactériologique, contenant de l'uracile, lysine, adénine et méthionine dans différentes conditions. Les dépôts sont ainsi faits sur 5 boîtes ; une servant de contrôle de dépôt et de croissance et contenant de l'histidine, la seconde ne contenant que les 4 acides aminés et bases mentionnés ci-dessus mais pas d'histidine et les 3 dernières boîtes contenant respectivement 2, 5 et 10 mM de 3-aminotriazole (3-AT), un inhibiteur compétitif d'un des produits du gène *HIS3*. Les boîtes sont photographiées après 5 jours d'incubation à 30°C à l'aide du système « Gel Doc XR » (Biorad) afin d'évaluer la croissance des cellules.

2. Complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC)

Cette méthode est similaire au double hybride en levure dans la mesure où elle se base sur l'expression d'une protéine rapportrice, la YFP (yellow fluorescent protein) qui est scindée dans 2 vecteurs distincts en fusion avec une protéine A d'une part et avec une protéine B d'autre part. Dans le cas présent, l'interaction est vérifiée directement *in planta* par microscopie confocale à fluorescence. En cas d'interaction entre les protéines A et B, cela permet en principe la reconstitution du chromophore de la YFP et une fluorescence est ainsi détectable à 527 nm par microscopie confocale après une excitation à 514 nm (figure 17).

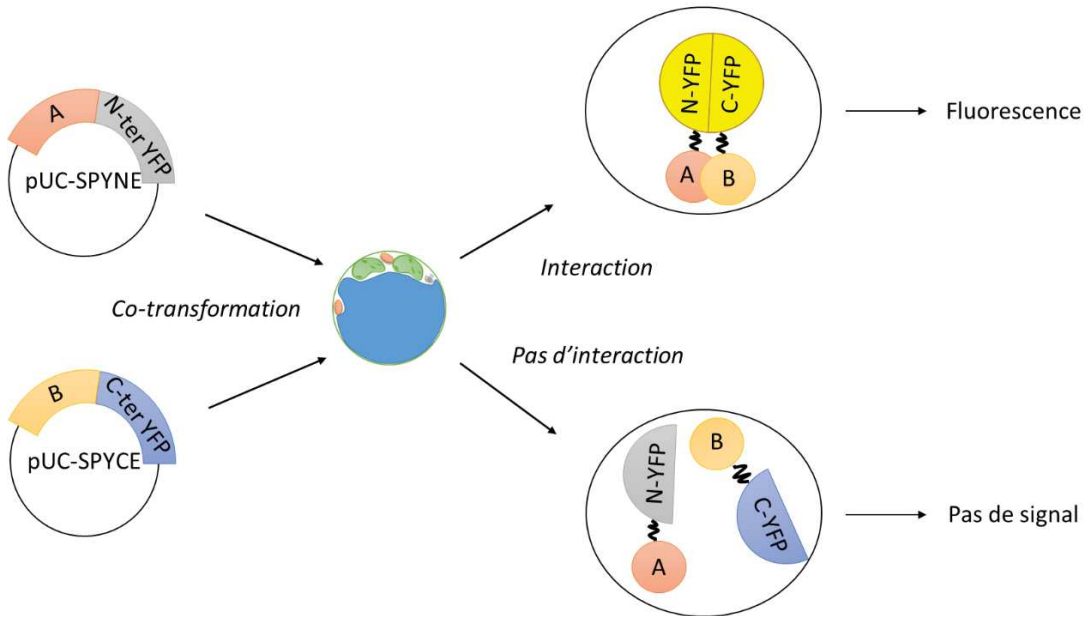


Figure 17: Principe de la complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC). Des protoplastes d'*A. thaliana* sont co-transformés avec les plasmides pUC-SPYNE et pUC-SPYCE qui permettent chacun l'expression d'une protéine fusionnée à une demie YFP. Si les protéines fusionnées à chaque ½-YFP interagissent ensembles, le chromophore est reconstitué et permet l'émission d'une fluorescence à 527 nm après excitation à 514 nm. A l'inverse, en absence d'interaction, la YFP n'est pas reconstituée et aucune fluorescence n'est détectée.

2.1. Préparation des plasmides

Puisque cette approche demande de grandes quantités de plasmide (cartes plasmidiques présentées en figure 18), l'ADN plasmidique est extrait à partir de 100 mL de culture bactérienne grâce au kit « Plasmid Plus Midi kit » (Qiagen) selon les instructions du fournisseur et les concentrations sont estimées à l'aide du spectrophotomètre « Nanodrop 1 000 » (Thermo Scientific).

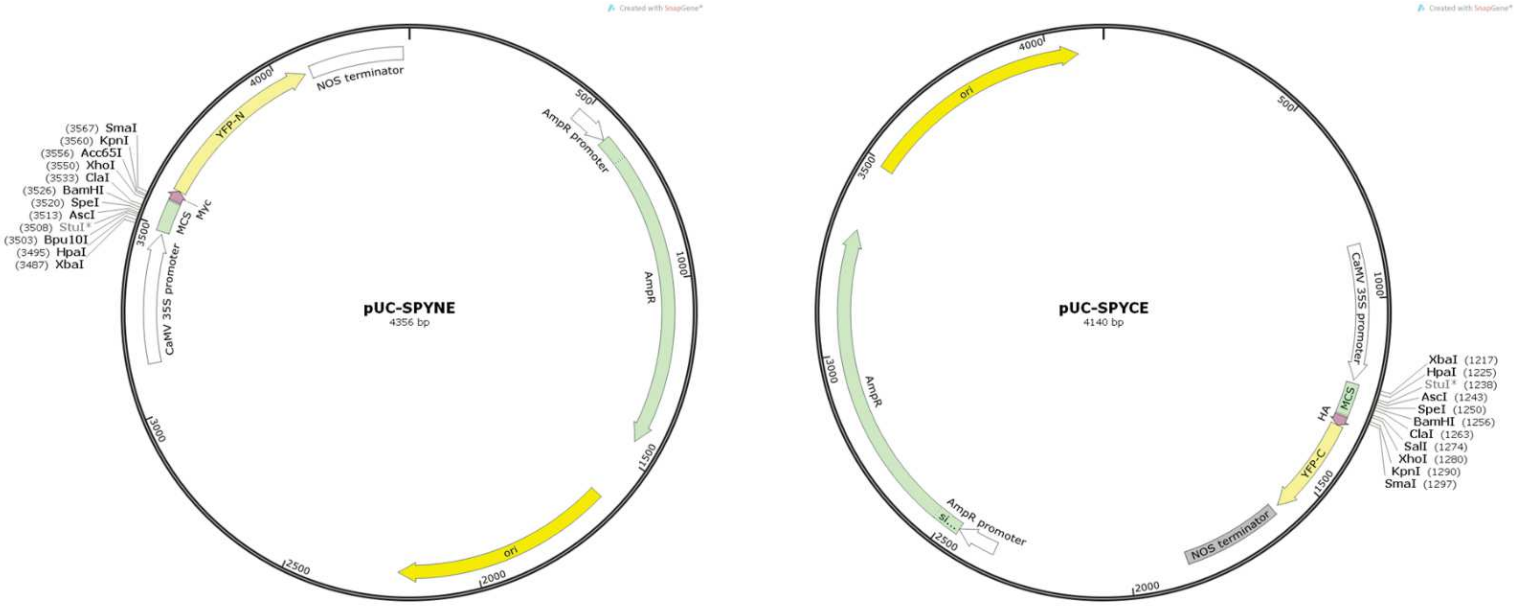


Figure 18: Cartes des plasmides utilisés lors d'expériences de BiFC. Le vecteur pUC-SPYNE permet la fusion à la partie N-terminale de la YFP alors que le vecteur pUC-SPYCE permet la fusion à la partie C-terminale de la YFP. Les deux plasmides portent une cassette de résistance à l'ampicilline.

2.2. Préparation et transformation du matériel végétal

2.2.1. Préparation de protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*

Les protoplastes sont préparés à partir de plants d'*A. thaliana* âgés de 3 semaines cultivés en jours courts, dont les feuilles sont découpées en fines lamelles au scalpel et déposées dans une boîte de Petri contenant 10 mL de solution enzymatique. Cette solution est composée de mannitol 400 mM, KCl 20 mM, MES 20 mM, cellulase R10 1 %, macérozyme R10 0,25 % (Duchefa Biochemie). Les enzymes sont activées à 55°C pendant 10 min et la solution est refroidie avant ajout de $CaCl_2$ 10 mM et BSA 0,1 %. Toutes les solutions sont filtrées avant utilisation (0,45 µm). Après une étape d'infiltration sous vide de 30 min, les protoplastes sont obtenus par digestion enzymatique de la paroi végétale à l'obscurité pendant 3 h à température ambiante (~22°C). La solution est filtrée au-dessus d'un tube de 50 mL et la boîte de Petri est rincée avec 4 mL de solution de lavage, composée de NaCl 154 mM, $CaCl_2$ 125 mM, KCl 5 mM, MES 2 mM, glucose 5 mM, filtrée dans le même tube de sorte à récupérer les protoplastes. La solution obtenue est délicatement homogénéisée puis centrifugée 5 min à 900 rpm (accélération et décélération douces). Le surnageant est éliminé à la pipette et les protoplastes sont délicatement remis en suspension dans 10 mL de solution de lavage. Après 1 min 30 de centrifugation à 900 rpm, le surnageant est remplacé par 2 mL de solution de lavage et la concentration en protoplastes est déterminée au microscope à l'aide d'une cellule de Neubauer. La solution est à nouveau centrifugée 5 min à 900 rpm, le surnageant est éliminé et les protoplastes

sont remis délicatement en suspension à une concentration de 500 000 protoplastes/mL dans une solution de reprise contenant du mannitol 400 mM, $MgCl_2$ 15 mM et MES 4 mM.

2.2.2. Transformation de protoplastes

Dans des tubes de 2 mL, 10 µg de chaque plasmide (pUC SPYNE et pUC SPYCE) sont mélangés avec 100 µL de protoplastes, soit 50 000 protoplastes. La transformation se fait par ajout de 110 µL de solution composée de PEG-4 000 40 %, mannitol 200 mM et $CaCl_2$ 100 mM. Après 5 min, la réaction est interrompue par dilution du PEG dans 1,8 mL de solution de lavage (voir plus haut). Le surnageant est éliminé par centrifugation à 900 rpm pendant 5 min, les protoplastes sont délicatement remis en suspension dans 100 µL de solution de reprise (voir plus haut) et transférés dans des puits contenant 900 µL de solution d'incubation composée de mannitol 500 mM, MES 4 mM et KCl 20 mM. Après 16 à 20 h d'incubation à 22°C à l'obscurité, les protoplastes sont centrifugés 5 min à 900 rpm et la quasi-totalité du surnageant est éliminée avant observation au microscope confocal à fluorescence.

Résultats

Chapitre 1 : Redondance fonctionnelle des protéines NFU au sein du chloroplaste

1. Caractérisation biochimique de NFU1 et recherche de partenaires par double hybride en levure

Afin de comprendre la fonction potentielle de NFU1 *in vivo*, il a été question de déterminer le type de centre Fe-S incorporé par des expériences de reconstitution *in vitro* sur la version non étiquetée de la protéine. Cette partie a nécessité l'ajustement des protocoles de reconstitution utilisés, passant ainsi de reconstitutions chimiques et/ou enzymatiques en présence de DTT à un protocole de reconstitution enzymatique en absence de DTT. La suppression de l'agent réducteur dans le mélange de reconstitution a permis de modifier l'état d'oligomérisation d'holoNFU1 qui était sous forme agrégée après reconstitution en présence de DTT alors que la protéine est éluée sous forme de dimère lors de l'étape de filtration sur gel après reconstitution enzymatique en absence de DTT. Sur ce dimère, 1,54 ± 0,29 atomes de fer et 1,68 ± 0,11 atomes de soufre ont été mesurés par monomère de NFU1, indiquant que la protéine fixe un centre [4Fe-4S] au sein d'un homodimère. Le deuxième axe était de déterminer les partenaires de NFU1 par double hybride en levure. Une collaboration avec l'INRA de Montpellier a permis de compléter cette approche par des études d'interactomique et de BiFC. D'après ces expériences, NFU1 interagit d'une part avec SUFD et SUFA1 qui font partie de la machinerie SUF, et d'autre part avec APR2, CpLIP, DWARF27.1, HCAR, IPMI, ISPG, NiR, SUFE3 et THIC qui sont des protéines chloroplastiques à centre [4Fe-4S] ainsi qu'avec GLU2, une glutamate synthase à centre [3Fe-4S]. Enfin, des expériences de transfert de centre Fe-S *in vitro* ont confirmé la capacité de NFU1 à céder un centre [4Fe-4S] aux protéines ISPG et THIC.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article suivant, actuellement en révision à The Journal of Biological Chemistry.

The plastidial *Arabidopsis thaliana* NFU1 binds and delivers [4Fe-4S] clusters to specific client proteins

Mélanie Roland[1], Jonathan Przybyla-Toscano[1,a†], Florence Vignols[2†], Nathalie Berger[2†], Loïck Christ[1], Véronique Santoni[2], Hui-Chen Wu[2,b], Tiphaine Dhalleine[1], Christian Dubos[2], Jérémy Couturier[1], Nicolas Rouhier[1]

[1] Université de Lorraine, Inra, IAM, F-54000 Nancy, France.
[2] BPMP, Université de Montpellier, CNRS, INRA, SupAgro, Montpellier, France.

Running title: Plastidial *iron-sulfur partners of NFU1*

† equal contribution

Present addresses:
[a] Department of Plant Physiology, Umeå Plant Science Centre, Umeå University, S-90187 10 Umeå, Sweden.
[b] Department of Biological Sciences and Technology, National University of Tainan, 70005 Tainan, Taiwan.

*To whom correspondence should be addressed: Université de Lorraine, UMR1136 Interactions Arbres/Microorganismes, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.
Email: nicolas.rouhier@univ-lorraine.fr, Phone number: ++ 33 3 72 74 51 57

Keywords: chloroplast, iron-sulfur cluster, protein maturation, transfer protein, NFU

ABSTRACT

Proteins incorporating iron-sulfur (Fe-S) cofactors are required for a plethora of metabolic processes. Their maturation depends on three Fe-S cluster assembly machineries in plants, located in the cytosol, mitochondria and chloroplasts. After *de novo* formation on scaffold proteins, Fe-S clusters are loaded onto client proteins by use of transfer proteins. Among plastidial representatives of this latter category, NFU2 and NFU3 are required for the maturation of the [4Fe-4S] clusters found in photosystem I subunits, acting upstream of HCF101. NFU2 is additionally required for the maturation of the [2Fe-2S] dihydroxyacid dehydratase, important for branched-chain amino acid synthesis. Here, we report that recombinant *Arabidopsis thaliana* NFU1 is able to assemble a [4Fe-4S] cluster per homodimer. We also provide insights into the specificity of NFU1 for the maturation of chloroplastic Fe-S proteins by performing co-immunoprecipitation experiments and assaying the physical interaction of NFU1 with many [4Fe-4S]-containing plastidial proteins using binary yeast two-hybrid assays. Interactions with two proteins involved in isoprenoid and thiamine biosynthesis, respectively 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase (ISPG) and 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate synthase (THIC), were further confirmed by bimolecular fluorescence complementation and *in vitro* Fe-S cluster transfer experiments. The additional interaction detected with the scaffold protein SUFD allowed building a model in which NFU1 receives its Fe-S cluster from the $SUFBC_2D$ scaffold complex and serves for the maturation of specific [4Fe-4S] client proteins.

Iron and sulfur are essential elements for all organisms, in particular as building blocks of iron-sulfur (Fe-S) proteins that are themselves essential for several key molecular processes. In plants, Fe-S proteins participate to photosynthesis and respiration, being present in the electron transfer chains found in chloroplasts and mitochondria, but also for sulfur and nitrogen assimilation, or chlorophyll and

vitamin metabolisms to cite a few examples (Balk and Schaedler, 2014; Przybyla-Toscano et al., 2018). The most represented Fe-S cluster forms are the [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters with some proteins such as the glutamate synthase (GOGAT) incorporating [3Fe-4S] clusters (Couturier et al., 2013; Przybyla-Toscano et al., 2018). The maturation of Fe-S proteins is not a spontaneous process and relies on dedicated machineries that exist in all kingdoms although with some variations in the type and number of machineries present and in the molecular actors implicated (Lill, 2009). In plants, three machineries exist: the iron-sulfur cluster (ISC) machinery is found in mitochondria; the cytosolic iron-sulfur protein assembly (CIA) machinery provides Fe-S clusters for the maturation of both cytosolic and nuclear Fe-S proteins and is dependent on the ISC machinery; and the sulfur mobilization (SUF) machinery works independently and is involved in the maturation of plastidial proteins (Couturier et al., 2013; Lill, 2009). Regardless the machinery, the Fe-S cluster biogenesis can be divided into several steps. In early steps, an Fe-S cluster is built *de novo* on so-called scaffold proteins, necessitating a multiprotein assembly complex for the mobilisation, reduction and assembly of iron and sulfur atoms. The preformed Fe-S cluster will be conveyed to a set of transfer proteins, eventually with the help of chaperones. After possible conversion and exchange among these Fe-S cluster transfer proteins potentially associated to their accessory factors, the Fe-S cluster is delivered to final targets (Lill, 2009).

In the current model of the mitochondrial ISC machinery, a [2Fe-2S] cluster is assembled on ISU/ISCU scaffold proteins prior to its transfer to a glutaredoxin (GRX) referred to as Grx5 in yeast. Whereas these steps should be sufficient for the maturation of [2Fe-2S] proteins (Braymer and Lill, 2017), the maturation of [4Fe-4S] proteins also requires a conversion from two [2Fe-2S] clusters to a [4Fe-4S] cluster by reductive coupling, probably occurring in the course of the interaction between GRX5 and ISCA1/2 heterodimer (Brancaccio et al., 2014). The BOLA1 and IBA57 maturation factors may be involved at this step. Further late acting Fe-S cluster transfer proteins, NFU1, IND1/INDH (when present) and BOLA3, participate to the maturation of some [4Fe-4S] proteins but not all (Bych et al., 2008; Melber et al., 2016; Sheftel et al., 2012).

In the current model of the chloroplastic SUF machinery, the cysteine desulfurase NFS2, assisted by SUFE proteins, provides the required sulfur atoms for the *de novo* synthesis of an Fe-S cluster onto the $SUFBC_2D$ scaffold complex. However, how the system is supplied with iron atoms and electrons is less clear. Accordingly, all these genes are essential as confirmed by the embryo-lethality of the corresponding *Arabidopsis thaliana* loss-of-function mutants (Hjorth et al., 2005; Hu et al., 2017; Murthy et al., 2007; Nagane et al., 2010; Van Hoewyk et al., 2007; Xu and Møller, 2006, 2004). Then, only scarce information are available in the following stages albeit proteins belonging to the same family as the mitochondrial counterparts are present *i.e.*, GRXS14/16, BOLA1/4, IBA57.2, SUFA1, NFU1/2/3 and HCF101 (Abdel-Ghany et al., 2005; Couturier et al., 2013; Léon et al., 2003; Przybyla-Toscano et al., 2018; Waller et al., 2012). A first relevant functional information is that, except IBA57.2, each gene/protein complements the corresponding yeast mutants (Bandyopadhyay et al., 2008a; Uzarska et al., 2018). The physiological analysis of *hcf101*, *nfu2* and *nfu3* knock-down or knock-out mutants, which exhibit dwarf phenotypes, pointed to their involvement in the maturation of the [4Fe-4S] clusters found in photosystem I (PSI), with NFU2 and NFU3 acting directly upstream of HCF101 (Nath et al., 2016; Touraine et al., 2019, 2004; Yabe et al., 2004). HCF101 is also required for the maturation of the [4Fe-4S] cluster in the ferredoxin-thioredoxin reductase (FTR)

(Lezhneva et al., 2004; Stöckel and Oelmüller, 2004). In accordance with its capacity to bind both [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters, NFU2 is required for the maturation of the [2Fe-2S] cluster present in the dihydroxyacid dehydratase (DHAD), an enzyme implicated in the synthesis of branched-chain amino acids (Gao et al., 2018, 2013; Touraine et al., 2019). A valid biochemical characterization of NFU3 was hampered so far by the impossibility to express sufficient amounts of soluble, non-aggregated recombinant protein for a proper spectroscopic characterization, but it was suggested to bind both [3Fe-4S] and [4Fe-4S] clusters (Nath et al., 2016). On the other hand, no firm conclusion has been gained from the study of individual *grxS14*, *grxS16* and *sufa1* Arabidopsis mutants except that these proteins are dispensable, at least in the growth conditions tested (Abdel-Ghany et al., 2005; Rey et al., 2017; Touraine et al., 2019; Yabe and Nakai, 2006).

Unlike *nfu2* and *nfu3* mutants, an Arabidopsis *nfu1* mutant has no phenotype when grown under standard conditions (Touraine et al., 2019). This result suggests that NFU1 has either an accessory or very specific function or a functional redundancy with other Fe-S transfer protein(s), rendering difficult the determination of its role *in planta*. Hence, to tackle the role of NFU1 in Arabidopsis, we have characterized the biochemical and spectroscopic properties of the recombinant protein, before identifying its plastidial partner proteins using co-immunoprecipitation (co-IP) experiments and a binary yeast-two hybrid (Y2H) screen with other SUF components and many candidate [4Fe-4S]-containing proteins. The *in planta* interaction was validated for a few proteins using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays before assessing the capacity of NFU1 to transfer its Fe-S cluster to two selected client proteins, the 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase (ISPG/GcpE/HDS) and the 4-amino-2-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine phosphate synthase (THIC). The identification of these NFU1 partners allowed us to position NFU1 in the nebula of SUF components and Fe-S client proteins.

RESULTS

AtNFU1 binds a [4Fe-4S] cluster into a homodimer

The plastidial NFU1/2/3 isoforms have two NFU domains repeated in tandem but only the N-terminal domain possesses the conserved CXXC motif participating in Fe-S cluster ligation. They are all able to restore the growth defect of the yeast mutant for the mitochondrial Nfu1 isoform (Uzarska et al., 2018). This suggested that they share some common properties such as the capacity to bind a [4Fe-4S] cluster but this has not yet been explored for any plant NFU1 isoforms. Moreover, it is important to assess whether NFU1 can bind other types of Fe-S clusters as observed for *Arabidopsis thaliana* NFU2 (Gao et al., 2013).

The mature form of Arabidopsis NFU1 was expressed in *Escherichia coli* as an untagged recombinant protein. Unlike NFU2 that can be partially isolated under holoform (Gao et al., 2013; Yabe et al., 2004), no color typical of the presence of an Fe-S cluster was visible in the lysed cell extract and the purified NFU1 appeared devoid of its cofactor in accordance with the UV-visible absorption spectrum showing a single absorption peak at 280 nm (Fig. 1A). To evaluate the ability of NFU1 to bind an Fe-S cluster, *in vitro* enzymatic Fe-S cluster reconstitution experiments were performed in anaerobic conditions in the presence of the *E. coli* cysteine desulfurase (EcIscS). The UV-visible absorption spectrum of the reconstituted NFU1 exhibited a shoulder at 410 nm and a progressive increase of the absorbance from 360 nm to the peak at 280 nm (Fig. 1A). This spectrum is very similar to the one obtained for the reconstituted [4Fe-4S] cluster-bound form of NFU2 (Gao

et al., 2013). The quantification of both iron and labile sulfur atoms bound to the protein showed that the sample contained 1.54 iron ± 0.29 and 1.68 sulfur ± 0.11 per NFU1 monomer. Moreover, analytical gel filtration experiments have been performed using both apo- and holo-NFU1 (Fig. 1B). Both forms separated in a single peak corresponding to an estimated molecular mass of 30 kDa for apo-NFU1 and 25 kDa for holo-NFU1, respectively (Fig. 1B). From the theoretical molecular mass of a mature NFU1 (17 kDa), we concluded that both protein forms exist as homodimers. Altogether, these results indicated that the Fe-S cluster is not required for dimerization and that the reconstituted samples contained ≈ 80% of [4Fe-4S] cluster-loaded NFU1 based on the analytical data.

AtNFU1 physically interacts with SUFD, SUFA1 and various [4Fe-4S]-containing proteins

So far, there is no known NFU1 partners in plants and only negative results have been obtained using binary Y2H, either with the SUF component HCF101 or with two putative targets, APS reductase 1 (APR1) and the PSI subunit (PsaC) (Gao et al., 2013; Touraine et al., 2019). As a first approach to determine what are the SUF partners and client Fe-S proteins of NFU1, co-IP experiments using anti-GFP antibodies have been achieved from 2 week-old transgenic lines expressing either a NFU1-GFP fusion (*ProNFU1::gNFU1-GFP* construct) or a GFP alone fused downstream of the chloroplastic targeting peptide (CTP) of the NFU3 protein (*Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP* construct) for a specific targeting of GFP into the stroma of chloroplasts. After verifying that both constructs allow the specific expression of both fusion proteins in chloroplasts (Fig. S1), four replicates have been performed using distinct transgenic lines. The table 1 lists the 49 proteins present in at least 3 replicates originating from the co-IP performed with the NFU1-GFP expressing lines and absent in the 4 replicates performed with the control lines. It also comprises 5 additional proteins (labelled with a star) representing Fe-S proteins or subunits associated to Fe-S proteins found using a slightly less stringent cut-off, *i.e*, also present in at least 3 replicates but found in one replicate of control experiments. Using the latter filter, a total of 89 additional proteins were retrieved (Table S1). Among these 138 proteins, we identified 6 known Fe-S proteins. HCF101 and GRXS16 are SUF components. Recovering HCF101 was surprising, because no interaction was previously detected by Y2H and BiFC (Touraine et al., 2019). It may be that it has been pulled down as part of a complex formed with other Fe-S proteins. Concerning GRXS16, the question of a direct physical interaction remains asked. Although no interaction was observed between NFU1 and GRXS16 by binary Y2H (see below), the NFU2 paralog has proven to be able to efficiently transfer a [2Fe-2S] cluster to GRXS16 (Gao et al., 2013). A role of GRXS16 in Fe-S cluster biogenesis has yet to be validated *in planta*, but *in vitro* the recombinant protein incorporates either a [2Fe-2S] or a [4Fe-4S] cluster (Rey et al., 2017). Four putative Fe-S client proteins have been isolated. The 5'adenylyl-phosphosulfate reductase 2 (APR2), one of the three APR isoforms in Arabidopsis, catalyzes the second step of sulfate assimilation and is thus implicated in cysteine and methionine synthesis. The quinolinate synthase SUFE3 is involved in NAD synthesis (Murthy et al., 2007). The glutamate synthase 2 (GLU2) participates to nitrogen assimilation by catalysing the conversion of glutamine into glutamate at the expense of ferredoxin. The last Fe-S protein firmly identified is THIC, an enzyme involved in the synthesis of vitamin B1 (thiamine) (Kong et al., 2008). APR2, SUFE3 and THIC are known to bind [4Fe-4S] clusters whereas GLU2 binds a [3Fe-4S] cluster (Przybyla-Toscano et al., 2018). Another likely candidate partner is the isopropyl malate isomerase (IIL1/IPMI), an Fe-S enzyme catalyzing the isomerization

between 2-isopropylmalate and 3-isopropylmalate and thus implicated in the synthesis of leucine and glucosinolates (Knill et al., 2009). It forms a protein complex involving a large subunit and a small subunit, and the three isoforms corresponding to the small subunits have been retrieved from these experiments. Despite being found in the four co-IP replicates, the large subunit, bearing the Fe-S cluster, was not retained here because it was also found in two of the control experiments. Then, what is noticeable among the set of the 45 other identified proteins is the presence a set of proteins performing redox reactions. It includes four sulfurtransferases (STR9, 10, 12, 14), enzymes containing a rhodanese domain with a conserved cysteine involved in trans-persulfidation reactions (Selles et al., 2019). It also comprises several thioredoxin (TRX)-like proteins, TRX z, TRX-lilium2 also referred to as the atypical Cys-His rich thioredoxin 2 and a novel putative TRX superfamily member (At5g65840). Having reactive cysteines, it may be that these proteins formed covalent bonds with the reactive cysteines of an apo-NFU1. In line with such a possible interaction, we have recently observed that mitochondrial TRXs o have the ability to reduce an intramolecular disulfide formed in the NFU domain of mitochondrial NFU5 (Zannini et al., 2018). Whether this is true also for chloroplastic NFU1/TRX couples remains to be investigated and the physiological relevance assessed. TRX z is known to be part of the plastid-encoded RNA polymerase (PEP) complex, likely explaining why fructokinase-like 2 and plastid transcriptionally active 5 and 17 proteins have been retrieved too (Arsova et al., 2010). To conclude on that approach, there are quite a few other proteins that have never been biochemically characterized and for which there is no function. Consequently, it is difficult to extrapolate whether they could be or not novel Fe-S containing proteins or involved in the maturation process. For instance, several chloroplastic chaperones are present in the expanded list and it may be that they are required for Fe-S cluster exchange as documented for the assembly step of the mitochondrial ISC machinery. Although usually powerful, it is worth pointing that the co-IP approach may not be the best for supposedly weak or transient interactions or interactions that would rely on the presence of an oxygen-labile Fe-S cluster.

Hence, as a second more systematic approach, we sought to analyze the capacity of NFU1 to interact with the presumed scaffold and transfer proteins of the SUF machinery, *i.e.* SUFB, SUFC, SUFD, SUFA1, BOLA1, BOLA4, IBA57.2, GRXS14, GRXS16, NUF2, NFU3 and HCF101 using binary Y2H assays. An interaction was only observed with SUFD and SUFA1 (Fig. 2). Then, a large set of [4Fe-4S]-containing proteins involved in various metabolic pathways were tested. This included nitrite reductase (NIR) and sulfite reductase (SIR), two siroheme-containing proteins involved in nitrogen and sulfur assimilation. This also included several radical-SAM enzymes *i.e.*, THIC, the chloroplastic lipoate synthase (cLIP), which participates to the formation of lipoic acid and should incorporate two [4Fe-4S] clusters by analogy to the bacterial and mitochondrial orthologs, and the tRNA modifying enzyme, MIAB. Additional targets are the glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase 2 (ASE2) implicated in the *de novo* synthesis of purine, the ISPG/GcpE/HDS and 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (ISPH/HDR) participating in the synthesis of isoprenoids, the β-carotene isomerase DWARF27.1 notably required for strigolactone synthesis and its two homologues (DWARF27.2/3), the IIL1/IPMI large subunit described above and the 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase (HCAR), a protein involved in the chlorophyll metabolism and binding two [4Fe-4S] clusters. Among these 13 candidate partners, interactions have been detected with NIR, cLIP, THIC, HCAR,

DWARF27.1 and ISPG when NFU1 was fused to the GAL4 binding domain (Fig. 3). In these experiments, we could not firmly confirm the existence of an interaction with the large subunit of IPMI because the GAL4 auto-activation caused by this protein is strong and concluding on the growth difference in the presence of NFU1 remains questionable. Looking at the strength of the interactions, the strongest ones were observed with THIC and DWARF27.1, then with ISPG, HCAR and cLIP and finally NIR, the latter being visible only in the absence of 3-amino triazol (3-AT).

To challenge the relevance of these interactions in plant cells, we additionally performed BiFC assays in Arabidopsis protoplasts. We have first validated NFU1 homodimerisation as revealed by the strong BiFC signal in Arabidopsis chloroplasts in cells co-expressing NFU1-YFP fusions (*i.e.* NFU1 fused at the N-terminus of the N-terminal (AA_{1-155}) or C-terminal regions ($AA_{156-239}$) of YFP (Figs. 4A, S2 & S3). We next tested combinations of NFU1 with five selected partners isolated by one or the other above-described approach, *i.e.* SUFA1, ISPG, THIC, SUFE3 and cLIP (Figs. 4B, S2 & S3). Transfections with combinations of NFU1 fused to the C-terminal region of the YFP marker protein (NFU1-C) and of the partners fused to the N-terminal region of the YFP (protein-N) revealed positive BiFC in all cases, exclusively in the chloroplasts. The strongest fluorescent signals were obtained with THIC and ISPG followed by NFU1/SUFA1 and NFU1/SUFE3 pairwises. Only faint fluorescent signals under high laser intensities were obtained with cLIP. This might be due to the need of extended time required for optimized NFU1/cLIP interaction or to the lability of this partnership. Overall, these experiments revealed that NFU1 cooperates in a close environment with all the proteins tested in this plant reporter system.

NFU1 transfers its [4Fe-4S] cluster to apo-ISPG and -THIC in vitro

Based on the identified interactions, we tested whether we could obtain evidence for an Fe-S cluster transfer *in vitro* using two client proteins, ISPG and THIC, as their Fe-S cluster content was characterized previously (Fenwick et al., 2015; Seemann et al., 2005). Moreover, both proteins have a single [4Fe-4S] cluster per monomer, unlike HCAR and cLIP, and they are formed by a single domain and do not rely on additional subunits, unlike IPMI and SUFE3.

Hence, we produced the respective His-tagged recombinant proteins. After an aerobic purification, ISPG and THIC were both a mixture of apo- and holo-forms. By treating the proteins with an excess of EDTA and TCEP, we could obtain stable apo-proteins. Thus, we first assessed the ability of both apo-forms to incorporate [4Fe-4S] clusters by performing *in vitro* IscS-mediated Fe-S cluster reconstitution experiments (Fig. S4). Although the characteristic large absorption band at 410 nm is not as pronounced as in other [4Fe-4S] proteins, the UV-visible absorption spectra were indicative of the presence of [4Fe-4S] clusters. This was confirmed by analytical measurements of both iron and labile sulfur atoms bound to the proteins as ISPG incorporated 3.99 ± 0.14 iron and 3.91 ± 0.11 labile sulfur per monomer whereas THIC contained 3.81 ± 0.43 iron and 3.63 ± 0.63 labile sulfur per monomer after reconstitution.

In a second step, *in vitro* Fe-S cluster transfer experiments were performed using a 2-time molar excess of untagged holo-NFU1 (reconstituted as before) as compared to apo-acceptors. After 1h incubation, donor and acceptor proteins were separated on a nickel affinity chromatography column. The unbound fractions contained NFU1 and eventually tiny amounts of the acceptor proteins (Figs. 5 and 6). The UV-visible absorption spectra indicated that the absorption bands typical of the Fe-S cluster in NFU1 were considerably diminished, though not totally,

likely because of the initial excess used. On the other hand, the imidazole-eluted fractions, which contained ISPG or THIC, exhibited a brown-red colour. The UV-visible absorption spectra showed broad bands centred around 320 nm and 410 nm (Figs. 5 and 6) similar to the ones observed in the spectra of reconstituted proteins (Fig. S4). Altogether, these results indicated that holo-NFU1 was able to transfer a [4Fe-4S] cluster to both apo-ISPG and apo-THIC *in vitro*.

DISCUSSION

The maturation of all chloroplastic Fe-S proteins depends on the SUF machinery. The late-acting Fe-S cluster transfer proteins, including NFU1/2/3 and HCF101, are in principle in direct contact with client proteins. Unlike NFU1, some of the NFU2, NFU3 and HCF101 targets have been unveiled (Hu et al., 2017; Nath et al., 2016; Schwenkert et al., 2010; Touraine et al., 2019, 2004). The fact that an *Arabidopsis thaliana nfu1* mutant has no macroscopic phenotype when grown under standard conditions prevented to delineate NFU1 function(s) and associated partners using a physiological approach (Touraine et al., 2019).

In this work, we purified the Arabidopsis NFU1 protein to investigate which type of Fe-S cluster(s) is bound to the protein *in vitro*. Previous studies showed that the large diversity in the domain organization of NFU proteins is associated to differences in their biochemical properties. The *Helicobacter pylori* Nfu, formed by a single NFU domain, and the Arabidopsis NFU2 formed by two NFU domains (only the N-terminal one containing the ligating cysteine residues) were shown to bind either one [2Fe-2S] cluster as purified from *E. coli* cells or one [4Fe-4S] cluster upon *in vitro* reconstitution (Benoit et al., 2018; Gao et al., 2013). The *Escherichia coli* and *Azotobacter vinelandii* NfuA that are formed by two domains, an N-terminal degenerated (*i.e.* devoid of known ligand cysteines) ISCA-type domain associated to a C-terminal NFU domain, were reported to bind only [4Fe-4S] clusters into homodimers (Bandyopadhyay et al., 2008b; Py et al., 2012). In mitochondrial NFUs, the NFU domain is coupled to a domain of unknown function at its N-terminus. The human NFU1 was shown to incorporate a [4Fe-4S] cluster upon reconstitution in a homodimer but a SAXS-derived structural model highlighted the existence of a trimer of dimers (Cai et al., 2016; Tong et al., 2003). These *in vitro* observations are in agreement with the *in vivo* investigations which showed that only the maturation of [4Fe-4S] proteins, including respiratory complexes, aconitase and lipoate synthase, is affected in a yeast *nfu1* mutant or in human patients (Cameron et al., 2011; Melber et al., 2016; Navarro-Sastre et al., 2011; Tong et al., 2003). Hence, the best, not to say the sole documented example where both *in vitro* and *in vivo* results support the requirement of a NFU protein in the maturation of [2Fe-2S] proteins is for the plant NFU2-DHAD couple (Gao et al., 2018; Touraine et al., 2019). Concerning Arabidopsis NFU1, we have observed that it was purified as an apo-form after heterologous expression in *E. coli* and that a [4Fe-4S] cluster holo-dimeric loaded form of NFU1 was formed after an *in vitro* anaerobic IscS-mediated reconstitution. NFU1 homodimerization was also visible in plant cells using BIFC but not in the yeast nuclear context during Y2H assays. Overall, this suggests that NFU1 should not participate to the maturation of [2Fe-2S] clusters, but only to the maturation of [4Fe-4S] and possibly of [3Fe-4S] clusters.

The question of the NFU1 partners among SUF components was unsolved so far. We have obtained evidence for possible interactions with SUFD, SUFA1, GRXS16 and HCF101. As already discussed, the detection in co-IP experiments of HCF101 and GRXS16 as putative NFU1 partners whereas they were not found to physically interact by Y2H and/or BiFC raises some

doubt about the existence of a direct contact. For this reason, these interactions are not represented in the updated model proposed in Fig. 7. On the other hand, the interaction with SUFD and SUFA1 seen in Y2H and in Y2H and BiFC experiments respectively, suggests that NFU1 directly receives its cluster from the SUFBCD scaffold complex, before exchanging its cluster with SUFA1, the sole A-type transfer protein in chloroplasts. Accordingly, *E. coli* NfuA is able to receive its Fe-S cluster from both ISCU and $SUFBC_2D$ scaffold and to interact with all A-type transfer proteins, having the ability to transfer its cluster *in vitro* to SufA, IscA and ErpA, and forming a complex with ErpA stabilizing its Fe-S cluster (Angelini et al., 2008; Py et al., 2018, 2012). However, the model is that ErpA and NfuA to a lesser extent are the final Fe-S cluster donors to client apo-proteins (Py et al., 2018). A [4Fe-4S] cluster transfer from the NFU domain of *A. vinelandii* NifU to ^{NIF}IscA is also documented (Mapolelo et al., 2012a). Noteworthy, *E. coli* SufA does also receive an Fe-S cluster from $SUFBC_2D$ (Chahal et al., 2009) and is competent for instance for the maturation of both [2Fe-2S] and [4Fe-4S] containing proteins as shown using ferredoxin and biotin synthase (Chahal and Outten, 2012; Ollagnier-de-Choudens et al., 2004). This raises the possibility that, in chloroplasts, SUFA1 may obtain its cluster independently of NFU1 and on the contrary deliver it to NFU1. This sequence order would fit with the mitochondrial model in which NFUs likely act downstream of the A-type transfer proteins, ISCA1/ISA1 and ISCA2/ISA2. *In vitro* experiments provided evidence that these A-type transfer proteins exist as homodimers, as ISCA1/2 heterodimers but also as ISCA-IBA57 heterodimers (Banci et al., 2014; Brancaccio et al., 2017; Gourdoupis et al., 2018). In fact, it seems that an even higher level of flexibility and adaptability exists for A-type transfer proteins as most of the characterized homo- or heterodimers are able to incorporate either [2Fe-2S] or [4Fe-4S] clusters. Hence, whereas the interaction between NFUs and A-type transfer proteins is a robust observation made in both prokaryote and eukaryote organisms (Beilschmidt et al., 2017; Melber et al., 2016; Py et al., 2018, 2012), which of NFU1 or SUFA1 act upstream remains uncertain in the chloroplastic SUF system. So far, SUFA1 was characterized as a [2Fe-2S] cluster containing protein able to receive *in vitro* an Fe-S cluster from GRXS14 and to transfer it to a ferredoxin (Abdel-Ghany et al., 2005; Mapolelo et al., 2013; Yabe and Nakai, 2006). Hence, an Fe-S cluster exchange from NFU1 to SUFA1 would necessitate an oxidative conversion from the [4Fe-4S]-loaded NFU1 into [2Fe-2S] loaded SUFA1 forms, unless SUFA1 also binds [4Fe-4S] clusters. Alternatively, a reductive Fe-S cluster conversion from a [2Fe-2S]-loaded SUFA1 to [4Fe-4S]-loaded NFU1 might be possible. Further experiments are needed to address in which direction these exchanges occur.

The question of whether NFU1 has direct client Fe-S proteins was also the purpose of this study. By combining several complementary approaches, we have identified 9 NFU1 partners, if we consider the interaction with IPMI as too uncertain. They incorporate either a [3Fe-4S] cluster in the case of GLU2 or one or several [4Fe-4S] clusters in the case of SUFE3, APR2, cLIP, DWARF27.1, HCAR, ISPG, NIR and THIC. Although we could not test or obtain evidence for all these interactions by all methods, most of the interactions have been observed using at least two different approaches. Whereas the chloroplastic lipoate synthase cLIP has not been much investigated so far, the requirement of NFU1 as a maturation factor is consistent with NFU-type proteins being required for the maturation or repair of Fe-S clusters in lipoate synthase present in bacteria, or in yeast and human mitochondria (McCarthy and Booker, 2017; Melber et al., 2016). As cLIP/NFU1 appeared as the less efficient partnership *in planta*, future tests should

assess whether other NFUs may preferentially serve for the maturation of cLIP. The interactions of NFU1 with THIC and ISPG were evidenced both *in vivo* by Y2H and BiFC and *in vitro* from the observation of an intact [4Fe-4S] cluster transfer from a holodimeric NFU1. The fact that THIC was also retrieved from the co-IP experiments makes little doubt about the validity of this interaction. Concerning ISPG, the result is consistent with the observation that *E. coli* NfuA is also a required maturation factor for bacterial IspG/H enzymes as recently demonstrated by a genetic approach (Py et al., 2018). Taken together, these results indicate that the plastidial NFU1 of Arabidopsis is involved in maturation pathways that are conserved throughout evolution. For other proteins specific to plants, such as DWARF27.1 and HCAR, obtaining data about their maturation will be crucial as no extrapolation is possible from other model organisms. Only HCAR was analyzed before by western blots in *sufb*, *sufc*, *sufd*, *nfu2* and *hcf101* Arabidopsis mutants (Hu et al., 2017). The protein level was diminished, although not totally absent in *sufb*, *sufc*, *sufd* RNAi lines, but did not vary much in *nfu2* and *hcf101*. This leads us to discuss the physiological consequences of the described interactions and possible redundancies with other SUF maturation factors. The *sufa1* and *nfu1* Arabidopsis mutants have no or weak growth phenotypes under standard conditions, which is also the case for *apr2* or *hcar* mutants (Grant et al., 2011; Meguro et al., 2011). Nevertheless, mutants for other identified proteins have either strong(er) growth phenotypes, for instance the albino phenotype of an *ispg* mutant (Gutiérrez-Nava et al., 2004), or even embryo- or seedling-lethal phenotypes as observed for *sufe3* and *thic* mutants, respectively (Kong et al., 2008; Murthy et al., 2007). These phenotypic differences indicate indeed the existence of back-up system(s) for NFU1, meaning a certain level of redundancy with other maturation factors. This would be totally in line with the *E. coli* model, in which several factors serve for the maturation of a single target and their nature may depend on the growth conditions (Roche et al., 2013). For instance, in *E. coli*, depending on stress conditions, either NfuA or ErpA is involved in the maturation of ISPG (Py et al., 2018). Hence, determining whether the functions of NFU1 are restricted to stress conditions or more prominent in this context is likely now required. In plant chloroplasts, the most likely candidates for ensuring functions similar to NFU1 are obviously NFU2, NFU3 but also HCF101 because they assemble the same type of cluster and they are critical for plant growth (Gao et al., 2013; Nath et al., 2016; Schwenkert et al., 2010). From a phylogenetic point of view, NFU1 and NFU2/3 form two separate phylogenetic clades with the gene duplication generating *NFU2* and *NFU3* having occurred in an ancestor of angiosperms. For instance, a single *NFU2/3* representative is present in chlorophyceae, bryophytes and lycophytes whereas there are two in monocots and dicots (Couturier et al., 2013; Touraine et al., 2019). Assuming that NFU1/2/3 originate from a single ancestral gene, these proteins may have diverged to some extent but also conserved common biochemical and structural properties. In support of this conclusion, all three plastidial NFUs were able to restore the growth defect of a yeast mutant for the mitochondrial Nfu1, despite the difference in protein organization between NFUs present in both organelles (Uzarska et al., 2018). However, the functions of NFU1 and NFU2/3 diverged and are clearly not fully overlapping. Unlike NFU1, NFU2 and NFU3 are involved in PSI maturation together with HCF101 but are also biochemically competent for the maturation of the [2Fe-2S] cluster in DHAD (Touraine et al., 2019). Additional functions of NFU2/3 may actually have been masked by the strong effect on PSI and by their redundancy (a double *nfu2 nfu3* mutant is lethal, Touraine et al., 2019). Hence, to

address the question of redundancy among NFUs, it would be mandatory to perform similar experiments with NFU2 and NFU3 in order to identify their set of client proteins.

Experimental procedures

Heterologous expression in E. coli and purification of recombinant proteins

The sequences coding for the presumed mature forms (*i.e.*, devoid of N-terminal targeting sequences) of Arabidopsis NFU1, THIC and ISPG were cloned respectively into the *Nde*I and *Bam*HI restriction sites of pET12a, the *Nco*I-*Xho*I and *Nde*I-*Xho*I restriction sites of pET28a (Table S2), in order to produce an untagged NFU1, an N-terminal His-tagged THIC and a C-terminal His-tagged ISPG.

NFU1 was expressed in the *E. coli* BL21 (DE3) strain containing the pSBET plasmid (Schenk et al., 1995). Protein expression in 3.2 L was induced by adding of 100 µM of isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) during exponential growth phase. After 4 h at 37°C, cells were collected by centrifugation for 20 min at 6,318 g and the cell pellets were resuspended in about 25 mL of TN buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl). Bacteria cells were lysed by sonication (3 x 1 min) and cell debris removed at 4°C by centrifugation for 30 min at 27,216 g. The soluble fraction was sequentially precipitated by ammonium sulfate to 40% and then to 80% of the saturation. NFU1 was recovered mainly in the 0-40 % ammonium sulfate fraction. This fraction was subjected to gel filtration chromatography (ACA44) equilibrated with TN buffer. NFU1-containing fractions were pooled, concentrated and dialyzed against 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer by ultrafiltration (YM10 membrane) under nitrogen pressure using an Amicon cell. The sample was loaded on an ion exchange chromatography (DEAE sepharose column) equilibrated in 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer, before applying a linear 0-0.4 M NaCl gradient. The purest fractions containing NFU1 as judged by SDS-PAGE analysis were pooled and dialyzed against 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer by ultrafiltration. Finally, the fractions were concentrated and stored at -20°C until further use.

The His-tagged ISPG and THIC were expressed in the *E. coli* Rosetta2 (DE3) strain. Protein expression was achieved in a 3.2 L culture. After an initial growth phase at 37°C up to the exponential phase (OD600 = 0.6-0.8), flasks were placed two hours at 4°C in the presence of 0.5% ethanol before induction by 100 µM IPTG. The cultures were further grown for about 18 h at 20°C. Cells were collected by centrifugation for 20 min at 6,318 g and resuspended in about 25 mL of TN buffer plus imidazole 20 mM (TNI20). Bacteria cells were lysed by sonication (3 x 1 min) and soluble and insoluble fractions cell were separated by centrifugation for 30 min at 27,216 g and 4°C. The soluble fraction was then loaded onto a Ni-NTA affinity column (Qiagen) equilibrated in TNI20 buffer. After extensive washing, recombinant proteins were eluted in TN buffer containing 250 mM imidazole. Proteins were then concentrated and dialyzed against TN buffer by ultrafiltration under nitrogen pressure (Amicon, YM10 membrane) and stored at -20°C. The purity of each recombinant protein was checked on SDS-PAGE. The concentrations of apo-proteins were determined spectrophotometrically using the theoretical molecular extinction coefficient at 280 nm of 4,595 $M^{-1}cm^{-1}$ for NFU1, 41,425 $M^{-1}cm^{-1}$ for ISPG and 92,290 $M^{-1}cm^{-1}$ for THIC.

In vitro IscS-mediated reconstitution of Fe-S cluster

All experiments were done at room temperature under anaerobic atmosphere using a Jacomex glovebox (O_2 < 2 ppm). Reduced apo-NFU1, ISPG and THIC were obtained by treating purified proteins with a 20-fold excess TCEP and a 50-fold excess EDTA for 1 h or overnight in the case of

NFU1 which allows to get rid of residual polysulfides visible from the presence of a shoulder at 320 nm (Mapolelo et al., 2012b), before desalting on a G-25 column pre-equilibrated with 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer. The Fe-S cluster reconstitution was performed in 500 µL of 37.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 37.5 mM NaCl buffer, using 50 µM protein, a 20-fold excess of L-cysteine and ammonium iron (II) sulfate hexahydrate and catalytic amount of *E. coli* cysteine desulfurase IscS purified as described previously (Zannini et al., 2018). The reaction was initiated by the addition of IscS and followed by monitoring the UV-visible absorption spectrum. After a 1 h reaction, the Fe-S cluster-loaded proteins were desalted on a G-25 column equilibrated with TN buffer.

Determination of the oligomerization state of NFU1

The oligomerization state of apo- and holo-NFU1 was determined by size-exclusion chromatography. Samples containing about 200 µg of protein were loaded onto Sephadex S200 10/300 column equilibrated in TN buffer and connected to an Akta purifier system (GE Healthcare). Proteins were detected by recording absorption at 280 nm and 420 nm. The column was calibrated using a molecular weight standard from Sigma. Elution volume, protein name and molecular weight are as follows: 8.47 mL, thyroglobulin, 669 kDa; 10.51 mL, apo-ferritin, 443 kDa; 11.92 mL, β-amylase, 200 kDa; 13.89 mL, bovine serum albumin, 66 kDa; 15.74 mL, carbonic anhydrase, 29 kDa; 17.01 mL, cytochrome c, 12.4 kDa, and 18.28 mL, aprotinin, 6.5 kDa.

In vitro Fe-S cluster transfer experiments

Under strictly anaerobic conditions in a Jacomex glovebox (O_2 < 2 ppm), two molar equivalents of reconstituted holo-NFU1 respective to reduced apo-ISPG or apo-THIC were mixed in the presence of a 10-fold excess EDTA for 1 h to ensure that the Fe-S cluster is transferred intact and not upon degradation and reassembly. Untagged NFU1 and tagged acceptor proteins (ISPG or THIC) were then separated on Ni-NTA affinity column (IMAC-Qiagen) equilibrated in TNI20 buffer. The column was then washed with 6 column volumes of TNI20 buffer, and elution was performed using TN buffer containing 250 mM imidazole. Fractions corresponding to washing and elution steps were concentrated to a volume of 500 µL using Vivaspin 500 centrifugal filters, before recording UV-visible absorption spectra and quantifying the contents in iron and labile sulfide. Aliquots of each fraction were also analyzed by SDS-PAGE.

Iron and labile sulfide quantification

Protein concentrations were determined using the colorimetric bicinchoninic acid assay (BCA) kit as recommended (Interchim). For iron quantification, different volumes of protein (25, 50 and 100 µL) were diluted in 130 µL of water. Proteins were precipitated by adding 90 µL of 70% (v/v) perchloric acid for 10 min at room temperature after strong shaking. After centrifugation (10 min, 11,600 g), 180 µL of supernatant were mixed with 144 µL of 3.2 mM bathophenanthroline disulfate, 72 µL of 192 mM sodium ascorbate and 152 µL of 6.2 M ammonium acetate. The mixture was homogenized with 30 sec of vortex before 30 min of incubation at room temperature. Iron amounts were determined by subtracting the non-specific absorbance at 680 nm from the specific absorbance of the ferrous iron-chelator complex measured at 535 nm relatively to a standard curve obtained with ammonium iron (II) sulfate (0 to 20 nmol).

For labile sulfide quantification, 25, 50 and 100 µL of proteins (eventually brought to 100 µL with water) were mixed with 300 µL of 1% (w/v) zinc acetate and 15 µL of 3 M NaOH. The mixture was incubated for 10 min at room temperature before adding 50 µL of 20 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (prepared in

7.2 M HCl) and 50 µL of 30 mM $FeCl_3$ (prepared in 1.2 M HCl). After 30 sec shaking and incubation at 4°C for 3 h, the mixture was centrifuged for 5 min at 11,600 *g* and the presence of methylene blue in the supernatant was recorded at 670 nm. Lithium sulfide (0 to 20 nmol) was used for the calibration curve.

Binary yeast two-hybrid assays

The experiments have been performed with the Gal4-based yeast two-hybrid reporter strain CY306 (Vignols et al., 2005). The sequences coding for proteins devoid of their chloroplastic targeting sequences were cloned in both pGADT7 and pGBKT7 vectors (Clontech Laboratories) using *Nco*I-, *Nde*I-, *Bam*HI-, or *Xho*I-containing primers (Table S2). Binary interactions were tested using both AD (Activator domain for Gal4) and BD (DNA binding domain for Gal4) fusion combinations. Cells co-transformed with pGAD- and pGBK-based constructs were selected on minimal YNB medium (0,7% yeast extract w/o amino acids, 2% glucose, 2% agar) containing required amino acids and bases (histidine, adenine, lysine, uracil and methionine). Interactions were assessed through cell growth on selective YNB media, in the absence of histidine and in the absence or presence of 2 to 10 mM 3-AT to get rid of some trans-activating constructs and estimate the strength of each interaction. Negative controls were performed using co-transformations of AD- or BD- fusions with empty vectors. Each dot is a 7 µL drop of cultures adjusted at an OD_{600}=0.05. Representative images shown here were taken 5 days post-dotting.

Bimolecular fluorescence complementation

All proteins selected for BiFC analyses were cloned as full-length open reading frames upstream of the C-terminal and N-terminal regions of the YFP protein into the pUC-SPYCE and pUC-SPYNE vectors, abbreviated -C and -N in figures, respectively), using a restriction site-based strategy and primers listed in Table S3 (Walter et al., 2004). Leaf protoplasts were prepared from 21- to 28-day old *Arabidopsis* plantlets grown in growth chambers in short day conditions (8h light / 23°C / 217 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16h dark / 20°C, 65% humidity) and transfected according to (Yoo et al., 2007) using 10 µg of each pUC-SPYCE and pUC-SPYNE constructs expressing selected proteins. YFP fluorescence in *Arabidopsis* protoplast cells was recorded 20-24h post-transfection by using a Leica TCS SP8 confocal laser-scanning microscope. YFP was excited with an argon laser at 514 nm and detected at 520-550 nm, whereas chlorophyll auto-fluorescence was monitored at 680-720 nm after excitation at 561 nm. Images were obtained using a LAS X software and treated with Adobe Photoshop CS3 at high resolution. Results are representative of at least two independent transfection experiments including the analysis of around 20 cells per transformation event.

Co-immunoprecipitation experiments

To generate *ProNFU1::gNFU1-GFP* expressing plants, the *NFU1* locus (2000 bp prior to the start codon until the end of the coding sequence without the STOP) was amplified with AttB1ProNFU1 (5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTCGCAGTACCCTAAACCATT G) and AttB2NFU1 (5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGCTTGTAAAGGTTAC) primers, cloned into pDONR207 vector and recombined in pGWB4 (Nakagawa et al., 2007). To generate plants expressing stroma-targeted GFP (*Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP*), the *NFU3* chloroplastic targeting sequence (CTP) was amplified with AttB1NFU3 (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTATGGGTTCTGTTTCGGGTC) and AttB2-PS-NFU3 (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGCAGCTCACGTGACCAAATAC) primers, cloned into pDONR207 and recombined in PGWB505 (derived from the

pGWB series (Nakagawa et al., 2007). All PCR products were obtained using high-fidelity Phusion DNA polymerase and each construct in pDONR207 was sequenced to ensure its integrity. *ProNFU1::gNFU1-GFP* and *Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP* expressing seedlings were germinated and grown under long day condition (16 h/8 h light/dark) on half strength Murashige and Skoog medium (MS/2) with 0.05% MES, 1% sucrose, 0.7% agar. One g of aerial tissues from two weeks-old seedlings was cross-linked in 1% formaldehyde in PBS buffer two times (7 min under vacuum). The reaction was blocked by adding 300 mM glycine (30 min under vacuum). Fixed tissues were rinsed three times with water, dried and frozen in liquid nitrogen prior grinding. Powder was resuspended in 2 mL of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% sodium-deoxycholate) and centrifuged two times 10 min at 14000 g to remove cell debris. 50 µL of antibodies raised against GFP coupled to magnetic beads (Miltenyi Biotec®) were added to the supernatant and mixed (wheel rotation) for 30 min at 4°C. Tubes were then placed on magnetic rack and after 4 washes with RIPA buffer, proteins were eluted with 100 µL of 1X Laemmli solution (65 mM Tris-HCl pH 7.5, 5% glycerol, 2% SDS, 125 mM DTT). These manipulations were done on 4 biological replicates per genotype.

Mass spectrometry analysis

To analyze co-IP samples by mass spectrometry, eluted proteins were loaded on a 10% precast acrylamide gel (biorad) for a short run (15 min, 100 kV). The whole band was manually excised from the gel and cut in small pieces. After sequential washes with 25 mM ammonium bicarbonate, 50% acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate and 100% acetonitrile, thiol groups of cysteines were alkylated for 30 min with iodoacetamide 55 mM after a 45 min reduction step with 10 mM DTT. The samples were then sequentially washed with 50% acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate and with 100% acetonitrile. The proteins were then digested with 0.25 µg of trypsin (Sequencing Grade Modified, Promega) in 25 mM ammonium bicarbonate overnight at 37°C. Peptides were eluted first with 2% formic acid and twice with 80% acetonitrile in 2% formic acid. Supernatants were pooled and evaporated in a vacuum centrifuge. Peptides were resuspended in 8 µL of 2% formic acid and 6 µL were injected for LC-MS/MS analyses. They were performed using an Ultimate 3000 RSLC nano system (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) interfaced online with a nano easy ion source and a Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). The samples were analyzed in Data Dependent Acquisition (DDA). Protein digests were first loaded onto a pre-column (Thermo Scientific PepMap 100 C18, 5 µm particle size, 100 Å pore size, 300 µm i.d. x 5 mm length) at a flow rate of 10 µL/min for 3 min.
The peptides were separated in a reverse-phase column (Thermo Scientific PepMap C18, 2 µm particle size, 100 Å pore size, 75 µm i.d. × 50 cm length) at a flow rate of 300 nL/min. Loading buffer (solvent A) was 0.1% formic acid in water and elution buffer (solvent B) was 0.1% formic acid in 80% acetonitrile. The linear gradient employed was 2-25% of solvent B in 103 min, then 25-40% of solvent B from 103 to 123 min, finally 40-90% of solvent B from 123 to 125 min. The total run time was 150 min including a high organic wash step and re-equilibration step. The Q Exactive Plus mass analyzer was operated in positive ESI mode at 1.8 kV. In DDA, the top 10 precursors were acquired between 375 and 1500 m/z with a 2 Th (Thomson) selection window, dynamic exclusion of 40 s, normalized collision energy (NCE) of 27 and resolutions of 70,000 for MS and 17,500 for MS2. Raw mass spectrometric data were analyzed in the Maxquant environment (Cox and Mann, 2008) v.1.5.0.0 and Andromeda was employed for database search (Cox et al., 2011). The MS/MS data were matched against the

TAIR10 + GFP database. For protein identification and quantification, cysteine carbamidomethylation was set up as a fixed modification and oxidation of methionine as a variable modification. At least two different peptides are necessary for protein identification and quantification. Up to two missed cleavages were allowed for protease digestion. For the other characteristics, Maxquant default parameters were used. Intensities without normalization were considered and a protein was considered as a putative interactant if present in at least 3 replicates originating from *ProNFU1::gNFU1-GFP* lines but absent in 3 or 4 replicates of *Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP* lines. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Perez-Riverol et al., 2018) partner repository with the dataset identifier PXD015295.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE) and by grant no. ANR-2013-BSV6-0002-01. The PhD salary of M. Roland was provided by a funding from the Lorraine University of Excellence (LUE). The authors wish to thank Carine Alcon and the Montpellier Rio-Imaging and PHIV platforms for expertise and assistance in confocal microscopy.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

MR, JPT, FV, NB, LC, HCW, TD performed the experiments, FV, NB, VS, CD, JC, NR have conceived and supervised the experiments. All authors have read and approved the manuscript, the initial draft having been written by MR, JC and NR.

REFERENCES

Abdel-Ghany, S.E., Ye, H., Garifullina, G.F., Zhang, L., Pilon-Smits, E.A.H., Pilon, M., 2005. Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Chloroplasts. Involvement of the Scaffold Protein CpIscA. Plant Physiol. 138, 161–172. https://doi.org/10.1104/pp.104.058602

Angelini, S., Gerez, C., Choudens, S.O., Sanakis, Y., Fontecave, M., Barras, F., Py, B., 2008. NfuA, a New Factor Required for Maturing Fe/S Proteins in Escherichia coli under Oxidative Stress and Iron Starvation Conditions. J. Biol. Chem. 283, 14084–14091. https://doi.org/10.1074/jbc.M709405200

Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustün, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., Börnke, F., 2010. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. Plant Cell 22, 1498–1515. https://doi.org/10.1105/tpc.109.071001

Balk, J., Schaedler, T.A., 2014. Iron cofactor assembly in plants. Annu Rev Plant Biol 65, 125–153. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035759

Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Del Conte, R., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccioli, M., Winkelmann, J., 2014. [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 6203–6208. https://doi.org/10.1073/pnas.1400102111

Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., Rouhier, N., 2008a.

Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. EMBO J. 27, 1122–1133. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.50

Bandyopadhyay, S., Naik, S.G., O'Carroll, I.P., Huynh, B.-H., Dean, D.R., Johnson, M.K., Santos, P.C.D., 2008b. A Proposed Role for the Azotobacter vinelandii NfuA Protein as an Intermediate Iron-Sulfur Cluster Carrier. J. Biol. Chem. 283, 14092–14099. https://doi.org/10.1074/jbc.M709161200

Beilschmidt, L.K., Ollagnier de Choudens, S., Fournier, M., Sanakis, I., Hograindleur, M.-A., Clémancey, M., Blondin, G., Schmucker, S., Eisenmann, A., Weiss, A., Koebel, P., Messaddeq, N., Puccio, H., Martelli, A., 2017. ISCA1 is essential for mitochondrial Fe_4S_4 biogenesis *in vivo*. Nature Communications 8, 15124. https://doi.org/10.1038/ncomms15124

Benoit, S.L., Holland, A.A., Johnson, M.K., Maier, R.J., 2018. Iron–sulfur protein maturation in Helicobacter pylori: identifying a Nfu-type cluster carrier protein and its iron–sulfur protein targets. Molecular Microbiology 108, 379–396. https://doi.org/10.1111/mmi.13942

Brancaccio, D., Gallo, A., Piccioli, M., Novellino, E., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2017. [4Fe-4S] Cluster Assembly in Mitochondria and Its Impairment by Copper. J. Am. Chem. Soc. 139, 719–730. https://doi.org/10.1021/jacs.6b09567

Braymer, J.J., Lill, R., 2017. Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. J. Biol. Chem. 292, 12754–12763. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.787101

Bych, K., Kerscher, S., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Zwicker, K., Huynen, M.A., Lill, R., Brandt, U., Balk, J., 2008. The iron–sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. The EMBO Journal 27, 1736–1746. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.98

Cai, K., Liu, G., Frederick, R.O., Xiao, R., Montelione, G.T., Markley, J.L., 2016. Structural/Functional Properties of Human NFU1, an Intermediate [4Fe-4S] Carrier in Human Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. Structure 24, 2080–2091. https://doi.org/10.1016/j.str.2016.08.020

Cameron, J.M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T.A., Tong, W.-H., Ogilvie, I., Shoubridge, E.A., Robinson, B.H., 2011. Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. Am. J. Hum. Genet. 89, 486–495. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.011

Chahal, H.K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., Outten, F.W., 2009. The SufBCD Fe−S Scaffold Complex Interacts with SufA for Fe−S Cluster Transfer. Biochemistry 48, 10644–10653. https://doi.org/10.1021/bi901518y

Chahal, H.K., Outten, F.W., 2012. Separate FeS scaffold and carrier functions for $SufB_2C_2$ and SufA during in vitro maturation of [2Fe2S] Fdx. J. Inorg. Biochem. 116, 126–134. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.008

Couturier, J., Touraine, B., Briat, J.-F., Gaymard, F., Rouhier, N., 2013. The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. Front Plant Sci 4, 259. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00259

Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nature Biotechnology 26, 1367–1372. https://doi.org/10.1038/nbt.1511

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., Mann, M., 2011. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. J. Proteome Res. 10, 1794–1805. https://doi.org/10.1021/pr101065j

Fenwick, M.K., Mehta, A.P., Zhang, Y., Abdelwahed, S.H., Begley, T.P., Ealick, S.E., 2015. Non-canonical active site architecture of the radical SAM thiamin pyrimidine synthase. Nat Commun 6, 6480. https://doi.org/10.1038/ncomms7480

Gao, H., Azam, T., Randeniya, S., Couturier, J., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2018. Function and maturation of the Fe–S center in dihydroxyacid dehydratase from Arabidopsis. J. Biol. Chem. jbc.RA117.001592. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001592

Gao, H., Subramanian, S., Couturier, J., Naik, S.G., Kim, S.-K., Leustek, T., Knaff, D.B., Wu, H.-C., Vignols, F., Huynh, B.H., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. Arabidopsis thaliana Nfu2 Accommodates [2Fe-2S] or [4Fe-4S] Clusters and Is Competent for in Vitro Maturation of Chloroplast [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Cluster-Containing Proteins. Biochemistry 52, 6633–6645. https://doi.org/10.1021/bi4007622

Gourdoupis, S., Nasta, V., Calderone, V., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2018. IBA57 Recruits ISCA2 to Form a [2Fe-2S] Cluster-Mediated Complex. J. Am. Chem. Soc. 140, 14401–14412. https://doi.org/10.1021/jacs.8b09061

Grant, K., Carey, N.M., Mendoza, M., Schulze, J., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H., van Hoewyk, D., 2011. Adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in Arabidopsis implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. Biochem. J. 438, 325–335. https://doi.org/10.1042/BJ20110025

Gutiérrez-Nava, M. de la L., Gillmor, C.S., Jiménez, L.F., Guevara-García, A., León, P., 2004. Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. Plant Physiol. 135, 471–482. https://doi.org/10.1104/pp.103.036996

Hjorth, E., Hadfi, K., Zauner, S., Maier, U.-G., 2005. Unique genetic compartmentalization of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in Arabidopsis thaliana. FEBS Letters 579, 1129–1135. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.084

Hu, X., Kato, Y., Sumida, A., Tanaka, A., Tanaka, R., 2017. The SUFBC2D complex is required for the biogenesis of all major classes of plastid Fe-S proteins. Plant J 90, 235–248. https://doi.org/10.1111/tpj.13483

Knill, T., Reichelt, M., Paetz, C., Gershenzon, J., Binder, S., 2009. Arabidopsis thaliana encodes a bacterial-type heterodimeric isopropylmalate isomerase involved in both Leu biosynthesis and the Met chain elongation pathway of glucosinolate formation. Plant Mol. Biol. 71, 227–239. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9519-5

Kong, D., Zhu, Y., Wu, H., Cheng, X., Liang, H., Ling, H.-Q., 2008. AtTHIC, a gene involved in thiamine biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Cell Res. 18, 566–576. https://doi.org/10.1038/cr.2008.35

Léon, S., Touraine, B., Ribot, C., Briat, J.-F., Lobéraux, S., 2003. Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from Arabidopsis thaliana. Biochemical Journal 371, 823–830. https://doi.org/10.1042/bj20021946

Lezhneva, L., Amann, K., Meurer, J., 2004. The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]-cluster-containing complexes in Arabidopsis thaliana chloroplasts. Plant J. 37, 174–185. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01952.x

Lill, R., 2009. Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. Nature 460, 831–838. https://doi.org/10.1038/nature08301

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Naik, S.G., Huynh, B.H., Johnson, M.K., 2012a. Spectroscopic and Functional Characterization of Iron–Sulfur Cluster-Bound Forms of *Azotobacter vinelandii* ^{Nif}IscA. Biochemistry 51, 8071–8084. https://doi.org/10.1021/bi3006658

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Naik, S.G., Huynh, B.H., Johnson, M.K., 2012b. Spectroscopic and Functional Characterization of Iron-Bound Forms of *Azotobacter vinelandii* ^{Nif}IscA. Biochemistry 51, 8056–8070. https://doi.org/10.1021/bi300664j

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A.-N., Li, H., Couturier, J., Outten, C.E., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe–S cluster trafficking. Dalton Transactions 42, 3107. https://doi.org/10.1039/c2dt32263c

McCarthy, E.L., Booker, S.J., 2017. Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. Science 358, 373–377. https://doi.org/10.1126/science.aan4574

Meguro, M., Ito, H., Takabayashi, A., Tanaka, R., Tanaka, A., 2011. Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in Arabidopsis. Plant Cell 23, 3442–3453. https://doi.org/10.1105/tpc.111.089714

Melber, A., Na, U., Vashisht, A., Weiler, B.D., Lill, R., Wohlschlegel, J.A., Winge, D.R., 2016. Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. eLife 5. https://doi.org/10.7554/eLife.15991

Murthy, N.M.U., Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., Abdel-Ghany, S.E., Rousset, C., Ye, H., Fontecave, M., Pilon-Smits, E.A.H., Pilon, M., 2007. Characterization of Arabidopsis thaliana SufE2 and SufE3 functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and NAD synthesis. J. Biol. Chem. 282, 18254–18264. https://doi.org/10.1074/jbc.M701428200

Nagane, T., Tanaka, A., Tanaka, R., 2010. Involvement of AtNAP1 in the regulation of chlorophyll degradation in Arabidopsis thaliana. Planta 231, 939–949. https://doi.org/10.1007/s00425-010-1099-8

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T., 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. Journal of Bioscience and Bioengineering 104, 34–41. https://doi.org/10.1263/jbb.104.34

Nath, K., Wessendorf, R.L., Lu, Y., 2016. A Nitrogen-Fixing Subunit Essential for Accumulating 4Fe-4S-Containing Photosystem I Core Proteins. Plant Physiol. 172, 2459–2470. https://doi.org/10.1104/pp.16.01564

Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., Del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Ugarte, M., Gutierrez-Solana, L.G., Campistol, J., Garcia-Cazorla, A., Vaquerizo, J., Riudor, E., Briones, P., Elpeleg, O., Ribes, A., Lill, R., 2011. A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. Am. J. Hum. Genet. 89, 656–667. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.10.005

Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., Fontecave, M., 2004. SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly. J Biol Inorg Chem 9, 828–838. https://doi.org/10.1007/s00775-004-0581-9

Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D.J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yılmaz, Ş., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A.F., Ternent, T., Brazma, A., Vizcaíno, J.A., 2018. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. Nucleic Acids Research 47, D442–D450. https://doi.org/10.1093/nar/gky1106

Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Gaymard, F., Couturier, J., Rouhier, N., 2018. Roles and maturation of iron–sulfur proteins in plastids. J Biol Inorg Chem 1–21. https://doi.org/10.1007/s00775-018-1532-1

Py, B., Gerez, C., Angelini, S., Planel, R., Vinella, D., Loiseau, L., Talla, E., Brochier-Armanet, C., Garcia Serres, R., Latour, J.-M., Ollagnier-de Choudens, S., Fontecave, M., Barras, F., 2012. Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe-S carrier. Molecular Microbiology 86, 155–171. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08181.x

Py, B., Gerez, C., Huguenot, A., Vidaud, C., Fontecave, M., Choudens, S.O. de, Barras, F., 2018. The ErpA/NfuA complex builds an oxidation-resistant Fe-S cluster delivery pathway. J. Biol. Chem. 293, 7689–7702. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002160

Rey, P., Becuwe, N., Tourrette, S., Rouhier, N., 2017. Involvement of Arabidopsis glutaredoxin S14 in the maintenance of chlorophyll content. Plant Cell Environ. 40, 2319–2332. https://doi.org/10.1111/pce.13036

Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., Barras, F., 2013. Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. Biochim. Biophys. Acta 1827, 455–469. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.12.010

Schenk, P.M., Baumann, S., Mattes, R., Steinbiss, H.H., 1995. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in Escherichia coli using T7 RNA polymerase and rare argtRNAs. Biotechniques 19, 196–198.

Schwenkert, S., Netz, D.J.A., Frazzon, J., Pierik, A.J., Bill, E., Gross, J., Lill, R., Meurer, J., 2010. Chloroplast HCF101 is a scaffold protein for [4Fe-4S] cluster assembly. Biochem. J. 425, 207–218. https://doi.org/10.1042/BJ20091290

Seemann, M., Wegner, P., Schünemann, V., Bui, B.T.S., Wolff, M., Marquet, A., Trautwein, A.X., Rohmer, M., 2005. Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from Arabidopsis thaliana is a [4Fe–4S] protein. J Biol Inorg Chem 10, 131–137. https://doi.org/10.1007/s00775-004-0619-z

Selles, B., Moseler, A., Rouhier, N., Couturier, J., 2019. Rhodanese domain-containing sulfurtransferases: multifaceted proteins involved in sulfur trafficking in plants. J. Exp. Bot. 70, 4139–4154. https://doi.org/10.1093/jxb/erz213

Sheftel, A.D., Wilbrecht, C., Stehling, O., Niggemeyer, B., Elsässer, H.-P., Mühlenhoff, U., Lill, R., 2012. The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. Mol. Biol. Cell 23, 1157–1166. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0772

Stöckel, J., Oelmüller, R., 2004. A Novel Protein for Photosystem I Biogenesis. J. Biol. Chem. 279, 10243–10251. https://doi.org/10.1074/jbc.M309246200

Tong, W.-H., Jameson, G.N.L., Huynh, B.H., Rouault, T.A., 2003. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 9762–9767. https://doi.org/10.1073/pnas.1732541100

Touraine, B., Boutin, J.-P., Marion-Poll, A., Briat, J.-F., Peltier, G., Lobréaux, S., 2004. Nfu2: a scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in Arabidopsis chloroplasts. Plant J. 40, 101–111. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02189.x

Touraine, B., Vignols, F., Przybyla-Toscano, J., Ischebeck, T., Dhalleine, T., Wu, H.-C., Magno, C., Berger, N., Couturier, J., Dubos, C., Feussner, I., Caffarri, S., Havaux, M., Rouhier, N., Gaymard, F., 2019. Iron–sulfur protein NFU2 is required for branched-chain amino acid synthesis in Arabidopsis roots. J Exp Bot 70, 1875–1889. https://doi.org/10.1093/jxb/erz050

Uzarska, M.A., Przybyla-Toscano, J., Spantgar, F., Zannini, F., Lill, R., Mühlenhoff, U., Rouhier, N., 2018. Conserved functions of Arabidopsis mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron-sulfur clusters. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1865, 1250–1259. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.003

Van Hoewyk, D., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Herbert, S.K., Kugrens, P., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2007. Chloroplast iron-sulfur cluster protein maturation requires the

essential cysteine desulfurase CpNifS. PNAS 104, 5686–5691. https://doi.org/10.1073/pnas.0700774104

Vignols, F., Bréhélin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D., Meyer, Y., 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. PNAS 102, 16729–16734. https://doi.org/10.1073/pnas.0506880102

Waller, J.C., Ellens, K.W., Alvarez, S., Loizeau, K., Ravanel, S., Hanson, A.D., 2012. Mitochondrial and plastidial COG0354 proteins have folate-dependent functions in iron–sulphur cluster metabolism. J Exp Bot 63, 403–411. https://doi.org/10.1093/jxb/err286

Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., Kudla, J., 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation [WWW Document]. The Plant Journal. URL http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-313X.2004.02219.x (accessed 9.6.19).

Xu, X.M., Møller, S.G., 2006. AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in Arabidopsis. EMBO J. 25, 900–909. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600968

Xu, X.M., Møller, S.G., 2004. AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for Arabidopsis embryogenesis. PNAS 101, 9143–9148. https://doi.org/10.1073/pnas.0400799101

Yabe, T., Morimoto, K., Kikuchi, S., Nishio, K., Terashima, I., Nakai, M., 2004. The Arabidopsis Chloroplastic NifU-Like Protein CnfU, Which Can Act as an Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein, Is Required for Biogenesis of Ferredoxin and Photosystem I. Plant Cell 16, 993–1007. https://doi.org/10.1105/tpc.020511

Yabe, T., Nakai, M., 2006. Arabidopsis AtIscA-I is affected by deficiency of Fe–S cluster biosynthetic scaffold AtCnfU-V. Biochemical and Biophysical Research Communications 340, 1047–1052. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.104

Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Sheen, J., 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nature Protocols 2, 1565.

Zannini, F., Roret, T., Przybyla-Toscano, J., Dhalleine, T., Rouhier, N., Couturier, J., 2018. Mitochondrial Arabidopsis thaliana TRXo Isoforms Bind an Iron–Sulfur Cluster and Reduce NFU Proteins In Vitro. Antioxidants 7, 142. https://doi.org/10.3390/antiox7100142

Figure legends

Figure 1. *In vitro* enzymatic Fe-S cluster reconstitution in Arabidopsis NFU1.
UV-visible absorption spectra (A) and oligomerisation state (B) of apo- (grey lines) and enzymatically-reconstituted holo-NFU1 (dark lines). For analytical gel filtration (B), proteins were loaded onto a Sephadex S200 10/300 column. Absorbance of the eluted fractions was recorded at 280 nm (solid line) and 420 nm (dashed line), a wavelength characteristic of the Fe-S cluster. The apparent molecular masses of apo- and holo-NFU1 were determined from the elution volumes relatively to those of standard proteins as described in the experimental procedure.

Figure 2. Binary Y2H assays between Arabidopsis NFU1 and SUF components.
The co-transformed yeast cells were plated at an OD_{600} of 0.05 on a control plate containing histidine (+His) and on test plates without histidine (-His) and containing 2 or 5 mM 3-amino triazol (3AT). Yeast cells were grown for 5 days at 30°C. Empty pGAD/pGBK-NFU1 and pGAD-NFU1/empty pGBK co-transformed yeast cells do not grow without histidine (not shown). The interaction between NFU1 and SUFD is not visible when the other combination of chimeric constructs is used.

Figure 3. Binary Y2H assays between Arabidopsis NFU1 and putative client proteins known to incorporate [4Fe-4S] clusters.
The co-transformed yeast cells were plated at an OD_{600} of 0.05 on a control plate containing histidine (+His) and on test plates without histidine (-His), eventually containing 2, 5 or 10 mM 3-amino triazol (3AT). Yeast cells were grown for 5 days at 30°C. Empty pGAD /pGBK-NFU1 co-transformed yeast cells do not grow without histidine (not shown).

Figure 4. BiFC assays between Arabidopsis NFU1 and its putative interactors in Arabidopsis leaf protoplasts.
Arabidopsis protoplasts were transfected with combinations of two vectors expressing NFU1 with itself (A) or with its potential interactors upstream of the N- or C-terminal halves of YFP (B). Results shown are representative of at least two independent transfection assays for at least 20 cells per transfection. Scale bar: 10 µm. In A, the replacement of one of these constructs by an empty vector as negative controls gives no signal. In B, NFU1-C was assayed individually with THIC-N, ISPG-N, SUFA1-N, SUFE3-N and cLIP-N. Negative controls using an empty-C vector are shown separately in Fig. S3. The mid values of argon laser intensities used are indicated. Protoplast transfections with vectors expressing the same combinations of proteins fused to the other YFP halves (NFU1-N and selected protein-C fusions) provided the same results with similar laser intensities (not shown).

Figure 5. *In vitro* Fe-S cluster transfer from holo-NFU1 to apo-ISPG monitored by UV-visible absorption spectroscopy.
The transfer reaction was initiated by mixing two molar equivalents of holo-NFU1 relative to a reduced apo-ISPG. After 1h incubation, the untagged NFU1 was separated from the his-tagged ISPG on IMAC. Insert at the top shows an SDS-PAGE of the unbound (U) and eluted (E) fractions. M: molecular weight marker.
In A, UV-visible absorption spectra of IscS-reconstituted holo-NFU1 prior (dashed line) and after incubation with apo-ISPG and IMAC separation (solid line). In B, UV-visible absorption spectra of apo-ISPG prior (dashed line) and after incubation with holo-NFU1 and IMAC separation (solid line).

Figure 6. *In vitro* Fe-S cluster transfer from holo-NFU1 to apo-THIC monitored by UV-visible absorption spectroscopy.
The transfer reaction was initiated by mixing two molar equivalents of holo-NFU1 relative to a reduced apo-THIC. After 1h incubation, the untagged NFU1 was separated from the His-tagged THIC on IMAC. Insert at the top shows an SDS-PAGE of the unbound (U) and eluted (E) fractions. M: molecular weight marker.
In A, UV-visible absorption spectra of IscS-reconstituted holo-NFU1 prior (dashed line) and after incubation with apo-ISPG and IMAC separation (solid line). In B, UV-visible absorption spectra of apo-THIC prior (dashed line) and after incubation with holo-NFU1 and IMAC separation (solid line).

Figure 7. Positioning of NFU1 and its partner proteins in the current model of the SUF machinery.
The previous model (Touraine et al., 2019) for the plastidial SUF machinery was implemented with recent results including those reported in this paper for NFU1. The approaches used for defining these interactions are depicted with a color code, as visible on the scheme. A question mark remains for the interaction between NFU1 and IPMI large subunit, because we could not firmly establish it. For the sake of clarity, other candidate SUF components *i.e.*, BOLA1/4, GRXS14/16 and IBA57.2 have not been represented here because their position is unclear.

Gene IDs	moy_intensity *Pro35S::CTP NFU 3-GFP*	moy_intensity *ProNFU1::gNFU1-GFP*	Number of peptides	Symbol	Protein name	Function	Localization	Fe-S cluster type
AT5G50210	0,00	1,87E+07	8	SUFE3	quinolinate synthase SUFE3	NAD synthesis	plastid	4Fe-4S
AT1G62180	0,00	1,09E+07	7	APR2	5'adenylyl-phosphosulfate reductase 2	sulfate assimilation	plastid	4Fe-4S
AT2G29630*	7,80E+04	1,05E+07	5	THIC	thiamin C biosynthesis	thiamine biosynthesis	plastid	4Fe-4S
AT2G41220*	1,17E+05	1,10E+06	8	GLU2	glutamate synthase 2	nitrogen assimilation	plastid	3Fe-4S
AT2G38270*	8,86E+04	2,64E+06	2	GRXS16	glutaredoxin S16	Fe-S cluster assembly machinery	plastid	2Fe-2S, 4Fe-4S
AT3G24430*	1,61E+05	1,83E+07	9	HCF101	high-chlorophyll fluorescence 101	Fe-S cluster assembly machinery	plastid	4Fe-4S
AT2G43100	0,00	6,92E+06	6	IPMI2	isopropylmalate isomerase 2	glucosinolate and leucine biosynthesis	plastid	none
AT3G58990	0,00	5,76E+06	4	IPMI1	isopropylmalate isomerase 1	glucosinolate and leucine biosynthesis	plastid	none
AT2G43090*	1,54E+05	1,18E+07	8	IPMI3	isopropylmalate isomerase 3	glucosinolate and leucine biosynthesis	plastid	none
AT5G10920	0,00	1,64E+06	2	none	arginiosuccinate lyase	amino acid biosynthesis (arginine)	plastid	none
AT1G58080	0,00	8,08E+06	3	ATP-PRT1	ATP phosphoribosyl transferase 1	amino acid biosynthesis (histidine)	plastid	none
AT5G05590	0,00	1,40E+06	3	PAI2	phosphoribosylanthranilate isomerase 2	amino acid biosynthesis (tryptophan)	plastid	none
AT4G14210	0,00	7,17E+06	3	PDS3	phytoene desaturase 3	carotenoid biosynthesis	plastid	none
AT5G59370	0,00	2,63E+07	6	ACT4	actin4	cellular architecture	cytosol	none
AT4G16390	0,00	1,14E+07	9	SVR7	suppressor of variegation 7	chloroplast biogenesis	plastid	none
AT1G69200	0,00	1,54E+06	2	FLN2	fructokinase-like 2	chloroplast organization	plastid	none
AT1G79050	0,00	5,65E+06	6	RECA1	homolog of bacterial RecA	DNA metabolism	plastid	none
AT2G43710	0,00	1,19E+06	5	SSI2	suppressor of SA insensitive 2	fatty acid desaturation	plastid	none
AT4G15560	0,00	1,44E+06	2	DXS	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase	isoprenoid biosynthesis	plastid	none
AT4G21210	0,00	8,84E+06	5	RP1	PPDK regulatory protein 1	kinase activity	plastid	none
AT1G70070	0,00	1,65E+06	3	ISE2	increased size exclusion limit 2	plasmodesmata formation	plastid, cytosol, nucleus	none
AT2G21280	0,00	4,09E+06	2	GC1	giant chloroplast 1	plastid division	plastid	none
AT5G24020	0,00	1,54E+06	2	ARC11	accumulation and replication of chloroplasts 11	plastid division	plastid	none
AT1G80480	0,00	1,49E+07	7	PTAC17	plastid transcriptionally active 17	plastid gene expression	plastid	none
AT4G13670	0,00	3,57E+07	10	PTAC5	plastid transcriptionally active 5	plastid gene expression	plastid	none
AT5G13630	0,00	7,04E+06	5	GUN5	genomes uncoupled 5	plastid-to-nucleus signal transduction	plastid	none
AT1G02560	0,00	1,96E+07	4	CLPP5	nuclear encoded CLP protease 5	protease	plastid	none
AT4G20960	0,00	3,19E+06	4	PYRD	pyrimidine deaminase	riboflavin biosynthesis	plastid	none
ATCG00810	0,00	3,44E+06	2	RPL22	ribosomal protein L22	ribosomal protein	plastid	none
AT1G78630	0,00	9,60E+06	2	emb1473	embryo defective 1473	ribosomal protein	plastid, cyto, mito	none
AT3G12930	0,00	4,72E+06	2	DG238	delayed greening 238	ribosome availability	plastid	none
AT3G62910	0,00	2,19E+06	3	CPRF1	chloroplast ribosome release factor 1	ribosome availability	plastid	none
ATCG00180	0,00	1,48E+06	2	RPOC1	RNA polymerase beta' subunit-1	RNA polymerase	plastid	none
ATCG00190	0,00	2,78E+06	3	RPOB	RNA polymerase subunit β	RNA polymerase	plastid	none
ATCG00740	0,00	2,87E+06	3	RPOA	RNA polymerase subunit α	RNA polymerase	plastid	none
AT5G13030	0,00	5,78E+06	7	SELO	selenoprotein O	ROS regulation	plastid	none
AT1G32900	0,00	5,81E+06	8	GBSS1	granule bound starch synthase 1	starch biosynthesis	plastid	none
AT5G24300	0,00	7,06E+06	5	SS1	starch synthase 1	starch biosynthesis	plastid	none
AT5G43780	0,00	2,67E+06	7	ATPS4	ATP sulfurylase 4	sulfate assimilation	plastid	none
AT3G21200	0,00	2,47E+06	2	PGR7	proton gradient regulation 7	tetrapyrrole biosynthesis	plastid	none
AT1G22940	0,00	5,07E+05	2	TH1	thiamine requiring 1	thiamine biosynthesis	plastid	none
AT3G06730	0,00	2,07E+06	2	TRXZ	thioredoxin Z	thioredoxin	plastid	none
AT4G29670	0,00	4,71E+06	2	ACHT2	atypical cys his rich thioredoxin 2/TRX-lilium2	thioredoxin	plastid	none
AT5G65840	0,00	6,78E+06	4	none	none	thioredoxin	plastid	none
AT2G42220	0,00	8,84E+06	5	STR9	sulfurtransferase 9	thiosulfate metabolism	plastid	none
AT3G08920	0,00	3,14E+06	3	STR10	sulfurtransferase 10	thiosulfate metabolism	mitochondrion	none
AT5G19370	0,00	1,46E+07	9	STR12	sulfurtransferase 12	thiosulfate metabolism	plastid	none
AT4G27700	0,00	8,26E+06	4	STR14	sulfurtransferase 14	thiosulfate metabolism	plastid	none
AT1G03160	0,00	1,58E+06	3	FZL	FZO-like	thylakoid organization	plastid	none
AT4G33760	0,00	3,88E+06	4	OKI	okina kuki	tRNA synthesis	plastid, cyto, mito	none
AT1G23180	0,00	1,97E+06	3	none	ARM repeat superfamily protein	unknown	plastid, nucleus	none
AT3G62530	0,00	7,67E+06	4	none	ARM repeat superfamily protein	unknown	plastid, mitochondrion	none
AT2G13440	0,00	1,59E+06	2	none	glucose-inhibited division family A protein	unknown	plastid, mitochondrion	none
AT5G07190	0,00	5,14E+06	3	ATS3	seed gene 3	unknown	extracellular	none

Table 1. Potential NFU1 partners obtained with co-immunoprecipitation experiments and their assigned or presumed function. Proteins were considered as interactors if they were identified in coIP experiments in at least 3 replicates using ProNFU1::gNFU1-GFP lines and not identified in the 4 replicates using Pro35S::CTPNFU3-GFPlines. The five hits labelled with an asterisk are Fe-S proteins or Fe-S associated proteins found in only one replicate using Pro35S::CTPNFU3-GFPlines.

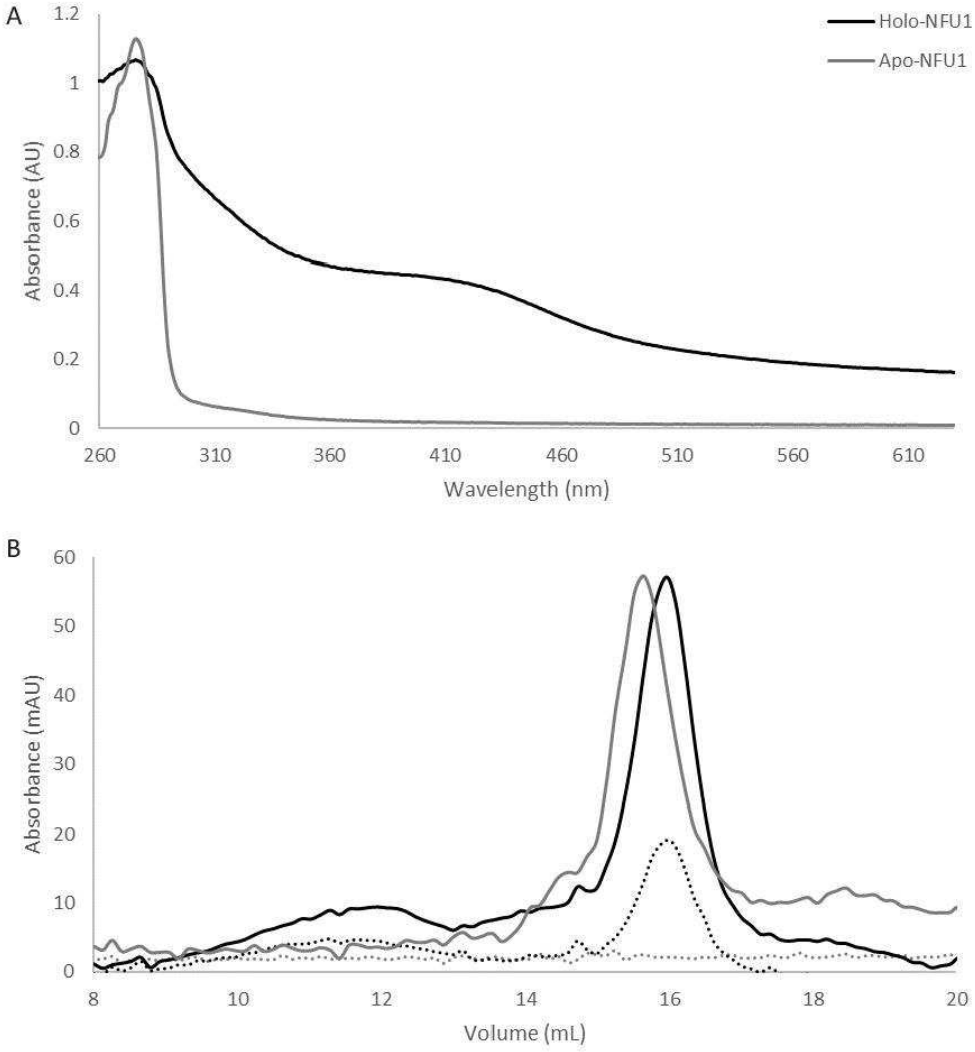

A
Holo-NFU1
Apo-NFU1
Absorbance (AU)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
260
310
360
410
460
510
560
610
Wavelength (nm)
B
Absorbance (mAU)
60
50
40
30
20
10
0
8
10
12
14
16
18
20
Volume (mL)

Figure 1

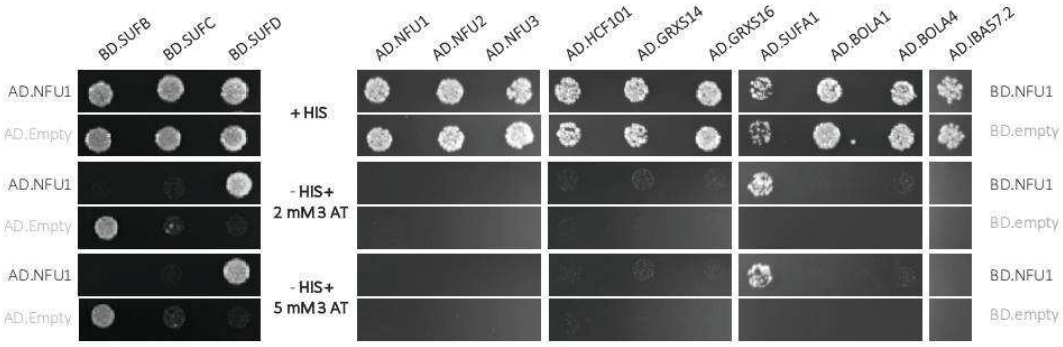

BD.SUFB
BD.SUFC
BD.SUFD
AD.NFU1
AD.Empty
AD.NFU1
AD.Empty
AD.NFU1
AD.Empty
+ HIS
- HIS+
2 mM 3 AT
- HIS+
5 mM 3 AT
AD.NFU1
AD.NFU2
AD.NFU3
AD.HCF101
AD.GRXS14
AD.GRXS16
AD.SUFA1
AD.BOLA1
AD.BOLA4
AD.IBA57.2
BD.NFU1
BD.empty
BD.NFU1
BD.empty
BD.NFU1
BD.empty

Figure 2

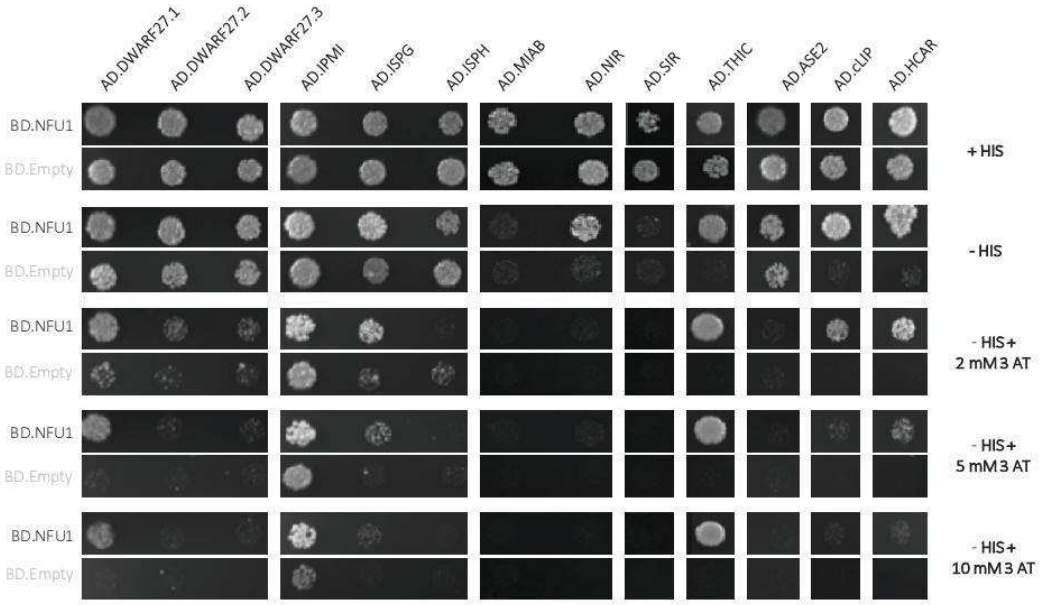

AD.DWARF27.1
AD.DWARF27.2
AD.DWARF27.3
AD.IPMI
AD.ISPG
AD.ISPH
AD.MIAB
AD.NIR
AD.SIR
AD.THIC
AD.ASE2
AD.cLIP
AD.HCAR
BD.NFU1
BD.Empty
+ HIS
- HIS
- HIS+ 2 mM 3 AT
- HIS+ 5 mM 3 AT
- HIS+ 10 mM 3 AT

Figure 3

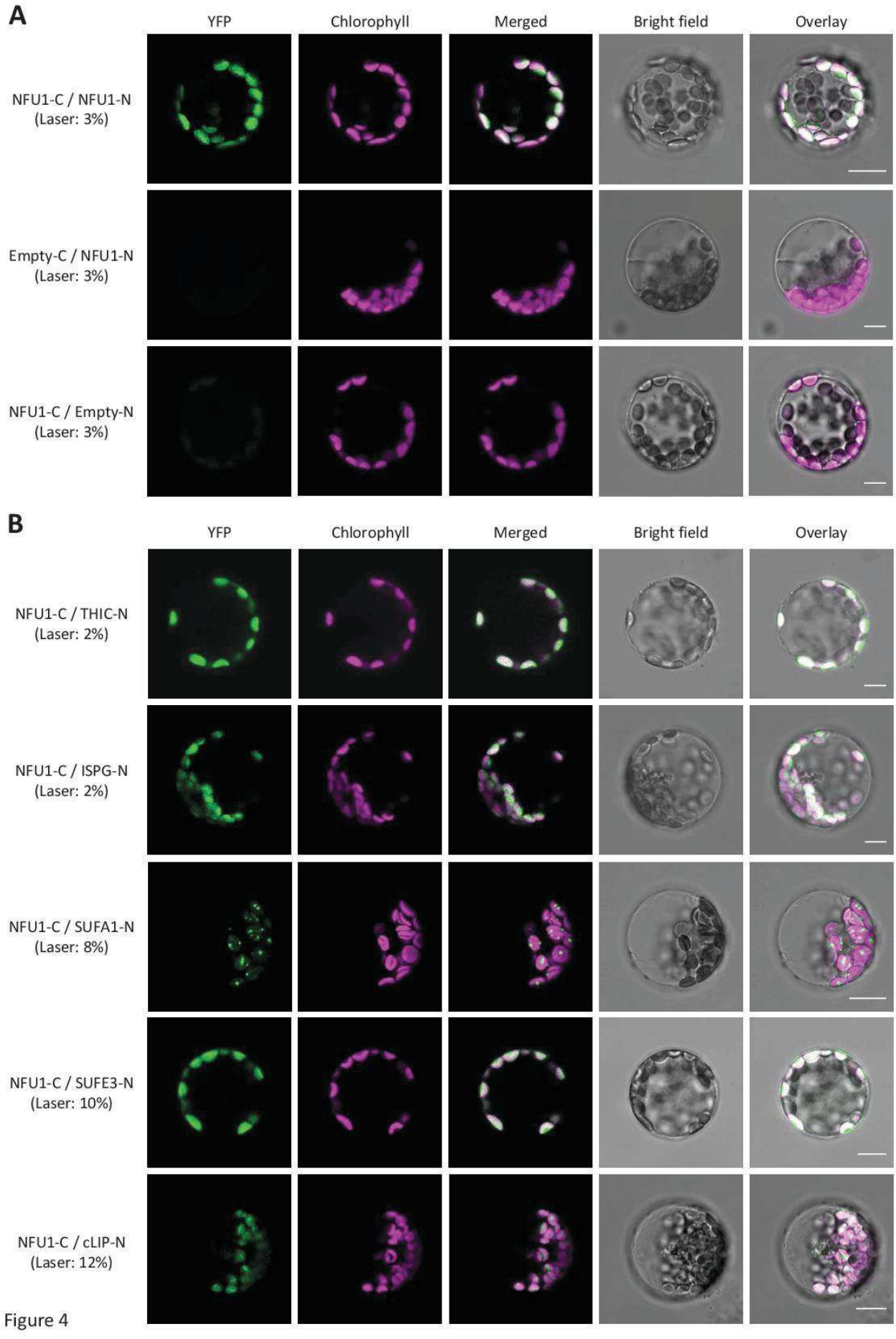

A
YFP
Chlorophyll
Merged
Bright field
Overlay
NFU1-C / NFU1-N
(Laser: 3%)
Empty-C / NFU1-N
(Laser: 3%)
NFU1-C / Empty-N
(Laser: 3%)
B
YFP
Chlorophyll
Merged
Bright field
Overlay
NFU1-C / THIC-N
(Laser: 2%)
NFU1-C / ISPG-N
(Laser: 2%)
NFU1-C / SUFA1-N
(Laser: 8%)
NFU1-C / SUFE3-N
(Laser: 10%)
NFU1-C / cLIP-N
(Laser: 12%)

Figure 4

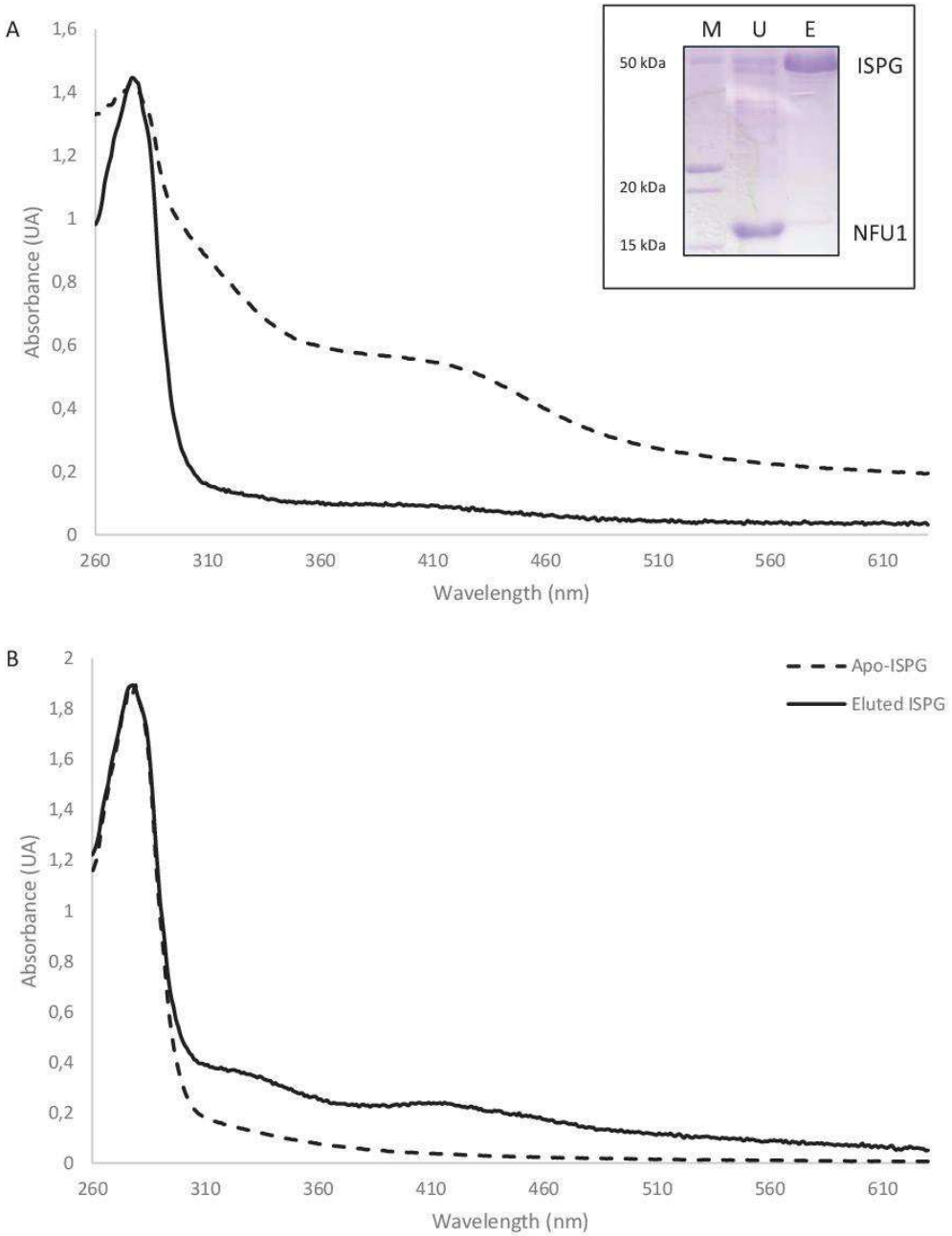

A
M U E
50 kDa
20 kDa
15 kDa
ISPG
NFU1
Absorbance (UA)
Wavelength (nm)
B
Apo-ISPG
Eluted ISPG
Absorbance (UA)
Wavelength (nm)

Figure 5

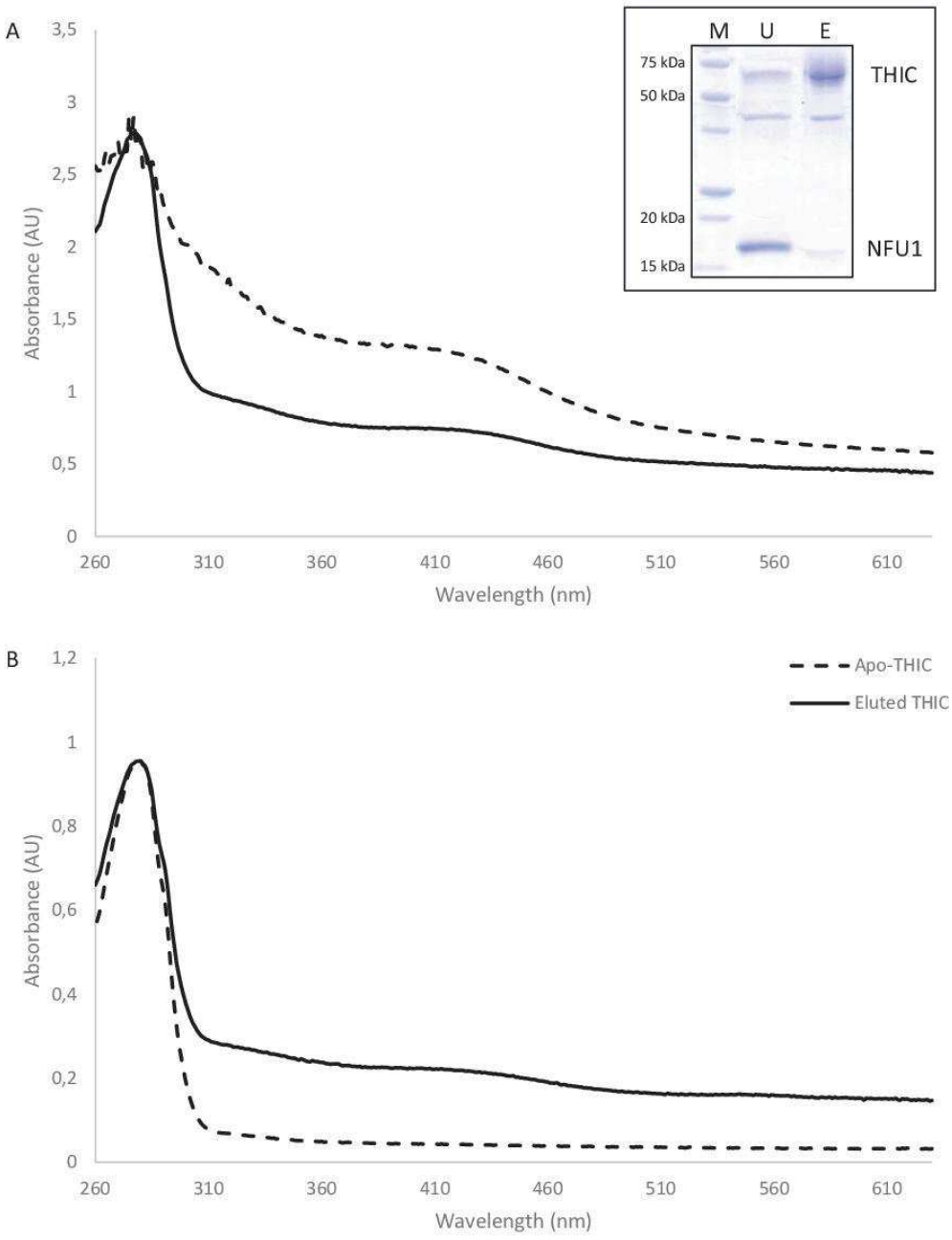

A
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Absorbance (AU)
260
310
360
410
460
510
560
610
Wavelength (nm)
M
U
E
75 kDa
50 kDa
20 kDa
15 kDa
THIC
NFU1
B
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Absorbance (AU)
260
310
360
410
460
510
560
610
Wavelength (nm)
Apo-THIC
Eluted THIC

Figure 6

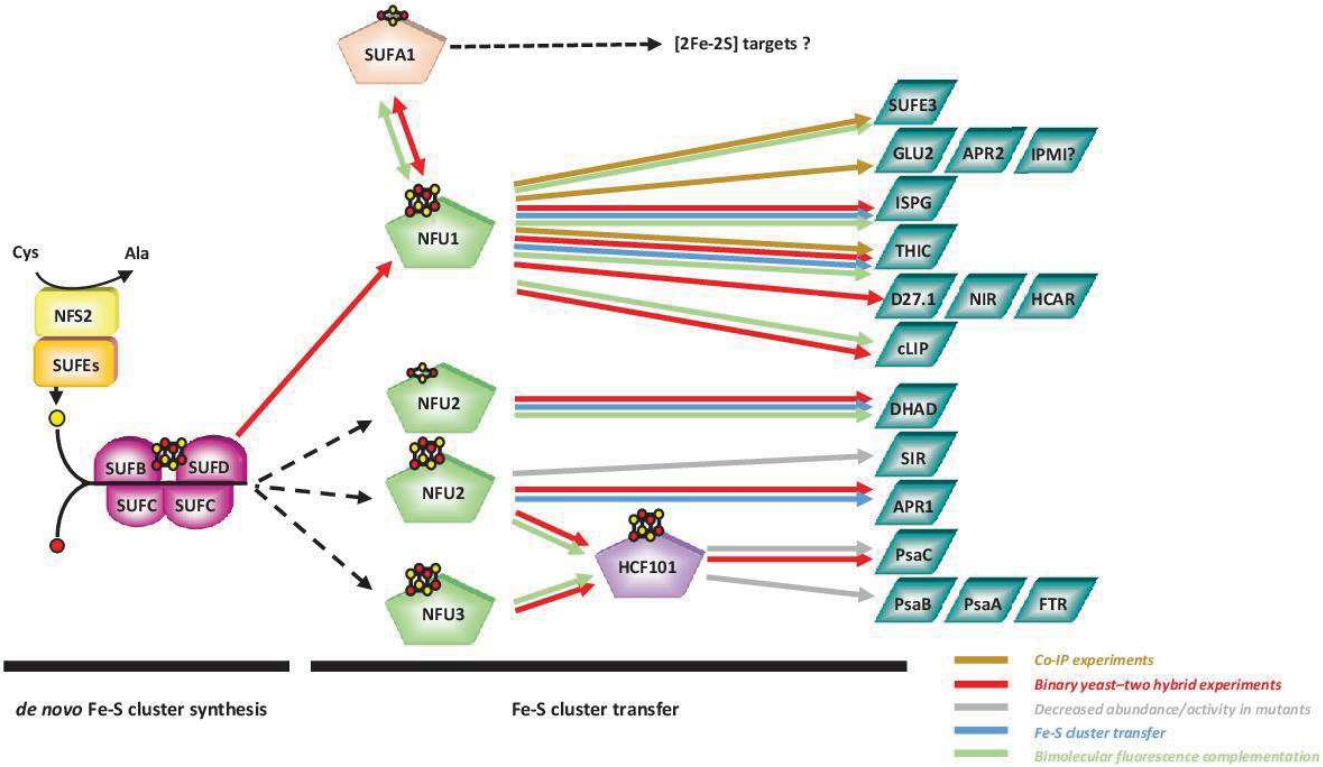

SUFA1
[2Fe-2S] targets ?
SUFE3
GLU2
APR2
IPMI?
ISPG
THIC
D27.1
NIR
HCAR
cLIP
NFU1
NFU2
NFU2
NFU3
DHAD
SIR
APR1
PsaC
PsaB
PsaA
FTR
HCF101
Cys
Ala
NFS2
SUFEs
SUFB
SUFD
SUFC
SUFC
de novo Fe-S cluster synthesis
Fe-S cluster transfer
Co-IP experiments
Binary yeast–two hybrid experiments
Decreased abundance/activity in mutants
Fe-S cluster transfer
Bimolecular fluorescence complementation

Figure 7

Supporting information to the manuscript

"The plastidial *Arabidopsis thaliana* NFU1 binds and delivers [4Fe-4S] clusters to specific client proteins"

Mélanie Roland[1], Jonathan Przybyla-Toscano[1,a†], Florence Vignols[2†], Nathalie Berger[2†], Loïck Christ[1], Véronique Santoni[2], Hui-Chen Wu[2,b], Tiphaine Dhalleine[1], Christian Dubos[2], Jérémy Couturier[1], Nicolas Rouhier[1]

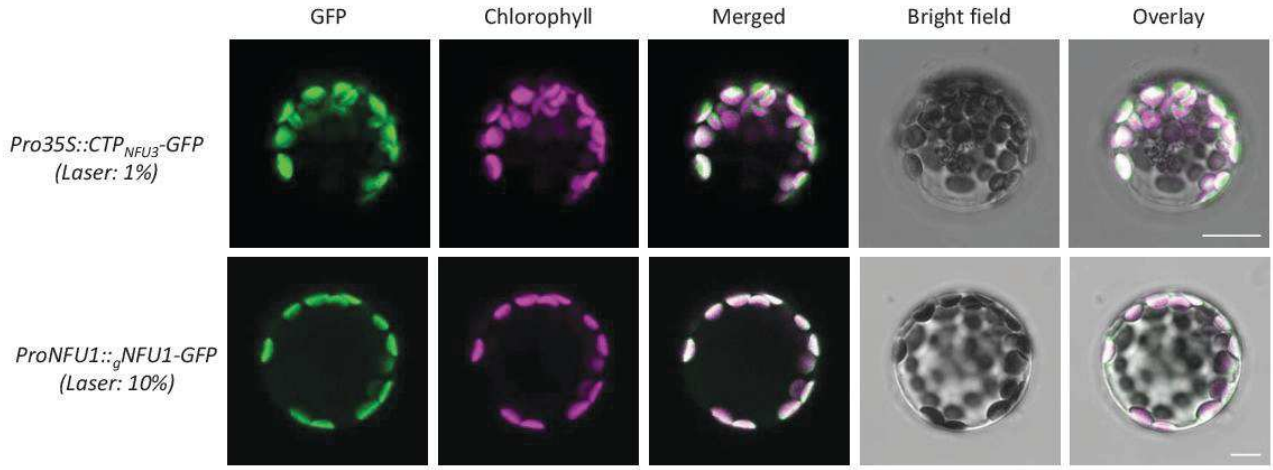
Figure S1. Validation of the plastidial targeting of gNFU1-GFP and CTP_{NFU3}-GFP fusion proteins in Arabidopsis leaf protoplasts.
Constructs expressing gNFU1-GFP and CTP_{NFU3}-GFP fusion proteins under the control of *NFU1* and *35S* promoters, respectively, were transfected in leaf protoplasts and analyzed for GFP fluorescence 24h post-transfection. Overlap of GFP fluorescence recorded between 500-550 nm with the autofluorescence of the chlorophyll recorded between 680-720 nm validated the plastidial targeting of both proteins. Images were acquired at high resolution using an argon (488 nm) laser with intensities representative of two independent transfection assays. Scale bars correspond to 10 µm. Image acquisition parameters were similar to that used for BiFC experiments and are indicated below the confocal microscopy data.

Figure S2. Summary of acquisition parameters used for BiFC experiments.
Image resolution selected for image scanning and acquisition parameters are show for all BiFC assays performed in the study. All observations were performed using a HC-PL-APO-CS2 40x/1.10 Water objective.

Figure S3. BiFC assays between Arabidopsis NFU1 and its putative interactors in Arabidopsis leaf protoplasts, continued.
Additional panels showing positive BiFC assays described in Figure 4 (see corresponding legend) together with the absence of YFP fluorescence in BiFC assays involving co-transfections of either -N or -C fusions proteins with empty vectors as negative controls. None of the protein tested was able to restore YFP fluorescence when expressed alone without protein partner.

Figure S4: Enzymatic Fe-S cluster reconstitution of holo-ISPG (A) and -THIC (B).
UV-visible absorption spectra of apo- (grey line) and enzymatically-reconstituted holo-ISPG or THIC (dark line).

Supplemental Figure S1



Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	-3.36 µm	79.68 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	6.29 µm	89.33 µm	0.081 µm

ProNFU1::$_g$NFU1-GFP

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	66.26 µm	3.35 µm	69.62 µm	0.065 µm
Y	1024	66.26 µm	-49.28 µm	16.98 µm	0.065 µm

Supplemental Figure S2

NFU1-C / NFU1-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	3.98 µm	87.02 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-17.4 µm	65.63 µm	0.081 µm

Empty-C / NFU1-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	-7.76 µm	75.28 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-20.13 µm	62.91 µm	0.081 µm

NFU1-C / Empty-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	6.5 µm	89.54 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-31.24 µm	51.79 µm	0.081 µm

NFU1-C / THIC-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	-22.23 µm	60.81 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-26.63 µm	56.41 µm	0.081 µm

Empty-C / THIC-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	4.82 µm	87.86 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-27.89 µm	55.15 µm	0.081 µm

NFU1-C / ISPG-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	14.05 µm	97.08 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-23.7 µm	59.34 µm	0.081 µm

Empty-C / ISPG-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	12.68 µm	95.71 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-19.75 µm	63.29 µm	0.081 µm

NFU1-C / SUFA1-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	-11.4 µm	71.64 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-44.4 µm	38.64 µm	0.081 µm

Empty-C / SUFA1-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	34.18 µm	117.22 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-21.5 µm	61.53 µm	0.081 µm

NFU1-C / SUFE3-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	10.9 µm	93.94 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-24.32 µm	58.71 µm	0.081 µm

Empty-C / SUFE3-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	-10.9 µm	72.14 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-33.47 µm	49.56 µm	0.081 µm

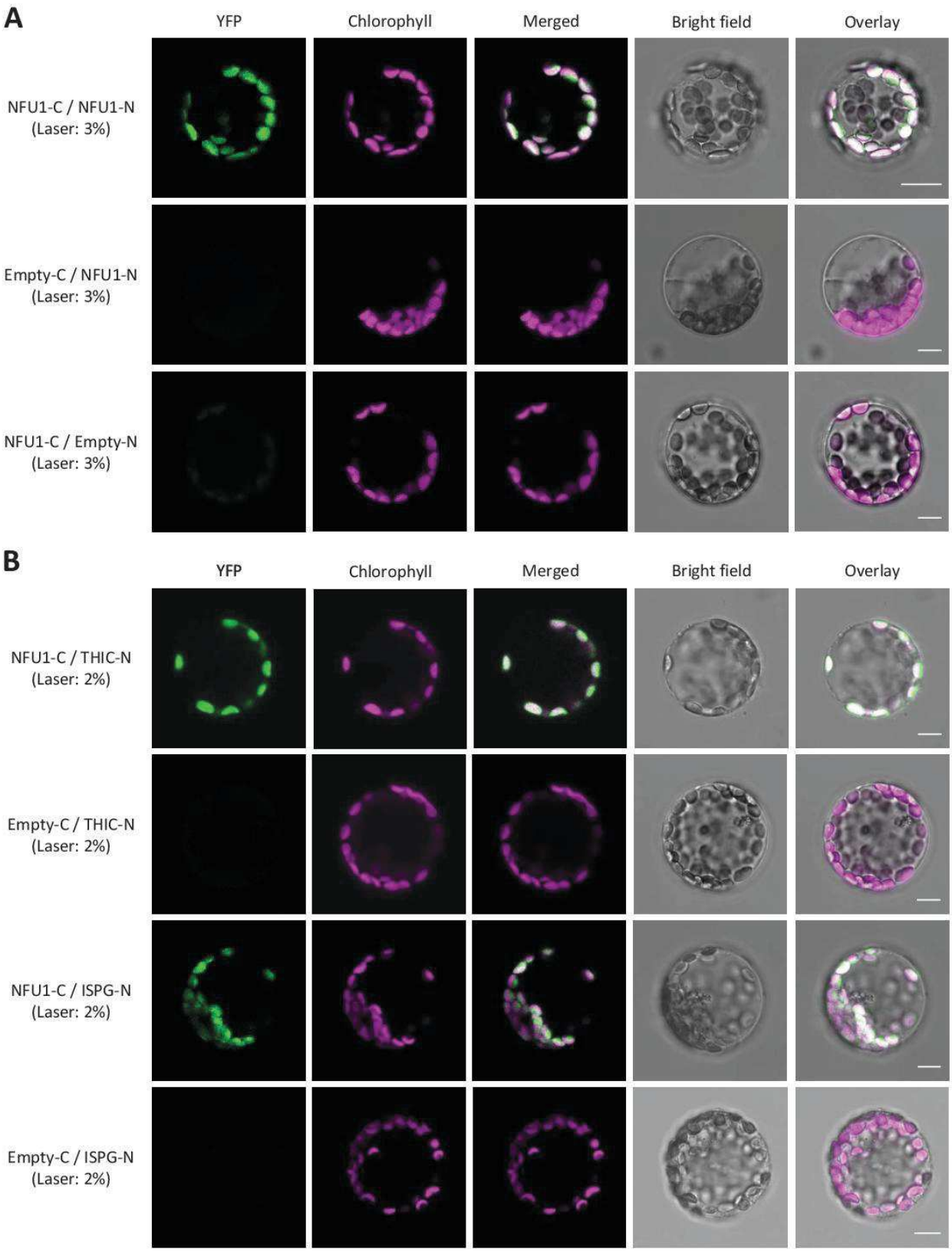
NFU1-C / cLIP-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	-7.13 µm	75.91 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-24.23 µm	58.81 µm	0.081 µm

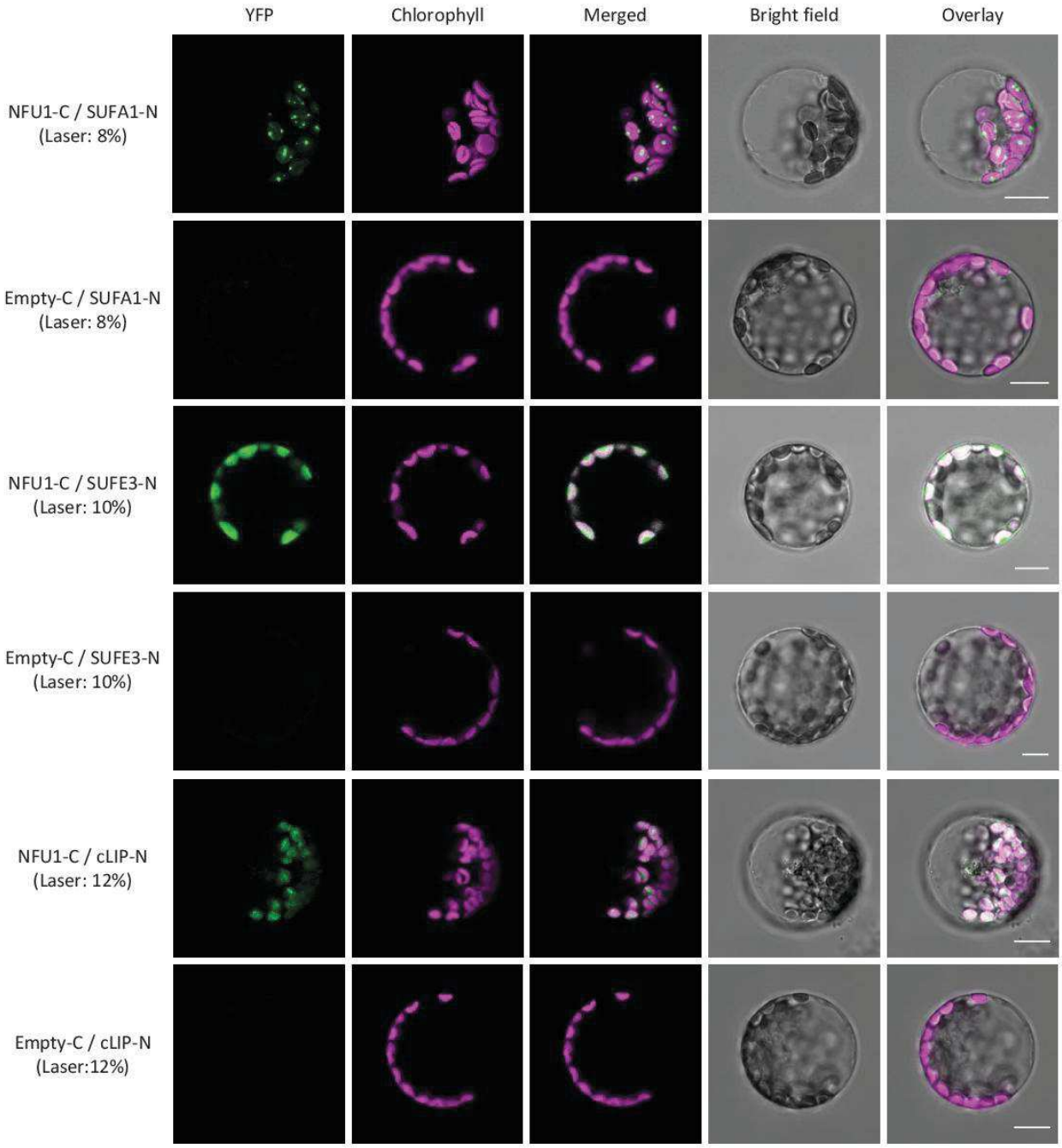
Empty-C / cLIP-N

Dimension	Logical Size	Physical Length	Start Position	End Position	Pixel Size / Voxel Size
X	1024	83.04 µm	6.29 µm	89.32 µm	0.081 µm
Y	1024	83.04 µm	-30.2 µm	52.84 µm	0.081 µm

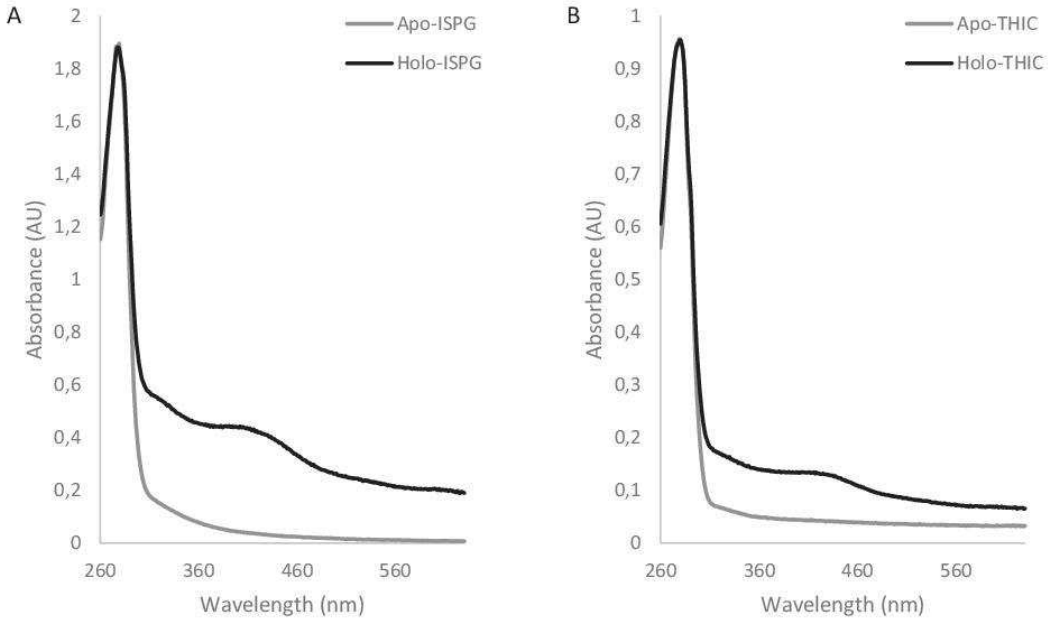
Supplemental Figure S3



Supplemental Figure S3 continued



Supplemental Figure S4



Gene IDs	moy_intensity *Pro35S::CTP NFU3-GFP*	moy_intensity *ProNFU1::gNFU1-GFP*	Number of peptides	Symbol	Protein name	Function	Localization	Fe-S cluster type
AT5G50210	0,00	1,87E+07	8	SUFE3	quinolinate synthase SUFE3	NAD synthesis	plastid	4Fe-4S
AT1G62180	0,00	1,09E+07	7	APR2	5'adenylyl-phosphosulfate reductase 2	sulfate assimilation	plastid	4Fe-4S
AT2G29630	7,80E+04	1,05E+07	5	THIC	thiamin C biosynthesis	thiamine biosynthesis	plastid	4Fe-4S
AT2G41220	1,17E+05	1,10E+06	8	GLU2	glutamate synthase 2	nitrogen assimilation	plastid	3Fe-4S
AT2G38270	8,86E+04	2,64E+06	2	GRXS16	glutaredoxin S16	Fe-S cluster assembly machinery	plastid	2Fe-2S, 4Fe-4S
AT3G24430	1,61E+05	1,83E+07	9	HCF101	high-chlorophyll fluorescence 101	Fe-S cluster assembly machinery	plastid	4Fe-4S
AT2G43100	0,00	6,92E+06	6	IPMI2	isopropylmalate isomerase 2	glucosinolate and leucine biosynthesis	plastid	none
AT3G58990	0,00	5,76E+06	4	IPMI1	isopropylmalate isomerase 1	glucosinolate and leucine biosynthesis	plastid	none
AT2G43090	1,54E+05	1,18E+07	8	IPMI3	isopropylmalate isomerase 3	glucosinolate and leucine biosynthesis	plastid	none
AT5G10920	0,00	1,64E+06	2	none	argininosuccinate lyase	amino acid biosynthesis (arginine)	plastid	none
AT4G01900	1,99E+05	9,41E+06	6	GLB1	nitrogen regulatory protein P-II homolog	amino acid biosynthesis (arginine)	plastid	none
AT1G58080	0,00	8,08E+06	3	ATP-PRT1	ATP phosphoribosyl transferase 1	amino acid biosynthesis (histidine)	plastid	none
AT1G09795	2,03E+05	8,41E+06	4	ATP-PRT2	ATP phosphoribosyl transferase 2	amino acid biosynthesis (histidine)	plastid	none
AT5G14060	8,63E+04	9,41E+06	7	AK2	aspartokinase 2	amino acid biosynthesis (lysine and threonine)	plastid	none
AT3G59890	6,06E+04	2,41E+06	2	DAPB2	dihydrodipicolinate reductase 2	amino acid biosynthesis (lysine)	plastid	none
AT4G33680	7,21E+04	2,85E+06	5	DAP	L-diaminopimelate aminotransferase	amino acid biosynthesis (lysine)	plastid	none
AT1G08250	4,35E+04	4,89E+06	5	ADT6	arogenate dehydratase 6	amino acid biosynthesis (phenylalanine)	plastid	none
AT5G05590	0,00	1,40E+06	3	PAI2	phosphoribosylanthranilate isomerase 2	amino acid biosynthesis (tryptophan)	plastid	none
AT5G17990	1,05E+05	7,36E+06	5	PAT1	phosphoribosylanthranilate transferase 1	amino acid biosynthesis (tryptophan)	plastid	none
AT1G15710	2,41E+05	9,03E+06	3	TyrAAT2	arogenate dehydrogenase 2	amino acid biosynthesis (tyrosine)	plastid	none
AT3G25660	1,57E+05	3,14E+06	4	GATA	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	amino acid metabolism (glu and gln)	plastid, mitochondrion	none
AT4G33510	1,46E+05	4,71E+06	5	DHS2	3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	aromatic amino acid biosynthesis	plastid	none
AT5G52100	1,79E+05	7,02E+06	3	CRR1	chlororespiratory reduction 1	biogenesis/stabilization of the NDH complex	plastid	none
AT5G64380	9,81E+04	1,48E+06	2	FBPase2	fructose biphosphatase like protein 2	Calvin-Benson cycle	plastid	none
AT4G14210	0,00	7,17E+06	3	PDS3	phytoene desaturase 3	carotenoid biosynthesis	plastid	none
AT3G04870	3,97E+04	2,16E+06	3	ZDS	zeta-carotene desaturase	carotenoid biosynthesis	plastid	none
AT4G19170	2,26E+04	4,06E+05	3	NCED4	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4	carotenoid catabolism	plastid	none
AT5G59370	0,00	2,63E+07	6	ACT4	actin4	cellular architecture	cytosol	none
AT1G36390	1,66E+05	3,00E+06	2	CGE2	chloroplast GrpE	chaperone	plastid	none
AT1G80030	1,03E+05	5,48E+06	4	DJA7	DNA J protein A7	chaperone	plastid	none
AT2G22360	3,11E+04	1,68E+06	6	DJA6	DNA J protein A6	chaperone	plastid	none
AT3G04550	2,03E+05	9,27E+06	6	RAF1	rubisco accumulation factor 1	chaperone	plastid	none
AT5G55220	1,99E+05	3,14E+07	15	TIG1	trigger factor-like protein	chaperone	plastid	none
AT4G18480	1,07E+06	8,08E+07	19	CHLI1	magnesium-chelatase I subunit 1	chlorophyll biosynthesis	plastid	none
AT4G16390	0,00	1,14E+07	9	SVR7	suppressor of variegation 7	chloroplast biogenesis	plastid	none
AT1G69200	0,00	1,54E+06	2	FLN2	fructokinase-like 2	chloroplast organization	plastid	none
AT2G24020	3,49E+05	2,02E+07	8	STIC2	suppressor of TIC40	chloroplast protein import	plastid	none
AT4G01800	2,36E+05	2,56E+07	15	SECA1	protein translocase subunit	chloroplast Sec translocation machinery	plastid	none
AT1G48860	7,05E+04	1,16E+07	16	EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	chorismate biosynthesis	plastid	none
AT5G66120	1,14E+05	2,77E+06	5	unknown	3-dehydroquinate synthase	chorismate biosynthesis	plastid	none
AT2G21385	2,46E+04	7,00E+06	6	CGLD11	conserved in the green lineage and diatoms 11	cpATPase biogenesis	plastid	none
AT1G79050	0,00	5,65E+06	6	RECA1	homolog of bacterial RecA	DNA metabolism	plastid	none
AT1G14410	5,98E+04	3,17E+06	4	WHY1	whirly 1	DNA metabolism	plastid	none
AT1G32440	3,55E+05	5,37E+06	6	PKP3	plastidial pyruvate kinase 3	fatty acid biosynthesis	plastid	none
AT2G43710	0,00	1,19E+06	5	SSI2	suppressor of SA insensitive 2	fatty acid desaturation	plastid	none
AT5G51820	1,10E+05	1,98E+06	2	PGMP	phosphoglucomutase	glucose isomerisation	plastid	none
AT4G15560	0,00	1,44E+06	2	DXS	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase	isoprenoid biosynthesis	plastid	none
AT5G62790	3,16E+05	1,21E+07	6	DXR	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	isoprenoid biosynthesis	plastid	none
AT2G26930	1,58E+05	8,05E+06	3	ISPE/CMK	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	isoprenoid biosynthesis	plastid	none
AT4G21210	0,00	8,84E+06	5	RP1	PPDK regulatory protein 1	kinase activity	plastid	none
AT1G66430	6,12E+04	3,75E+06	4	FRK6	fructokinase 6	kinase activity	plastid	none
AT1G74030	4,22E+05	1,12E+07	5	ENO1	enolase 1	monosaccharide metabolism	plastid	none
AT3G02360	1,18E+04	4,15E+06	3	PGD2	6-phosphogluconate dehydrogenase 2	monosaccharide metabolism	peroxisome	none
AT2G21660	9,34E+05	4,60E+06	3	GRP7	glycine-rich RNA-binding protein 7	mRNA processing	nucleus	none
AT1G51100	2,74E+04	5,07E+06	3	CRR41	chlororespiratory reduction 41	NDH subcomplex A assembly	plastid	none
AT1G11790	1,61E+05	8,27E+06	4	ADT1	arogenate dehydratase 1	phenylalanine biosynthesis	plastid	none
AT5G13120	1,45E+05	4,18E+06	3	PNSL5	photosynthetic NDH subcomplex L 5	photosynthesis, chlororespiration	plastid	none
AT3G55250	6,83E+04	3,23E+06	4	PSA3	Photosystem I assembly factor 3	Photosystem I assembly	plastid	none
AT1G70070	0,00	1,65E+06	3	ISE2	increased size exclusion limit 2	plasmodesmata formation	plastid, cytosol, nucleus	none
AT2G21280	0,00	4,09E+06	2	GC1	giant chloroplast 1	plastid division	plastid	none
AT5G24020	0,00	1,54E+06	2	ARC11	accumulation and replication of chloroplasts 11	plastid division	plastid	none
AT4G13670	0,00	3,57E+07	10	PTAC5	plastid transcriptionally active 5	plastid gene expression	plastid	none
AT2G02740	2,03E+04	4,88E+06	4	PTAC11	plastid transcriptionally active 11	plastid gene expression	plastid	none
AT4G20130	3,62E+04	2,02E+06	4	PTAC14	plastid transcriptionally active 14	plastid gene expression	plastid	none
AT1G80480	0,00	1,49E+07	7	PTAC17	plastid transcriptionally active 17	plastid gene expression	plastid	none
AT3G12080	7,05E+04	5,85E+06	5	EMB2738	GTP-binding family protein	plastid gene expression	plastid	none
AT5G13630	0,00	7,04E+06	5	GUN5	genomes uncoupled 5	plastid-to-nucleus signal transduction	plastid	none
AT3G56290	4,01E+04	2,83E+06	2	none	potassium transporter	potassium transporter	plastid	none
AT1G02560	0,00	1,96E+07	4	CLPP5	nuclear encoded CLP protease 5	protease	plastid	none
AT1G53280	1,59E+05	4,57E+06	3	DJ1B	class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	protease	plastid	none
AT2G47940	5,47E+04	6,50E+06	5	DEGP2	degradation of periplasmic proteins 2	protease	plastid	none

AT5G51070	5,89E+04	3,47E+06	4	ERD1	early responsive to dehydration 1	protease	plastid	none
ATCG00670	7,77E+04	9,61E+06	2	CLPP1	caseinolytic protease P 1	protease	plastid	none
AT3G20330	5,57E+05	3,35E+06	3	PYRB	pyrimidine B	pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	plastid	none
AT3G17810	9,16E+04	5,30E+06	3	PYD1	dihydropyrimidine dehydrogenase	pyrimidine ribonucleotide degradation	plastid	none
AT4G20960	0,00	3,19E+06	4	PYRD	pyrimidine deaminase	riboflavin biosynthesis	plastid	none
ATCG00810	0,00	3,44E+06	2	RPL22	ribosomal protein L22	ribosomal protein	plastid	none
AT1G78630	0,00	9,60E+06	2	emb1473	embryo defective 1473	ribosomal protein	plastid, cyto, mito	none
AT3G49010	3,98E+05	2,53E+06	2	RPL13B	60S ribosomal protein L13-1	ribosomal protein	cytosol	none
ATCG00160	1,97E+05	9,79E+06	2	RPS2	ribosomal protein S2	ribosomal protein	plastid	none
ATCG00790	7,24E+04	3,21E+06	2	RPL16	ribosomal protein L16	ribosomal protein	plastid	none
AT3G12930	0,00	4,72E+06	2	DG238	delayed greening 238	ribosome availability	plastid	none
AT3G62910	0,00	2,19E+06	3	CPRF1	chloroplast ribosome release factor 1	ribosome availability	plastid	none
ATCG00180	0,00	1,48E+06	2	RPOC1	RNA polymerase beta' subunit-1	RNA polymerase	plastid	none
ATCG00190	0,00	2,78E+06	3	RPOB	RNA polymerase subunit β	RNA polymerase	plastid	none
ATCG00740	0,00	2,87E+06	3	RPOA	RNA polymerase subunit α	RNA polymerase	plastid	none
AT1G06190	1,73E+05	4,96E+06	4	RHON1	Rho termination factor	RNA processing	plastid, nucleus	none
AT3G23700	1,32E+05	7,03E+06	4	SRRP1	S1 RNA-binding ribosomal protein 1	RNA processing	plastid	none
AT3G48110	4,89E+04	4,92E+06	5	EDD1	glycine-tRNA ligase	RNA processing	plastid	none
AT5G13030	0,00	5,78E+06	7	SELO	selenoprotein O	ROS regulation	plastid	none
AT1G12800	2,76E+04	7,00E+06	7	SDP	S1 domain containing RBP	rRNA processing	plastid	none
AT5G51110	1,24E+05	1,95E+07	7	RAF2	rubisco assembly factor 2	rubisco assembly	plastid	none
AT1G32900	0,00	5,81E+06	8	GBSS1	granule bound starch synthase 1	starch biosynthesis	plastid	none
AT5G24300	0,00	7,06E+06	5	SS1	starch synthase 1	starch biosynthesis	plastid	none
AT4G18240	1,27E+05	4,79E+06	2	SS4	starch synthase 4	starch biosynthesis	plastid	none
AT3G01180	1,73E+05	8,24E+06	6	SS2	starch synthase 2	starch biosynthesis	plastid	none
AT3G52180	1,38E+05	8,12E+06	5	SEX4	starch excess 4	starch degradation	plastid	none
AT5G26570	9,30E+04	8,27E+06	7	PWD	phosphoglucan water dikinase	starch degradation	plastid	none
AT5G43780	0,00	2,67E+06	7	ATPS4	ATP sulfurylase 4	sulfate assimilation	plastid	none
AT2G14750	5,59E+04	5,44E+06	4	APK1	adenosine-5'-phosphosulfate kinase	sulfate assimilation	plastid	none
AT3G21200	0,00	2,47E+06	2	PGR7	proton gradient regulation 7	tetrapyrrole biosynthesis	plastid	none
AT5G08280	2,93E+05	1,61E+07	8	HEMC	hydroxymethylbilane synthase	tetrapyrrole biosynthesis	plastid	none
AT3G56940	2,25E+05	3,58E+06	4	CRD1	magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase	tetrapyrrole biosynthesis	plastid	none
AT4G25080	7,51E+05	5,04E+06	3	CHLM	magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase	tetrapyrrole biosynthesis	plastid	none
AT1G22940	0,00	5,07E+05	2	TH1	thiamine requiring 1	thiamine biosynthesis	plastid	none
AT3G06730	0,00	2,07E+06	2	TRXZ	thioredoxin Z	thioredoxin	plastid	none
AT4G29670	0,00	4,71E+06	2	ACHT2	atypical cys his rich thioredoxin 2/TRX-lilium2	thioredoxin	plastid	none
AT5G65840	0,00	6,78E+06	4	none	none	thioredoxin	plastid	none
AT2G41680	2,39E+05	1,30E+07	8	NTRC	NADPH-dependent thioredoxin reductase C	thioredoxin	plastid	none
AT2G42220	0,00	8,84E+06	5	STR9	sulfurtransferase 9	thiosulfate metabolism	plastid	none
AT3G08920	0,00	3,14E+06	3	STR10	sulfurtransferase 10	thiosulfate metabolism	mitochondrion	none
AT5G19370	0,00	1,46E+07	9	STR12	sulfurtransferase 12	thiosulfate metabolism	plastid	none
AT4G27700	0,00	8,26E+06	4	STR14	sulfurtransferase 14	thiosulfate metabolism	plastid	none
AT1G03160	0,00	1,58E+06	3	FZL	FZO-like	thylakoid organization	plastid	none
AT2G45770	2,26E+05	8,47E+06	4	CPFTSY	cell division protein FtsY homolog	thylakoid organization	plastid	none
AT1G17220	2,17E+05	7,07E+06	8	FUG1	translation initiation factor 2	translation initiation	plastid	none
AT3G63190	3,46E+05	4,89E+06	4	RRF	ribosome recycling factor	translation process	plastid, cytosol	none
AT5G08650	4,83E+04	5,62E+06	5	none	translation factor GUF1 homolog	translation process	plastid	none
AT4G33760	0,00	3,88E+06	4	OKI	okina kuki	tRNA synthesis	plastid, cyto, mito	none
AT1G07780	9,11E+04	9,15E+06	3	PAI1	phosphoribosylanthranilate isomerase 1	tryptophan biosynthesis	plastid	none
AT1G23180	0,00	1,97E+06	3	none	ARM repeat superfamily protein	unknown	plastid, nucleus	none
AT3G62530	0,00	7,67E+06	4	none	ARM repeat superfamily protein	unknown	plastid, mitochondrion	none
AT2G13440	0,00	1,59E+06	2	none	glucose-inhibited division family A protein	unknown	plastid, mitochondrion	none
AT5G07190	0,00	5,14E+06	3	ATS3	seed gene 3	unknown	extracellular	none
AT1G02150	6,96E+04	1,13E+07	6	TPR	tetratricopeptide repeat-like superfamily protein	unknown	plastid	none
AT1G52510	1,21E+05	1,52E+07	6	none	alpha/beta-hydrolases superfamily protein	unknown	plastid	none
AT1G70820	1,07E+05	3,99E+06	4	none	phosphoglucomutase	unknown	plastid	none
AT1G73060	7,84E+04	8,32E+06	6	LPA3	low PSII accumulation 3	unknown	plastid	none
AT2G27680	1,36E+05	5,58E+06	4	none	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	unknown	plastid	none
AT2G35410	3,90E+05	1,42E+07	5	none	RNA-binding family protein	unknown	plastid, nucleus	none
AT3G08840	3,77E+04	2,63E+06	2	none	D-alanine ligase family	unknown	plastid	none
AT3G10350	4,60E+04	8,26E+06	4	GET3b	P-loop containing NTP hydrolases superfamily protein	unknown	plastid	none
AT3G44100	4,83E+04	3,79E+06	2	none	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	unknown	extracellular	none
AT3G44620	8,36E+04	1,12E+07	3	none	protein tyrosine phosphatases	unknown	plastid	none
AT4G25450	6,00E+04	2,19E+06	2	NAP8	non-intrinsic ABC protein 8	unknown	plastid	none
AT4G28030	3,29E+04	8,56E+05	2	none	acyl-CoA N-acyltransferases superfamily protein	unknown	plastid	none
AT5G17670	7,78E+04	5,06E+06	4	none	alpha/beta-hydrolases superfamily protein	unknown	plastid	none
AT5G27560	4,46E+04	1,80E+06	2	none	DUF1995 containing protein	unknown	plastid	none

Table 1. Potential NFU1 partners obtained with co-immunoprecipitation experiments and their assigned or presumed function. Proteins were considered as interactors if they were identified in coIP experiments in at least 3 replicates using ProNFU1::gNFU1-GFP lines and either not identified in the 4 replicates using Pro35S::CTPNFU3-GFPlines (a value of 0 is thus found in the column 2 (Pro35S::CTPNFU3-GFP) for 49 candidates) or identified in only one replicate using Pro35S::CTPNFU3-GFPlines (a value is indicated in the column 2 (Pro35S::CTPNFU3-GFP) for 89 candidates.

Table S2. Primers used for cloning in pGAD, pGBK and pET vectors.

Primer name	AGI	Protein sequence	Primer sequence
AtASE2fw	At4g34740	53-561	5' CCCCCCCCATATGTCTTCTTCTTCTTCTCCTTCG
AtASE2rv			5' CCCCGGATCCCTACCGTACCCAACCTCCTTCA
AtBOLA1fw	At1g55805	52-160	5' CCCCCATGGCTAGCAGCGTTGAGAAA
AtBOLA1rv			5' CCCGGATCCCTAGTCTTTAGAAGGAGA
AtBOLA4fw	At5g17560	50-177	5' CCCCCCCCCATATGGCCGTTTTGTCTCGTAAAGAG
AtBOLA4rv			5' CCCGGATCCTCAAACTTCAGAAGGAGT
AtcLIPfw	At5g08415	38-394	5' CCCCCCCCCATATGGAATCCGGGGATGTTTCGT
AtcLIPrv			5' CCCCCTCGAGTTAAGACAAGGATTTAGA
AtDWARF27.1fw	At1g03055	51-264	5' CCCCCCCCATATGGAGACAGCAAGAATCGAGACA
AtDWARF27.1rv			5' CCCCGGATCCTTAATGCTTCACACCGTAGCT
AtDWARF27.2fw	At1g64680	22-250	5' CCCCCCCATATGGGAATTGCTGAGCCGAGCGGA
AtDWARF27.2rv			5' CCCCGGATCCTTATGCCTCTAGTTTAGGGCA
AtDWARF27.3fw	At4g01995	34-258	5' CCCCCCCCATATGCGTATCTCTAATTCGTCAGAG
AtDWARF27.3rv			5' CCCCGGATCCTTACGCTAAAGGACACTCCCC
AtGRXS14fw	At3g54900	66-173	5' CCCCCCATGGCTTTGACTCCTGCGCTGAAG
AtGRXS14rv			5' CCCCGGATCCTCAAGAGCACATTGCCTT
AtGRXS16fw	At2g38270	63-293	5' CCCCCCATGGCTTCCGCCGTCAAATCTCTAACG
AtGRXS16rv			5' CCCCGGATCCTTATTTTTTGAAGTGACCGGCGAG
AtHCARfw	At1g04620	30-462	5' CCCCCCGGTCTCCCATGAATCTAGAGCCAAAAAAGAAGG
AtHCARrv			5' CCCCGGATCCTCATTTCTTGGAGAGCATTTT
AtHCF101fw	At3g24430	65-532	5' CCCCCCCCATATGGCTCAAGCTAGTAGTAGTGTT
AtHCF101rv			5' CCCCCCGAATTCCTAGACTTCGACTGGAGA
AtIBA57.2fw	At1g60990	61-432	5' CCCCCCATGGCTTCTTCCGATTCGTTG
AtIBA57.2rv			5' CCCCCCGGATCCTCAAGAACTCGAGTTGGC
AtIPMIfw	At4g13430	49-509	5' CCCCCCCCATATGGCTCCTCAAAAGGATCGG
AtIPMIrv			5' CCCCGAATTCTTACTGCAAGAACTCCCTTGG
AtISPGfw	At5g60600	50-741	5'CCCCCCGGTCTCCCATGTCAAACCAAGGCTCTGATTTA
AtISPGrv			5' CCCCGGATCCTTACTCATCAGCCACGGGCGGGTC
AtISPGrv2			5' CCCCCTCGAGCTCATCAGCCACGGGCGGGTC
AtISPHfw	At4g34350	40-466	5' CCCCCCGGTCTCCCATGTCGTCTGGCGATGAGAACGCT
AtISPHrv			5' CCCCGGATCCTTAAGCCAGCTGCAATAACTCT
AtMiaBfw	At4g36390	87-640	5' CCCCCCATGGCTAGTTCCGGTAAGTTT
AtMiaBrv			5' CCCCCCGAATTCTTAACTTGCACAAGACGC
AtNFU1fw	At4g01940	73-231	5' CCCCCCCCCATATGGTATCTTCAGGTTTATATTCA

AtNFU1rv			5' CCCCGGATCCCTAGCTTGTAAAGGTTACATT
AtNFU2fw	At5g49940	73-235	5' CCCCCCATGGCTGTAGCAACCCCAGACCCC
AtNFU2rv			5' CCCCGGATCCCTATATAAGTTGAACAGC
AtNFU3fw	At4g25910	72-236	5' CCCCCCCCCATATGCGAACAGTATTTGGTCACGTG
AtNFU3rv			5' CCCCGGATCCTCACTCAAGAAGCTGGACTGC
AtNiRfw	At2g15620	28-586	5' CCCCCCCCATATGGCCGCTCAGACCACAGCTCCG
AtNiRrv			5' CCCCGGATCCTTAATCTTCATTCTCTTCTC
AtSiRfw	At5g04590	63-642	5' CCCCCCCCATATGGTCTCCACTCCTGCGAAGCCT
AtSiRrv			5' CCCCCCGGTCTCGGATCCTTATTGAGAAACTCCTTTGTA
AtSUFA1fw	At1g10500	54-180	5' CCCCCCATGGCTGTTCGATCCGCTTCGGTT
AtSUFA1rv			5' CCCCGGATCCTCACATCTCGGCAGCAAA
AtSUFBfw	At4g04770	53-557	5' CCCCCCCCCATATGGCTGATGTTGGAATCGATTCTCGT
AtSUFBrv			5' CCCCGGATCCTTAACCCACTGATCCTTC
AtSUFCfw	At3g10670	73-338	5' CCCCCCCCCATATGGCTGTCGATTCGGATTCG
AtSUFCrv			5' CCCCCTCGAGCTAACCGGATATCGCTTTGTA
AtSUFDfw	At1g32500	37-475	5' CCCCCCCCCATATGGCTCAAGCTTCGTTCTCTGAC
AtSUFDrv			5' CCCCCTCGAGTCAGAGCAAGCCTTTGACGTG
AtTHICfw	At2g29630	55-644	5' CCCCCCCCATATGACTTTGACGTTTGATCCA
AtTHICrv			5' CCCCCTCGAGTTATTTCTGAGCAGCTTTGAC

Table S3. Primers used for cloning in pUC-SPYCE/SPYNE vectors.

Primer name	**AGI**	**Protein sequence**	**Primer sequence**
AtcLIPfw	At5g08415	1-394	5' CCCCTCTAGAATGATGCATCATTGCTCAAT
AtcLIPrv			5' CCCCCTCGAGAGACAAGGATTTAGA
AtISPGfw	At5g60600	1-741	5' CCCCTCTAGAATGGCGACTGGAGTATTGCCA
AtISPGrv			5' CCCCCTCGAGCTCATCAGCCACGGGCGGGTC
AtNFU1fw	At4g01940	1-231	5' CCCCGGATCCATGATGGCTTCTCTCGCG
AtNFU1rv			5' CCCCCTCGAGGCTTGTAAAGGTTACATT
AtSUFA1fw	At1g10500	1-180	5' CCCCTCTAGAATGGCTTTCGCTACTGGAATC
AtSUFA1rv			5' CCCCCTCGAGCATCTCGGCAGCAAAAGAC
AtSUFE3fw	At2g29630	1-718	5' CCCCTCTAGAATGGCGTTAGCTCTCTCC
AtSUFE3rv			5' CCCCCTCGAGTCTCTTGCTCTCACA
AtTHICfw	At2g29630	1-718	5' CCCCCGTCTCTCTAGAATGGCTGCTTCAGTACACTGT
AtTHICrv			5' CCCCCTCGAGTTTCTGAGCAGCTTTGACATA

2. Détermination des cibles de NFU2 par approches protéomiques et comparaison d'interactions avec NFU1 et NFU3

Afin de comprendre les fonctions respectives des 3 protéines NFU chloroplastiques et les spécificités et redondances qui existent entre elles, j'ai réalisé des expériences de double hybride en levure avec ces 3 protéines et les protéines de la machinerie SUF ou des protéines cibles potentielles et j'ai effectué les clonages nécessaires aux expériences de BiFC qui visaient à confirmer les interactions identifiées. Les résultats obtenus avec NFU2 et NFU3 ont été intégrés dans un article de recherche décrivant l'identification de cibles potentielles de NFU2 par des expériences de co-immunoprécipitation, de protéomique quantitative, de double hybride en levure et de BiFC. Ces travaux ont permis de confirmer certaines cibles connues et d'identifier 12 nouvelles cibles pour NFU2. Globalement, les résultats obtenus montrent une certaine redondance entre NFU1, NFU2, et NFU3, parfois 2 à 2 ou pour l'ensemble de ces protéines vis-à-vis de cibles chloroplastiques à centres [4Fe-4S].

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article suivant, actuellement préparation.

Getting further into NFU2 function in Fe-S cluster transfer, a proteomic approach

Identification of client proteins for the chloroplastic iron-sulfur transfer protein NFU2 in Arabidopsis

Nathalie Berger[1], Florence Vignols[1], Jonathan Przybyla-Toscano[2], Mélanie Roland[2], Valérie Rofidal[1], Brigitte Touraine[1], Krzysztof Zienkiewicz[3], Jérémy Couturier[2], Ivo Feussner[3], Véronique Santoni[1], Nicolas Rouhier[2], Christian Dubos[1*], Frédéric Gaymard[1]

[1] BPMP, Université de Montpellier, CNRS, INRA, SupAgro, Montpellier, France
[2] Université de Lorraine, Inra, IAM, F-54000 Nancy, France
[3] Department of Plant Biochemistry, Albrecht-von-Haller-Institute for Plant Sciences and Göttingen Center for Molecular Biosciences (GZMB), University of Göttingen, 37077 Göttingen, Germany

*Corresponding author, Email: christian.dubos@inra.fr

Key words: NFU2, chloroplast, proteomic, quantification, iron-sulfur cluster, Arabidopsis

ABSTRACT

Iron-sulfur (Fe-S) proteins have critical functions in plastids, participating notably to the photosynthetic electron transfer, sulfur and nitrogen assimilation, chlorophyll metabolism and vitamin or amino acid biosynthesis. Their maturation relies on an assembly machinery referred to as the SUF machinery. *De novo* synthesized Fe-S clusters on a scaffold protein complex are delivered to client proteins *via* several transfer proteins. However the maturation pathways of most client proteins and their specificities towards transfer proteins are mostly unknown. In order to decipher the interacting proteins of the Fe-S cluster transfer protein NFU2, one of the three chloroplastic representatives found in *Arabidopsis thaliana*, we have performed a quantitative analysis of the shoot and root proteomes of *nfu2* plants. Combined with co-immunoprecipitation and binary yeast two-hybrid experiments, we identified 12 new targets, whose interactions with NFU2 were validated using bimolecular fluorescence complementation experiments. The plant mutant analysis also revealed a possible role for NFU2 in plant response to desiccation. This study allows delineating the maturation pathways of many Fe-S proteins, extending considerably the number of NFU2 clients. It also helps clarifying the respective roles of the three chloroplastic NFUs.

INTRODUCTION

Iron is essential for both prokaryotic and eukaryotic organisms as this metal is found in cofactors contributing to the activity and/or stability of several metalloproteins involved in key physiological processes (e.g. respiration, photosynthesis, DNA repair and replication). As a cofactor moiety, iron is mainly found in hemes and iron-sulfur (Fe-S) clusters, the latter being formed by the assembly of iron atoms and inorganic sulfide in various stoichiometries (Balk and Schaedler, 2014). In plants as in other organisms, the most widespread clusters are, in the following order, the [4Fe-4S], [2Fe-2S], Rieske-type [2Fe-2S] and [3Fe-4S] clusters (Couturier et al., 2013). In addition to the above-mentioned processes, these are found in proteins involved for instance in sulfur and nitrogen assimilation, chlorophyll metabolism and vitamin and amino acid biosynthesis (Balk and Pilon, 2011).

The majority of Fe-S proteins found in plants are encoded by the nuclear genome and imported from the cytosol to dedicated cell compartments as apo-proteins (devoid of Fe-S cluster). After their targeting, apo-proteins acquire their Fe-S cluster and are converted to mature holo-forms. This maturation step is ensured by the action of complex multi-protein machineries. In Arabidopsis, three machineries for Fe-S cluster assembly were identified and are distributed in cytosol (CIA for cytosolic iron-sulfur protein assembly), mitochondria

(ISC for iron sulfur cluster) and chloroplasts (SUF for sulfur mobilization). *De novo* building of Fe-S cluster on so-called scaffold proteins depends on an assembly complex, which composition differs depending on the machinery. However, this step requires a cysteine desulfurase that provides sulfur atoms and is associated to other accessory/regulatory proteins, an electron donor that reduces notably the sulfane sulfur species into sulfide, and an iron donor. Although it is reported that frataxin may control the entry of iron, as well as persulfide transfer, in the complex for the ISC mitochondria (Colin et al., 2013; Gervason et al., 2019), the iron donors are still unidentified for any machinery. It is worth noting that the CIA machinery depends on the mitochondrial cysteine desulfurase NFS1 for sulfur supply. After their assembly, Fe-S clusters are transferred to recipient apo-targets with the help of Fe-S cluster transfer proteins and eventually of chaperones (Balk and Schaedler, 2014; Couturier et al., 2013).

Within the SUF machinery, 10 proteins in Arabidopsis would participate to the transfer of preformed Fe-S clusters: GRXS14, GRXS16, BOLA1, BOLA4, SUFA1, IBA57.2, HCF101, NFU1, NFU2, and NFU3 (Couturier et al., 2013; Przybyla-Toscano et al., 2018). So far, there is no described *bola1* or *bola4* mutants, and compared to wild-type plants the Arabidopsis *grxs14*, *grxS16*, *sufa1* and *nfu1* null mutants present no obvious phenotype consistent with an Fe-S cluster maturation deficiency (Rey et al., 2017; Touraine et al., 2019; Yabe and Nakai, 2006). It is thus difficult to determine the precise functions of these proteins *in planta*. However, both glutaredoxin isoforms, GRXS14 and S16, and SUFA1 were initially characterized as [2Fe-2S] cluster incorporating proteins, able to transfer their cluster to apo-ferredoxin (Abdel-Ghany et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2008). Moreover, GRXS14 is able to transfer its [2Fe-2S] cluster to SUFA1 *in vitro* (Mapolelo et al., 2013) suggesting a potential *in vivo* sequential Fe-S cluster shuttling similar to the one described for mitochondrial orthologs (Banci et al., 2014; Brancaccio et al., 2014). Interestingly, NFU1 also interacts with SUFA1, however it is a [4Fe-4S] cluster containing protein suggesting that a conversion may be required if an Fe-S cluster exchange occurs (Roland et al., submitted). On the contrary, the corresponding mutants for other transfer proteins belonging to the SUF machinery have strong phenotypes. The Arabidopsis *hcf101* mutant is seedling lethal but could be partially rescued on sucrose, the *nfu2* and *nfu3* single mutants are dwarf and a double mutant is lethal (Lezhneva et al., 2004; Nath et al., 2016; Stöckel and Oelmüller, 2004; Touraine et al., 2019, 2004; Yabe et al., 2004). These strong phenotypes have been primarily explained by a defect in PSI assembly attributed to defaults in the maturation of the three [4Fe-4S] clusters bound to PsaA, PsaB and PsaC. In the current model, NFU2 and NFU3 act immediately upstream HCF101 serving, in this context, as relays for the delivery of Fe-S clusters (Touraine et al., 2019). NFU2, NFU3 and HCF101 likely have other direct client proteins among the ~ 50 Fe-S proteins found in chloroplasts, a majority ligating [4Fe-4S] clusters (Przybyla et al., in prep). The measurement of protein levels or activities in a given loss-of-function mutant is helpful to determine the proteins whose maturation is affected but it does not tell whether the interactions are direct. For instance, the protein level of ferredoxin-thioredoxin reductase (FTR) is decreased in the *hcf101* mutant but not in *nfu2* and *nfu3* mutants (Lezhneva et al., 2004; Stöckel and Oelmüller, 2004; Touraine et al., 2019). Altered quantity of some other Fe-S proteins have been reported in *nfu2* and *nfu3* mutants, including increases as reported for the PetC Rieske protein (Hu et al., 2017; Nath et al., 2016; Touraine et al., 2019, 2004; Yabe et al., 2004). However, the observed variations were not often reproduced among studies possibly because of the differences in plant growth conditions. Anyway, it is difficult to conclude whether an increased amount of proteins is a compensation mechanism or whether the proteins accumulate as apo-proteins because of a maturation defect but are in fact not functional. The same is true for stable protein levels, it does not mean that the protein is correctly matured if the apo-proteins are stable enough. A few studies relying on both *in vitro* and *in vivo* approaches already provided evidence for direct interactions between NFU2 and some partners. Among chloroplastic NFU proteins, NFU2 is the sole isoform reported as having the capacity to bind either a [2Fe-2S] cluster or a [4Fe-4S] cluster (Gao et al., 2013). So far, it was shown to transfer a [2Fe-2S] cluster *in vitro* to GRXS16, to the 5-adenosine phospho-sulfate reductase (APR1) and to the dihydroxyacid dehydratase (DHAD), involved

in the synthesis of branched chain amino acids (Gao et al., 2018, 2013). Consistent with the latter interaction and in the absence of NFU3 and HCF101 in roots, a short root phenotype is observed in the Arabidopsis *nfu2* mutant which accumulates branched chain amino acid precursors (Stöckel and Oelmüller, 2004; Touraine et al., 2019).

We have recently listed up to 51 known or putative Fe-S proteins in Arabidopsis plastids (Przybyla et al., in prep) for only 10 Fe-S cluster transfer proteins. The specificities in the delivery of Fe-S clusters from scaffold proteins to these clients is unknown for most of them. This was hampered for several reasons, some already described above, *e.g.* absence of phenotypes in several mutants for SUF components maybe due to some redundancies, lack of antibodies for many targets, lack of studies addressing direct physical interactions. In the case of *hcf101*, *nfu2* and *nfu3* mutants, we make the assumption that the strong photosynthetic defects might mask the existence of other Fe-S protein targets. Hence to unveil the set of NFU2 interacting proteins, we have combined several approaches. A global quantitative label free (QLF) proteomic strategy was carried out comparing both the shoot and root proteomes of wild-type and *nfu2* plants. This was completed by use of untargeted (co-immunoprecipitation experiments followed by shotgun mass spectrometry) and targeted approaches (binary yeast two-hybrid (Y2H) experiments using selected putative NFU2 targets). These three strategies allowed the identification of twelve new targets, whose interactions with NFU2 was validated using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments. We also reveal a possible role for NFU2 in the plant response to desiccation.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

For proteomic and metabolomic analyses, *nfu2-1* (SALK_039254C) (Touraine et al., 2004) and Col-8 (wild type) seeds were surface sterilized and sown in 0.2 ml tubes containing 0.8% agar prepared in pH 5.5 Hoagland-based solution (1 mM KH_2PO_4, 1 mM KNO_3, 1 mM $MgSO_4$, 5 mM $CaNO_3$, 50 µM H_3BO_3, 0.05 µM $CoCl_2$, 0.05 µM $CuSO_4$, 15 µM $ZnSO_4$, 2.5 µM KI, 50 µM $MnSO_4$, 3 µM Na_2MoO_4). Iron was added as 50 µM Fe^{3+}-EDTA. After 7 days in growth chamber, the bottoms of the tubes were cut off prior transfer to 2.5 L opaque recipient in the same medium. Plants were grown for 8 weeks under short day condition (8h/16h, day/night; 23°C/20°C, day/night) at a light intensity of 160 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ and 65% humidity (Figure S1A). Leaves and roots were harvested and stored at -80°C until analysis. For ABA measurement and rapid dehydration tests, plants were cultivated as described above. Two weeks old seedlings, grown on half strength Murashige and Skoog medium (MS/2) with 0.05% MES, 1% sucrose, 0.7% agar for 14 days in long day condition (16h/8h light/dark), were also included for the proteomic analysis. Fe concentration was 50 µM and provided as Fe^{3+}-EDTA (Figure S1B). For co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments, transgenic plants expressing a GFP targeted to chloroplasts *via* the *NFU3* chloroplastic targeting sequence (*Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP* in Col-8) and *nfu2-1* lines complemented by a NFU2-GFP fusion (*Pro35S::NFU2-GFP*) were grown on MS/2 as described above (Figure S2).

Constructs

All the PCR products were obtained using high-fidelity DNA polymerase (Phusion) and each construct was sequenced to ensure its integrity. The primers used are described in Table S1.

To generate the *Pro35S:NFU2:GFP*, the *NFU2* cDNA was cloned in 5' of the GFP coding sequence and placed under the control of *Pro35S* using the pGWB505 vector (Nakagawa et al., 2007). The *Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP* construct was reported before (Roland et al., in revision). The coding sequences for NFU2 and its target proteins and were cloned in pGAD and PGBK vectors for Y2H and in pUC-SPYNE and pUC-SPYCE vectors for BiFC experiments (Walter et al., 2004).

Chlorophyll and carotenoid determination

Four leaf disks (diameter of 0.45 cm) per plants were sampled and mixed in 100% acetone for pigment extraction in the dark under agitation until the samples get cleared (3 to 4 hours). Absorbance of the supernatant was measured at 470 nm, 644.8 nm and 661.6 nm. The concentrations were determined as follows: Chla (µg/ml) = $11.24*A_{661.6} - 2.04*A_{644.8}$; Chlb (ug/ml) = $-4.19*A_{661.6} + 20.13*A_{644.8}$; Carotenoids (µg/ml) = $(1000*A_{470} - 1.9*\text{Chla} - 63.14\ \text{Chlb})/214$ (Lichtenthaler, 1987).

Protein extraction and trypsin digestion for label free experiments

Proteins were extracted from 50 mg of leaves or roots from eight weeks old plants and from two weeks old seedlings in 250 µL of 1X Laemmli (65 mM Tris-HCl pH 7.5; 5% glycerol; 2% SDS) (Laemmli, 1970). After vortexing, samples were centrifuged at 20°C for 10 min at 14,000 g. The supernatant was withdrawn and protein contents were measured using the Pierce™ Detergent Compatible Bradford Assay Kit (ThermoScientific) (Bradford, 1976). 35 µg of extracted proteins for each sample were loaded on a 12% precasted gel (Bio-Rad) and were subject to a 20 min migration at 100 V. Each lane of the gel was cut in 4 parts and in small pieces (2 mm^2), washed two times with carbonate buffer (25 mM NH_4HCO_3) and two other times with 50% acetonitrile in 25 mM NH_4HCO_3. Bands were dehydrated in 100% acetonitrile and after drying, treated during 45 min at 56°C with 10 mM DTT, and alkylated with 55 mM iodoacetamide during 30 min at room temperature in the dark. Treated bands were washed two times with 50% acetonitrile in 25 mM NH_4HCO_3 and were dehydrated in 100% acetonitrile. After drying, samples were digested with a trypsin solution (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, Madison, USA), in a 1:50 (trypsin:protein) ratio overnight at 37°C. Peptides were extracted from the gel with 200 µL of 2% formic acid (FA) under shaking during 30 min. The supernatant was collected and two more extractions were done with 80% acetonitrile / 2% FA under shaking, during 30 min each. The three supernatants were pooled and vacuum dried. Each sample was solubilized in 10 µL of 2% FA and 1 µL was injected for mass spectrometry (MS/MS) analysis (Qexactive Plus, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Data processing for protein identification and label free quantification (LFQ)

Raw mass spectrometry data were analyzed in the Maxquant environment (Cox and Mann, 2008) v.1.5.0.0 and Andromeda was employed for database search (Cox et al., 2011). The MS/MS data were matched against the TAIR10 + GFP database. For protein identification and quantification, cysteine carbamidomethylation was set up as a fixed modification and oxidation of methionine as variable modification. At least two unique peptides are necessary for protein identification and quantification. Up to two missed cleavage was allowed for protease digestion. For the other characteristics, Maxquant default parameters were used. Following the quantification step and the LFQ normalization, proteins were considered as quantifiable only if they are present in all samples, i.e. four biological replicates for each genotype. For statistics, pairwise *t*-tests $P<0.05$ were carried out. Before statistical treatment, the normal distribution of the logarithmic transformed data was assessed. For proteomic analysis, a protein was considered as absent in *nfu2-1* if it was identified with 2 peptides in at least 3 WT replicates and not in the 4 *nfu2-1* replicates. All raw MS data and Maxquant files generated have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifiers xxxxxxxxx.

Co-IP experiments

1 g of aerial tissues from two weeks old seedlings was cross-linked in 1% formaldehyde in PBS buffer two times (7 min under vacuum). The reaction was blocked by adding 300 mM glycine (30 min under vacuum). Fixed tissues were rinsed three times with water, dried and frozen in liquid nitrogen prior grinding. Powder was diluted in 2 mL of RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% sodium-deoxycholate) buffer and centrifuged two times 10 min at 14,000 g to remove cell debris. 50 µL of antibodies directed against GFP and coupled to magnetic beads (Miltenyi Biotec®) were added to the supernatant and mixed (wheel rotation) for 30 min at 4°C. Tubes were then placed on magnetic rack and after 4 washes with RIPA buffer, proteins were recovered and denatured with 100 µL of 1X Laemmli solution. Samples were then treated and analyzed as for the LFQ with the following parameters: a protein was considered as interacting with NFU2 if it was identified with 2 peptides in at least 2 replicates from *Pro35S:NFU2:GFP* expressing plants and not in the 3 replicates from *Pro35S::CTP_{NFU3}-GFP* expressing plants. All raw MS data and Maxquant files generated have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifiers xxxxxxxxx.

Y2H experiments

Yeast CY306 cells were prepared and co-transfected with pGAD and pGBK-SPYCE

(fusion with the activation domain (AD) and DNA binding domain (BD) of the GAL4 regulator, respectively) construct pairs as described earlier (Vignols et al., 2005). The primers used for cloning the sequence encoding the mature form of selected proteins are described in Table S1. All steps have been described previously (Roland et al., in revision).

BiFC experiments

Arabidopsis protoplasts were prepared and co-transfected with pUC-SPYNE and pUC-SPYCE (fusion with the N-terminal and the C-terminal part of the YFP fluorescent protein, respectively) construct pairs for 5 min in a PEG-based medium as described earlier (Yoo et al., 2007) without vacuum infiltration. Pairs of constructs involving one empty vector were also transfected as a control to ensure that none of the proteins assayed could restore YFP fluorescence in the absence of interacting partners. The YFP fluorescence in Arabidopsis protoplasts was recorded between 520 and 550 nm with a SP8 laser-scanning confocal microscope (Leica Microsystems) after excitation with an argon laser at 514 nm. The fluorescence of chlorophyll was recorded between 680 and 720 nm after excitation at 560 nm. The Leica LASX software was used to obtain images with maximum Z-stack intensity projection. Results presented are representative of three independent transfection experiments that include the analysis of 10–20 cells per transformation event.

RESULTS

Global analysis of the biological function of proteins whose abundance is affected in a nfu2 mutant

To uncover the pathways affected in *nfu2* loss-of-function mutants and identify new NFU2 targets, label free quantitative (LFQ) proteomic analyses were performed using samples from two weeks-old seedlings as well as from roots and shoots of eight weeks-old Arabidopsis *nfu2-1* mutant and wild type (WT) plants (Figure S1). From these experiments, 4616, 3824 and 2393 proteins were identified in roots, leaves and seedlings, respectively from the four replicates using both genotypes. The abundance of 311, 820 and 502 proteins present in roots, leaves and seedlings, respectively varied significantly, displaying a logarithmic fold change (log(FC)) lower than -0.2 or higher than +0.2 between *nfu2-1* and WT samples (Table S2-S4). Among them, 167, 339 and 174 are less accumulated whereas 154, 481 and 328 are more accumulated respectively in the roots, shoots and seedlings of *nfu2-1* as compared to the WT. The subcellular localization of these proteins was analyzed using the multiple marker abundance profiling method of the SUBA4 bioinformatic platform (http://suba.live/) (Figure 1). In the roots and leaves of eight weeks-old Arabidopsis *nfu2-1* mutant, the proteins less accumulated are in majority cytosolic and nuclear (Figure 1A-B). This is different from two weeks-old seedlings, in which 75% of the proteins are localized in plastids (Figure 1C). In *nfu2-1* roots, 30% of the proteins that are more accumulated are predicted as extracellular and 50% have an unassigned localization (Figure 1A). In leaves and seedlings, about 90% of these proteins are localized in plastids (Figure 1B-C). Taken together this first analysis suggests that *nfu2-1* mutation, by affecting the amount of several proteins present in chloroplasts, impacts the entire cell organization strongly modulating the accumulation of cytoplasmic, nuclear and extracellular proteins, notably in roots.

GO term enrichment analysis of the proteins whose abundance varies in *nfu2-1* was conducted using the PANTHER gene ontology platform (http://go.pantherdb.org) (Figure 2 and Table S5-S6). In the root samples, proteins of the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP) (GO:0009051), *i.e.*, glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD), were over-represented (Figure 2A). For instance, PGD1 and PGD3, that are targeted to both the cytosol and the plastids, were over-accumulated in *nfu2-1* when compared to the WT. The amount of the third isoform, the peroxisomal PGD2 (Hölscher et al., 2016), was not affected. These changes suggest that mechanisms for maintaining the generation of reducing equivalents in the form of NADPH, have been established possibly to compensate a lack of electron supply to the chloroplastic ferredoxin NADP-reductase (FNR) via PSI. The need of NADPH is particularly important for the functioning of antioxidant systems. Otherwise, this GO term analysis indicated that the abundance of proteins involved in the response to several stresses was decreased in *nfu2-1* roots (cadmium ion, GO:0046686; osmotic stress, GO:0006970; abiotic stress, GO:0009628;

biotic stress, GO:0009607 and GO:0043207; decreased oxygen levels, GO:0036293, GO:0070482 and GO:0001666). Other GO term enrichments likely recapitulate Fe-S protein maturation defects. The carbohydrate derivative biosynthetic process GO term (GO:1901137) reflects in large part the decrease of isopropylmalate isomerase (IPMI) complex proteins, the large subunit of the heterodimer being a known Fe-S protein that is associated to a small subunit represented by three isoforms. Similarly, the oxidation-reduction process GO term (GO:0055114) gathers cytosolic and chloroplastic Fe-S enzymes implicated in diverse biochemical processes, including aconitases (ACO1, ACO3), glutamate synthase (GLU2), nitrite reductase (NIR) and sulfite reductase (SIR).

On the other hand, the metabolic adjustments/perturbations occurring in *nfu2-1* leaves and *nfu2-1* seedlings are globally very similar (Figures 2B-C). As expected, these proteome analyses point to the establishment of a response to photosynthesis deficiency with overrepresented GO-terms in the mutant such as Rubisco complex assembly (GO:0110102), carbon fixation (GO:0015977), reductive PPP pathway (GO:0019253) but also negative regulation of photosynthesis (GO:0043155) which corresponds mainly to the photorespiration process. Accordingly, the photosynthesis (GO:0015979) and the electron transport chain (GO:0022900) in seedlings) GO terms, corresponding in part to photosystem subunits, are enriched among proteins whose abundance is decreased in *nfu2-1*. Surprisingly, nine enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle (GO:0006099 and GO:0072350) had their abundance diminished in the *nfu2-1* leaves. This is in contrast to what is usually observed in mutants affected in photosynthesis that display an increase of the TCA cycle protein/activity (Motohashi et al., 2012).

Even though the chloroplast ultrastructure is not visibly altered in the *nfu2* mutant, another major conclusion arising from this GO terms analysis is that there are major perturbations of the chloroplastic function, which are likely a consequence of the reported photosynthesis failure (Touraine et al., 2019). Indeed, in both *nfu2-1* leaves and seedlings, plastid translation (GO:0032544), plastid organization (GO:0009657), and *de novo* protein folding (GO: 0006458) as well as thylakoid membrane organization (GO:0010027) GO terms are enriched in proteins whose abundance was increased in *nfu2-1*.

As observed for roots, the GO terms over-represented in proteins decreasing in *nfu2-1* leaves or seedlings relate globally to stress response with enriched GO terms in leaves such as response to oxidative, abiotic and biotic stresses. Interestingly, in both leaves and seedlings, there are GO terms among proteins whose abundance was decreased in *nfu2-1*, that are reminiscent of the response to water deficit *i.e.*, response to abscisic acid and osmotic stress in seedlings and response to desiccation in leaves, which is by far the most enriched biological function in this analysis. All of this might indicate that the general stress response mechanisms of the *nfu2-1* mutant are altered but in particular that the ABA signaling and/or metabolism is affected. Carefully looking at the abundance of proteins known to participate in the water deficit response, RD2 (response to desiccation), RD29A, dehydrin ERD14 (early response to dehydration) and different LEA (late embryogenesis abundant) these are indeed decreased in *nfu2-1* leaves (Figure 3A). Then, targeted metabolomics/hormonomics were achieved to determine whether this may originate from variations in the ABA content. These measurements revealed that the amount of ABA hormone followed the same pattern, *i.e.* it is decreased by a factor 2 (Figure 3B), whereas the amount of other hormones is globally unchanged (not shown). Rapid dehydration assays showed that the water loss was faster and more pronounced for the *nfu2-1* mutant than for the WT (Figure 3C).

Impact of nfu2-1 mutation on photosystem I (PSI) protein components

NFU2 is required for the biogenesis of a functional PSI. Accordingly, a decreased accumulation of proteins constituting the core complex of PSI (Psa A, B and C, Photosystem I subunit), and the peripheral subunits (PsaD-1 and D-2) as well as proteins from the peripheral antenna (Lhca-1 to Lhca-4, PSI light harvesting complex gene a1 to 4) have been reported in *nfu2* mutants using western blots (Hu et al., 2017; Touraine et al., 2019, 2004; Yabe et al., 2004).

In order to get more insight into the importance of NFU2 is this process, accumulation of the 31 PSI proteins involved in PSI biogenesis was quantified by the LFQ method (Table 2). The previous observations made for PsaA, B, C and

D-2 as well as Lhca-1 to Lhca-3 were confirmed, in *nfu2-1* leaves and seedlings. A decrease of PsaD-1 protein accumulation was also observed, but only in *nfu2-1* leaves, whereas a decrease Lhca-4 accumulation was solely observed in *nfu2-1* seedlings. This approach revealed that PsaF, G, H-2, K, E-1 and N accumulation was decreased in the leaves and seedlings of the *nfu2-1* mutant. PsaL, O, E-2, Lhca-5 protein accumulation was also decreased in the *nfu2-1* mutant, but only in seedlings. In contrast an increase in Lhca-6 and PPD1 (PsbP domain protein 1) was observed in *nfu2-1* leaves, Ycf3 (Hypothetical chloroplast open reading frame 3) in *nfu2-1* seedlings and Ycf4 in both leaves and seedlings.

Altogether, 12 proteins from the PSI (≈38%) displayed altered accumulation in the *nfu2-1* mutant; including the three Fe-S proteins (i.e. PsaA, B and C). These data indicate that NFU2 activity defect had profound effects on the accumulation of proteins that are involved in the biogenesis and architecture of PSI.

Quantification of Fe-S proteins in nfu2-1

The major goal of this study was to identify novel NFU2 targets among plastidial Fe-S proteins. Among the 51 known/putative chloroplastic Fe-S proteins, 36 (≈70%) were quantifiable in both WT and *nfu2-1* mutant (Table 1).

The abundance of several Fe-S proteins is significantly decreased in the *nfu2-1* mutant, nine in roots (*i.e.* adenosine 5'-phosphosulfate reductase 2 (APR2); glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (ASE) 1 and 2; DHAD, FTR, GLU2, IPMI large subunit, NIR and SIR), eight in leaves (*i.e.* beta-carotene isomerase D27 (DWARF27.2), HCF101, GLU2, NADH dehydrogenase subunits I and K (NDHI & NDHK), PsaA, B and C) and five in seedlings (NADH-dependent glutamate synthase 1 (GLT1), pheophorbide a oxygenase (PAO) PsaA, B and C).

In contrast, two proteins displayed an increased abundance in *nfu2-1* mutant, NEET in leaves and GLU1 (glutamate synthase 1) in both leaves and seedlings. A third protein, PSB33 follows the same trend as GLU1. It was reported to be an Fe-S protein in Chlamydomonas but the cysteines found in the algal ortholog are missing in the Arabidopsis counterpart raising question about its capacity to ligate an Fe-S cluster. FTR displayed a contrasted pattern of accumulation since it was decreased in roots and increased in leaves and seedlings. Similarly, the abundance of SIR in the *nfu2-1* mutant was decreased in roots and increased in leaves.

Altogether, the abundance of 21 different chloroplastic Fe-S proteins was significantly affected in the *nfu2-1* mutant. Noteworthy, the pattern of accumulation in *nfu2-1* mutant for 7 proteins (HCF101, GLU1, NIR, PsaA, PsaB, PsaC and SIR) follows the general trends described in previous studies using western blots (Touraine et al., 2019, 2004; Yabe et al., 2004). The 11 other proteins whose abundance is decreased in *nfu2-1* (*i.e.* APR2, ASE1, ASE2, DWARF27.2, FTR, GLU2, GLT1, IPMI LSU1, NDHK, NDHI and PAO) might be novel targets of NFU2.

Co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments identified new potential NFU2 interacting proteins

To identify additional NFU2 targets, Co-IP experiments were performed using three independent *nfu2-1* transgenic lines overexpressing a NFU2-GFP fusion (*Pro35S:NFU2-GFP*) and three independent WT lines expressing a chloroplastic GFP (*Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP*) (Figure S3A). The NFU2-GFP fusion is functional as it rescues the *nfu2-1* root length and growth rate defects (Figure S2). 179 and 148 proteins were respectively identified for the *Pro35S:NFU2-GFP* and for the *Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP* expressing lines, the majority predicted as plastidial (Figure S3B). Among them, 146 were common to both genotypes and 33 and 2 specific to the *Pro35S:NFU2:GFP* and to the *Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP* expressing lines, respectively. 26 putative NFU2-interacting proteins have been conserved, among which 25 are predicted as chloroplastic proteins (Table 3). This includes 6 proteins not detected in the three *Pro35S::CTP$_{NFU3}$-GFP* replicates and present at least in two *Pro35S:NFU2-GFP* replicates and 20 proteins present in all samples but significantly over-represented in the *Pro35S:NFU2:GFP* lines (*t*-test: $P<0.05$). Importantly, GFP was not found as differentially expressed between the lines, confirming the suitability of the used control.

Among these 26 proteins, four known Fe-S proteins GLT1, GLU1, ISPG (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase) and ISPH (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase) are present. No variation in GLT1, ISPG and ISPH abundance

between *nfu2-1* and the WT was observed in proteomic experiments whereas GLU1 was accumulated in *nfu2-1* leaves and seedlings (Table 1). ISPG and ISPH are two enzymes from the non-mevalonate or methyl-erythritol 4-phosphate pathway, required for the biogenesis of IPP (isopentenyl diphosphate) and DMAPP (dimethylallyl diphosphate), the precursors for isoprenoids biosynthesis (e.g chlorophylls, carotenoid, ABA) (Rohdich et al., 2003). Interestingly, the proteomic analysis revealed that the abundance of three enzymes (*i.e.* 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR); 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase (ISPD) and 4-(cytidine 5'-phospho)-2-C-methyl-D-erithritol kinase (ISPE) acting upstream of ISPG and ISPH was increased in *nfu2-1* leaves. This observation suggests the establishment of compensatory mechanisms to sustain the biosynthesis of these essential compounds and thus maintain *nfu2-1* growth. To further investigate this hypothesis, two weeks old *nfu2-1* and WT seedlings were treated with fosmidomycin, an inhibitor of DXR activity (Zeidler et al., 2014). As expected, a decrease in the chlorophyll and carotenoid contents, fresh weight and primary root growth was observed for the WT (Figure 4). For the *nfu2-1* mutant, the decrease in the chlorophyll and carotenoid content follows a similar trend as the WT (Figure 4A-B). However, the difference in fresh weight between the WT and *nfu2-1*, synonymous of its reduced shoot growth, disappears for highest fosmidomycin concentrations tested (Figure 4C). These data suggest that additional proteins should act redundantly with NFU2 in shoots to sustain the Fe-S cluster assembly of ISPG and ISPH. It is also noticeable that, unlike WT plants, the primary root growth of *nfu2-1* was not affected by the fosmidomycin treatment (Figure 4D). These later observations suggest that the *nfu2-1* mutant has already minimal levels of isoprenoid precursors and that its function in sustaining primary root growth, might occur, at least in part, via its involvement in the biosynthesis of isoprenoid precursors.

Targeted binary yeast two-hybrid screen

Although powerful, LFQ proteomics and Co-IP experiments are large-scale approaches and do not necessarily provide information about physical interactions. Moreover, it can be challenging to detect weak or transient interactions. Hence, yeast two hybrid (Y2H) experiments were carried out as an additional complementary approach, to assess the interaction of NFU2 with selected chloroplastic Fe-S proteins, most of them previously tested with NFU1 (Roland et al., in revision). It included several proteins that were not detected/quantifiable in some samples used for the proteomic analyses such as the sirohydrochlorin ferrochelatase B SIRB, the chloroplastic lipoate synthase 1 (cLIP1), the tRNA methylthiotransferase MIAB, and the hydroxymethylpyrimidine phosphate synthase (THIC) plus controls using two proteins for which an interaction with NFU2 and NFU3 was reported already, HCF101 and DHAD (Touraine et al., 2019). These potential interactions were assayed with NFU2 fused either with the binding or with the activation domain of GAL4 (Figure 5). When fused to the binding domain of GAL4 (GAL4-BD), auto-activation was observed on selective medium without histidine in the absence of partners, preventing to draw any conclusion and prompting us to add 2 mM of the 3-amino-triazol (3-AT) inhibitor (Figure 5A). In this condition, interactions with HCF101, DHAD, ASE2, IPMI LSU1, ISPH and cLIP1 were reliably visible. It is noteworthy that the interaction of NFU2 with ASE2 and ISPH were weak but reproducible, and that the one with ISPH was visible, in addition to those with HCF101 and DHAD, when NFU2 was fused to GAL4-AD (Figure 5B). For comparative purposes among the 3 plastidial NFUs, similar experiments were conducted with NFU3. Indeed, the same set of proteins was already tested with NFU1, reporting its interaction with DWARF27.1, ISPG, NIR, THIC and cLIP1 (Roland et al, in revision). NFU3 was found to interact with HCF101 and ISPH when fused to GAL4-BD and GAL4-AD but also with DHAD, ASE2, cLIP1 and MIAB when fused to GAL4-AD (Figure 5A-B).

Altogether these data obtained in a yeast cellular context showed that NFU2 interacts with four proteins, ISPH was also fished by the co-IP experiments, ASE2 and IPMI LSU1 were identified as being differentially accumulated in the *nfu2* mutant by LFQ proteomics whereas cLIP represents a new putative client protein. In addition to HCF101 and DHAD, NFU2 and NFU3 share at least ASE2, ISPH and cLIP1 as clients. As no interaction was previously found between NFU1 and HCF101 or DHAD

(Touraine et al., 2019), the sole common partner between NFU1, NFU2 and NFU3 is cLIP1 using yeast two-hybrid experiments.

In planta analysis of NFU2 interaction with its novel putative targets by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays

LFQ proteomics analysis of *nfu2-1* mutant together with Co-IP experiments using NFU2-GFP fusion and Y2H directed screening yielded 14 proteins (APR2, ASE1, ASE2, DWARF27.2, FTR, GLU2, GLT1, IPMI LSU1, NDHK, NDHI, ISPG, ISPH, cLIP1 and PAO) for which no molecular connection with NFU2 was established in previous studies. The capacity of NFU2 to interact with these potential new targets was assayed in plant cells. For BiFC experiments, NFU2 and its putative clients were fused at the N-terminus of both the N-terminal and the C-terminal region of YFP and both interactions were tested for each protein couple, DHAD being used as a positive control (Touraine et al., 2019).

YFP fluorescence was observed in protoplasts transformed with NFU2 and either DHAD, ASE1, ASE2, DWARF27.2, FTR, ISPG, ISPH, cLIP1 or PAO. These interactions were observed in both orientations, except for DWARF27.2 and PAO (Table 4). In contrast, no interaction was observed with IPMI LSU1 and NDHI. BiFC experiments conducted with NFU1 and NFU3 identified several interactions that were observed in both orientations. It included the interaction of NFU1 with ASE1, ASE2, FTR, ISPG, ISPH, cLIP1 and PAO and NFU3 with FTR, ISPG, ISPH and cLIP1.

Altogether, these data highlight the interaction *in planta* between NFU2 and 8 novel Fe-S proteins, some of these interactions being also found with NFU1 and NFU3.

DISCUSSION

Metabolic and physiological adjustments in the *nfu2* mutant

The proteins whose abundance was modified in the *nfu2-1* mutant compared to the wild type were mostly cytosolic (roots and leaves) and chloroplastic (leaves and seedlings) (Figure 1). The majority of proteins whose abundance was decreased in *nfu2* were associated with the primary metabolism. This is likely to adjust the metabolism in response to photosynthesis defects (Figure 2). The most important variations in protein levels are found for PSI subunits. Accordingly, previous studies highlighted important roles of NFU2, but also NFU3 and HCF101, in the establishment of a functional PSI, the *nfu2* mutant being the one with the less affected growth (Touraine et al., 2019, 2004; Yabe et al., 2004). The accumulation of specific PSI subunits (Psa A, B, C, D-1 and D-2) was already shown to be decreased in these mutants by western blots. A clearer picture is obtained here as the LFQ approach pointed to the fact that the abundance of 19 proteins (out of 31), which are part of PSI or involved in its assembly, was modified in the *nfu2-1* mutant, most of them being less accumulated (Table 2). Hence, the maturation defects of the Fe-S proteins, PsaA, PsaB and PsaC, whose abundance is strongly decreased in the *nfu2* mutant, have dramatic consequences on other subunits. This is consistent with previous studies showing that a defect in PsaE-1, or in PsaD1/D2 affected the whole PSI and notably the accumulation of PsaC and PsaD and PsaC and PsaE respectively (Ihnatowicz et al., 2004; Varotto et al., 2000). The *psad* and *psae* mutants display growth and photosynthetic activity defects similar to that of *nfu2-1* mutants (Ihnatowicz et al., 2004; Touraine et al., 2019; Varotto et al., 2000). It was also shown that the abundance of PsaF, G, H, L, N, O subunits as well as Lhca-1 to 4 were affected by the absence of PsaD (Ihnatowicz et al., 2004). These observations indicate that the complex formed by these three proteins (PsaC, D and E-1) on the stromal side of the PSI relies on a balanced stoichiometry between the three subunits.

A striking observation was that a large number of proteins related to the abiotic stress response have their abundance decreased in the *nfu2-1* mutant. In particular, several proteins were related to the response to desiccation in leaves of 8 weeks old plants (Figure 3A). Consistently, the ABA content, but not of other hormones, was about 2 times lower in *nfu2-1* mutant as compared with the wild type and this was accompanied by a higher sensitivity to dehydration as assessed *via* rapid dehydration assays. This decrease implies that the biosynthesis and/or catabolism of this hormone is impaired. The synthesis of ABA relies first on isoprenoid precursors (IPP and DMAPP), whose synthesis requires two Fe-S proteins in the non-mevalonate pathway (ISPG and ISPH), and then on derived carotenoids that are converted to ABA by several enzymatic

reactions in plastids and in the cytosol (Finkelstein, 2013). The fact that the carotenoid levels are not altered in the *nfu2* mutant indicates that the defect(s) should occur downstream. The sole known Fe-S proteins that participate to the late-steps of ABA biosynthesis are the cytosolic abscisic aldehyde oxidases (AAO1-4) which also incorporate a molybdenum cofactor (Seo et al., 2000). However, the assembly of Fe-S and Moco cofactors in these AAOs should rely only on the cytosolic and mitochondrial Fe-S assembly machineries but not on the SUF machinery. Moreover, its abundance does not vary in the *nfu2* mutant and most of the other proteins related to ABA biosynthesis or degradation were not quantifiable. It may actually be that one of the other enzymes involved in ABA synthesis has an Fe-S cluster, as not all of them have been biochemically characterized. Also, it is possible that rechanneling of ABA precursors towards the synthesis of more critical molecules occurs to sustain growth. Whether the loss of NFU2 function renders plants more susceptible to other abiotic stresses remains to be determined.

Identification of novel potential NFU2 Fe-S protein targets

Among the 21 Fe-S proteins displaying an altered abundance in the *nfu2-1* mutant as compared to the WT, eight were previously analyzed by western blot (WB) and/or enzymatic activity in the same genotypes. The comparison between these studies and the work presented herein highlighted an overall good correlation. For instance, in this study PsaA, B and C abundance was decreased in *nfu2-1* mutant leaves and seedlings as previously demonstrated by WB analyses (Touraine et al., 2004; Yabe et al., 2004). Similarly, HCF101 decreased abundance in *nfu2-1* mutant leaves was in agreement with previous observations (Touraine et al., 2019). Here, NIR and SIR accumulation was decreased only in *nfu2-1* mutant roots but not in seedlings or leaves where its abundance was even increased. Similar observations were previously made by WB analysis but on whole plant tissues, most probably reflecting what was occurring in roots (Yabe et al., 2004). However, a decrease of SIR activity in leaves was previously reported, indicating that the increased abundance of SIR observed in this study might correspond to the apo-protein form (Touraine et al., 2004). GLU1 abundance was higher in *nfu2-1* mutant leaves and seedlings in accordance with a previous study reporting an increase of GLU activity in *nfu2-1* mutant plants (Touraine et al., 2004). These results indicate that the loss of NFU2 function activates some metabolic feedback stimulating the accumulation of GLU1 in the aerial tissues and that it is likely that the transfer of Fe-S cluster to apo-GLU1 might occur independently of NFU2 *via* another Fe-S carrier protein. Conversely, the accumulation of FD (ferredoxin) and PSB33 was not in agreement with what was previously described by WB. For instance, it was shown that *nfu2* mutants displayed a lower level of FD accumulation compared to the WT (Yabe et al., 2004). This was in contrast to what was observed in this study since no variation was observed for FD2 (that represent 80% of the ferredoxin found in plants), at least in leaves, the sole tissue where this protein was detected and quantified. Considering PSB33, an opposite trend was observed: in this study PSB33 abundance was higher in *nfu2-1* mutant leaves and seedlings than in the WT whereas no variation was observed by Yabe and coworkers. These discrepancies might be indeed due to differences in the growth conditions between the studies but it cannot be excluded that some technical limitation might come from the LC-MS/MS analysis.

Based on these good concordances, we postulate that the 11 Fe-S proteins whose abundance is decreased in the *nfu2-1* mutant are true NFU2 client proteins. It includes APR2, ASE1, ASE2, DWARF27.2, FTR, GLU2, GLT1, IPMI LSU1, NDHK, NDHI and PAO. An important point to consider here is that HCF101 abundance is decreased in the *nfu2-1* mutant leaves. Since HCF101 can act as an intermediate between NFU2 and some apo-proteins, as for PsaA, B and C proteins (Touraine et al., 2019), other leaf-specific proteins, such as DWARF27.2, NDHK and NDHI may also rely on HCF101 for their maturation. The lack of fluorescence observed in BiFC experiments carried out on Arabidopsis protoplasts when NFU2 was assayed with NDHI is in support of this hypothesis. However, for DWARF27.2 the situation is less clear since BiFC experiments revealed a weak but significant interaction with NFU2. It may still be that the endogenous HCF101 promotes this interaction. In contrast, in the absence of

HCF101 in roots (it is not detectable by LC-MS/MS and WB analyses, Stöckel and Oelmüller, 2004), proteins detected in this organ, i.e. APR2, ASE1, ASE2, FTR, GLU2 and IPMI LSU1, should be directly targeted by NFU2 in roots but also in shoots. This assumption was confirmed for APR2, ASE1, ASE2, FTR and GLU2 by BiFC experiments carried out on Arabidopsis protoplasts (Table 4). In contrast, no interaction was observed for IPMI LSU1 using this approach whereas it is seen by Y2H (Figure 5). Hence, it is possible that the presence of the YFP-tags on NFU2, IPMI LSU1, or both prevents this interaction in plant cells only, even though the whole IPMI complex can be formed (i.e. IPMI LSU1 can interact with three different small subunits participating either to the biosynthesis of leucine with IPMI SSU1 or glucosinolate with IPMI SSU2 and 3; He et al., 2010; Knill et al., 2009). Concerning GLT1 and PAO, an interaction with NFU2 was visualized by BiFC (Figure 6). As the decrease of GLT1 and PAO protein abundance in the *nfu2-1* mutant was only observed in whole seedling samples, we might postulate that other NFUs or HCF101 are involved in their maturation in the aerial tissues. Interactomic analysis and Y2H experiments yielded three additional potential targets whose abundance was either not affected by *nfu2-1* mutation (ISPG and ISPH) or not quantifiable in the experiments (cLIP1). For these proteins, BiFC and Y2H experiments confirmed the interaction with NFU2. Hence, the lack of quantitative difference in protein abundance between *nfu2-1* and WT plants for ISPG and ISPH suggests either that the apo-proteins are stable or that other transfer proteins promotes their maturation. The validity of the connection of NFU2 with lipoate synthase is reinforced by observations made in yeast, human and bacteria, where the maturation of lipoate synthase depends on the mitochondrial or cytosolic NFU counterparts (McCarthy and Booker, 2017; Melber et al., 2016; Navarro-Sastre et al., 2011). More importantly, the expression of plastidial NFUs in the yeast *nfu1* mutant restored the defaults that were dependent on the lipoate synthase maturation defect (Uzarska et al., 2018).

Partial overlap in Fe-S protein interactions among plastidial NFUs

Previous studies have highlighted that plastidial NFU2 and NFU3, but not NFU1, participated to the maturation of the same targets *i.e.*, PsaA, B, C and possibly of DHAD in leaves, either through HCF101 or directly (Hu et al., 2017; Touraine et al., 2019). On the other hand, the yeast complementation data mentioned above suggest that NFU1 might also, to some extent, act redundantly with NFU2 and NFU3 although it is more distantly related (Uzarska et al., 2018). Hence, the targeted yeast two-hybrid and BiFC experiments have been extended to both NFU1 (Roland et al., in revision) and NFU3 (Table 4 and Figure 5) to have a more exhaustive view about the levels of specificity *vs* redundancy existing among these three paralogs. Among the putative NFU2 interactors, five proteins, ASE2, FTR, ISPG, ISPH and cLIP1, are found to interact with NFU3 and 7 proteins (ASE1, ASE2, FTR, IPMI, ISPG, ISPH, , NIR LIP and PAO) with NFU1. On the other hand, NFU1 and NFU3 might have specific partners, as Y2H experiments pointed to additional interactions between NFU1 and DWARF27.1, , and THIC on the one hand and between NFU3 and MIAB on the other hand (Roland et al., in revision and Figure 5). All these interactions are summarized in Figure 6 and obviously some await more confirmation and mechanistic insights. In the future, it would be worth performing a similar exhaustive analysis with HCF101 because of its capacity to serve as a relay for NFU2 and NFU3. Assessing *in vitro* the capacity of all these NFU proteins to transfer their Fe-S clusters toward their identified partners would also be valuable to validate the interactions in a one to one partnership and to access the efficiencies and rate constants of the transfer.

To conclude, this study brings new insights into the Fe-S protein maturation model and highlights the potential role played notably by NFU2, but also by NFU1/NFU3, in diverse facets of the plant primary (e.g. photosynthesis, photorespiration, nitrogen and sulfur assimilation, purines and branched amino acids biosynthesis) and secondary metabolisms (e.g. glucosinolate and isoprenoid biosynthesis). In depth metabolomic analyses of the respective single and double mutants grown in different conditions, when viable, may help deciphering which NFUs have a predominant role in a given physiological context.

ACKNOWLEGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche as part of the 'Investissements d'Avenir' program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE) and by grant no. ANR- 2013-BSV6-0002-01. The PhD salary of M. Roland was provided by a funding from the Lorraine University of Excellence (LUE). The authors wish to thank Carine Alcon and the Montpellier Rio-Imaging and PHIV platforms for expertise and assistance in confocal microscopy.

REFERENCES

Abdel-Ghany, S.E., Ye, H., Garifullina, G.F., Zhang, L., Pilon-Smits, E.A.H., Pilon, M., 2005. Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Chloroplasts. Involvement of the Scaffold Protein CpIscA. Plant Physiol. 138, 161–172. https://doi.org/10.1104/pp.104.058602

Balk, J., Pilon, M., 2011. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. Trends Plant Sci 16, 218–226. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.12.006

Balk, J., Schaedler, T.A., 2014. Iron cofactor assembly in plants. Annu Rev Plant Biol 65, 125–153. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035759

Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Conte, R.D., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccioli, M., Winkelmann, J., 2014. [2Fe-2S] cluster transfer in iron–sulfur protein biogenesis. PNAS 111, 6203–6208. https://doi.org/10.1073/pnas.1400102111

Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., Rouhier, N., 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. EMBO J. 27, 1122–1133. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.50

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

Brancaccio, D., Gallo, A., Mikolajczyk, M., Zovo, K., Palumaa, P., Novellino, E., Piccioli, M., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2014. Formation of [4Fe-4S] clusters in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery. J. Am. Chem. Soc. 136, 16240–16250. https://doi.org/10.1021/ja507822j

Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.-M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., Ollagnier de Choudens, S., 2013. Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. J. Am. Chem. Soc. 135, 733–740. https://doi.org/10.1021/ja308736e

Couturier, J., Touraine, B., Briat, J.-F., Gaymard, F., Rouhier, N., 2013. The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. Front Plant Sci 4, 259. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00259

Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nature Biotechnology 26, 1367–1372. https://doi.org/10.1038/nbt.1511

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., Mann, M., 2011. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. J. Proteome Res. 10, 1794–1805. https://doi.org/10.1021/pr101065j

Finkelstein, R., 2013. Abscisic Acid synthesis and response. Arabidopsis Book 11, e0166. https://doi.org/10.1199/tab.0166

Gao, H., Azam, T., Randeniya, S., Couturier, J., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2018. Function and maturation of the Fe–S center in dihydroxyacid dehydratase from Arabidopsis. J. Biol. Chem. 293, 4422–4433. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001592

Gao, H., Subramanian, S., Couturier, J., Naik, S.G., Kim, S.-K., Leustek, T., Knaff, D.B., Wu, H.-C., Vignols, F., Huynh, B.H., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. Arabidopsis thaliana Nfu2 Accommodates [2Fe-2S] or [4Fe-4S] Clusters and Is Competent for in Vitro Maturation of Chloroplast [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Cluster-Containing Proteins. Biochemistry 52, 6633–6645. https://doi.org/10.1021/bi4007622

Gervason, S., Larkem, D., Mansour, A.B., Botzanowski, T., Müller, C.S., Pecqueur, L., Le Pavec, G., Delaunay-Moisan, A., Brun, O., Agramunt, J., Grandas, A., Fontecave, M., Schünemann, V., Cianférani, S., Sizun, C., Tolédano, M.B., D'Autréaux, B., 2019. Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. Nature Communications 10. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11470-9

He, Y., Chen, B., Pang, Q., Strul, J.M., Chen, S., 2010. Functional specification of Arabidopsis isopropylmalate isomerases in glucosinolate and leucine biosynthesis. Plant Cell Physiol. 51, 1480–1487. https://doi.org/10.1093/pcp/pcq113

Hölscher, C., Lutterbey, M.-C., Lansing, H., Meyer, T., Fischer, K., von Schaewen, A., 2016. Defects in Peroxisomal 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Isoform PGD2 Prevent Gametophytic Interaction in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. 171, 192–205. https://doi.org/10.1104/pp.15.01301

Hu, X., Kato, Y., Sumida, A., Tanaka, A., Tanaka, R., 2017. The SUFBC2D complex is required for the biogenesis of all major classes of plastid Fe-S proteins. Plant J 90, 235–248. https://doi.org/10.1111/tpj.13483

Ihnatowicz, A., Pesaresi, P., Varotto, C., Richly, E., Schneider, A., Jahns, P., Salamini, F., Leister, D., 2004. Mutants for photosystem I subunit D of Arabidopsis thaliana: effects on photosynthesis, photosystem I stability and expression of nuclear genes for chloroplast functions. Plant J. 37, 839–852. https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02011.x

Knill, T., Reichelt, M., Paetz, C., Gershenzon, J., Binder, S., 2009. Arabidopsis thaliana encodes a bacterial-type heterodimeric isopropylmalate isomerase involved in both Leu biosynthesis and the Met chain elongation pathway of glucosinolate formation. Plant Mol. Biol. 71, 227–239. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9519-5

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Lezhneva, L., Amann, K., Meurer, J., 2004. The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]-cluster-containing complexes in Arabidopsis thaliana chloroplasts. Plant J. 37, 174–185. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01952.x

Lichtenthaler, F.W., 1987. Karl Freudenberg, Burckhardt Helferich, Hermann O. L. Fischer: a centennial tribute. Carbohydr. Res. 164, 1–22. https://doi.org/10.1016/0008-6215(87)80114-3

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A.-N., Li, H., Couturier, J., Outten, C.E., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe–S cluster trafficking. Dalton Transactions 42, 3107. https://doi.org/10.1039/c2dt32263c

McCarthy, E.L., Booker, S.J., 2017. Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. Science 358, 373–377. https://doi.org/10.1126/science.aan4574

Melber, A., Na, U., Vashisht, A., Weiler, B.D., Lill, R., Wohlschlegel, J.A., Winge, D.R., 2016. Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. eLife 5. https://doi.org/10.7554/eLife.15991

Motohashi, R., Rödiger, A., Agne, B., Baerenfaller, K., Baginsky, S., 2012. Common and specific protein accumulation patterns in different albino/pale-green mutants reveals regulon organization at the proteome level. Plant Physiol. 160, 2189–2201. https://doi.org/10.1104/pp.112.204032

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T., 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. Journal of Bioscience and Bioengineering 104, 34–41. https://doi.org/10.1263/jbb.104.34

Nath, K., Wessendorf, R.L., Lu, Y., 2016. A Nitrogen-Fixing Subunit Essential for Accumulating 4Fe-4S-Containing Photosystem I Core Proteins. Plant Physiol. 172, 2459–2470. https://doi.org/10.1104/pp.16.01564

Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., Del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Ugarte, M., Gutierrez-Solana, L.G., Campistol, J., Garcia-Cazorla, A., Vaquerizo, J., Riudor, E., Briones, P., Elpeleg, O., Ribes, A., Lill, R., 2011. A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the

maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. Am. J. Hum. Genet. 89, 656–667. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.10.005

Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Gaymard, F., Couturier, J., Rouhier, N., 2018. Roles and maturation of iron–sulfur proteins in plastids. J Biol Inorg Chem 1–21. https://doi.org/10.1007/s00775-018-1532-1

Rey, P., Becuwe, N., Tourrette, S., Rouhier, N., 2017. Involvement of Arabidopsis glutaredoxin S14 in the maintenance of chlorophyll content. Plant Cell Environ. 40, 2319–2332. https://doi.org/10.1111/pce.13036

Rohdich, F., Zepeck, F., Adam, P., Hecht, S., Kaiser, J., Laupitz, R., Gräwert, T., Amslinger, S., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., 2003. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. PNAS 100, 1586–1591. https://doi.org/10.1073/pnas.0337742100

Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y., Koshiba, T., 2000. The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 12908–12913. https://doi.org/10.1073/pnas.220426197

Stöckel, J., Oelmüller, R., 2004. A Novel Protein for Photosystem I Biogenesis. J. Biol. Chem. 279, 10243–10251. https://doi.org/10.1074/jbc.M309246200

Touraine, B., Boutin, J.-P., Marion-Poll, A., Briat, J.-F., Peltier, G., Lobréaux, S., 2004. Nfu2: a scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in Arabidopsis chloroplasts. Plant J. 40, 101–111. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02189.x

Touraine, B., Vignols, F., Przybyla-Toscano, J., Ischebeck, T., Dhalleine, T., Wu, H.-C., Magno, C., Berger, N., Couturier, J., Dubos, C., Feussner, I., Caffarri, S., Havaux, M., Rouhier, N., Gaymard, F., 2019. Iron–sulfur protein NFU2 is required for branched-chain amino acid synthesis in Arabidopsis roots. J Exp Bot 70, 1875–1889. https://doi.org/10.1093/jxb/erz050

Uzarska, M.A., Przybyla-Toscano, J., Spantgar, F., Zannini, F., Lill, R., Mühlenhoff, U., Rouhier, N., 2018. Conserved functions of Arabidopsis mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron-sulfur clusters. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1865, 1250–1259. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.003

Varotto, C., Pesaresi, P., Meurer, J., Oelmüller, R., Steiner-Lange, S., Salamini, F., Leister, D., 2000. Disruption of the Arabidopsis photosystem I gene psaE1 affects photosynthesis and impairs growth. Plant J. 22, 115–124. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00717.x

Vignols, F., Bréhélin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D., Meyer, Y., 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. PNAS 102, 16729–16734. https://doi.org/10.1073/pnas.0506880102

Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., Kudla, J., 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. The Plant Journal 40, 428–438. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02219.x

Yabe, T., Morimoto, K., Kikuchi, S., Nishio, K., Terashima, I., Nakai, M., 2004. The Arabidopsis Chloroplastic NifU-Like Protein CnfU, Which Can Act as an Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein, Is Required for Biogenesis of Ferredoxin and Photosystem I. Plant Cell 16, 993–1007. https://doi.org/10.1105/tpc.020511

Yabe, T., Nakai, M., 2006. Arabidopsis AtIscA-I is affected by deficiency of Fe–S cluster biosynthetic scaffold AtCnfU-V. Biochemical and Biophysical Research Communications 340, 1047–1052. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.104

Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Sheen, J., 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nat Protoc 2, 1565–1572. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199

Zeidler, J., Schwender, J., Müller, C., Wiesner, J., Weidemeyer, C., Beck, E., Jomaa, H., Lichtenthaler, H.K., 2014. Inhibition of the Non-Mevalonate 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Pathway of Plant Isoprenoid Biosynthesis by Fosmidomycin. Zeitschrift für Naturforschung C 53, 980–986. https://doi.org/10.1515/znc-1998-11-1208

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *S*ubcellular localization of proteins whose abundance was significantly affected by the *nfu2-1* mutation.
Proteins were extracted from *Arabidopsis thaliana* **(A)** roots, **(B)** leaves and **(C)** seedlings. Protein localization was analyzed *in silico* using the multiple marker abundance profiling method of the SUBA4 bioinformatic platform (http://suba.live/).

Figure 2. Gene ontology (GO) analysis of the proteins whose abundance was significantly affected by the *nfu2-1* mutation.
Proteins were extracted from *Arabidopsis thaliana* **(A)** roots, **(B)** leaves and **(C)** seedlings. GO term enrichment analysis was conducted using the PANTHER gene ontology platform (http://go.pantherdb.org).

Figure 3. *nfu2-1* mutation affects the plant response to dehydration.
(A) Protein abundance in *nfu2-1* in comparison to the wild type (log Fold Change) of dehydration response marker proteins (ALDH7B4, aldehyde dehydrogenase 7B4; RD29A, response to desiccation 29A; RD2, response to desiccation 2; LEA14, late embryogenesis abundant 14; PIP2;3, plasma membrane intrinsic protein 2;3, ERD14, early response to dehydration 14; P5SCA, delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthase; PXG3, peroxygenase 3). **(B)** ABA content in wild type and *nfu2-1* seedlings. **(C)** Rapid dehydration assay conducted on detached wild type and nfu2-1 leaves. **(B-C)** n = 3 biological repeats. Error bars show ± SD. *t*-test significant difference: ***, $p < 0.001$.

Figure 4. Effect of fosmidomycin treatment on wild type and *nfu2-1* seedlings.
Fosmidomycin is an inhibitor of the biogenesis of IPP (isopentenyl diphosphate) and DMAPP (dimethylallyl diphosphate), the precursors for the biosynthesis of isoprenoids (*e.g* chlorophylls, carotenoids, ABA). Dose-dependent effect of fosmidomycin on **(A)** chlorophyll content, **(B)** carotenoid content, **(C)** fresh weight and **(D)** root length of *Arabidopsis thaliana* WT and *nfu2-1* seedlings. **(A-D)** Means within each condition with the same letter are not significantly different according to one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test, $p < 0.05$ (n = 3 technical repeats from one representative experiment). Error bars show ± SD.

Figure 5. Yeast two-hybrid binary interaction screen between plastidial NFUs and selected [4Fe-4S]-containing proteins.
Control plates contained histidine (+His) and test plates were without histidine (–His) in the absence or presence of 3-aminotriazol (+3AT) at 2 mM). The images shown are representative of three independent transformation experiments. **(A)** Constructs expressing NFU2 and NFU3 fused to the Gal4 DNA-binding domain (BD, NFUs used as baits) or **(B)** fused to the Gal4 activator domain (AD, NFUs used as preys).

Figure 6. Specificities and redundancies of NFUs towards chloroplastic Fe-S proteins.
Scheme summarizing which of the 21 NFU2 client proteins including the 12 newly identified proteins have also interactions with NFU1, NFU3 and HCF101.

Table 1. Abundance of chloroplastic Fe-S cluster proteins in *nfu2-1* relative to wild type.

ID	Acronym	log (FC) roots	log (FC) leaves	log (FC) seedlings	Fe-S cluster	Function	Name
At4g04610	APR1	n.v.	n.q.	n.q.	4Fe4S	Sulfate assimilation	Adenosine 5'-phosphosulfate reductase 1
At1g62180	APR2	**absent**	n.v.	n.q.	4Fe4S	Sulfate assimilation	Adenosine 5'-phosphosulfate reductase 2
At4g21990	APR3	n.v.	n.v.	n.q.	4Fe4S	Sulfate assimilation	Adenosine 5'-phosphosulfate reductase 3
At2g16570	ASE1	**-0.26***	n.v.	n.q.	4Fe4S	Purine nucleotide biosynthesis	Amidophosphoribosyltransferase 1
At4g34740	ASE2	**-0.44****	n.v.	n.v.	4Fe4S	Purine nucleotide biosynthesis	Amidophosphoribosyltransferase 2
At4g38880	ASE3	n.q.	n.v.	n.q.	4Fe4S	Purine nucleotide biosynthesis	Amidophosphoribosyltransferase 3
At1g44446	CAO	n.d.	n.q.	n.q.	rieske 2Fe/2S	Chlorophyll biosynthesis	Chloropyll a oxygenase
At2g42750	CDJ1	n.d.	n.d.	n.q.	4Fe4S	Unknown	DNA J protein C77
At5g23240	CDJ2	n.d.	n.d.	n.q.	4Fe4S	Unknown	DNA J protein C76
At3g05345	CDJ3	n.d.	n.d.	n.q.	4Fe4S	Unknown	DNA J protein C82
At4g29890	CMO	n.d.	n.d.	n.q.	rieske 2Fe/2S	Glycine betaine biosynthesis	Choline monooxygenase (putative)
At3g23940	DHAD	**-0.11***	n.v.	n.v.	2Fe2S	Branched chain amino acid	Dihydroxyacid dehydratase
At1g03055	DWARF27.1	n.d.	n.d.	n.q.	4Fe4S (?)	Strigolactone biosynthesis	DWARF27.1
At1g64680	DWARF27.2	n.d.	**-0.88****	n.q.	4Fe4S (?)	Unknown	DWARF27.2
At4g01995	DWARF27.3	n.d.	n.d.	n.d.	4Fe4S (?)	Unknown	DWARF27.3
At1g10960	FD1 (PETF2)	n.d.	n.d.	n.q.	2Fe2S	Electron transport chain	Ferredoxin 1
At1g60950	FD2 (PETF)	n.d.	n.v.	n.q.	2Fe2S	Photosynthesis	Ferredoxin 2
At2g27510	FD3	n.v.	n.d.	n.q.	2Fe2S	Electron transport chain	Ferredoxin 3
At5g10000	FD4	n.d.	n.d.	n.q.	2Fe2S	Electron transport chain	Ferredoxin 4
At2g04700	FTR	**-0.75***	**+0.33***	**+0.31****	4Fe4S	Ferredoxin-thioredoxin reductase	Ferredoxin-thioredoxin reductase
At3g24430	HCF101	n.d.	**-0.32***	n.v.	4Fe4S	Fe-S cluster transfer	High clorophyll fluorescence 101
At5g04140	**GLU1**	n.q.	**+0.45****	**+0.83****	3Fe4S	Nitrate assimilation	Glutamate synthase 1 (Fd-GOGAT)
At2g41220	GLU2	**-0.55***	**-0.33***	n.q.	3Fe4S	Nitrate assimilation	Glutamate synthase 2 (Fd-GOGAT)
At5g53460	**GLT1**	n.v.	n.v.	**-0.60****	3Fe4S	Nitrate assimilation	Glutamate synthase 1 (NADH-dependent)
At1g18500	IPMSI	n.v.	n.v.	n.v.	3Fe4S	Leucine biosynthesis	Isopropylmalate synthase
At4g13430	IPMI LSU1	**-0.56***	n.v.	n.v.	4Fe4S	Leucine biosynthesis	Isopropylmalate isomerase (large subunit 1)
At5g60600	**ISPG**	n.v.	n.v.	n.v.	4Fe4S	Isoprenoid precursor biosynthesis	4-Hydroxy-2-methylbut-2-enyl diphosphate synthase
At4g34350	**ISPH**	n.v.	n.v.	n.v.	4Fe4S	Isoprenoid precursor biosynthesis	4-Hydroxy-2-methylbut-2-enyl diphosphate reductase
At5g08415	LIP1	n.d.	n.d.	n.q.	2x[4Fe4S]	Lipoyl biosynthesis	Lipoyl synthase 1
At4g36390	MIAB	n.d.	n.v.	n.q.	2x[4Fe4S]	t-RNA maturation	Methylthiotransferase
AtCg00430	NDHK	n.d.	-0.29*	n.v.	4Fe4S	Aerobic respiration	NADH dehydrogenase (subunit K)
AtCg01090	NDHI	n.d.	**-0.42****	n.v.	2x[4Fe4S]	Photosynthesis	NADPH dehydrogenase
At5g51720	NEET	n.d.	+0.37*	n.v.	2Fe2S	Iron homeostasis	NEET
At4g01940	NFU1	n.d.	n.q.	n.q.	4Fe4S	Fe-S cluster transfer	NFU domain protein 1
At5g49940	NFU2	n.d.	n.d.	n.q.	2Fe2S or 4Fe4S	Fe-S cluster transfer	NFU domain protein 2
At4g25910	NFU3	n.d.	n.d.	n.q.	2Fe2S or 4Fe4S	Fe-S cluster transfer	NFU domain protein 3
At2g15620	NIR	**-0.64****	n.v.	n.v.	4Fe4S	Nitrate assimilation	Nitrite reductase
At3g44880	PAO	n.d.	n.v.	**-0.25***	rieske 2Fe/2S	Chlorophyll catabolism	Pheophorbide a oxygenase
At4g03280	PetC	n.d.	n.v.	n.v.	rieske 2Fe/2S	Photosynthesis	Photosynthetic electron transfer C
AtCg00350	PsaA	n.d.	-1.09*	**-1.68****	4Fe4S	Photosynthesis	PsaA subunit of photosystem I
AtCg00340	PsaB	n.d.	-1.01*	**-1.81****	4Fe4S	Photosynthesis	PsaB subunit of photosystem I
AtCg01060	PsaC	n.d.	**-1.14****	**-2.02****	4Fe4S	Photosynthesis	PsaC subunit of photosystem I
At1g71500	PSB33	n.d.	**+0.3***	**+0.45****	2Fe2S	Photosynthesis	Photosystem B protein 33
At4g25650	PTC52	n.q.	n.v.	n.v.	rieske 2Fe/2S	Chlorophyll catabolism	Protochlorophyllide-dependent translocon component 52
At5g04590	SIR1	**-0.37****	+0.31*	n.v.	4Fe4S	Sulfate assimilation	Sulfite reductase
At1g50170	SIRB	n.d.	n.v.	n.q.	4Fe4S	Siroheme biosynthesis	Sirohydrochlorin ferrochelatase B
At1g10500	SUFA1	n.d.	n.d.	n.q.	4Fe4S	Fe-S cluster transfer	SUFA1
At4g04770	SUFB1	n.d.	n.v.	n.q.	4Fe4S	Fe-S cluster assembly	SUFB1
At5g50210	SUFE3	n.v.	n.d.	n.q.	4Fe4S	NAD biosynthesis	Sulfur E3
At2g29630	THIC	n.d.	n.d.	n.q.	4Fe4S	Thiamin biosynthesis	Thiamin C
At2g24820	TIC55	n.d.	n.v.	n.v.	rieske 2Fe/2S	Chloroplast Protein Import	Translocon at the inner envelope membrane of

n.q.: not quantifiable, n.v.: no variation, n.d.: not detected

Table 2. Abundance of chloroplastic photosystem I associated proteins in *nfu2-1* relative to wild type.

ID	Acronym	log (FC) roots	log (FC) leaves	log (FC) seedlings	Fe-S cluster	Function	Name
AtCg00350	PsaA		**-1.09***	**-1.68****		PSI core	Photosystem I subunit A
AtCg00340	PsaB		**1.01***	**-1.81****		PSI core	Photosystem I subunit B
AtCg01060	PsaC		**-1.15****	**-2.1****		PSI core	Photosystem I subunit C
At1g31330	PsaF		**-0,89***	**-2.05***		PSI core	Photosystem I subunit F
At1g55670	PsaG		**-1.32***	**-1.58****		PSI core	Photosystem I subunit G
At3g16140	PsaH-1		n.v.	n.d.		PSI core	Photosystem I subunit H-1
At1g52230	PsaH-2		**-0.94****	**-2.50****		PSI core	Photosystem I subunit H-2
AtCg00510	PsaI		n.v.	n.d.		PSI core	Photosystem I subunit I
AtCg00630	PsaJ		n.v.	n.q.		PSI core	Photosystem I subunit J
At1g30380	PsaK		**-1.06****	**-1.64****		PSI core	Photosystem I subunit K
At4g12800	PsaL		n.v.	**-1.77****		PSI core	Photosystem I subunit L
At1g08380	Psa0		n.v.	**-1.98****		PSI core	Photosystem I subunit O
At4g02770	PsaD-1		**-0.8****	n.d.		PSI periphical	Photosystem I subunit D-1
At1g03130	PsaD-2		**-0.86****	**-1.92****		PSI periphical	Photosystem I subunit D-2
At4g28750	PsaE-1		**-0.76****	**-2.01****		PSI periphical	Photosystem I subunit E-1
At2g20260	PsaE-2		n.v.	**-1.00****		PSI periphical	Photosystem I subunit E-2
At5g64040	PsaN		**-0.86****	**-2.13****		PSI peripheral	Photosystem I subunit N
At2g46820	PsaP		n.v.	n.v.		PSI peripheral	Photosystem I subunit P
At3g54890	Lhca-1		**-0.30***	**-0.41***		PSI antenna	Photosystem I light harvesting complex gene 1
At3g61470	Lhca-2		**-0.71****	**-1.00****		PSI antenna	Photosystem I light harvesting complex gene 2
At1g61520	Lhca-3		**-0.53****	**-1.13****		PSI antenna	Photosystem I light harvesting complex gene 3
At3g47470	Lhca-4		n.v.	**-0.49****		PSI antenna	Photosystem I light harvesting complex gene 4
At1g45474	Lhca-5		n.v.	**-2.02***		PSI antenna	Photosystem I light harvesting complex gene 5
At1g19150	Lhca-6		**+0.29***	n.v.		PSI antenna	Photosystem I light harvesting complex gene 6
At2g44860	PSA2		n.q.	n.d.		PSI chaperon	Photosystem I assemby 2
At3g55250	PSA3		n.v.	n.v.		PSI chaperon	Photosystem I assemby 3
AtCg00360	Ycf3		n.q.	**+0.27***		PSI chaperon	Hypothetical chloroplast open reading frame 3
AtCg00520	Ycf4		n.v.	n.q.		PSI chaperon	Hypothetical chloroplast open reading frame 4
At1g22700	PYG7		**+0.54****	**+0.49***		PSI chaperon	Pale yellow green 7
At5g44650	Y3IP1		n.v.	**-0.35****		PSI chaperon	YCF3-interacting protein 1
At4g15510	PPD1		**+0.43***	n.v.		PSI chaperon	PsbP domain protein 1

n.q.: not quantifiable, n.v.: no variation, n.d.: not detected

Table 3. NFU2 interacting chloroplastic proteins identified by Co-IP.

Gene ID	moy_intensity *Pro35S: NFU3 GFP*	moy_intensity *Pro35S:NFU2:GFP*	Number of peptides	log(FC)	Symbols	Protein name	function	localisation	Fe-S cluster type
AT5G53460	16.18	19.96	3	3.78	GLT1	NADH-dependent glutamate synthase 1	glutamate biosynthtetic process	chloroplast stroma	3Fe-4S
AT5G04140	19.33	21.03	4	1.70	GLU1, GLS1, GLUS, FD-GOGA	glutamate synthase 1	glutamate biosynthetic process	chloroplast/mitochondrion	3Fe-4S
AT4G34350	n.q.	21.63	4	absent	ISPH	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reducta	chlorophyll and carotenoid biosynthe	chloroplast	4Fe-4S
AT5G60600	n.q.	20.76	2	absent	ISPG	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate syntha	chlorophyll and carotenoid biosynthe	chloroplast	4Fe-4S
AT4G27440	20.26	24.08	5	3.82	PORB	protochlorophyllide oxidoreductase B	chloroplyll biosynthesis	chloroplast	none
AT5G30510	18.55	21.81	5	3.26	RPS1, ARRPS1	ribosomal protein S1	plastid translation machinery	chloroplast	none
AT4G13670	18.41	21.42	2	3.01	PTAC5	plastid transcriptionally active 5	chloroplast developement	chloroplast	none
AT3G62030	21.14	23.69	5	2.56	ROC4	rotamase CYP 4	PSII stability and repair	chloroplast stroma	none
AT2G04030	20.44	22.85	6	2.41	CR88, Hsp88.1, AtHsp90.5	Chaperone protein htpG family protein	protein import	chloroplast stroma	none
AT3G12780	24.55	26.76	21	2.21	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	TCA cycle	chloroplast stroma	none
AT4G20360	24.25	26.33	19	2.08	ATRAB8D, ATRABE1B, RABE1	RAB GTPase homolog E1B	unknown	chloroplast	none
AT5G52920	18.83	20.81	3	1.98	PKP1, PKP-BETA1, PKP2	plastidic pyruvate kinase beta subunit 1	fatty acid biosynhtesis	chloroplast	none
AT3G14415	21.40	23.34	9	1.94	GOX2	Glyoxylate oxydase	photorespiration	peroxisome	none
ATCG00720	19.21	21.01	2	1.80	PETB	photosynthetic electron transfer B	cytochrome b6f	chloroplast thylakoid	none
AT3G52150	19.36	20.95	2	1.59	PSRP2	PLASTID-SPECIfiC RIBOSOMAL PROTEIN 2	plastid translation machinery	chloroplast	none
AT2G39730	24.41	25.97	13	1.55	RCA	rubisco activase	carbon assimilation	chloroplast	none
AT2G38540	19.96	21.41	2	1.45	LP1, LTP1, ATLTP1	lipid transfer protein 1	pathogen response	chloroplast thylakoid, cell wall	none
AT3G50820	19.28	20.69	7	1.42	PSBO2, PSBO-2, OEC33	photosystem II subunit O-2	PSII	chloroplast	none
AT4G21280	21.43	22.83	5	1.40	PSBQ, PSBQA, PSBQ-1	photosystem II subunit QA	PSII	chloroplast	none
AT4G10340	22.85	24.21	5	1.36	LHCB5	light harvesting complex of photosystem II 5	PSII	chloroplast	none
AT4G27090	19.15	20.34	2	1.19		Ribosomal protein L14	plastid translation machinery	chloroplast	none
AT5G45390	21.62	22.31	2	0.69	CLPP4, NCLPP4	CLP protease P4	protein quality control	chloroplast	none
AT4G30620	n.q.	19.04	2	absent	STCL	STIC2 like	protein import	chloroplast	none
AT2G27820	n.q.	19.34	2	absent	PD1, ADT3	prephenate dehydratase 1	Phe and Tyr synthesis	chloroplast	none
AT5G45930	n.q.	21.46	5	absent	CHLI2, CHL I2, CHLI-2	magnesium chelatase i2	chloroplyll biosynthesis	chloroplast	none
AT5G67030	n.q.	17.08	2	absent	ABA1, AtZEP	zeaxanthin epoxidase	ABA biosynthesis	chloroplast	none

n.q.: not quantifyed

Table 4. Overview of interactions assayed by BiFC experiments using NFU-YFP constructions

	NFU1	NFU2	NFU3
ATASE1	●	●	●
ATASE2	●	●	●
DHAD	●	●	●
Dwarf27	●	●	●
FTR*	●	●	●
IPMI	●	●	●
ISPG	●	●	●
ISPH	●	●	●
LIPp	●	●	●
NDHi	●	●	●
PAO	●	●	●

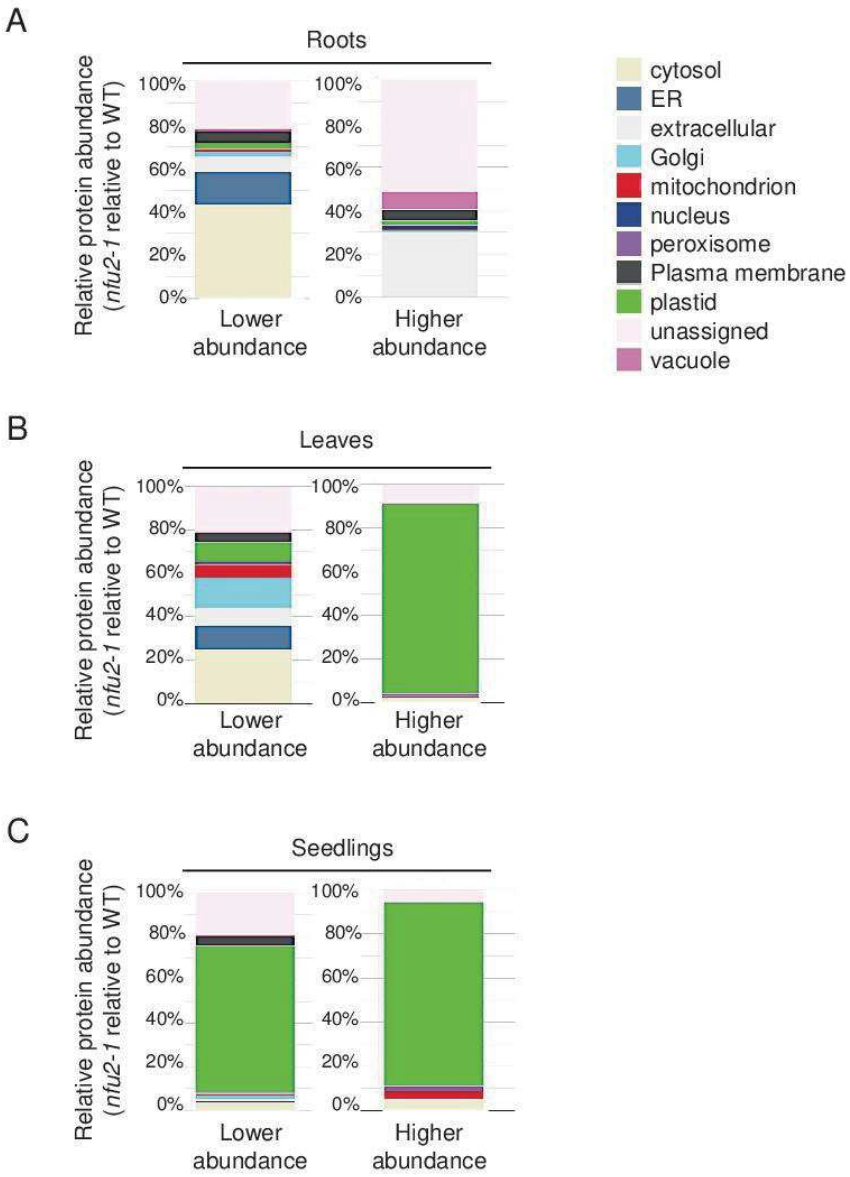

A
Roots
Relative protein abundance (nfu2-1 relative to WT)
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Lower abundance
Higher abundance
cytosol
ER
extracellular
Golgi
mitochondrion
nucleus
peroxisome
Plasma membrane
plastid
unassigned
vacuole
B
Leaves
C
Seedlings

Figure 1

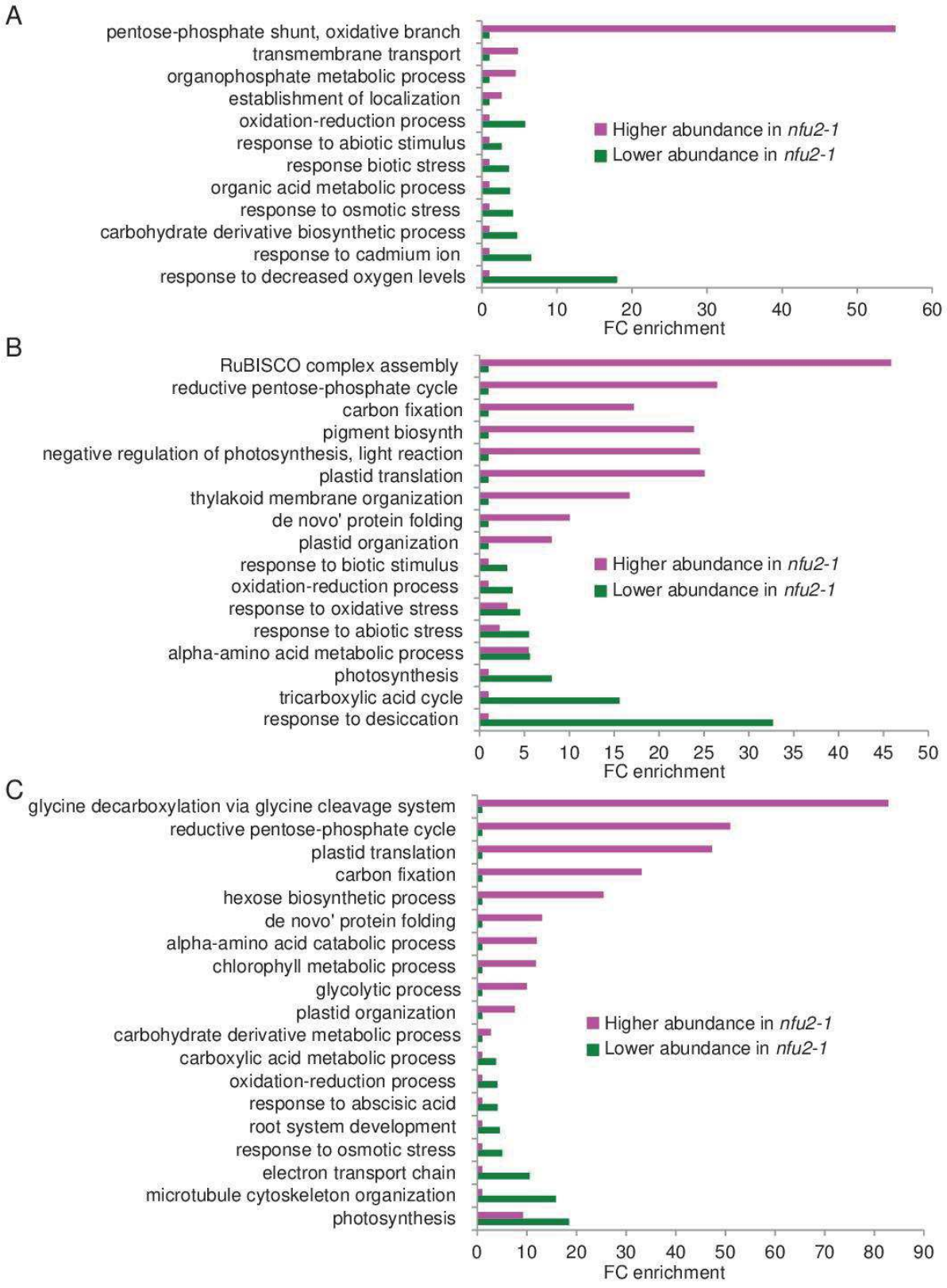

A
pentose-phosphate shunt, oxidative branch
transmembrane transport
organophosphate metabolic process
establishment of localization
oxidation-reduction process
response to abiotic stimulus
response biotic stress
organic acid metabolic process
response to osmotic stress
carbohydrate derivative biosynthetic process
response to cadmium ion
response to decreased oxygen levels
Higher abundance in nfu2-1
Lower abundance in nfu2-1
0 10 20 30 40 50 60
FC enrichment
B
RuBISCO complex assembly
reductive pentose-phosphate cycle
carbon fixation
pigment biosynth
negative regulation of photosynthesis, light reaction
plastid translation
thylakoid membrane organization
de novo' protein folding
plastid organization
response to biotic stimulus
oxidation-reduction process
response to oxidative stress
response to abiotic stress
alpha-amino acid metabolic process
photosynthesis
tricarboxylic acid cycle
response to desiccation
Higher abundance in nfu2-1
Lower abundance in nfu2-1
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
FC enrichment
C
glycine decarboxylation via glycine cleavage system
reductive pentose-phosphate cycle
plastid translation
carbon fixation
hexose biosynthetic process
de novo' protein folding
alpha-amino acid catabolic process
chlorophyll metabolic process
glycolytic process
plastid organization
carbohydrate derivative metabolic process
carboxylic acid metabolic process
oxidation-reduction process
response to abscisic acid
root system development
response to osmotic stress
electron transport chain
microtubule cytoskeleton organization
photosynthesis
Higher abundance in nfu2-1
Lower abundance in nfu2-1
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
FC enrichment

Figure 2

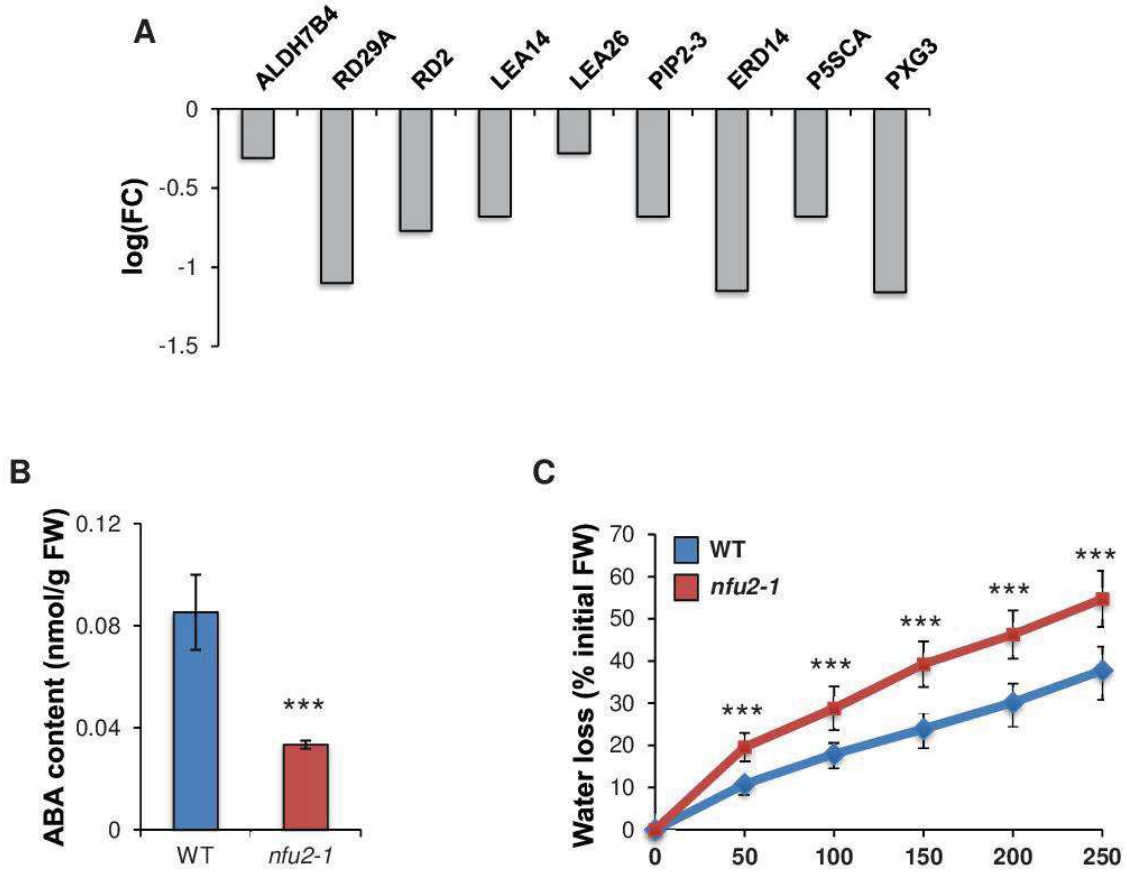

A
ALDH7B4
RD29A
RD2
LEA14
LEA26
PIP2-3
ERD14
P5SCA
PXG3
log(FC)
0
-0.5
-1
-1.5
B
ABA content (nmol/g FW)
0.12
0.08
0.04
0
***
WT
nfu2-1
C
Water loss (% initial FW)
70
60
50
40
30
20
10
0
WT
nfu2-1
***
***
***
***
***
0
50
100
150
200
250

Figure 3

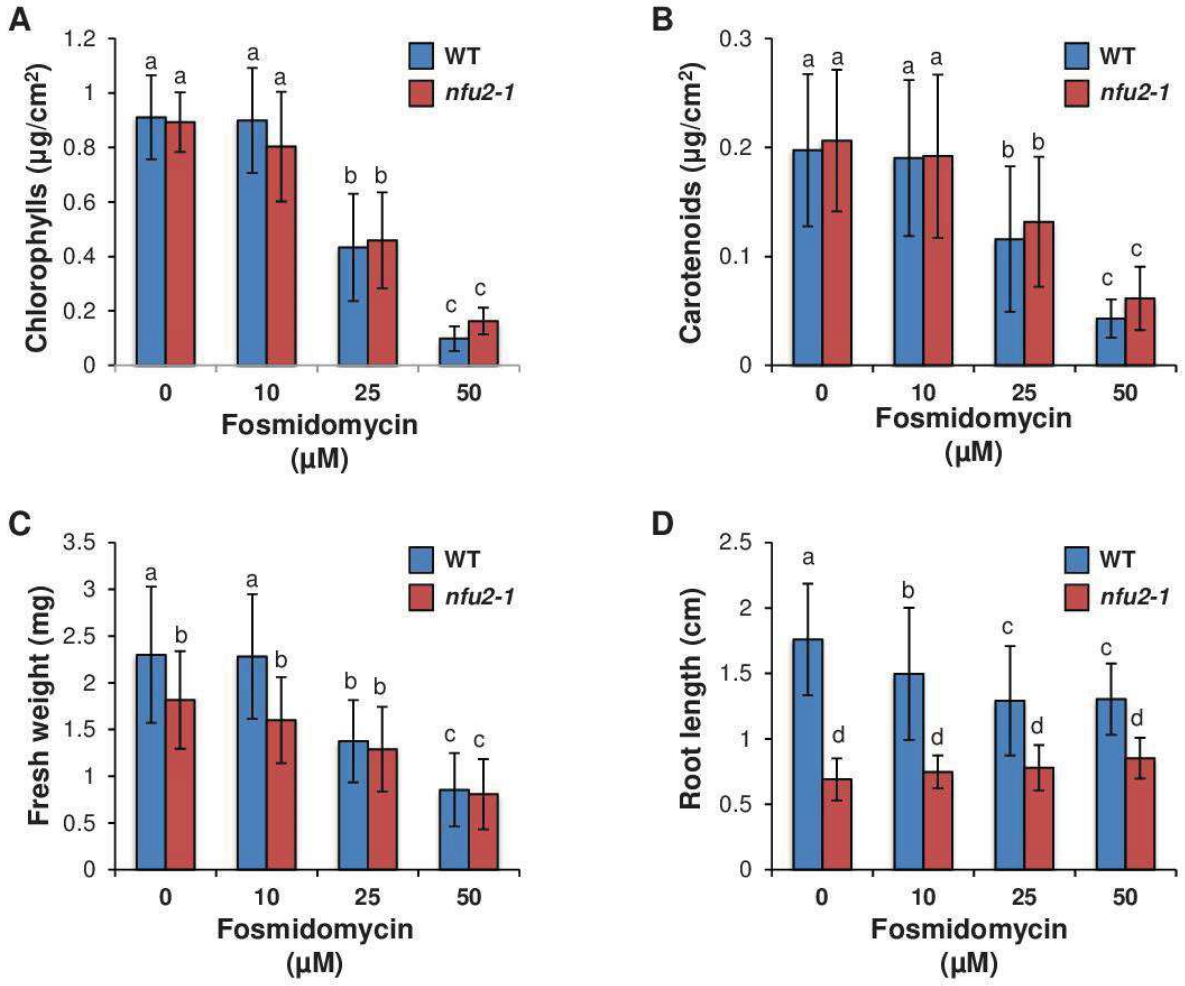

A
Chlorophylls (µg/cm²)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
a a
a a
b b
c c
0
10
25
50
Fosmidomycin (µM)
WT
nfu2-1
B
Carotenoids (µg/cm²)
0.3
0.2
0.1
0
a a
a a
b b
c c
0
10
25
50
Fosmidomycin (µM)
WT
nfu2-1
C
Fresh weight (mg)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
a b
a b
b b
c c
0
10
25
50
Fosmidomycin (µM)
WT
nfu2-1
D
Root length (cm)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
a d
b d
c d
c d
0
10
25
50
Fosmidomycin (µM)
WT
nfu2-1

Figure 4

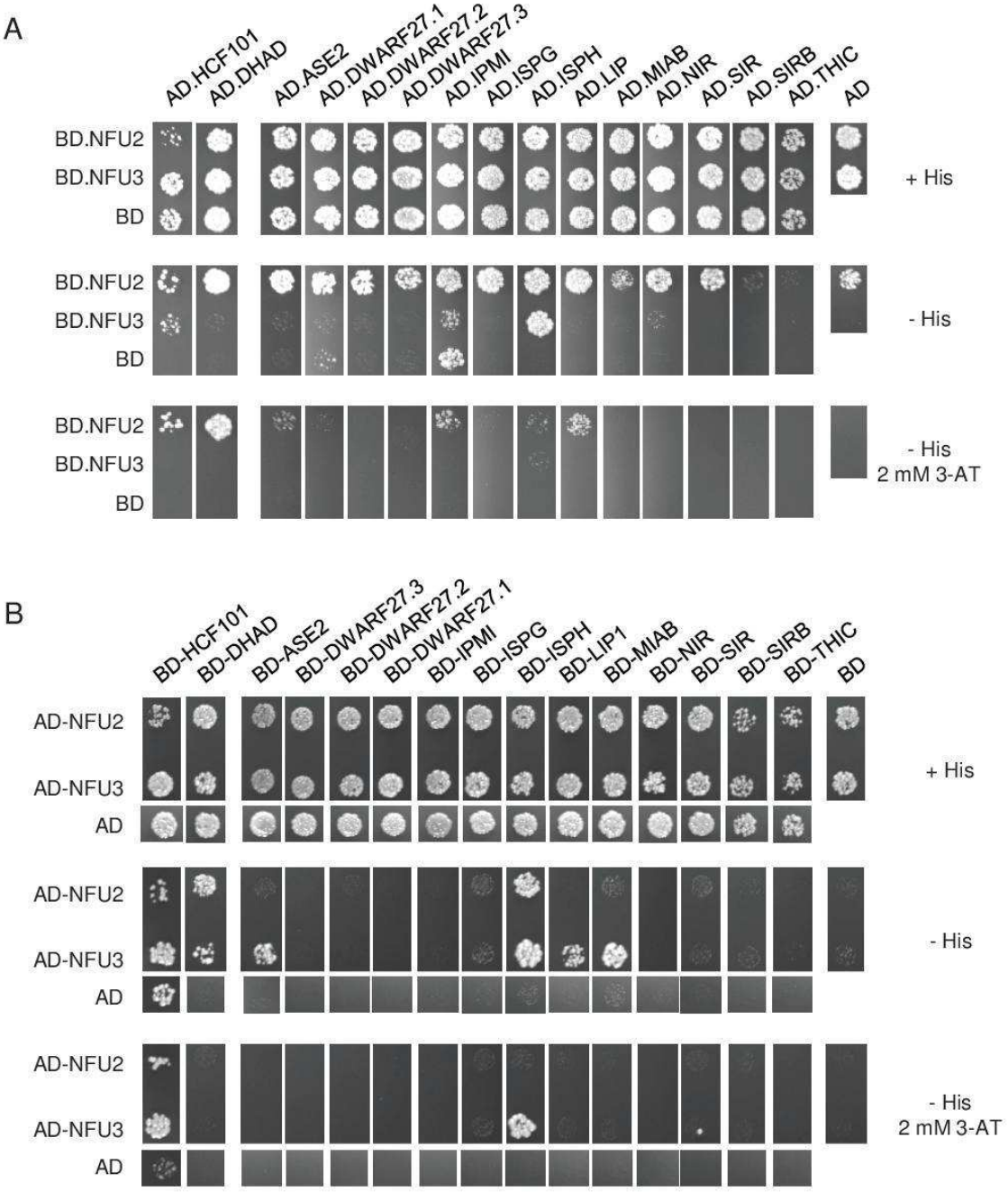

A
AD.HCF101
AD.DHAD
AD.ASE2
AD.DWARF27.1
AD.DWARF27.2
AD.DWARF27.3
AD.IPMI
AD.ISPG
AD.ISPH
AD.LIP
AD.MIAB
AD.NIR
AD.SIR
AD.SIRB
AD.THIC
AD
BD.NFU2
BD.NFU3
BD
+ His
- His
- His
2 mM 3-AT
B
BD-HCF101
BD-DHAD
BD-ASE2
BD-DWARF27.3
BD-DWARF27.2
BD-DWARF27.1
BD-IPMI
BD-ISPG
BD-ISPH
BD-LIP1
BD-MIAB
BD-NIR
BD-SIR
BD-SIRB
BD-THIC
BD
AD-NFU2
AD-NFU3
AD
+ His
- His
- His
2 mM 3-AT

Figure 5

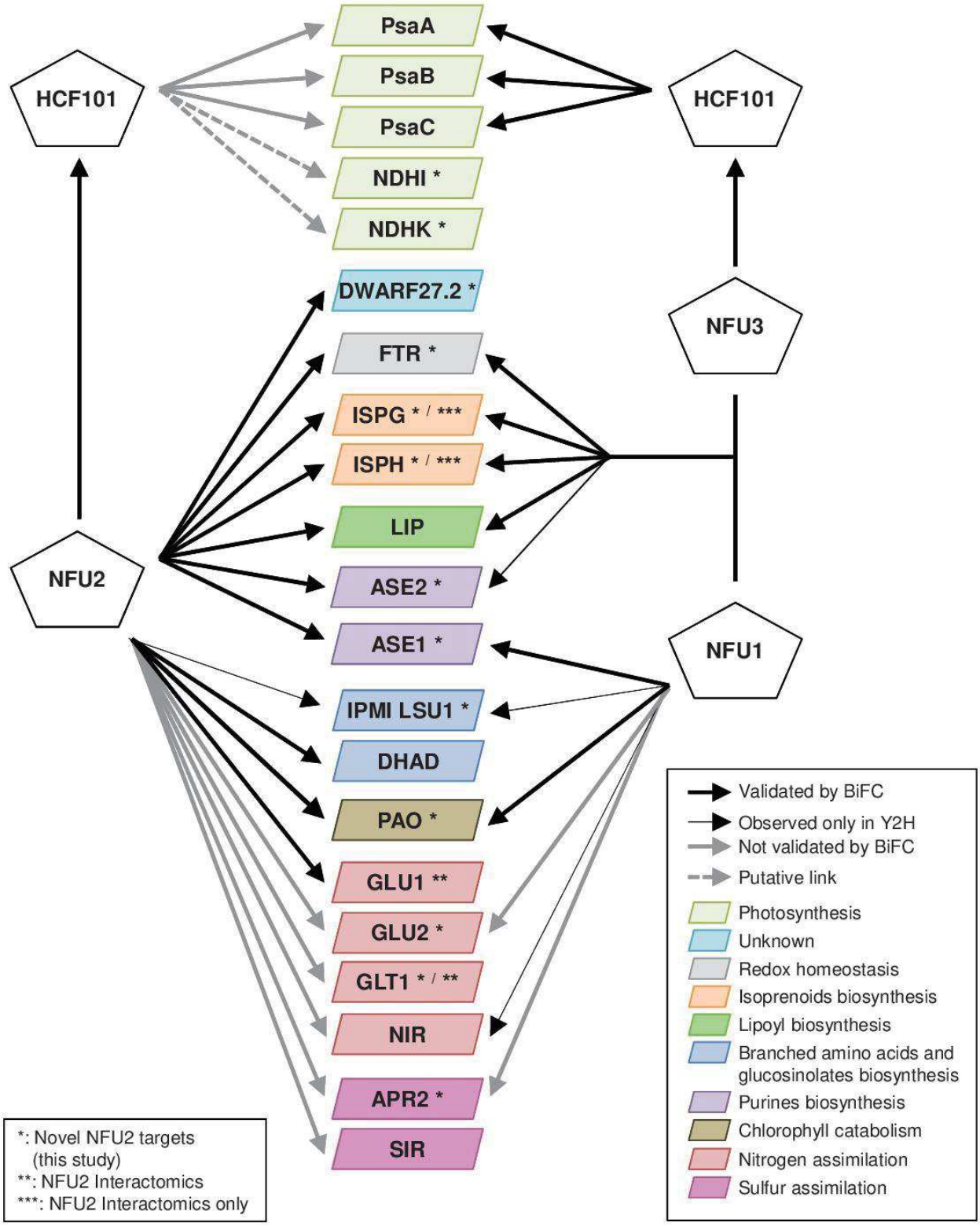

HCF101
HCF101
NFU3
NFU2
NFU1
PsaA
PsaB
PsaC
NDHI *
NDHK *
DWARF27.2 *
FTR *
ISPG * / ***
ISPH * / ***
LIP
ASE2 *
ASE1 *
IPMI LSU1 *
DHAD
PAO *
GLU1 **
GLU2 *
GLT1 * / **
NIR
APR2 *
SIR
*: Novel NFU2 targets (this study)
**: NFU2 Interactomics
***: NFU2 Interactomics only
Validated by BiFC
Observed only in Y2H
Not validated by BiFC
Putative link
Photosynthesis
Unknown
Redox homeostasis
Isoprenoids biosynthesis
Lipoyl biosynthesis
Branched amino acids and glucosinolates biosynthesis
Purines biosynthesis
Chlorophyll catabolism
Nitrogen assimilation
Sulfur assimilation

Figure 6

Chapitre 2 : Caractérisation des protéines IBA57.2 et SUFA1 d'*Arabidopsis thaliana*

Chez les eucaryotes, il existe 3 machineries d'assemblage de centres Fe-S différentes parmi lesquelles les machineries ISC et SUF partagent l'ensemble des familles géniques codant pour les protéines de transfert. La conversion de centres [2Fe-2S] en centres [4Fe-4S] au sein de la machinerie ISC se fait en principe lors de l'échange de centres Fe-S entre GRXS15 et les protéines ISCA en association à la protéine IBA57. Ensuite, le centre [4Fe-4S] est *a priori* transféré vers les protéines NFU. Certains mécanismes moléculaires impliqués au cours de ces étapes n'ont pas été clairement résolus, tout particulièrement chez les eucaryotes photosynthétiques. Par ailleurs, des orthologues sont présents au sein du chloroplaste, alors que dans ce compartiment le complexe d'échafaudage $SUFBC_2D$ permettrait directement l'assemblage de centres [4Fe-4S], posant la question du rôle de telles protéines dans ce compartiment. Dans ce cadre, les objectifs étaient (i) de comprendre les différences et similarités entre protéines chloroplastiques et mitochondriales, (ii) de valider les interactions entre les protéines SUFA1, IBA57.2 et NFU1 dans un contexte cellulaire, (iii) de rechercher des partenaires pour les protéines chloroplastiques SUFA1 et IBA57.2 par double hybride binaire en levure, et (iv) de réaliser la caractérisation biochimique des protéines SUFA1 et IBA57.2.

1. Etude des interactions entre SUFA1, IBA57.2 et NFU1 par complémentation de fluorescence bimoléculaire en protoplastes d'*A. thaliana*

Des résultats de double hybride en levure avaient montré la possibilité pour SUFA1 de former des homocomplexes, en principe des homodimères. Leur existence a été vérifiée *in planta* par des expériences de BiFC. Les résultats montrent un signal YFP qui co-localise avec l'autofluorescence de la chlorophylle et confirment ainsi cette interaction (figure 19). Les interactions SUFA1-SUFA1 observées en Y2H et BiFC ne permettent cependant pas de déterminer si des oligomères de masse plus importante ou des complexes protéiques impliquant SUFA1 sont formés *in cellulo* comme cela a été suggéré par des analyses biochimiques qui montraient que SUFA1 n'existe pas sous forme monomérique mais forme plutôt des homodimères voire des homocomplexes plus importants (Abdel-Ghany et al., 2005; Yabe et Nakai, 2006).

La formation de dimères a également été testée par cette technique pour IBA57.2 et NFU1, dont l'existence était suggérée par des résultats obtenus pour l'orthologue bactérien d'IBA57, YgfZ, et le paralogue d'*A. thaliana* NFU2 (Gao et al., 2013; Teplyakov et al., 2004). Sur la base de l'analyse de la structure cristallographique de l'isoforme d'*E. coli*, il a été proposé que le dimère covalent détecté, impliquant la cystéine strictement conservée des protéines IBA57, ne correspond pas à une forme fonctionnelle de la protéine (Teplyakov et al., 2004). La co-expression de fusions d'IBA57.2 avec la région N- et C-terminale de la YFP permet la détection d'une fluorescence au sein du chloroplaste, ce qui suggère la formation d'un dimère *in planta* dont la relevance fonctionnelle reste à explorer. La dimérisation de NFU1 observée par BiFC a été présentée dans le chapitre précédent.

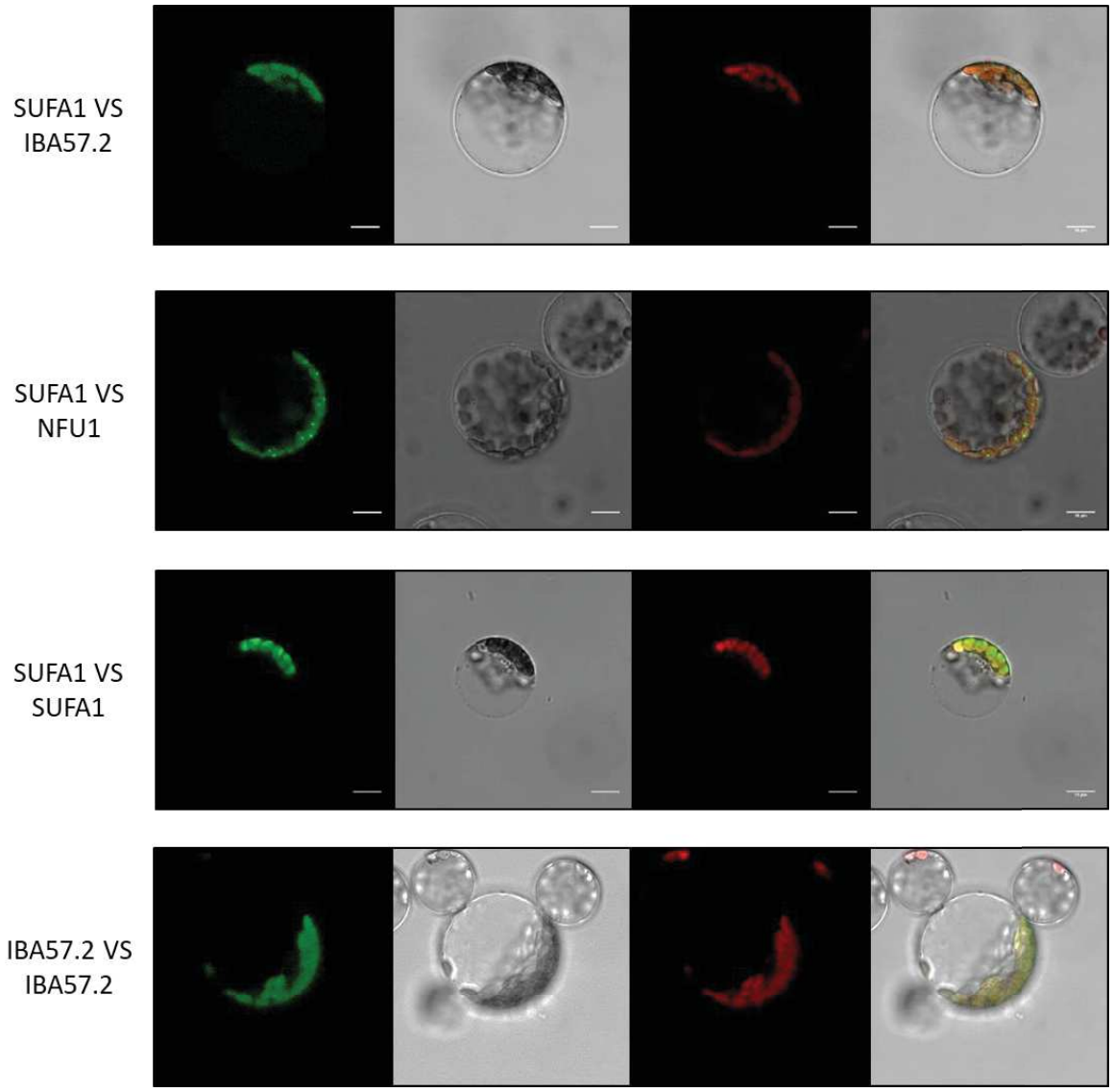


Figure 19: Expériences de BiFC impliquant les protéines de transfert IBA57.2, NFU1 et SUFA1 d'*A. thaliana*. Des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* sont co-transformés transitoirement avec les constructions codant pour les protéines IBA57.2, NFU1 ou SUFA1 fusionnées à la région N- ou C-terminale de la YFP. Des images de microscopie confocale représentatives de plusieurs observations sont présentées. De gauche à droite, ces images correspondent au signal YFP (en vert), au signal en transmission, à l'autofluorescence de la chlorophylle (en rouge) et à la superposition des trois images. La barre d'échelle correspond à 10 µm.

Les expériences de double hybride en levure réalisées au sein de l'équipe indiquaient également l'interaction de SUFA1 avec NFU1 et IBA57.2. J'ai validé ces interactions *in planta* par BiFC (Figure 19). L'interaction entre SUFA1 et IBA57 était attendue sur la base des données d'interaction pour les orthologues mitochondriaux (Beilschmidt et al., 2017; Gelling et al., 2008). De plus, de manière assez similaire à la co-occurrence génomique décrite pour les gènes/protéines BOLA et GRX de classe II (Couturier et al., 2009), les gènes et protéines SUFA1 et IBA57.2 seraient évolutivement liés. En effet, une analyse de génomique comparative a montré qu'IBA57 n'existe pas chez les organismes dépourvus de protéines ATC (Waller et al., 2010).

Outre le signal chloroplastique diffus habituel, des points de fluorescence plus intenses sont visibles dans le cas de l'interaction SUFA1-NFU1. Un profil similaire a

déjà été observé pour SUFA1 seule (Abdel-Ghany et al., 2005) et pour l'interaction NFU3-HCF101, et il serait dû à une accumulation excessive de complexes qui provoque une déformation de la membrane chloroplastique (Touraine et al., 2019). L'interaction entre SUFA1 et NFU1 était également attendue car elle est retrouvée chez les procaryotes et dans les mitochondries des eucaryotes, bien que ces protéines interagissent entre elles selon un mécanisme moléculaire différent. L'isoforme NfuA d'*E. coli* peut en effet transférer un centre Fe-S à SufA (Py et al., 2012). A l'inverse, l'étude de mutants de délétion pour ces protéines chez l'homme et la levure suggère un rôle de la protéine NFU1 en aval des protéines ISCA (Melber et al., 2016; Navarro-Sastre et al., 2011; Sheftel et al., 2012). Différentes études ont ainsi montré l'interaction entre protéines ISCA et NFU dans la mitochondrie sans qu'aucune expérience de transfert ne soit répertoriée (Beilschmidt et al., 2017; Melber et al., 2016; Przybyla-Toscano, 2017).

2. Caractérisation biochimique des protéines IBA57.2 et SUFA1 seules ou en complexe

2.1. Etude des protéines IBA57.2 et SUFA1

Dans le but final de caractériser les mécanismes moléculaires associés à la formation du complexe IBA57.2-SUFA1, chacune des protéines a été dans un premier temps produite sous forme recombinante dans *E. coli* sans ou avec une étiquette polyhistidine (6his). La pureté des deux versions d'IBA57.2 et SUFA1 est présentée en figure 20. Pour IBA57.2, un variant où la cystéine conservée (en position 330S) est substituée par une sérine a été aussi purifié (figure 20). Les protéines ont été purifiées en conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose.

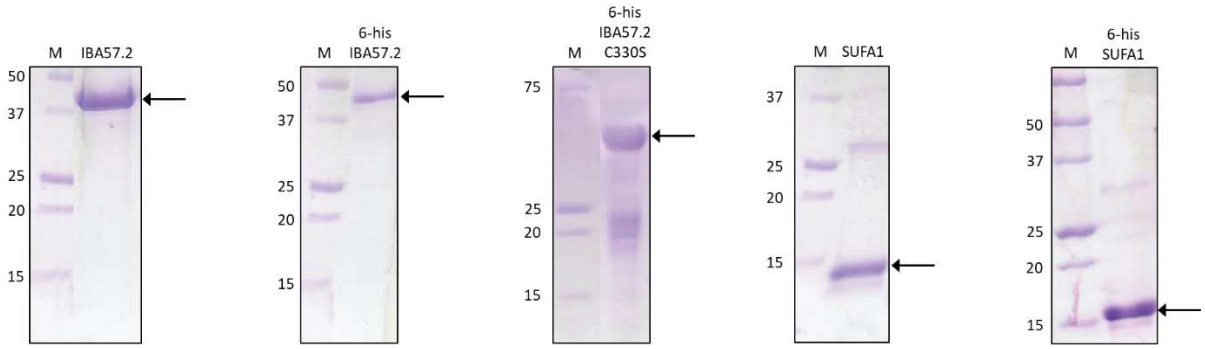


Figure 20: Analyse sur gel dénaturant réducteur des protéines IBA57.2 et SUFA1 purifiées. Les protéines IBA57.2 (± 6his) et SUFA1 (± 6his) ont été respectivement exprimées à partir de plasmides pET28a dans une souche *E. coli* Rosetta 2 et de plasmides pET3d et pET15b dans la souche *E. coli* BL21(DE3). Après purification selon les étapes présentées dans la section 1 du chapitre 2 du matériel et méthodes, environ 10 µg de protéine sont déposés sur gel dénaturant et réducteur à 15% d'acrylamide pour vérifier leur pureté. Le marqueur de masse moléculaire (M) est indiqué en kDa.

Après purification anaérobie, la préparation contenant SUFA1 est rouge-orangée pâle et plusieurs épaulements peu marqués sont présents sur le spectre d'absorption UV-visible de la protéine, à des longueurs d'ondes situées entre 320 et 600 nm (figure 21A). Ce signal indique que SUFA1 serait seulement partiellement sous holoforme après production en système bactérien d'*E. coli*, soit parce que le système de maturation de la bactérie ne permet pas une maturation complète de SUFA1, soit parce que le centre Fe-S présent sur SUFA1 est très labile. La coloration disparaissait généralement après 3h d'incubation avec de l'EDTA en aérobie, mais un signal à 320 nm persistait au niveau du spectre d'absorption UV-visible de SUFA1 (Figure 21A).

L'analyse de cette apoforme par filtration sur gel montrait l'existence de plusieurs pics distincts et d'un état d'oligomérisation qui n'était pas homogène. L'ajout de DTT pour réduire SUFA1 modifiait nettement le profil d'élution vers des formes de plus petites masses moléculaires mais ne le rendait pas plus homogène (figure 21B). Un épaulement similaire à 320 nm avait été également observé pour l'apoforme de ^{NIF}ISCA et il a été proposé que cela corresponde à la présence de polysulfures, éventuellement réductibles par un excès de phosphines (Mapolelo et al., 2012a).

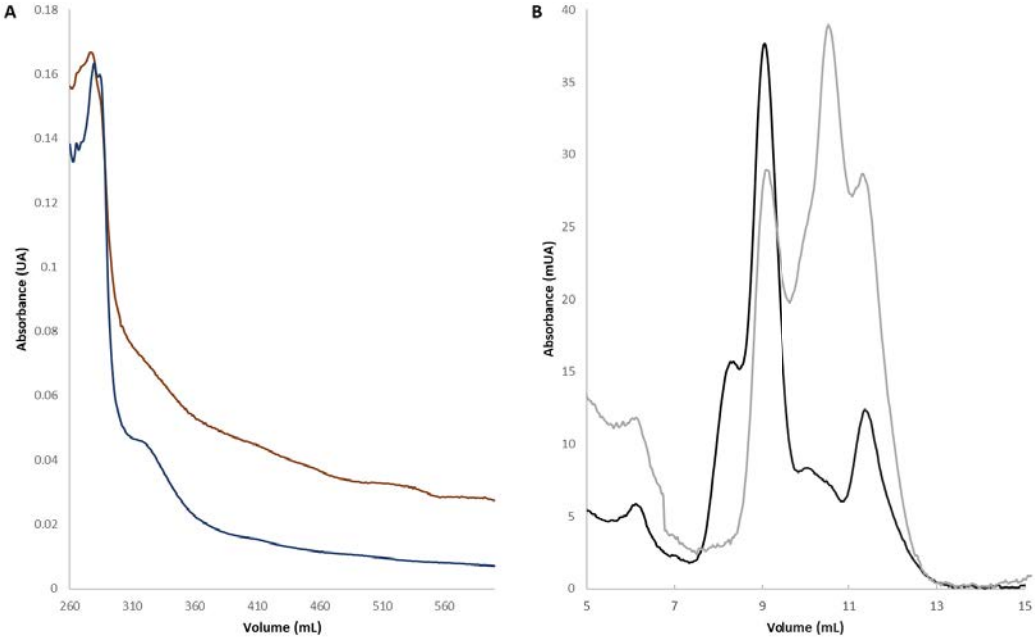


Figure 21 : Analyses biochimiques de la protéine SUFA1-6his. A : Spectres d'absorption UV-visible de la protéine après purification en anaérobie (brun) puis après 3 h d'incubation en présence d'un excès 80 x de chélateur de métal, ici l'EDTA, en aérobie (bleu). B : Détermination de l'état d'oligomérisation de la protéine par gel filtration sur colonne S75 10/300 équilibrée avec un tampon Tris-HCl 30mM pH 8.0, NaCl 200 mM (en noir), ou un tampon Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM, DTT 5 mM (en gris).

Par la suite, la protéine étiquetée a été produite dans une souche *E. coli* BL21 (DE3) exprimant l'opéron ISC d'*E. coli* et la SAM synthase via le plasmide pCDF DUET ISC-SAM puis purifiée en anaérobie et incubée en présence d'EDTA et réduite de manière extensive (sur la nuit) à l'aide de TCEP. L'analyse du spectre d'absorption UV-visible de la protéine montre que l'épaulement à 320 nm est réduit mais pas complètement absent (figure 22B). Le profil d'élution d'apo-SUFA1 ainsi préparée présentait 2 pics distincts. Un pic majoritaire élué à un volume de 15,17 mL et un second pic élué à 16,61 mL, correspondant à une masse moléculaire apparente de 35 kDa et de 16 kDa respectivement (figure 22A). Puisque sa masse théorique est de 14 kDa, SUFA1 serait ainsi présente sous forme d'un équilibre monomère-dimère avec une majorité de cette dernière forme. Cette forme a ainsi été utilisée pour des expériences de reconstitution enzymatique de centre Fe-S. Le spectre d'absorption UV-visible d'holo-SUFA1 présente des pics additionnels à 330 et 420 nm, ainsi que des épaulements à 520 et 620 nm (figure 22B) qui suggèrent la formation de centres Fe-S atypiques de type [3Fe-4S] linéaires (Kennedy et al., 1984; Zhang et al., 2013) et/ou d'atomes de fer liés à la protéine en plus de la présence d'un centre [4Fe-4S]. Des quantités de 0,35 ± 0,01 atomes de fer pour 0,25 ± 0,02 atomes de soufre sont mesurées par monomère de SUFA1. Les expériences de filtration sur gel indiquent que l'holoprotéine est majoritairement éluée à un volume de 14,43 mL soit une masse apparente de 52 kDa (figure 22A) qui correspondrait à un tétramère. D'après ces

données, il est difficile de déterminer la nature du centre Fe-S incorporé. Le spectre d'absorption UV-visible indiquerait plutôt un centre [4Fe-4S], cependant les quantités de fer et de soufre présentes dans le tétramère ne correspondraient qu'à environ 25% de reconstitution s'il s'agit d'un centre [4Fe-4S] (50% dans le cas d'un centre [2Fe-2S]). Ces résultats ne concordent pas avec les données existantes sur SUFA1, qui indiquent que l'apo-protéine était purifiée sous forme tétramérique pour partie convertie en une forme dimérique par réduction, et que la protéine lie un centre [2Fe-2S] au sein d'un dimère (Abdel-Ghany et al., 2005; Yabe et Nakai, 2006). De même, la protéine SufA d'*E. coli* lie un centre [2Fe-2S] (Gupta et al., 2009). Une différence importante entre les études menées sur SUFA1 est que les précédents travaux ont été réalisés avec des tampons ne contenant pas ou peu de NaCl alors que les expériences présentées ici sont réalisées en présence de 200 mM de NaCl (Abdel-Ghany et al., 2005; Yabe et Nakai, 2006). En raison d'une reconstitution incomplète de la protéine ou des conditions utilisées, il est possible que la protéine forme des tétramères mais que des centres Fe-S soient liées au sein d'un dimère comme cela a été montré pour des isoformes bactériennes d'IscA (Cupp-Vickery et al., 2004b; Morimoto et al., 2006). Une autre possibilité est que, comme d'autres protéines ATC, SUFA1 soit capable d'incorporer des centres [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] (Brancaccio et al., 2014; Ollagnier de Choudens et al., 2004, 2003), et que les résultats obtenus ici correspondent à un mélange de différentes holoformes de SUFA1. Concernant la possibilité de lier du fer, cela a été documenté pour de nombreuses protéines ISCA issues d'organismes différents (Lu et al., 2010; Mapolelo et al., 2012b; Wang et al., 2010). L'utilisation de techniques de spectroscopie adaptées (EPR et Mössbauer) s'avèreront indispensables pour la caractérisation de cette protéine. Il est également question, comme cela a été fait pour SufA d'*E. coli* de produire la protéine dans une souche exprimant les autres protéines de la machinerie SUF (Gupta et al., 2009).

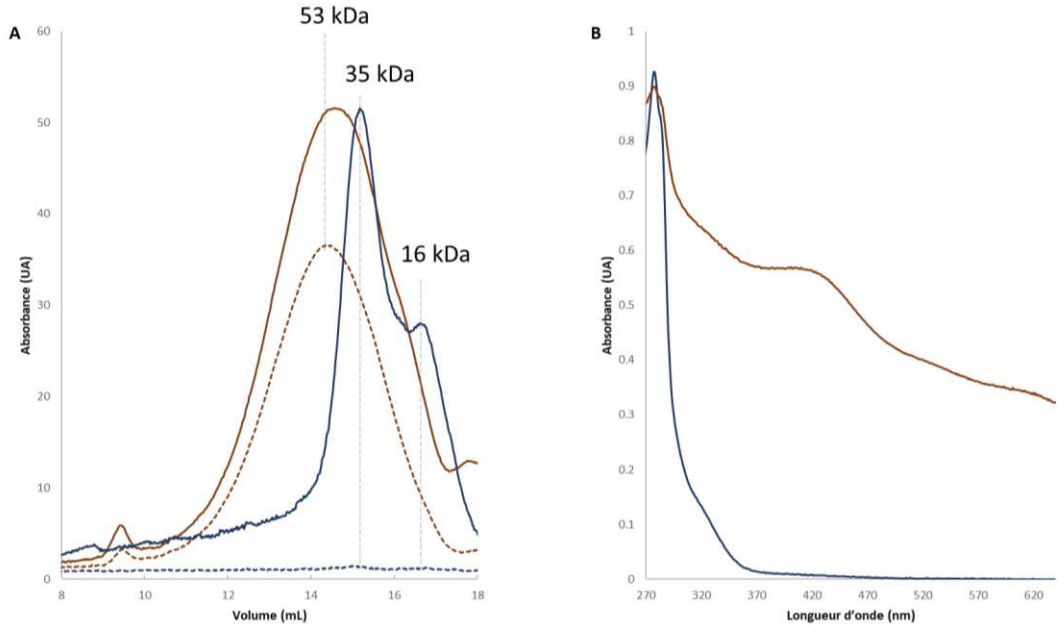


Figure 22: Reconstitution enzymatique d'apo-SUFA1-6his après réduction au TCEP. En A, la protéine sous apoforme (en bleu) et holoforme (en brun) sont analysées par gel filtration pour en déterminer l'état d'oligomérisation. En B, les spectres d'absorption UV-visible d'apo-SUFA1 (en bleu) et holo-SUFA1 (en brun). Pour l'analyse par gel filtration, les protéines sont déposées sur colonne S200 10/300 équilibrée en Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM et les absorbances sont enregistrées à 280 nm (ligne continue) et 420 nm (ligne pointillée).

Les mêmes expériences ont été réalisées sur IBA57.2. Lors d'expérience de filtration sur gel, la protéine est séparée dans deux pics, l'un majoritaire à 80,62 mL et correspondant à une masse apparente de 45 kDa, et le second à 69,57 mL qui correspond à une masse apparente de 106 kDa (figure 23). La masse théorique de la protéine étant de 41 kDa, le pic majoritaire correspondrait à la forme monomérique tandis que le pic minoritaire serait un dimère ce qui concorde avec la description de l'homologue d'*E. coli* YgfZ, dont la structure cristallographique indique l'existence d'un dimère covalent, permis par la formation d'un pont disulfure intermoléculaire impliquant la cystéine conservée du motif KGCY/F-x-GQE-xxx-R/K de chaque monomère (Teplyakov et al., 2004). Cette expérience doit être réalisée à nouveau en présence de réducteur et avec le mutant IBA57.2 C330S, afin de déterminer s'il s'agit également d'un dimère covalent articulé autour d'un pont disulfure.

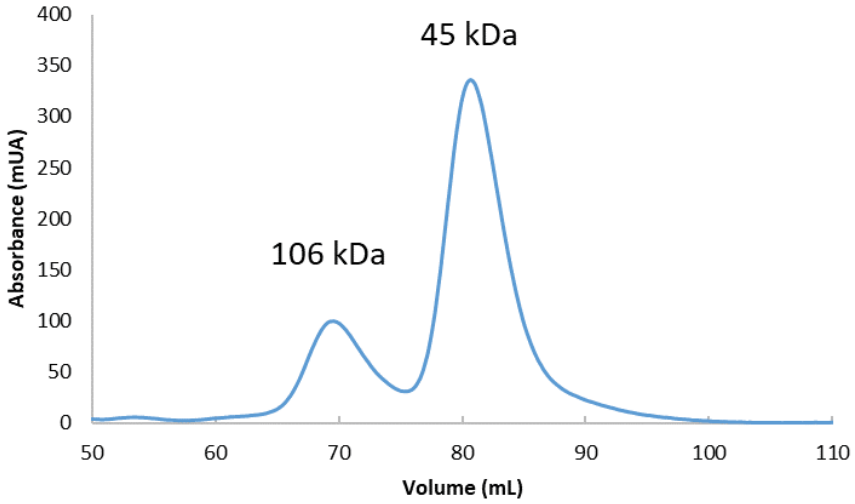


Figure 23: Profil d'élution de la protéine AtIBA57.2-6his sur gel filtration après purification IMAC. Le profil est obtenu par mesure de l'absorbance à 280 nm en sortie de colonne Superdex S200 16/600 équilibrée en tampon Tris-HCl pH 8.0 30 mM, NaCl 200 mM.

Aucun centre Fe-S n'était détecté sur IBA57.2 après purification en anaérobie mais la capacité de la protéine à lier un centre Fe-S a été testée au cours d'expériences de reconstitution enzymatique en absence de DTT. La solution de reconstitution d'IBA57.2 est devenue brunâtre et cette coloration subsistait après séparation des produits excédentaires sur colonne G-25. Des quantités de 5,87 ± 0,09 atomes de fer et 3,84 ± 0,72 atomes de soufre labile par monomère d'IBA57.2 ont été mesurées et le spectre d'absorption UV-visible de la protéine présente des pics d'absorption additionnels à 320 nm et 430 nm (figure 24), indiquant vraisemblablement la présence d'un centre Fe-S. En comparaison, une reconstitution faite avec IBA57.2 C330S indiquait que ce variant fixe seulement 1,00 ± 0,11 atomes de fer et 0,43 ± 0,05 atomes de soufre labile par monomère de protéine, et aucun pic d'absorption particulier n'a été détecté sur le spectre d'absorption UV-visible associé (figure 24).

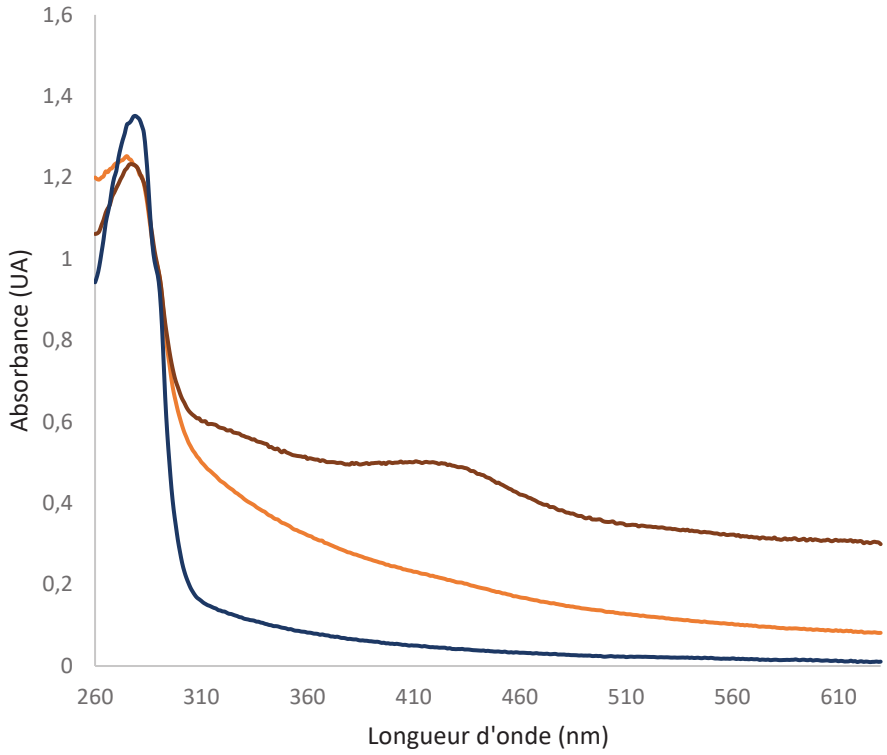


Figure 24: Spectres d'absorption UV-visible des protéines IBA57.2 sauvage et mutante après reconstitution enzymatique *in vitro*. En bleu : l'apoprotéine IBA57.2 C330S préréduite, en orange : la protéine IBA57.2 C330S reconstituée et en brun : holo-IBA57.2.

Ainsi, la capacité d'IBA57.2 à fixer du fer et du soufre labile serait dépendante de la cystéine conservée, déjà identifiée comme étant un résidu nécessaire à la fonction d'YgfZ chez *E. coli* (Hasnain et al., 2012). Forts de ces observations, une collaboration avec l'équipe du Pr Michael Johnson à Athens (USA) a été initiée pour la caractérisation spectroscopique d'holo-IBA57.2. Les données EPR obtenues sur des échantillons d'IBA57.2 reconstitués et oxydés suggèrent plutôt l'existence d'un centre ferrique mononucléaire à spin élevé avec ligature au moins partiellement par des résidus cystéinyls, et non d'un centre Fe-S. Le soufre labile pourrait être également lié par les cystéines (5 au total) présentes dans la protéine. Comme cela avait été suggéré par l'études des mutants de délétion *iba57Δ*, *isa1Δ* et *isa2Δ* qui présentent un phénotype identique chez la levure et l'homme, et par des études visant à montrer leur interaction (Beilschmidt et al., 2017; Gelling et al., 2008; Sheftel et al., 2012), la caractérisation d'un complexe ISCA2-IBA57 liant un centre [2Fe-2S] a été récemment publiée (Gourdoupis et al., 2018). La ligation du centre impliquerait la cystéine conservée d'IBA57 et les 3 cystéines présentes au niveau d'ISCA2. Par analogie, les protéines chloroplastiques IBA57.2 et SUFA1 pourraient également former un complexe liant un centre Fe-S dont la nature reste à déterminer.

2.2. Caractérisation du complexe IBA57.2-SUFA1

La capacité des deux protéines à former un complexe a d'abord été testée par co-expression des deux protéines en système hétérologue, IBA57.2 possède une étiquette histidine au contraire de SUFA1. Les 2 protéines sont globalement peu exprimées. La protéine IBA57.2 est présente dans l'élution, cependant la bande qui correspondrait à SUFA1 et qui devrait être située autour de 15 kDa se distingue à

peine (figure 25A). La présence de SUFA1 a été validée par Western-Blot à l'aide d'anticorps anti-SUFA1 (figure 25B). La nature des protéines présentes dans les 2 bandes n'est pas claire. Il est possible que la protéine IscA ou SufA d'*E. coli* soit également détectée. Bien que cette expérience semble valider la formation d'un complexe stable IBA57.2-SUFA1 *in cellulo*, les quantités obtenues sont négligeables et ne permettent pas la caractérisation biochimique et spectroscopique du complexe.

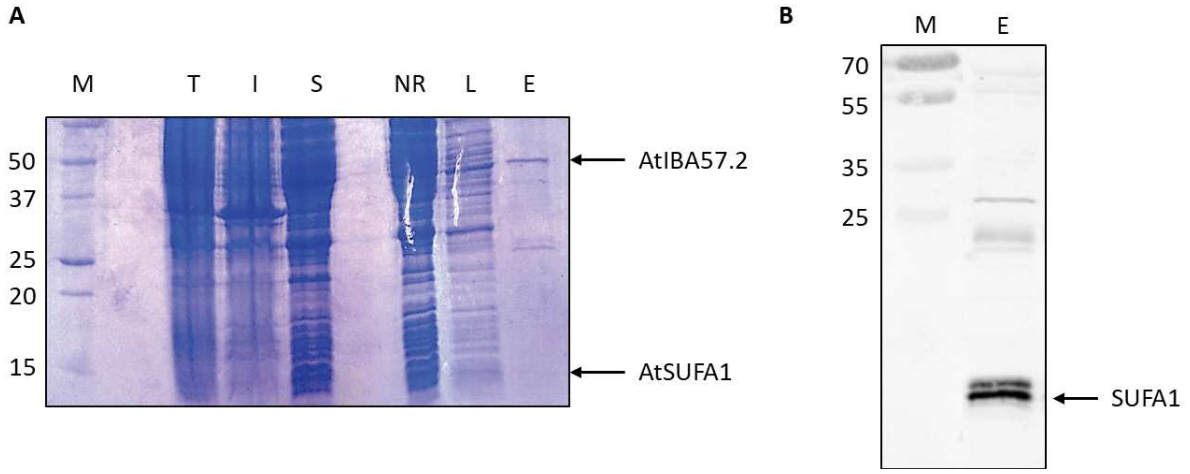


Figure 25: Etude de la formation d'un complexe IBA57.2-SUFA1 par co-expression des protéines recombinantes en système hétérologue *E. coli*. A : Analyse des différentes fractions de purification sur gel dénaturant et réducteur. B : Analyse par Western blot de la fraction d'élution avec un anticoprs anti-SUFA1. La masse des protéines du marqueur de taille (M) est indiquée en kDa. M : marqueur de masse moléculaire, T : fraction totale, I : fraction insoluble, S : fraction soluble, NR : fraction non retenue sur colonne, L : fraction de lavage, E : élution.

La caractérisation biochimique du complexe a été poursuivie par des reconstitutions chimiques de centre Fe-S en présence d'un mélange équimolaire des deux apo-protéines purifiées séparément. Après dessalage sur colonne G25, la solution contenant IBA57.2 et SUFA1 est colorée, et le spectre d'absorption UV-visible comprend des bandes d'absorption additionnelles à 330 nm et 420 nm (figure 26A). Le mélange reconstitué a ensuite été analysé par filtration sur gel. Plusieurs pics d'absorption ont été détectés à la fois à 280 nm et à 420 nm (figure 26B). Le premier pic élué à 7,95 mL correspond à une masse apparente supérieure à 1 000 kDa et indique la formation d'agrégats, de même que le second pic élué à 10,08 mL pour lequel la masse déduite est de 535 kDa. Deux autres pics sont visibles à 13,56 mL et 14,95 mL et correspondent à des masses apparentes de 83 et 39 kDa respectivement. Par rapport aux masses théoriques des deux protéines, 40 kDa pour IBA57.2 et 14 kDa pour SUFA1, seul le pic à 83 kDa pourrait correspondre à un mélange des deux protéines sous la forme d'un holocomplexe. L'analyse par électrophorèse sur gel dénaturant réducteur de cette fraction après précipitation acide (car les protéines se retrouvent très diluées) révèle bien 2 bandes distinctes à 40 kDa et 14 kDa correspondant aux 2 protéines (figure 26C).

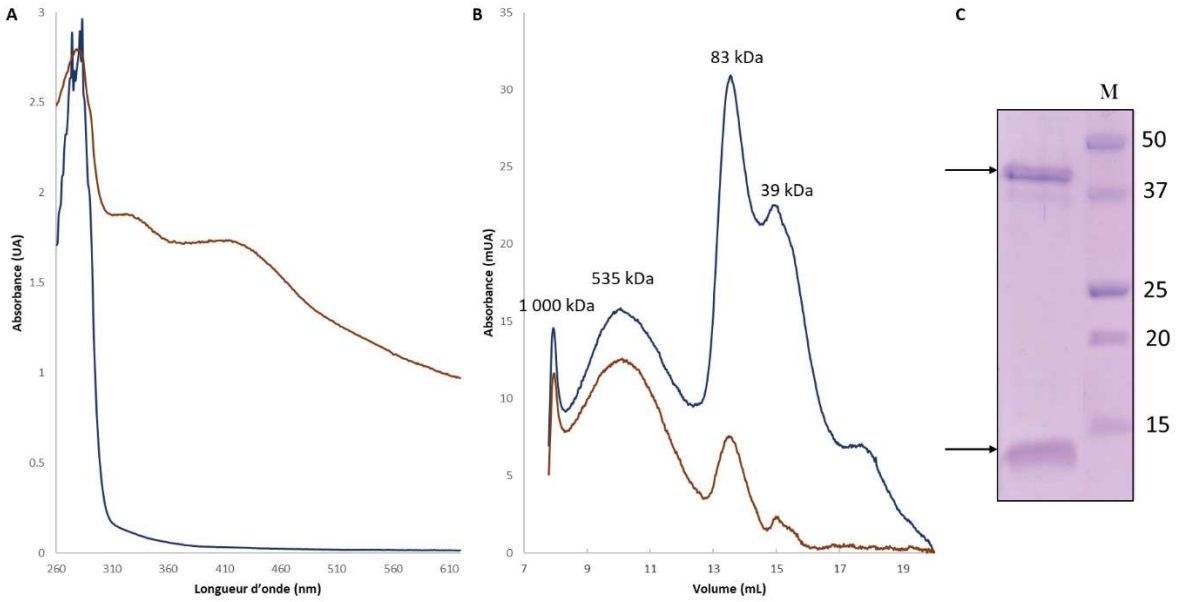


Figure 26: Caractérisation du complexe IBA57.2-SUFA1 après reconstitution. A : Spectres d'absorption UV-visible du mélange IBA57.2-SUFA1 avant (bleu) et après reconstitution (brun). B : Profil d'élution à 280 nm (bleu) et 420 nm (brun) de la co-reconstitution IBA57.2-SUFA1 sur gel filtration (colonne S200 10/300 équilibrée en Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 200 mM). C : Vérification du contenu de la fraction éluant à 13,54 mL par électrophorèse sur gel dénaturant réducteur à 15 % d'acrylamide. Le marqueur de masse moléculaire est indiqué en kDa.

Ces résultats sont encourageants et semblent confirmer la formation d'un complexe IBA57.2-SUFA1 capable de lier un centre Fe-S dont la nature reste à déterminer. En effet, le spectre d'absorption UV-visible associé au complexe SUFA1-IBA57.2 holo est différent de celui de l'hétérodimère ISCA2-IBA57 mitochondrial liant un centre [2Fe-2S] (Gourdoupis et al., 2018). La caractérisation du complexe SUFA1-IBA57.2 passe donc par l'optimisation des conditions de reconstitution pour limiter l'agrégation des protéines, et/ou la repurification d'un complexe non agrégé. Il est aussi possible d'ajouter une étiquette différente à SUFA1 pour une deuxième étape de purification. Cela pourrait permettre de définir la proportion de chaque protéine au sein du complexe. Il est remarquable que SUFA1 a été majoritairement détectée dans un complexe de 600 kDa à partir de fractions stromatiques où se trouverait la cystéine désulfurase NFS2 (Abdel-Ghany et al., 2005). Il serait intéressant de déterminer si la protéine IBA57.2 appartient à ce complexe ou s'il correspond plutôt à un complexe d'assemblage *de novo* comprenant SUFE et $SUFBC_2D$ par exemple et/ou si IBA57.2 peut faire partie d'un tel complexe. Enfin, l'utilisation du mutant IBA57.2 C330S serait une première étape vers l'identification des ligands impliqués dans la coordination d'un centre Fe-S sur le complexe SUFA1-IBA57.2.

3. Caractérisation fonctionnelle des protéines IBA57.2 et SUFA1 par identification de partenaires en double hybride en levure

3.1. Etude des interactions avec les protéines de la machinerie chloroplastique SUF

Pour ces tests, les interactions ont été testées sans *a priori* avec les protéines impliquées lors les étapes précoces de la maturation de protéines Fe-S chloroplastiques, c'est-à-dire les protéines d'échafaudage SUFB, SUFC et SUFD ainsi

que les protéines de transfert de soufre SUFE1/2/3 ; mais également avec celles impliquées dans les étapes tardives, c'est-à-dire les protéines de transfert appartenant aux familles des GRX, BOLA, NFU, ATC, IBA57 et MRP/HCF101. Les protéines IBA57.2 et SUFA1 ont été dans un premier temps utilisées comme protéines appâts, c'est-à-dire en fusion au domaine d'activation du facteur de transcription Gal4.

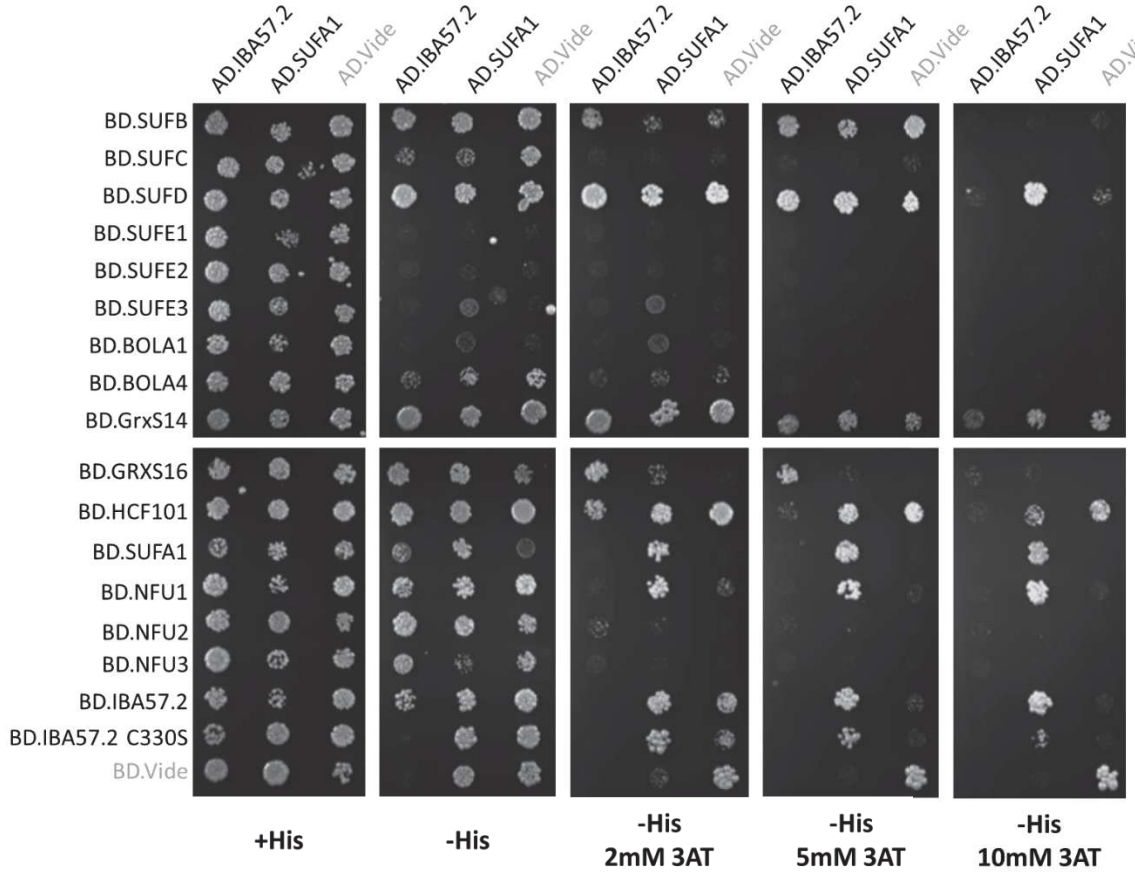


Figure 27: Expériences de double hybride binaire en levure impliquant les protéines IBA57.2 et SUFA1 en tant qu'appâts contre les protéines appartenant à la machinerie d'assemblage de centres Fe-S chloroplastique SUF. A l'exception des interactions impliquant les protéines SUFB-C-D-E1-E2-E3, les images présentées ici sont représentatives d'au moins 2 évènements de transformation indépendants pour lesquels 2 clones sont testés. L'interaction étiquetée « AD.Vide VS BD.Vide » correspond au témoin positif AD.VpG *vs* BD.EiF4G, le reste des lignes et colonnes associées correspondent à des levures co-transformées avec un vecteur vide en guise de témoin négatif.

Des interactions sont détectées entre SUFA1 et SUFD, NFU1, IBA57.2 et elle-même, ainsi qu'entre IBA57.2 et GRXS16 (figure 27). Globalement, le phénomène d'auto-activation observé sur milieu de sélection -His est inhibé par l'ajout de quantités plus ou moins importantes de 3-aminotriazole (3-AT). En effet, les constructions exprimant les protéines SUFB et SUFD fusionnées au domaine de liaison de Gal4 génèrent une forte transactivation, et il a été nécessaire d'augmenter la concentration en 3-AT à 10 mM pour supprimer cet effet et détecter une interaction entre SUFA1 et SUFD. A l'inverse la forte transactivation générée par les constructions BD-GRXS14 et BD-HCF101 empêche la détection d'interaction avec ces protéines. GRXS16 interagit quant à elle avec IBA57.2 jusqu'à 5 mM de 3-AT, ce qui correspond à une interaction forte quoique plus faible que les interactions

IBA57.2-SUFA1, SUFA1-SUFA1 et NFU1-SUFA1, toujours détectées à 10 mM de compétiteur. Ces interactions ayant déjà été détectées par le passé soit par double hybride en levure soit par BiFC, il était attendu de les retrouver. Par ailleurs, l'interaction SUFA1-IBA57.2 est toujours détectée avec IBA57.2 C330S, ce qui suggère que les protéines interagiraient en absence d'un centre Fe-S si le rôle de la cystéine dans la liaison d'un centre Fe-S au sein d'hétérodimère ATC-IBA57 est conservé (Gourdoupis et al., 2018).

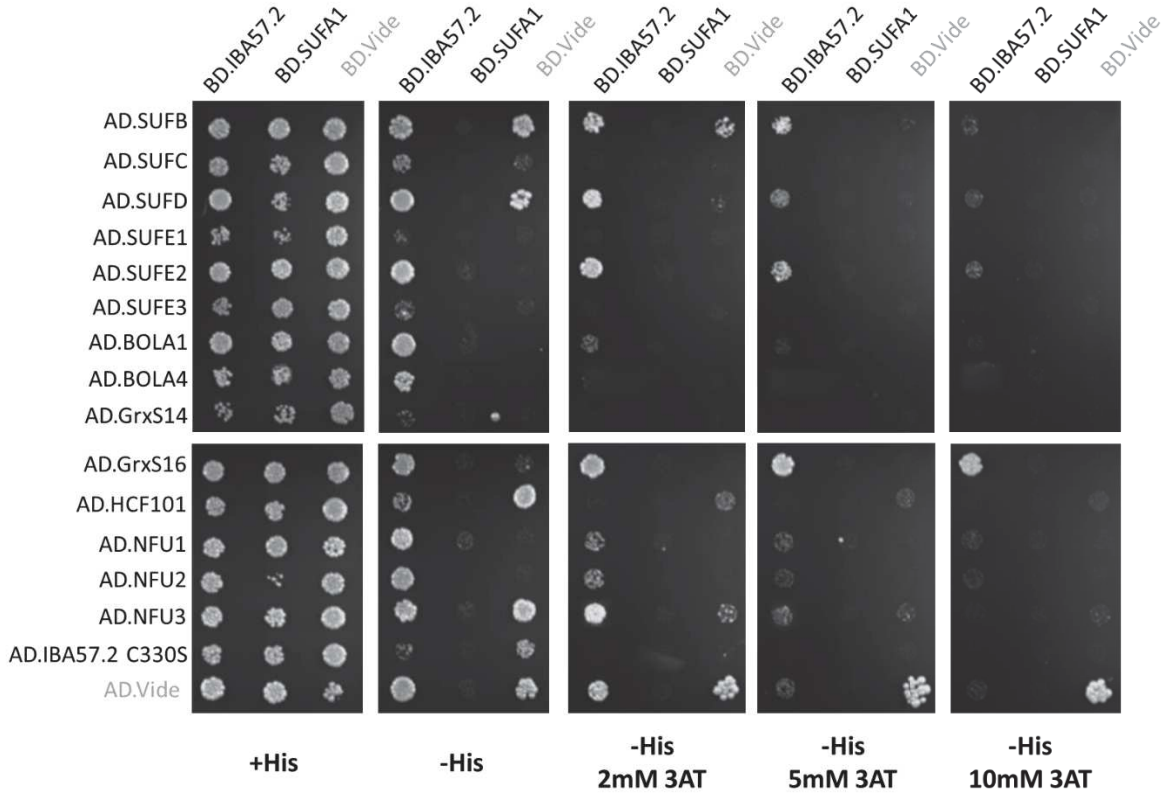


Figure 28: Expériences de double hybride en levure impliquant les protéines IBA57.2 et SUFA1 en tant que proies contre les protéines appartenant à la machinerie d'assemblage de centres Fe-S chloroplastique SUF. A l'exception des interactions impliquant les protéines SUFB-C-D-E1-E2-E3, les images présentées ici sont représentatives d'au moins 2 évènements de transformation indépendants pour lesquels 2 clones sont testés. L'interaction étiquetée « AD.Vide *vs* BD.Vide » correspond au témoin positif AD.VpG VS BD.EiF4G, le reste des lignes et colonnes associées correspondent à des levures co-transformées avec un vecteur vide en guise de témoin négatif.

Les tests d'interaction sont réitérés en utilisant IBA57.2 et SUFA1 en tant que proies, c'est-à-dire fusionnées au domaine de liaison du facteur de transcription Gal4. Pour ces tests, aucune interaction n'est détectée avec SUFA1, cette construction ne permettant vraisemblablement pas à la protéine d'interagir avec ses partenaires *in vivo*. A l'inverse, plus d'interactions ont été mises en évidence avec IBA57.2 dans cette configuration puisque des interactions sont détectées avec SUFB, SUFD, SUFE2, GRXS16 et potentiellement NFU3 (figure 28).

En résumé, SUFA1 interagit avec plusieurs protéines de la machinerie SUF que sont SUFD, IBA57.2 et NFU1. Les interactions avec IBA57.2 et NFU1 ont été discutées précédemment, toutefois il est intéressant de noter qu'aucune interaction n'a été détectée entre SUFA1 et NFU2 ou NFU3 alors qu'elles présentent autour de 30%

d'identité avec NFU1 et que l'expression de SUFA1 est réduite dans un fond génétique *nfu2* (Yabe et Nakai, 2006). Il avait donc été envisagé que SUFA1 intervienne en aval de NFU2 pour la maturation de protéines Fe-S sans qu'un lien direct entre les deux protéines ne soit établi. Enfin, l'interaction avec la protéine d'échafaudage SUFD indique vraisemblablement que SUFA1 seule ou en complexe avec IBA57.2 recevrait un centre Fe-S du complexe d'échafaudage $SUFBC_2D$. De fait, IBA57.2 interagit aussi avec les protéines d'échafaudage SUFB et SUFD. Ensuite, IBA57.2 interagit avec SUFE2 ce qui était plutôt inattendu puisque SUFE2 est la seule protéine SUFE d'*A. thaliana* sans domaine additionnel dont la seule fonction connue est le transfert de soufre depuis NFS2 (Murthy et al., 2007). Chez *E. coli*, un rôle hypothétique a été formulé pour YgfZ dans la réparation de protéines à centres Fe-S en condition de stress et l'expression de l'isoforme chloroplastique IBA57.2 permet de restaurer la croissance du mutant *ygfZ* sur plombagine, un agent de stress oxydant, ce qui suggère des fonctions similaires pour ces protéines (Waller et al., 2010). Sur cette base, une interaction avec SUFE2 permettrait l'apport de soufre pour la réparation de centres Fe-S par IBA57.2. Enfin, IBA57.2 interagit avec les protéines de transfert GRXS16 et NFU3. Bien qu'aucune interaction n'ait jamais été détectée entre ces familles protéiques, les GRX et NFU sont des partenaires connus des protéines ATC. Dans ce cas, IBA57.2 pourrait représenter le chaînon permettant les échanges de centres Fe-S entre SUFA1 et GRXS16 ou NFU3.

3.2. Etude des interactions entre les protéines IBA57.2 et SUFA1 et des cibles chloroplastiques potentielles

Les protéines cibles sélectionnées pour ces tests interviennent dans des voies métaboliques variées comme le métabolisme de la chlorophylle (CAO, HCAR et PAO), la méthylthiolation d'ARNt (MIAB), ou la synthèse de sirohèmes (SirB) dont dépendent les protéines Fe-S impliquées dans l'assimilation de l'azote et du soufre, NIR et SIR. Les autres protéines à centre Fe-S testées sont impliquées dans la synthèse des acides aminés branchés (DHAD et IPMI), de l'acide lipoïque (cLIP), des isoprénoïdes (ISPG et ISPH), des strigolactones (DWARF27.1-2-3), de la thiamine (THIC) et des purines (ASE2). Une dernière enzyme annotée comme choline mono-oxygénase (CMO) et incorporant un centre [2Fe-2S] de type Rieske a été intégrée. Les résultats ci-après sont ceux obtenus pour les fusions entre IBA57.2 ou SUFA1 et le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 car l'expression de ces protéines en fusion avec le domaine d'activation n'a permis la détection d'aucune interaction.

D'après les résultats présentés en figure 29, une interaction d'IBA57.2 avec les protéines ASE2, CAO et IPMI a été détectée. ASE2 et IPMI sont des protéines à centre [4Fe-4S] ce qui corrobore l'idée selon laquelle les protéines IBA57 sont impliquées dans la maturation de ce type de protéine (Gelling et al., 2008; Torraco et al., 2017; Waller et al., 2010). Parmi l'ensemble des protéines [4Fe-4S] connues, les protéines IBA57 interviendraient de façon spécifique dans la maturation de l'aconitase chez les eucaryotes mais pas chez *E. coli* (Gelling et al., 2008; Waller et al., 2010). Le chloroplaste ne contient pas d'aconitase, cependant l'isopropylmalate déshydrogénase (IPMI) avec laquelle IBA57.2 interagit fait partie de cette famille protéique (Gruer et al., 1997). Une telle interaction peut paraître surprenante puisqu'IBA57.2 ne permet pas la complémentation du mutant de levure *iba57Δ* qui

est auxotrophe pour le glutamate et la lysine du fait d'un défaut de maturation de l'aconitase Aco1 et de l'homoaconitase Lys4 (Uzarska et al., 2018). Il est à noter que la protéine IBA57 chloroplastique partage peu d'homologie de séquences avec les isoformes mitochondriales et appartient à un groupe phylogénétique distinct (Waller et al., 2012). D'après ces résultats, IBA57.2 pourrait donc intervenir dans la maturation de protéines appartenant à la famille protéique des aconitases. Chez *E. coli*, l'absence de la protéine YgfZ réduit fortement l'activité de MiaB, une protéine impliquée dans la modification de l'ARNt (Waller et al., 2010). L'expression de l'isoforme chloroplastique IBA57.2 dans un fond génétique *ygfZ* permet de restaurer l'activité de cette protéine (Waller et al., 2012), c'est pourquoi l'interaction entre IBA57.2 et MIAB a été testée en double hybride en levure. D'après les résultats obtenus, il n'est pas possible de valider une interaction physique entre MIAB et IBA57.2 et d'autres expériences seront nécessaires pour répondre à ce point. Cependant, il a été montré que la protéine NfuA d'*E. coli* peut transférer un centre Fe-S vers MiaB dont l'activité est également diminuée dans le mutant *nfuA* (Boutigny et al., 2013). Les résultats présentés dans le chapitre 2 montrent également une interaction entre les isoformes chloroplastiques NFU3 et MIAB, et il s'avère que NFU3 interagit avec IBA57.2. Ainsi la maturation de MIAB au sein du chloroplaste pourrait dépendre d'IBA57.2 par l'intermédiaire de NFU3, si l'interaction entre IBA57.2 et NFU3 correspond effectivement à un transfert de centre Fe-S, ce qui devra être vérifié par des expériences supplémentaires. Enfin, l'interaction d'IBA57.2 avec la protéine de type Rieske CAO pourrait indiquer une contribution pour la maturation des centres [2Fe-2S], comme le suggèrent la caractérisation biochimique du complexe humain [2Fe-2S]-ISCA2-IBA57 et la démonstration de l'intervention d'Iba57 au cours de la maturation de la protéine Rieske Rip1 présente au sein du complexe III chez la levure (Gourdoupis et al., 2018; Sánchez et al., 2019). En conclusion, la diversité des centres Fe-S liés par les partenaires potentiels d'IBA57.2 indique qu'elle serait responsable du transfert de plusieurs types de centres Fe-S et renforce l'intérêt de caractériser le centre Fe-S incorporé par le complexe chloroplastique SUFA1-IBA57.2.

Il est globalement à noter que peu d'interactions directes ont été observées avec IBA57 et qu'aucune interaction n'est détectée entre SUFA1 et des protéines cibles par double hybride en levure (figure 29). Sur la base des données bibliographiques qui suggèrent que SUFA1 est une protéine de transfert de centre [2Fe-2S], il était attendu que la protéine interagisse avec des cibles incorporant le même type de centre Fe-S (Abdel-Ghany et al., 2005; Yabe et Nakai, 2006). A l'exception de SirB, les autres protéines testées lient des centres [2Fe-2S] de type Rieske, néanmoins ce résultat peut avoir plusieurs significations. La première éventualité est que les constructions utilisées génèrent un encombrement stérique qui empêche la détection d'interactions entre SUFA1 et certains partenaires. Contrairement aux expériences de BiFC où les portions de YFP sont fusionnées à l'extrémité C-terminale, les domaines de Gal4 sont fusionnés à l'extrémité N-terminale. Toutefois des interactions ont été décelées avec les mêmes constructions que ce soit pour SUFA1 avec des protéines SUF ou pour les protéines cibles testées (figures 27 et 29). L'autre possibilité est que SUFA1 requiert des intermédiaires ou des partenaires (tels qu'IBA57) pour la maturation de protéines Fe-S et interviendrait ainsi dans des étapes antérieures au transfert final de centre

Fe-S à une protéine cible, comme cela a été proposé pour les isoformes SufA et IscA chez *E. coli* qui agissent en amont d'ErpA (Py et al., 2018; Vinella et al., 2009).

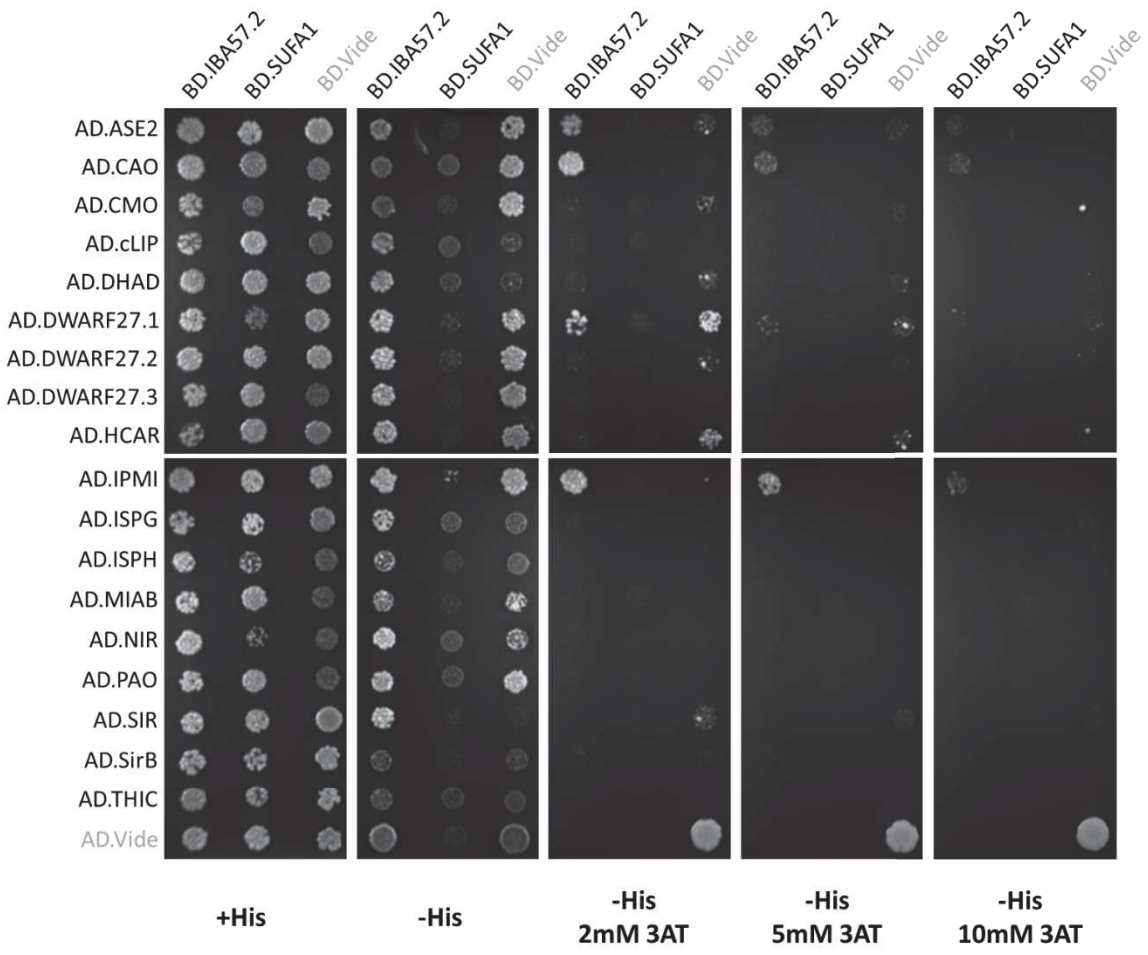


Figure 29: Expériences de double hybride en levure impliquant les protéines IBA57.2 et SUFA1 en tant que proies contre des protéines Fe-S chloroplastiques. A l'exception des interactions impliquant les protéines CAO, CMO, HCAR et PAO, les images présentées ici sont représentatives d'au moins 2 évènements de transformation indépendants pour lesquels 2 clones sont testés. L'interaction étiquetée « AD.Vide *vs* BD.Vide » correspond au témoin positif AD.VpG VS BD.EiF4G, le reste des lignes et colonnes associées correspondent à des levures co-transformées avec un vecteur vide en guise de témoin négatif.

4. Transfert de centre Fe-S entre NFU1 et SUFA1 *in vitro*

L'interaction entre NFU1 et SUFA1 a suscité un intérêt particulier puisqu'aucune interaction n'est détectée entre SUFA1 et NFU2 ou NFU3 et que ces deux protéines pourraient chacune recevoir un centre Fe-S de $SUFBC_2D$.

Un transfert de centre Fe-S *in vitro* d'une holoNFU1 contenant un centre [4Fe-4S] vers une apoSUFA1 a été testé dans les mêmes conditions que celles décrites dans le papier sur NFU1 (Roland et al., en révision). Le spectre d'absorption UV-visible de la fraction d'élution, qui contient uniquement SUFA1, présente des pics d'absorption à 330 nm, 420 et 460 nm (figure 30B). Les quantifications de fer et de soufre labile montrent la liaison de 0,84 ± 0,03 atomes de fer et 0,60 ± 0,01 atomes de soufre par monomère de SUFA1, des valeurs plus importantes que celles obtenues après reconstitution. A l'inverse, NFU1, qui se trouve dans la fraction de lavage, présente une absorbance réduite à 320 nm et 420 nm et ne contient plus que 0,34 ± 0,07

atomes de fer pour 0,35 ± 0,10 atomes de soufre par monomère de protéine (figure 30A). Ceci indique une diminution conséquente (passage de ~1.8/1.9 dans la protéine reconstituée à ~0.35) de la quantité de centre Fe-S incorporée par cette protéine. Ce transfert a été réalisé en présence d'EDTA, ce qui confirme un transfert intact de centre Fe-S depuis NFU1 vers SUFA1 plutôt qu'une reconstitution d'un centre Fe-S sur SUFA1 à partir de la dégradation des centres Fe-S présents sur NFU1. Le spectre d'absorption UV-visible de SUFA1 après transfert correspond plutôt à un centre [2Fe-2S]. Il est possible que la présence d'EDTA soit à l'origine de cette conversion ou que celle-ci ait eu lieu au cours du transfert comme cela a été observé entre NifU et ^{NIF}ISCA chez *A. vinelandii* (Mapolelo et al., 2012a). Par la suite, il serait intéressant de faire des expériences de reconstitution enzymatique sur SUFA1 en présence de NFU1 pour savoir quel type de centre est retrouvé sur SUFA1 et si l'efficacité de reconstitution est améliorée.

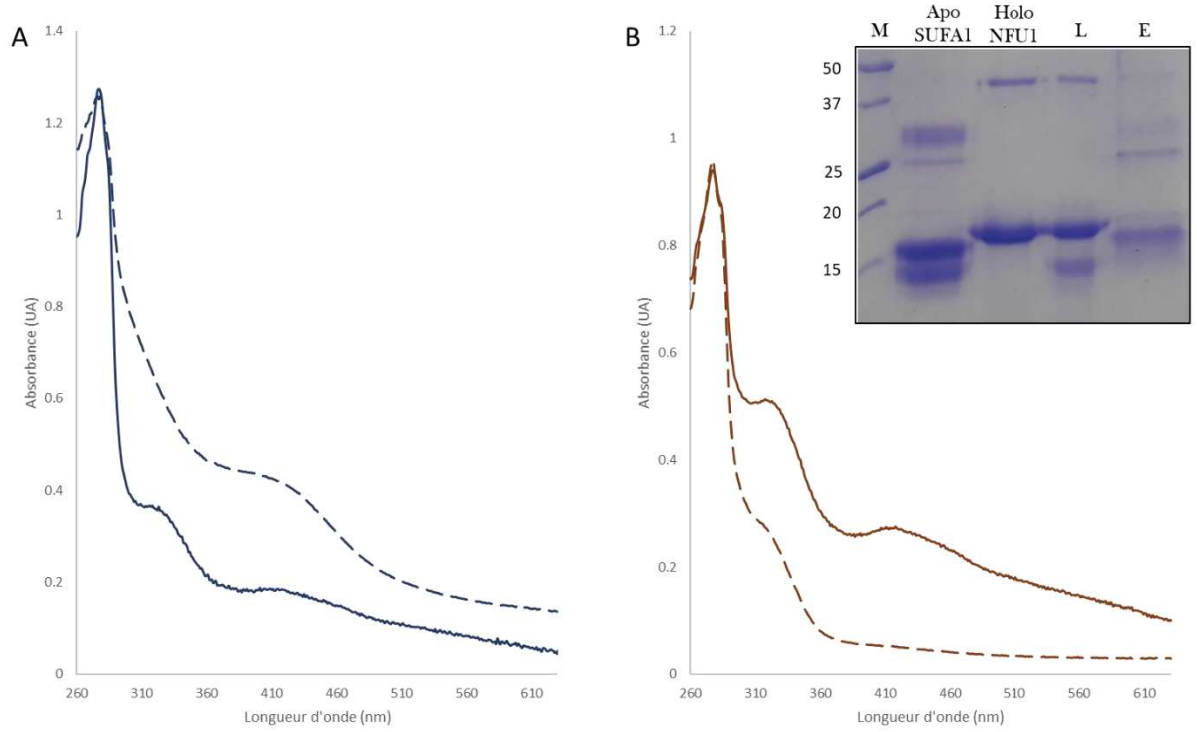


Figure 30: Expérience de transfert de centre Fe-S de NFU1 vers SUFA1 *in vitro*. Apo-SUFA1-6his (B : ligne pointillée) est incubée pendant 1h en présence d'EDTA et d'holo-NFU1 (A : ligne pointillée). Les lignes pleines correspondent aux fractions obtenues après séparation sur chromatographie d'affinité avec en A : le lavage et en B : l'élution. Le gel dénaturant réducteur associé montre les fractions de lavage (L) et d'élution (E) ainsi que les protéines avant transfert. Les tailles du marqueur de masse moléculaire (M) sont indiquées en kDa.

Chez *E. coli*, un transfert de centre Fe-S entre NfuA et les 3 protéines ATC a été démontré mais l'inverse n'est pas vrai (Py et al., 2018, 2012). En absence d'une protéine holo-SUFA1 homogène, la capacité de SUFA1 à transférer un centre Fe-S vers NFU1 n'a pas été testée pour le moment, mais devra être explorée car cela permettra d'affiner la position des protéines dans la machinerie SUF.

Conclusions générales

Ces travaux de thèse visaient notamment à compléter les connaissances concernant les étapes tardives de la maturation de protéines à centre Fe-S chloroplastiques, en se focalisant sur les familles protéiques ATC, IBA57, et NFU (Przybyla-Toscano et al., 2018). En effet, à l'exception de NFU2 et NFU3, la fonction et les partenaires des protéines chloroplastiques appartenant à ces familles n'étaient pas connus. De plus, il était attendu que NFU2 et NFU3 possèdent plus de partenaires que les seules protéines HCF101, APR1 et DHAD (Gao et al., 2013; Touraine et al., 2019). Les résultats présentés sous forme d'articles ou de données préliminaires ayant été discutés ou rédigés dans un format « résultats et discussion » respectivement, ce chapitre correspond à une conclusion générale visant à intégrer les données acquises au sein de modèles qui intégreront aussi la littérature récente.

1. Quelle place pour les protéines ATC, IBA57 et NFU au sein de la machinerie d'assemblage de centres Fe-S chloroplastique SUF ?

L'un des axes de recherche concernait le positionnement de ces acteurs vis-à-vis des autres protéines appartenant à la machinerie SUF. Le modèle présenté en figure 31 intègre les interactions décrites dans les résultats ainsi que des interactions supplémentaires entre les protéines d'échafaudage SUFB, SUFC ou SUFD et NFU2 ou NFU3 (voir annexes) également détectées par des expériences de double hybride en levure.

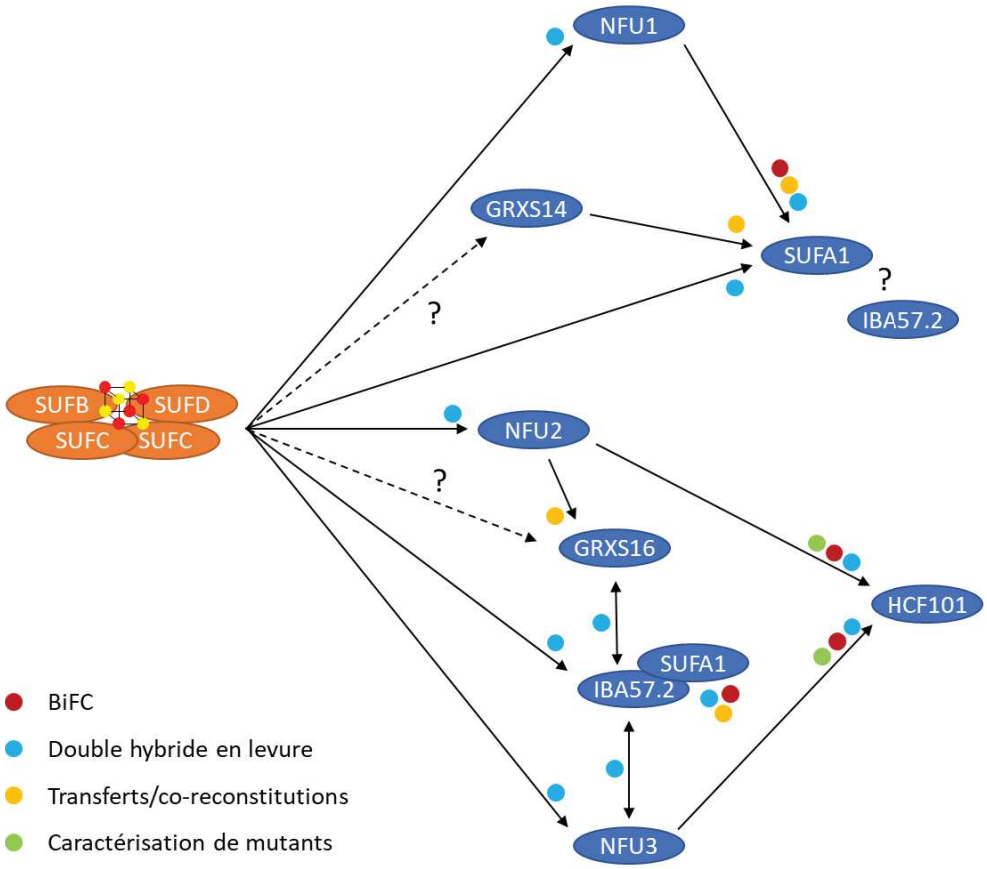


Figure 31 : Schéma représentant les interactions entre les protéines d'échafaudage et de transfert de la machinerie d'assemblage de centres Fe-S chloroplastique SUF. Les protéines d'échafaudage sont indiquées en orange et les protéines de transfert en bleu. Les cercles colorés qui accompagnent les flèches matérialisent les techniques de détection utilisées pour mettre en évidence les interactions. Ainsi, le double hybride en levure est représenté en bleu ciel, le BiFC en rouge, la caractérisation de mutants en vert et les transferts ou co-reconstitutions de centre Fe-S en orange. Pour des raisons de simplicité, les protéines BOLA ne figurent pas sur ce modèle.

En accord avec les observations réalisées sur d'autres organismes vivants (*E. coli*, levure, homme), IBA57.2 interagit avec SUFA1 sous la forme d'un complexe liant un centre Fe-S dont la nature reste à déterminer. Au regard des protéines dont la maturation dépend potentiellement de ce complexe, il est attendu que le complexe IBA57.2-SUFA1 puisse incorporer des centres [2Fe-2S] et/ou [4Fe-4S]. Une autre possibilité est que l'incorporation de centres de type [2Fe-2S] soit suffisante pour la maturation de protéines à centre [4Fe-4S] comme c'est le cas pour l'hétérodimère ISCA2-IBA57 de l'homme (Gourdoupis et al., 2018), ce qui pourra être testé après caractérisation spectroscopique du centre Fe-S présent sur le complexe IBA57.2-SUFA1.

De manière intéressante, IBA57.2 et SUFA1 interagiraient chacune avec au moins une des GRX chloroplastiques. Cette donnée indique un lien fonctionnel conservé entre GRX et ATC-IBA57, puisque ces familles de protéines interagissent également au sein de la machinerie mitochondriale où un transfert depuis les GRX vers les protéines ATC seules ou en complexe avec IBA57 a été démontré (Banci et al., 2014; Gourdoupis et al., 2018). Chez l'homme, l'interaction entre GRX5 et un hétérodimère ISCA1-ISCA2 permet d'ailleurs la synthèse de centres [4Fe-4S] *via* le couplage réductif de 2 centres [2Fe-2S] (Brancaccio et al., 2014). Il est encore délicat de savoir si cela reflète une grande flexibilité de ces protéines ou si ces expériences *in vitro*, qui peuvent éventuellement manquer de spécificité, ne sont pas représentatives de la situation *in vivo*. SUFA1 peut recevoir un centre [2Fe-2S] à partir de GRXS14 et restaurer les défauts de croissance des mutants *isa1Δ* et *isa2Δ* sur glutamate et lysine eux-mêmes liés à un défaut de maturation des aconitase et homoaconitase, deux protéines à centre [4Fe-4S] (Mapolelo et al., 2013; Uzarska et al., 2018). Ainsi, comme les protéines ATC mitochondriales, SUFA1 pourrait être impliquée dans la conversion de centres Fe-S. Cependant, dans le cas de SUFA1, l'interaction détectée par double hybride en levure avec SUFD, l'une des protéines constituant le complexe d'échafaudage $SUFBC_2D$, suggère plutôt que SUFA1, seule ou en complexe avec IBA57.2, recevrait un centre [4Fe-4S] de l'unité d'assemblage pour le convertir en centre [2Fe-2S]. La capacité de SUFA1 à incorporer et à transférer des centres de type [4Fe-4S] ou [2Fe-2S] à partir de $SUFBC_2D$ est à vérifier, mais paraît possible si l'on se réfère aux travaux portant sur l'isoforme SufA d'*E. coli*, qui est impliquée dans le transfert de ces 2 types de centres Fe-S à partir de $SUFBC_2D$ (Chahal et al., 2009; Ollagnier de Choudens et al., 2004). D'autre part, l'interaction de NFU1 avec le complexe d'échafaudage chloroplastique et avec SUFA1 et la démonstration d'un transfert d'un centre Fe-S depuis NFU1 vers SUFA1 posent question sur leur position. En effet, l'orthologue mitochondrial NFU1 dépend habituellement des protéines ATC pour l'acquisition de centre Fe-S (Beilschmidt et al., 2017; Melber et al., 2016). De plus, le centre Fe-S présent dans SUFA1 après transfert depuis NFU1 est différent du centre Fe-S formé sur la protéine par reconstitution *in vitro* et serait un centre [2Fe-2S], renforçant au passage l'hypothèse selon laquelle SUFA1 peut incorporer différent types de centres Fe-S. Il reste à vérifier si cette conversion n'est pas simplement liée à une dégradation progressive du centre Fe-S présent dans SUFA1. Concernant cette interaction, des expériences supplémentaires doivent être réalisées pour vérifier que le transfert de centre Fe-S depuis NFU1 vers SUFA1 est

unidirectionnel et pour vérifier si la présence d'IBA57.2 modifie la spécificité ou la nature de l'interaction.

Dans le modèle proposé, chacune des protéines de transfert (cela reste à tester pour les GRX) serait capable d'interagir avec le complexe d'échafaudage $SUFBC_2D$ et recevrait un centre Fe-S sans recours nécessaire à d'autres protéines de transfert. Cette possibilité devra être vérifiée/confirmée par des expériences de transfert de centre Fe-S *in vitro* à partir du complexe d'échafaudage $SUFBC_2D$ sous holoforme. Ces expériences pourraient être réalisées en présence d'autres facteurs de maturation ou des protéines partenaires/clientes pour voir dans quelles protéines les centres Fe-S s'accumulent. Ces expériences présentent un intérêt aussi pour NFU2 et NFU3 qui interagissent avec des protéines cibles à centre [2Fe-2S] et requièrent donc une étape de conversion de centre. De fait, il est possible que NFU2 et NFU3 réalisent cette conversion à partir d'un centre [4Fe-4S] de $SUFBC_2D$ ou que cette étape fasse intervenir SUFA1 seule ou en complexe avec IBA57.2. Outre un potentiel rôle de SUFA1 et IBA57.2 dans la conversion de centres Fe-S, cette hypothèse est justifiée d'une part par la détection d'une interaction entre IBA57.2 et NFU3, et d'autre part par la diminution de l'expression de SUFA1 dans un fond génétique *nfu2* (Yabe et Nakai, 2006), suggérant un lien entre ces deux protéines. De la même façon que NFU1, les isoformes NFU2 et NFU3 seraient impliquées à la fois dans le transfert de centres Fe-S vers des protéines cibles et vers d'autres protéines de transfert. Il a été montré que NFU2 et NFU3 interagissent avec HCF101 et la caractérisation des mutants de délétion *nfu2* et *nfu3* indique qu'elles sont impliquées, *a priori* de façon indirecte, dans la maturation de la sous–unité du PSI, PsaC, qui est une cible d'HCF101 (Touraine et al., 2019). Il est toutefois surprenant que les mutants *nfu2* et *nfu3* présentent un phénotype développemental si fort si leur fonction est uniquement une fonction redondante en amont d'HCF101 pour la maturation du PSI. Il est ainsi possible que NFU2 et/ou NFU3 participent à la maturation du centre [4Fe-4S] présent entre les sous-unités PsaA et PsaB. Il est également envisageable que NFU2 et NFU3 forment un hétérodimère mais cela n'a pas été validé par les expériences de double hybride en levure (voir annexes), ni par les co-immunoprécipitations réalisées avec NFU2. Le rôle des GRX dans cette équation n'est pas clair mais GRXS16, et pas GRXS14, reçoit un centre [2Fe-2S] de NFU2 ce qui suggère des voies d'acquisition différentes de centre Fe-S pour ces deux GRX chloroplastiques. Puisque les expériences de double hybride en levure sont limitées par la transactivation des GRX, notamment GRXS14, des expériences de BiFC ou de co-immunoprécipitation pourraient permettre de mieux cerner les partenaires des GRX au sein de la machinerie SUF.

Dans leur ensemble, les interactions discutées ici suggèrent un fonctionnement différent entre les machineries chloroplastiques et mitochondriales telle qu'elle est décrite actuellement. L'interaction de plusieurs protéines de transfert avec le complexe d'échafaudage $SUFBC_2D$ et l'observation d'un transfert de centre Fe-S depuis NFU1 vers SUFA1 indiquent un fonctionnement globalement similaire à celui de la machinerie d'*E. coli* (voir introduction, chapitre 2).

2. Maturation des protéines Fe-S chloroplastiques par les protéines de transfert ATC, IBA57 et NFU : spécificité ou redondance ?

Le chloroplaste contenant au moins 57 protéines à centres Fe-S (Przybyla-toscano et al., en préparation), l'un des objectifs de ce projet était d'identifier les protéines de transfert impliquées dans leur maturation en combinant différentes approches de recherche d'interactions avec ou sans *a priori*.

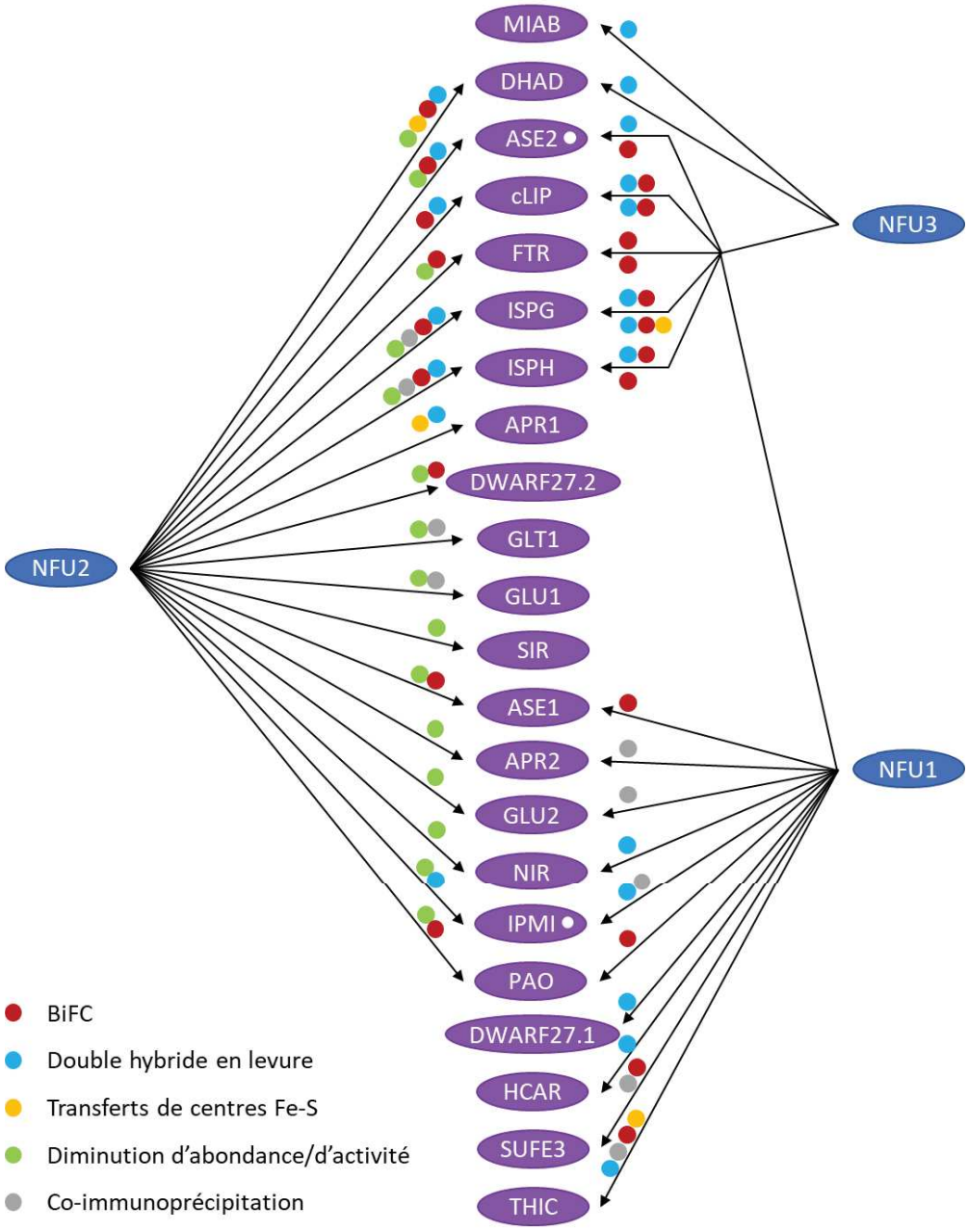


Figure 32 : Schéma représentant les interactions identifiées entre les protéines de transfert NFU1, NFU2 ou NFU3 et les protéines à centre Fe-S chloroplastiques. Les protéines de transfert sont indiquées en bleu et les protéines cibles en violet. Les cercles colorés qui accompagnent les flèches matérialisant différentes interactions servent à indiquer les méthodes de détection de celles-ci. Ainsi, le double hybride est représenté en bleu ciel, le BiFC en rouge, la caractérisation de mutants (mesure d'abondance protéique et/ou d'activité protéique) en vert, les transferts de centres Fe-S en orange et la co-immunoprécipitation est représentée en gris. Les points blancs qui accompagnent certaines protéines cibles indiquent que ces protéines interagissent également avec IBA57.2.

En combinant l'approche par double hybride binaire en levure (18 protéines testées) aux techniques de co-immunoprécipitation, de mesure d'abondance protéique dans le mutant de délétion *nfu2*, et de BiFC il a été possible de montrer une certaine redondance entre les 3 isoformes NFU, que ce soit entre les trois protéines ou les protéines prises deux à deux (voir figure 32). La redondance entre les protéines NFU est d'ailleurs appuyée par le phénotype des doubles mutants de délétion *nfu1* x *nfu2*, *nfu1* x *nfu3* et *nfu2* x *nfu3* pour lesquels un effet additionnel des mutations est détecté, allant jusqu'à la létalité embryonnaire dans le cas du mutant *nfu2* x *nfu3* (Touraine et al., 2019). Néanmoins des spécificités existeraient puisque certaines cibles n'interagissent qu'avec l'une des trois isoformes. Ces spécificités, de même que les redondances, devront évidemment être confirmées par la caractérisation plus poussée de NFU3 avec les mêmes approches que celles utilisées pour NFU2 (protéome quantitatif, métabolome, interactome par co-IP), la caractérisation des doubles mutants *nfu1* x *nfu2* et *nfu1* x *nfu3* ou encore des expériences de transfert *in vitro*, pour lesquelles il sera nécessaire d'obtenir au préalable la protéine NFU3 recombinante, qui n'a pu être produite sous forme soluble non agrégée malgré de multiples constructions, et les protéines cibles à la fois sous apo- et holoforme.

Outre une redondance entre les protéines appartenant à une même famille, une redondance fonctionnelle semble exister entre plusieurs familles protéiques de la machinerie, puisque certaines protéines cibles des NFU interagissent aussi avec IBA57.2. Ces observations pourraient illustrer l'existence de voies de maturation parallèles pour certaines protéines cibles dont l'utilisation serait modulée en fonction des conditions cellulaires, comme cela a été suggéré pour les homologues présents chez *E. coli* (Angelini et al., 2008; Waller et al., 2010). Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la caractérisation et l'analyse d'un mutant de délétion *iba57.2* dans différentes conditions. Actuellement, un mutant d'insertion pour IBA57.2 a été isolé parmi la collection de mutant d'insertion. Celui-ci ne présente aucun phénotype particulier en conditions standards de croissance ou en condition de carence en fer, et des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si la protéine est complètement absente (voir annexes). L'absence de phénotype du mutant *iba57.2* suggère soit des fonctions non-essentielles pour IBA57.2 soit une redondance avec d'autres protéines, notamment les NFU. Il serait utile de générer des doubles mutants *sufa1* x *iba57.2*, *sufa1* x *nfu1* voire *iba57.2* x *nfu1* puisqu'aucun des simples mutants n'a de phénotype et que les protéines interagissent entre elles. Pour ces protéines, il est envisageable d'étudier des lignées de surexpression. Des constructions permettant l'expression d'IBA57.2 sous le contrôle d'un promoteur fort (p35S-IBA57.2) ont été réalisées et pourraient entre autres permettre de rechercher les partenaires d'IBA57.2 par co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-IBA57.2 que nous avons générés.

Pour le moment, aucune interaction physique n'a été décrite entre SUFA1, BOLA1/4 ou GRXS14/S16 qui incorporent des centres [2Fe-2S] seules ou en complexes, et les protéines Fe-S chloroplastiques. Toutefois, peu ou pas d'études de protéomique ou d'interactomique ont été effectuées. De plus, seulement 5 des 17 protéines à centres [2Fe-2S] recensées dans le chloroplaste ont été testées par double hybride en levure et avec SUFA1 uniquement. De ce fait, il est envisagé d'inclure

d'autres protéines [2Fe-2S], y compris pour des expériences de BiFC, car l'utilisation de double hybride en levure pour ces GRX est limitée par la forte transactivation des fusions. Utiliser la co-immunoprécipitation est envisageable également car des lignées de surexpression sont disponibles mais les anticorps manquent de spécificité. Parmi les approches complémentaires, il serait possible d'avoir recours à de la spectroscopie Raman, qui a déjà permis la détection du défaut de maturation de protéines à centres [2Fe-2S] à partir de mitochondries isolées (Sánchez et al., 2019). Il serait en particulier intéressant de réaliser des analyses similaires à partir de chloroplastes issus des lignées d'Arabidopsis *grxs14* x *grxs16*. Ce mutant présentant un métabolisme chlorophyllien perturbé, il est possible que les GRX chloroplastiques interviennent spécifiquement dans la maturation des protéines à centre [2Fe-2S] impliquées dans le métabolisme de la chlorophylle, que sont CAO, PAO, PTC52 et TIC55, même si certaines de ces protéines interagissent aussi avec NFU2, NFU3 et IBA57.2 (figure 29 et annexes).

En conclusion, le fonctionnement de la machinerie SUF chloroplastique semble se rapprocher plus de celui de la machinerie SUF d'*E. coli* que de la machinerie ISC mitochondriale. Ainsi, à partir d'un complexe d'échafaudage unique, plusieurs voies de maturation existeraient pour une même protéine cible. Toutefois, même si des mutants de délétion pour certains gènes codant des protéines de transfert (GRXS14, S16, NFU1, SUFA1, IBA57.2) n'ont pas de phénotype (Rey et al., 2017; Touraine et al., 2019; Yabe et Nakai, 2006), d'autres (NFU2, NFU3, HCF101) ont des phénotypes forts à très marqués (Lezhneva et al., 2004; Touraine et al., 2019). L'une des méthodes utilisées pour la caractérisation fonctionnelle des protéines d'*E. coli* et notamment les protéines ISC et SUF est l'étude de mutants synthétiques létaux qui combinent 2 délétions (Butland et al., 2008). Ces mutants permettent généralement d'identifier des fonctions redondantes ou complémentaires entre deux protéines. Ainsi, la caractérisation de lignées de plante combinant des mutations pour des gènes apparemment superflus permettrait peut-être d'identifier leur fonction.

De manière plus générale, on s'aperçoit que la caractérisation fonctionnelle des protéines impliquées dans la maturation de centres Fe-S par la recherche systématique de partenaires est complémentaire à l'étude des mutants de délétion. Puisque la caractérisation fonctionnelle des protéines de la machinerie ISC d'*A. thaliana* s'avère limitée par la létalité de plusieurs mutants (Moseler et al., 2015; Przybyla-Toscano, 2017; Waller et al., 2012), il serait intéressant de réaliser un travail d'interactomique assez comparable, mais avec les protéines Fe-S mitochondriales. En effet, seules les interactions entre les protéines ISC ont été analysées de manière exhaustive jusqu'à présent (Przybyla-Toscano, 2017).

Annexes

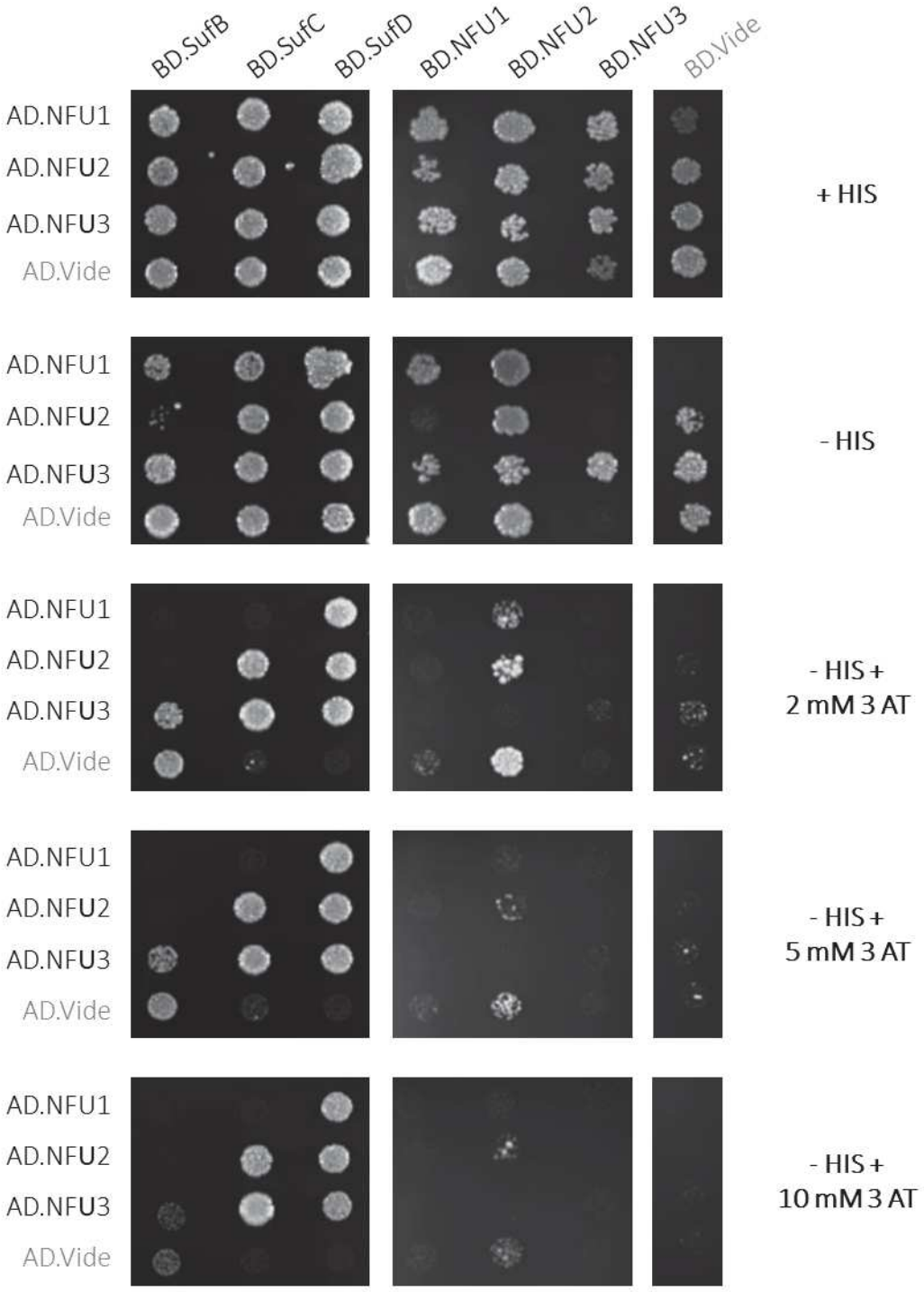


Figure 33: Expériences de double hybride en levure visant à identifier les interactions entre les isoformes chloroplastiques de NFU et les protéines d'échafaudage SUFB, SUFC et SUFD. Les images sélectionnées sont représentatives d'au moins 2 évènements de transformation indépendants pour lesquels 2 clones sont testés.

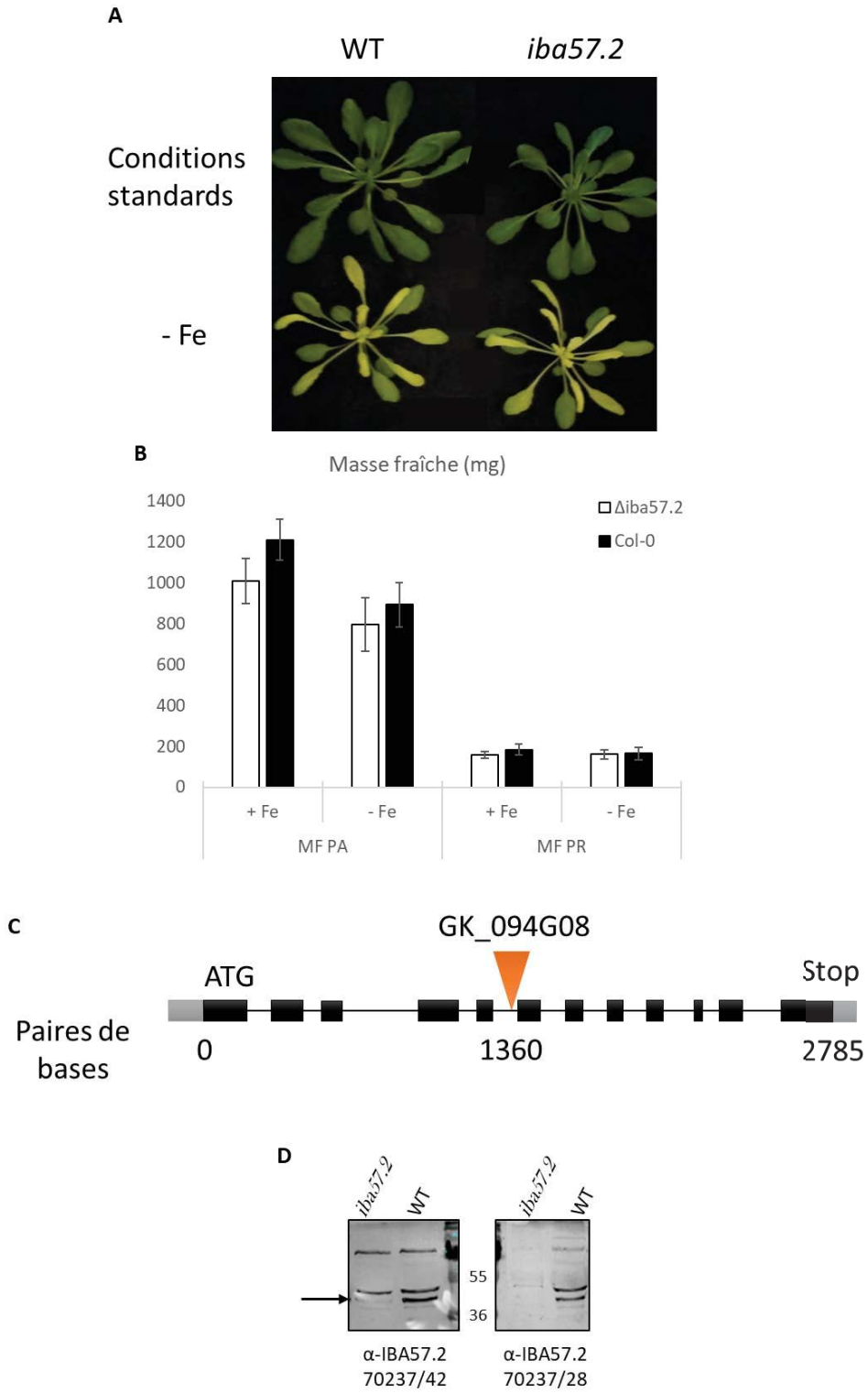


Figure 34: Caractérisation du mutant d'insertion *iba57.2* GK_094G08. En A : photo de plants âgés de 8 semaines cultivés en hydroponie en conditions standards de croissance ou en carence en fer. En B : comparaison de la masse fraîche (MF) en mg des parties aériennes (PA) et racinaires (PR) de plants sauvages (Col-0) et de mutants *iba57.2* (n = 6). En C : représentation du gène *IBA57.2*, les régions 5' et 3' non traduites sont représentées en gris, les exons sont des blocs noirs alors que les introns sont des lignes de la même couleur. La zone d'insertion de l'ADNt dans le mutant *iba57.2* est indiquée par une flèche orange. En D : expériences de western blot sur des protéines solubles totales de feuilles extraites à partir de plants sauvages (WT) ou de mutants *iba57.2*. Les masses du marqueur de taille sont indiquées en kDa.

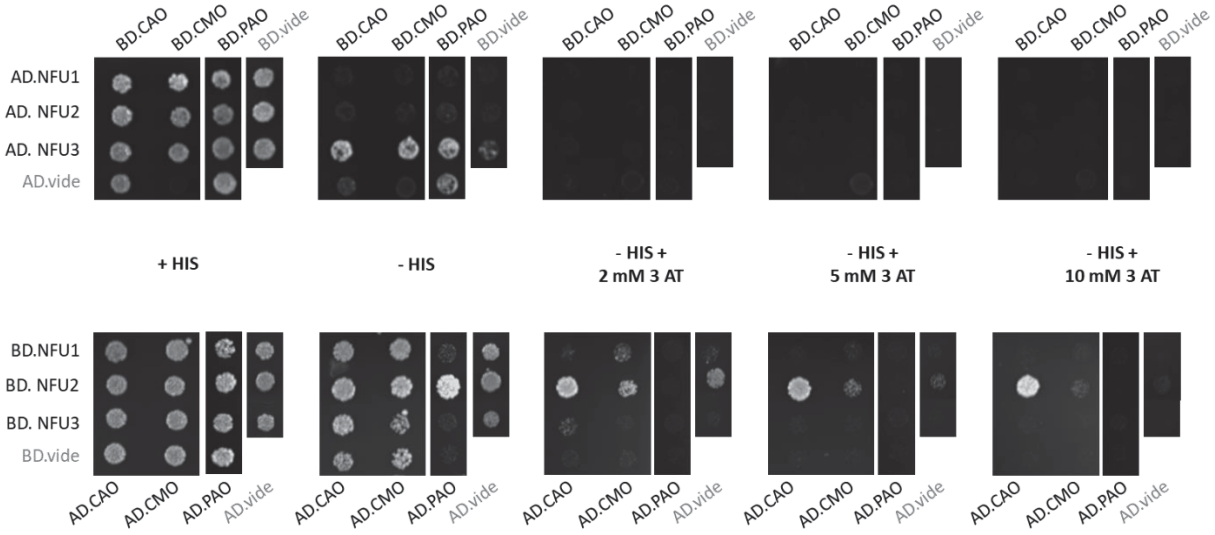


Figure 35: Expériences de double hybride en levure visant à identifier les interactions entre les isoformes chloroplastiques de NFU et des protéines cibles de type Rieske. Les images sélectionnées sont représentatives d'un seul évènement de transformation pour lesquels 2 clones sont testés.

Références bibliographiques

Abdel-Ghany, S.E., Ye, H., Garifullina, G.F., Zhang, L., Pilon-Smits, E.A.H., Pilon, M., 2005. Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Chloroplasts. Involvement of the Scaffold Protein CpIscA. Plant Physiol. 138, 161–172. https://doi.org/10.1104/pp.104.058602

Adam, A.C., Bornhövd, C., Prokisch, H., Neupert, W., Hell, K., 2006. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. The EMBO Journal 25, 174–183. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600905

Adinolfi, S., Puglisi, R., Crack, J.C., Iannuzzi, C., Dal Piaz, F., Konarev, P.V., Svergun, D.I., Martin, S., Le Brun, N.E., Pastore, A., 2018. The Molecular Bases of the Dual Regulation of Bacterial Iron Sulfur Cluster Biogenesis by CyaY and IscX. Front Mol Biosci 4. https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00097

Albrecht, A.G., Netz, D.J.A., Miethke, M., Pierik, A.J., Burghaus, O., Peuckert, F., Lill, R., Marahiel, M.A., 2010. SufU Is an Essential Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 192, 1643–1651. https://doi.org/10.1128/JB.01536-09

Aldea, M., Hernández-Chico, C., Campa, A.G. de la, Kushner, S.R., Vicente, M., 1988. Identification, cloning, and expression of bolA, an ftsZ-dependent morphogene of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 170, 5169–5176. https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5169-5176.1988

Angelini, S., Gerez, C., Choudens, S.O., Sanakis, Y., Fontecave, M., Barras, F., Py, B., 2008. NfuA, a New Factor Required for Maturing Fe/S Proteins in *Escherichia coli* under Oxidative Stress and Iron Starvation Conditions. J. Biol. Chem. 283, 14084–14091. https://doi.org/10.1074/jbc.M709405200

Armas, A.M., Balparda, M., Terenzi, A., Busi, M.V., Pagani, M.A., Gomez-Casati, D.F., 2019. Ferrochelatase activity of plant frataxin. Biochimie 156, 118–122. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.009

Azam, T., Przybyla-Toscano, J., Couturier, J., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2018. Mitochondrial Fe-S cluster assembly in *Arabidopsis thaliana*: In vitro characterization of the properties and roles of GRX, ISCA and NFU proteins.

Babcock, M., Silva, D. de, Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., Kaplan, J., 1997. Regulation of Mitochondrial Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of Frataxin. Science 276, 1709–1712. https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1709

Bak, D.W., Elliott, S.J., 2014. Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. Current Opinion in Chemical Biology, Biocatalysis and biotransformation. Bioinorganic chemistry 19, 50–58. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.12.015

Balk, J., Netz, D.J.A., Tepper, K., Pierik, A.J., Lill, R., 2005. The Essential WD40 Protein Cia1 Is Involved in a Late Step of Cytosolic and Nuclear Iron-Sulfur Protein Assembly. Molecular and Cellular Biology 25, 10833–10841. https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.10833-10841.2005

Balk, J., Pierik, A.J., Netz, D.J.A., Mühlenhoff, U., Lill, R., 2004. The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron–sulphur proteins. The EMBO Journal 23, 2105–2115. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600216

Balk, J., Schaedler, T.A., 2014. Iron cofactor assembly in plants. Annu Rev Plant Biol 65, 125–153. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035759

Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Conte, R.D., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccioli, M., Winkelmann, J., 2014. [2Fe-2S] cluster transfer in iron–sulfur protein biogenesis. PNAS 111, 6203–6208. https://doi.org/10.1073/pnas.1400102111

Banci, L., Ciofi-Baffoni, S., Gajda, K., Muzzioli, R., Peruzzini, R., Winkelmann, J., 2015. N-terminal domains mediate [2Fe-2S] cluster transfer from glutaredoxin-3 to anamorsin. Nature Chemical Biology 11, 772. https://doi.org/10.1038/nchembio.1892

Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., Rouhier, N., 2008. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe–2S] clusters. EMBO J. 27, 1122–1133. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.50

Barupala, D.P., Dzul, S.P., Riggs-Gelasco, P.J., Stemmler, T.L., 2016. Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe–S cluster cofactors. Archives of Biochemistry and Biophysics 592, 60–75. https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.01.010

Bastow, E.L., Bych, K., Crack, J.C., Brun, N.E.L., Balk, J., 2017. NBP35 interacts with DRE2 in the maturation of cytosolic iron-sulphur proteins in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 89, 590–600. https://doi.org/10.1111/tpj.13409

Beilschmidt, L.K., Ollagnier de Choudens, S., Fournier, M., Sanakis, I., Hograindleur, M.-A., Clémancey, M., Blondin, G., Schmucker, S., Eisenmann, A., Weiss, A., Koebel, P., Messaddeq, N., Puccio, H., Martelli, A., 2017. ISCA1 is essential for mitochondrial Fe_4S_4 biogenesis *in vivo*. Nature Communications 8, 15124. https://doi.org/10.1038/ncomms15124

Beinert, H., Holm, R.H., Münck, E., 1997. Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. Science 277, 653–659. https://doi.org/10.1126/science.277.5326.653

Bernard, D.G., Cheng, Y., Zhao, Y., Balk, J., 2009. An Allelic Mutant Series of ATM3 Reveals Its Key Role in the Biogenesis of Cytosolic Iron-Sulfur Proteins in Arabidopsis. Plant Physiology 151, 590–602. https://doi.org/10.1104/pp.109.143651

Bernard, D.G., Netz, D.J.A., Lagny, T.J., Pierik, A.J., Balk, J., 2013. Requirements of the cytosolic iron–sulfur cluster assembly pathway in Arabidopsis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 368, 20120259. https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0259

Beynon, J., Ally, A., Cannon, M., Cannon, F., Jacobson, M., Cash, V., Dean, D., 1987. Comparative organization of nitrogen fixation-specific genes from *Azotobacter*

vinelandii and *Klebsiella pneumoniae*: DNA sequence of the *nifUSV* genes. Journal of Bacteriology 169, 4024–4029. https://doi.org/10.1128/jb.169.9.4024-4029.1987

Blanc, B., Clémancey, M., Latour, J.-M., Fontecave, M., Ollagnier de Choudens, S., 2014. Molecular investigation of iron-sulfur cluster assembly scaffolds under stress. Biochemistry 53, 7867–7869. https://doi.org/10.1021/bi5012496

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 277, 1453–1462. https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453

Boniecki, M.T., Freibert, S.A., Mühlenhoff, U., Lill, R., Cygler, M., 2017. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. Nat Commun 8, 1287. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01497-1

Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D., Vickery, L.E., 2008. Studies on the Mechanism of Catalysis of Iron−Sulfur Cluster Transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB Chaperones. Biochemistry 47, 12795–12801. https://doi.org/10.1021/bi801565j

Bonomi, F., Rouault, T.A., 2014. Iron-sulfur proteins: a historical perspective, in: Iron-Sulfur Clusters in Chemistry and Biology. De Gruyter, pp. 1–10.

Boutigny, S., Saini, A., Baidoo, E.E.K., Yeung, N., Keasling, J.D., Butland, G., 2013. Physical and Functional Interactions of a Monothiol Glutaredoxin and an Iron Sulfur Cluster Carrier Protein with the Sulfur-donating Radical S-Adenosyl-l-methionine Enzyme MiaB. J. Biol. Chem. 288, 14200–14211. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460360

Boyd, J.M., Sondelski, J.L., Downs, D.M., 2009. Bacterial ApbC Protein Has Two Biochemical Activities That Are Required for in Vivo Function. J. Biol. Chem. 284, 110–118. https://doi.org/10.1074/jbc.M807003200

Brancaccio, D., Gallo, A., Mikolajczyk, M., Zovo, K., Palumaa, P., Novellino, E., Piccioli, M., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2014. Formation of [4Fe-4S] clusters in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery. J. Am. Chem. Soc. 136, 16240–16250. https://doi.org/10.1021/ja507822j

Braymer, J.J., Lill, R., 2017. Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. J. Biol. Chem. 292, 12754–12763. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.787101

Bridwell-Rabb, J., Iannuzzi, C., Pastore, A., Barondeau, D.P., 2012. Effector Role Reversal during Evolution: The Case of Frataxin in Fe–S Cluster Biosynthesis. Biochemistry 51, 2506–2514. https://doi.org/10.1021/bi201628j

Brintzinger, H., Palmer, G., Sands, R.H., 1966. On the ligand field of iron in ferredoxin from spinach chloroplasts and related nonheme iron enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 55, 397–404.

Broderick, W.E., Hoffman, B.M., Broderick, J.B., 2018. Mechanism of Radical Initiation in the Radical S-Adenosyl-l-methionine Superfamily. Acc. Chem. Res. 51, 2611–2619. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00356

Burschel, S., Decovic, D.K., Nuber, F., Stiller, M., Hofmann, M., Zupok, A., Siemiatkowska, B., Gorka, M., Leimkühler, S., Friedrich, T., 2019. Iron-sulfur cluster carrier proteins involved in the assembly of *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). Molecular Microbiology 111, 31–45. https://doi.org/10.1111/mmi.14137

Butland, G., Babu, M., Díaz-Mejía, J.J., Bohdana, F., Phanse, S., Gold, B., Yang, W., Li, J., Gagarinova, A.G., Pogoutse, O., Mori, H., Wanner, B.L., Lo, H., Wasniewski, J., Christopoulos, C., Ali, M., Venn, P., Safavi-Naini, A., Sourour, N., Caron, S., Choi, J.-Y., Laigle, L., Nazarians-Armavil, A., Deshpande, A., Joe, S., Datsenko, K.A., Yamamoto, N., Andrews, B.J., Boone, C., Ding, H., Sheikh, B., Moreno-Hagelsieb, G., Greenblatt, J.F., Emili, A., 2008. eSGA: *E. coli* synthetic genetic array analysis. Nature Methods 5, 789–795. https://doi.org/10.1038/nmeth.1239

Bych, K., Kerscher, S., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Zwicker, K., Huynen, M.A., Lill, R., Brandt, U., Balk, J., 2008a. The iron–sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. The EMBO Journal 27, 1736–1746. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.98

Bych, K., Netz, D.J.A., Vigani, G., Bill, E., Lill, R., Pierik, A.J., Balk, J., 2008b. The Essential Cytosolic Iron-Sulfur Protein Nbp35 Acts without Cfd1 Partner in the Green Lineage. J. Biol. Chem. 283, 35797–35804. https://doi.org/10.1074/jbc.M807303200

Cai, K., Frederick, R.O., Tonelli, M., Markley, J.L., 2018. Interactions of iron-bound frataxin with ISCU and ferredoxin on the cysteine desulfurase complex leading to Fe-S cluster assembly. Journal of Inorganic Biochemistry 183, 107–116. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.007

Cai, K., Liu, G., Frederick, R.O., Xiao, R., Montelione, G.T., Markley, J.L., 2016. Structural/Functional Properties of Human NFU1, an Intermediate [4Fe-4S] Carrier in Human Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. Structure 24, 2080–2091. https://doi.org/10.1016/j.str.2016.08.020

Cai, K., Tonelli, M., Frederick, R.O., Markley, J.L., 2017. Human Mitochondrial Ferredoxin 1 (FDX1) and Ferredoxin 2 (FDX2) Both Bind Cysteine Desulfurase and Donate Electrons for Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis. Biochemistry 56, 487–499. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00447

Cameron, J.M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T.A., Tong, W.-H., Ogilvie, I., Shoubridge, E.A., Robinson, B.H., 2011. Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. Am. J. Hum. Genet. 89, 486–495. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.011

Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., Michele, G.D., Filla, A., Frutos, R.D., Palau, F., Patel, P.I., Donato, S.D., Mandel, J.-L.,

Cocozza, S., Koenig, M., Pandolfo, M., 1996. Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. Science 271, 1423–1427. https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423

Chahal, H.K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., Outten, F.W., 2009. The SufBCD Fe−S Scaffold Complex Interacts with SufA for Fe−S Cluster Transfer. Biochemistry 48, 10644–10653. https://doi.org/10.1021/bi901518y

Chahal, H.K., Outten, F.W., 2012. Separate FeS scaffold and carrier functions for SufB2C2 and SufA during in vitro maturation of [2Fe2S] Fdx. Journal of Inorganic Biochemistry 116, 126–134. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.008

Chandramouli, K., Johnson, M.K., 2006. HscA and HscB Stimulate [2Fe-2S] Cluster Transfer from IscU to Apoferredoxin in an ATP-Dependent Reaction. Biochemistry 45, 11087–11095. https://doi.org/10.1021/bi061237w

Chandramouli, K., Unciuleac, M.-C., Naik, S., Dean, D.R., Huynh, B.H., Johnson, M.K., 2007. Formation and Properties of [4Fe-4S] Clusters on the IscU Scaffold Protein. Biochemistry 46, 6804–6811. https://doi.org/10.1021/bi6026659

Cheng, N.-H., Liu, J.-Z., Liu, X., Wu, Q., Thompson, S.M., Lin, J., Chang, J., Whitham, S.A., Park, S., Cohen, J.D., Hirschi, K.D., 2011. Arabidopsis monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. J. Biol. Chem. 286, 20398–20406. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201707

Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.-M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., Ollagnier de Choudens, S., 2013. Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. J. Am. Chem. Soc. 135, 733–740. https://doi.org/10.1021/ja308736e

Couturier, J., Jacquot, J.-P., Rouhier, N., 2009. Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. Cell. Mol. Life Sci. 66, 2539–2557. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0054-y

Couturier, J., Przybyla-Toscano, J., Roret, T., Didierjean, C., Rouhier, N., 2015. The roles of glutaredoxins ligating Fe–S clusters: Sensing, transfer or repair functions? Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, SI: Fe/S proteins 1853, 1513–1527. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.018

Couturier, J., Wu, H.-C., Dhalleine, T., Pégeot, H., Sudre, D., Gualberto, J.M., Jacquot, J.-P., Gaymard, F., Vignols, F., Rouhier, N., 2014. Monothiol Glutaredoxin–BolA Interactions: Redox Control of *Arabidopsis thaliana* BolA2 and SufE1. Molecular Plant 7, 187–205. https://doi.org/10.1093/mp/sst156

Crane, B.R., Getzoff, E.D., 1996. The relationship between structure and function for the sulfite reductases. Current Opinion in Structural Biology 6, 744–756. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(96)80003-0

Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L., Widmer, C., 1957. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta 25, 220–221. https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90457-2

Cupp-Vickery, J.R., Peterson, J.C., Ta, D.T., Vickery, L.E., 2004a. Crystal Structure of the Molecular Chaperone HscA Substrate Binding Domain Complexed with the IscU Recognition Peptide ELPPVKIHC. Journal of Molecular Biology 342, 1265–1278. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.025

Cupp-Vickery, J.R., Silberg, J.J., Ta, D.T., Vickery, L.E., 2004b. Crystal Structure of IscA, an Iron-sulfur Cluster Assembly Protein from *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology 338, 127–137. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.027

Dai, Y., Outten, F.W., 2012. The *E. coli* SufS–SufE sulfur transfer system is more resistant to oxidative stress than IscS–IscU. FEBS Letters 586, 4016–4022. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.10.001

Dlouhy, A.C., Li, H., Albetel, A.-N., Zhang, B., Mapolelo, D.T., Randeniya, S., Holland, A.A., Johnson, M.K., Outten, C.E., 2016. The *Escherichia coli* BolA Protein IbaG Forms a Histidine-Ligated [2Fe-2S]-Bridged Complex with Grx4. Biochemistry 55, 6869–6879. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00812

Dobritzsch, D., Schneider, G., Schnackerz, K.D., Lindqvist, Y., 2001. Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. The EMBO Journal 20, 650–660. https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.650

Dos Santos, P.C., Dean, D.R., 2014. A retrospective on the discovery of [Fe-S] cluster biosynthetic machineries in *Azotobacter vinelandii*, in: Iron-Sulfur Clusters in Chemistry and Biology. De Gruyter, pp. 267–296.

Dos Santos, P.C., Johnson, D.C., Ragle, B.E., Unciuleac, M.-C., Dean, D.R., 2007. Controlled Expression of *nif* and *isc* Iron-Sulfur Protein Maturation Components Reveals Target Specificity and Limited Functional Replacement between the Two Systems. Journal of Bacteriology 189, 2854–2862. https://doi.org/10.1128/JB.01734-06

Dos Santos, P.C., Smith, A.D., Frazzon, J., Cash, V.L., Johnson, M.K., Dean, D.R., 2004. Iron-Sulfur Cluster Assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. Journal of Biological Chemistry 279, 19705–19711. https://doi.org/10.1074/jbc.M400278200

Drennan, C.L., Peters, J.W., 2003. Surprising cofactors in metalloenzymes. Current Opinion in Structural Biology 13, 220–226. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00038-1

Duan, C.-G., Wang, X., Tang, K., Zhang, H., Mangrauthia, S.K., Lei, M., Hsu, C.-C., Hou, Y.-J., Wang, C., Li, Y., Tao, W.A., Zhu, J.-K., 2015. MET18 Connects the Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Pathway to Active DNA Demethylation in Arabidopsis. PLOS Genetics 11, e1005559. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005559

Dutkiewicz, R., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E.A., Marszalek, J., 2003. Ssq1, a Mitochondrial Hsp70 Involved in Iron-Sulfur (Fe/S) Center Biogenesis similarities to and differences from its bacterial counterpart. J. Biol. Chem. 278, 29719–29727. https://doi.org/10.1074/jbc.M303527200

Fesseler, J., Jeoung, J.-H., Dobbek, H., 2015. How the [NiFe4S4] Cluster of CO Dehydrogenase Activates CO2 and NCO−. Angewandte Chemie International Edition 54, 8560–8564. https://doi.org/10.1002/anie.201501778

Fish, W.W., 1988. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. Methods in Enzymology 158, 357–364. https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)58067-9

Fontecave, M., 2006. Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. Nature Chemical Biology 2, 171. https://doi.org/10.1038/nchembio0406-171

Fox, N.G., Yu, X., Feng, X., Bailey, H.J., Martelli, A., Nabhan, J.F., Strain-Damerell, C., Bulawa, C., Yue, W.W., Han, S., 2019. Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. Nat Commun 10, 1–8. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09989-y

Frazzon, A.P.G., Ramirez, M.V., Warek, U., Balk, J., Frazzon, J., Dean, D.R., Winkel, B.S.J., 2007. Functional analysis of Arabidopsis genes involved in mitochondrial iron–sulfur cluster assembly. Plant Mol Biol 64, 225–240. https://doi.org/10.1007/s11103-007-9147-x

Frey, A.G., Palenchar, D.J., Wildemann, J.D., Philpott, C.C., 2016. A Glutaredoxin·BolA Complex Serves as an Iron-Sulfur Cluster Chaperone for the Cytosolic Cluster Assembly Machinery. J. Biol. Chem. 291, 22344–22356. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.744946

Fu, W., Jack, R.F., Morgan, T.V., Dean, D.R., Johnson, M.K., 1994. nifU Gene Product from *Azotobacter vinelandii* Is a Homodimer That Contains Two Identical [2Fe-2S] Clusters. Biochemistry 33, 13455–13463. https://doi.org/10.1021/bi00249a034

Fuchs, M.G.G., Meyer, F., Ryde, U., 2010. A combined computational and experimental investigation of the [2Fe–2S] cluster in biotin synthase. J Biol Inorg Chem 15, 203–212. https://doi.org/10.1007/s00775-009-0585-6

Gao, H., Azam, T., Randeniya, S., Couturier, J., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2018. Function and maturation of the Fe–S center in dihydroxyacid dehydratase from Arabidopsis. J. Biol. Chem. jbc.RA117.001592. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001592

Gao, H., Subramanian, S., Couturier, J., Naik, S.G., Kim, S.-K., Leustek, T., Knaff, D.B., Wu, H.-C., Vignols, F., Huynh, B.H., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. *Arabidopsis thaliana* Nfu2 Accommodates [2Fe-2S] or [4Fe-4S] Clusters and Is Competent for in Vitro Maturation of Chloroplast [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Cluster-Containing Proteins. Biochemistry 52, 6633–6645. https://doi.org/10.1021/bi4007622

Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R., Mühlenhoff, U., 2008. Mitochondrial Iba57p Is Required for Fe/S Cluster Formation on Aconitase and Activation of Radical SAM Enzymes. Mol. Cell. Biol. 28, 1851–1861. https://doi.org/10.1128/MCB.01963-07

Gervason, S., Larkem, D., Mansour, A.B., Botzanowski, T., Müller, C.S., Pecqueur, L., Pavec, G.L., Delaunay-Moisan, A., Brun, O., Agramunt, J., Grandas, A.,

Fontecave, M., Schünemann, V., Cianférani, S., Sizun, C., Tolédano, M.B., D'Autréaux, B., 2019. Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. Nat Commun 10, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11470-9

Giel, J.L., Nesbit, A.D., Mettert, E.L., Fleischhacker, A.S., Wanta, B.T., Kiley, P.J., 2013. Regulation of iron–sulphur cluster homeostasis through transcriptional control of the Isc pathway by [2Fe–2S]–IscR in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 87, 478–492. https://doi.org/10.1111/mmi.12052

Golbeck, J.H., 2003. The binding of cofactors to photosystem I analyzed by spectroscopic and mutagenic methods. Annu Rev Biophys Biomol Struct 32, 237–256. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142356

Gourdoupis, S., Nasta, V., Calderone, V., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2018. IBA57 Recruits ISCA2 to Form a [2Fe-2S] Cluster-Mediated Complex. J. Am. Chem. Soc. 140, 14401–14412. https://doi.org/10.1021/jacs.8b09061

Grossman, J.D., Gay, K.A., Camire, E.J., Walden, W.E., Perlstein, D.L., 2019. Coupling Nucleotide Binding and Hydrolysis to Iron–Sulfur Cluster Acquisition and Transfer Revealed through Genetic Dissection of the Nbp35 ATPase Site. Biochemistry 58, 2017–2027. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00737

Gruer, M.J., Artymiuk, P.J., Guest, J.R., 1997. The aconitase family: three structural variations on a common theme. Trends in Biochemical Sciences 22, 3–6. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)10069-4

Gruner, I., Frädrich, C., Böttger, L.H., Trautwein, A.X., Jahn, D., Härtig, E., 2011. Aspartate 141 Is the Fourth Ligand of the Oxygen-sensing [4Fe-4S]2+ Cluster of *Bacillus subtilis* Transcriptional Regulator Fnr. J. Biol. Chem. 286, 2017–2021. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191940

Guillon, B., Bulteau, A.-L., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Friguet, B., Puccio, H., Drapier, J.-C., Bouton, C., 2009. Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe–S proteins. The FEBS Journal 276, 1036–1047. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06847.x

Guinote, I.B., Moreira, R.N., Barahona, S., Freire, P., Vicente, M., Arraiano, C.M., 2014. Breaking through the stress barrier: the role of BolA in Gram-negative survival. World J Microbiol Biotechnol 30, 2559–2566. https://doi.org/10.1007/s11274-014-1702-4

Guinote, I.B., Moreira, R.N., Freire, P., Arraiano, C.M., 2012. Characterization of the BolA Homolog IbaG: A New Gene Involved in Acid Resistance. Journal of Microbiology and Biotechnology 22, 484–493.

Gupta, V., Sendra, M., Naik, S.G., Chahal, H.K., Huynh, B.H., Outten, F.W., Fontecave, M., Ollagnier de Choudens, S., 2009. Native *Escherichia coli* SufA, Coexpressed with SufBCDSE, Purifies as a [2Fe−2S] Protein and Acts as an Fe−S Transporter to Fe−S Target Enzymes. J. Am. Chem. Soc. 131, 6149–6153. https://doi.org/10.1021/ja807551e

Gurbiel, R.J., Ohnishi, T., Robertson, D.E., Daldal, F., Hoffman, B.M., 1991. Q-band ENDOR spectra of the Rieske protein from *Rhodobacter capsulatus* ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase show two histidines coordinated to the iron-sulfur [2Fe-2S] cluster. Biochemistry 30, 11579–11584. https://doi.org/10.1021/bi00113a013

Hasnain, G., Waller, J.C., Alvarez, S., Ravilious, G.E., Jez, J.M., Hanson, A.D., 2012. Mutational analysis of YgfZ, a folate-dependent protein implicated in iron/sulphur cluster metabolism. FEMS Microbiol Lett 326, 168–172. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02448.x

Hirabayashi, K., Yuda, E., Tanaka, N., Katayama, S., Iwasaki, K., Matsumoto, T., Kurisu, G., Outten, F.W., Fukuyama, K., Takahashi, Y., Wada, K., 2015. Functional Dynamics Revealed by the Structure of the SufBCD Complex, a Novel ATP-binding Cassette (ABC) Protein That Serves as a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. J. Biol. Chem. 290, 29717–29731. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680934

Hsueh, K.-L., Westler, W.M., Markley, J.L., 2010. NMR Investigations of the Rieske Protein from *Thermus thermophilus* Support a Coupled Proton and Electron Transfer Mechanism. J. Am. Chem. Soc. 132, 7908–7918. https://doi.org/10.1021/ja1026387

Iametti, S., Barbiroli, A., Bonomi, F., 2015. Functional implications of the interaction between HscB and IscU in the biosynthesis of FeS clusters. J Biol Inorg Chem 20, 1039–1048. https://doi.org/10.1007/s00775-015-1285-z

Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Howes, B.D., Garcia-Serres, R., Clémancey, M., Latour, J.-M., Smulevich, G., Pastore, A., 2011. The role of CyaY in iron sulfur cluster assembly on the *E. coli* IscU scaffold protein. PLoS ONE 6, e21992. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021992

Inigo, S., Nagels Durand, A., Ritter, A., Le Gall, S., Termathe, M., Klassen, R., Tohge, T., De Coninck, B., Van Leene, J., De Clercq, R., Cammue, B., Fernie, A.R., Gevaert, K., De Jaeger, G., Leidel, S.A., Schaffrath, R., Van Lijsebettens, M., Pauwels, L., Goossens, A., 2016. Glutaredoxin GRXS17 Associates with the Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Pathway. Plant Physiology pp.00261.2016. https://doi.org/10.1104/pp.16.00261

Iwema, T., Picciocchi, A., Traore, D.A.K., Ferrer, J.-L., Chauvat, F., Jacquamet, L., 2009. Structural Basis for Delivery of the Intact [Fe2S2] Cluster by Monothiol Glutaredoxin. Biochemistry 48, 6041–6043. https://doi.org/10.1021/bi900440m

Jacobson, M.R., Cash, V.L., Weiss, M.C., Laird, N.F., Newton, W.E., Dean, D.R., 1989. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. Mol. Gen. Genet. 219, 49–57.

Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., Johnson, M.K., 2005. Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters. Annual Review of Biochemistry 74, 247–281. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518

Johnson, M.P., 2016. Photosynthesis. Essays In Biochemistry 60, 255–273. https://doi.org/10.1042/EBC20160016

Kennedy, M.C., Kent, T.A., Emptage, M., Merkle, H., Beinert, H., Münck, E., 1984. Evidence for the formation of a linear [3Fe-4S] cluster in partially unfolded aconitase. J. Biol. Chem. 259, 14463–14471.

Kiley, P.J., Beinert, H., 2003. The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. Current Opinion in Microbiology 6, 181–185. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00039-0

Kim, J.H., Bothe, J.R., Frederick, R.O., Holder, J.C., Markley, J.L., 2014. Role of IscX in Iron–Sulfur Cluster Biogenesis in *Escherichia coli*. J. Am. Chem. Soc. 136, 7933–7942. https://doi.org/10.1021/ja501260h

Knuesting, J., Riondet, C., Maria, C., Kruse, I., Bécuwe, N., König, N., Berndt, C., Tourrette, S., Guilleminot-Montoya, J., Herrero, E., Gaymard, F., Balk, J., Belli, G., Scheibe, R., Reichheld, J.-P., Rouhier, N., Rey, P., 2015. Arabidopsis Glutaredoxin S17 and Its Partner, the Nuclear Factor Y Subunit C11/Negative Cofactor 2α, Contribute to Maintenance of the Shoot Apical Meristem under Long-Day Photoperiod. Plant Physiology 167, 1643–1658. https://doi.org/10.1104/pp.15.00049

Kohbushi, H., Nakai, Y., Kikuchi, S., Yabe, T., Hori, H., Nakai, M., 2009. Arabidopsis cytosolic Nbp35 homodimer can assemble both [2Fe–2S] and [4Fe–4S] clusters in two distinct domains. Biochemical and Biophysical Research Communications 378, 810–815. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.138

Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., Johnson, M.K., 2001. IscA, an Alternate Scaffold for Fe−S Cluster Biosynthesis †. Biochemistry 40, 14069–14080. https://doi.org/10.1021/bi015656z

Lanz, N.D., Booker, S.J., 2015. Auxiliary iron–sulfur cofactors in radical SAM enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, SI: Fe/S proteins 1853, 1316–1334. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.002

Layer, G., Choudens, S.O., Sanakis, Y., Fontecave, M., 2006. Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis Characterization of *Escherichia coli* CyaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. J. Biol. Chem. 281, 16256–16263. https://doi.org/10.1074/jbc.M513569200

Layer, G., Gaddam, S.A., Ayala-Castro, C.N., Choudens, S.O., Lascoux, D., Fontecave, M., Outten, F.W., 2007. SufE Transfers Sulfur from SufS to SufB for Iron-Sulfur Cluster Assembly. J. Biol. Chem. 282, 13342–13350. https://doi.org/10.1074/jbc.M608555200

Léon, S., Touraine, B., Briat, J.-F., Lobréaux, S., 2005. Mitochondrial localization of *Arabidopsis thaliana* Isu Fe–S scaffold proteins. FEBS Letters 579, 1930–1934. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.038

Léon, S., Touraine, B., Ribot, C., Briat, J.-F., Lobéraux, S., 2003. Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. Biochem. J. 371, 823–830. https://doi.org/10.1042/bj20021946

Lezhneva, L., Amann, K., Meurer, J., 2004. The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]-cluster-containing complexes in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. Plant J. 37, 174–185. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01952.x

Li, H., Outten, C.E., 2012. Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. Biochemistry 51, 4377–4389. https://doi.org/10.1021/bi300393z

Li, J., Cowan, J.A., 2015. Glutathione-coordinated [2Fe–2S] cluster: a viable physiological substrate for mitochondrial ABCB7 transport. Chemical Communications 51, 2253–2255. https://doi.org/10.1039/C4CC09175B

Lloyd, S.J., Lauble, H., Prasad, G.S., Stout, C.D., 1999. The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642A:citrate complex. Protein Science 8, 2655–2662.

Loiseau, L., Gerez, C., Bekker, M., Choudens, S.O., Py, B., Sanakis, Y., Mattos, J.T. de, Fontecave, M., Barras, F., 2007. ErpA, an iron–sulfur (Fe–S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*. PNAS 104, 13626–13631. https://doi.org/10.1073/pnas.0705829104

Lu, J., Bitoun, J.P., Tan, G., Wang, W., Min, W., Ding, H., 2010. Iron-binding activity of human iron-sulfur cluster assembly protein hIscA1. Biochem. J. 428, 125–131. https://doi.org/10.1042/BJ20100122

Luo, D., Bernard, D.G., Balk, J., Hai, H., Cui, X., 2012. The DUF59 Family Gene AE7 Acts in the Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Pathway to Maintain Nuclear Genome Integrity in Arabidopsis. The Plant Cell 24, 4135–4148. https://doi.org/10.1105/tpc.112.102608

Majewska, J., Ciesielski, S.J., Schilke, B., Kominek, J., Blenska, A., Delewski, W., Song, J.-Y., Marszalek, J., Craig, E.A., Dutkiewicz, R., 2013. Binding of the Chaperone Jac1 Protein and Cysteine Desulfurase Nfs1 to the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Isu Protein Is Mutually Exclusive. J. Biol. Chem. 288, 29134–29142. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.503524

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Naik, S.G., Huynh, B.H., Johnson, M.K., 2012a. Spectroscopic and Functional Characterization of Iron–Sulfur Cluster-Bound Forms of *Azotobacter vinelandii* ^{Nif}IscA. Biochemistry 51, 8071–8084. https://doi.org/10.1021/bi3006658

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Naik, S.G., Huynh, B.H., Johnson, M.K., 2012b. Spectroscopic and Functional Characterization of Iron-Bound Forms of *Azotobacter vinelandii* ^{Nif}IscA. Biochemistry 51, 8056–8070. https://doi.org/10.1021/bi300664j

Mapolelo, D.T., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A.-N., Li, H., Couturier, J., Outten, C.E., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe–S cluster trafficking. Dalton Transactions 42, 3107. https://doi.org/10.1039/c2dt32263c

McCarthy, E.L., Booker, S.J., 2017. Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. Science 358, 373–377. https://doi.org/10.1126/science.aan4574

Melber, A., Na, U., Vashisht, A., Weiler, B.D., Lill, R., Wohlschlegel, J.A., Winge, D.R., 2016. Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. eLife 5. https://doi.org/10.7554/eLife.15991

Morimoto, K., Yamashita, E., Kondou, Y., Lee, S.J., Arisaka, F., Tsukihara, T., Nakai, M., 2006. The asymmetric IscA homodimer with an exposed [2Fe-2S] cluster suggests the structural basis of the Fe-S cluster biosynthetic scaffold. J. Mol. Biol. 360, 117–132. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.067

Mortenson, L.E., Valentine, R.C., Carnahan, J.E., 1962. An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. Biochemical and Biophysical Research Communications 7, 448–452. https://doi.org/10.1016/0006-291X(62)90333-9

Moseler, A., Aller, I., Wagner, S., Nietzel, T., Przybyla-Toscano, J., Mühlenhoff, U., Lill, R., Berndt, C., Rouhier, N., Schwarzländer, M., Meyer, A.J., 2015. The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. PNAS 112, 13735–13740. https://doi.org/10.1073/pnas.1510835112

Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., Lill, R., 2003. Components involved in assembly and dislocation of iron–sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. The EMBO Journal 22, 4815–4825. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg446

Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C.H., Lill, R., 2010. Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. Cell Metab. 12, 373–385. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.001

Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J., Lill, R., 2011. Specialized Function of Yeast Isa1 and Isa2 Proteins in the Maturation of Mitochondrial [4Fe-4S] Proteins. J. Biol. Chem. 286, 41205–41216. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.296152

Murthy, N.M.U., Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., Abdel-Ghany, S.E., Rousset, C., Ye, H., Fontecave, M., Pilon-Smits, E.A.H., Pilon, M., 2007. Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3 functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and NAD synthesis. J. Biol. Chem. 282, 18254–18264. https://doi.org/10.1074/jbc.M701428200

Nasta, V., Giachetti, A., Ciofi-Baffoni, S., Banci, L., 2017. Structural insights into the molecular function of human [2Fe-2S] BOLA1-GRX5 and [2Fe-2S] BOLA3-GRX5 complexes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1861, 2119–2131. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.005

Nath, K., Wessendorf, R.L., Lu, Y., 2016. A Nitrogen-Fixing Subunit Essential for Accumulating 4Fe-4S-Containing Photosystem I Core Proteins. Plant Physiology 172, 2459–2470. https://doi.org/10.1104/pp.16.01564

Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., Del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Ugarte, M., Gutierrez-Solana, L.G., Campistol, J., Garcia-Cazorla, A., Vaquerizo, J., Riudor, E., Briones, P., Elpeleg, O., Ribes, A., Lill, R., 2011. A fatal

mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. Am. J. Hum. Genet. 89, 656–667. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.10.005

Netz, D.J.A., Mascarenhas, J., Stehling, O., Pierik, A.J., Lill, R., 2014. Maturation of cytosolic and nuclear iron–sulfur proteins. Trends in Cell Biology 24, 303–312. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.11.005

Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Stümpfig, M., Mühlenhoff, U., Lill, R., 2007. The Cfd1–Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. Nature Chemical Biology 3, 278–286. https://doi.org/10.1038/nchembio872

Netz, D.J.A., Stümpfig, M., Doré, C., Mühlenhoff, U., Pierik, A.J., Lill, R., 2010. Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. Nature Chemical Biology 6, 758–765. https://doi.org/10.1038/nchembio.432

O'Brien, E., Holt, M.E., Thompson, M.K., Salay, L.E., Ehlinger, A.C., Chazin, W.J., Barton, J.K., 2017. The [4Fe4S] cluster of human DNA primase functions as a redox switch using DNA charge transport. Science 355, eaag1789. https://doi.org/10.1126/science.aag1789

Ollagnier de Choudens, S., Sanakis, Y., Fontecave, M., 2004. SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly. J Biol Inorg Chem 9, 828–838. https://doi.org/10.1007/s00775-004-0581-9

Ollagnier de Choudens, S.O., Nachin, L., Sanakis, Y., Loiseau, L., Barras, F., Fontecave, M., 2003. SufA from *Erwinia chrysanthemi* Characterization of a scaffold protein required for iron-sulfur cluster assembly. J. Biol. Chem. 278, 17993–18001. https://doi.org/10.1074/jbc.M300285200

Ollagnier-de-Choudens, S., Mattioli, T., Takahashi, Y., Fontecave, M., 2001. Iron-Sulfur Cluster Assembly Characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. J. Biol. Chem. 276, 22604–22607. https://doi.org/10.1074/jbc.M102902200

Outten, F.W., Wood, M.J., Muñoz, F.M., Storz, G., 2003. The SufE Protein and the SufBCD Complex Enhance SufS Cysteine Desulfurase Activity as Part of a Sulfur Transfer Pathway for Fe-S Cluster Assembly in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 278, 45713–45719. https://doi.org/10.1074/jbc.M308004200

Pandey, A.K., Pain, J., Dancis, A., Pain, D., 2019. Mitochondria export iron-sulfur (Fe-S) and sulfur intermediates to the cytoplasm for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation in yeast. J. Biol. Chem. jbc.RA119.008600. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008600

Pantopoulos, K., 2004. Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: An Update. Annals of the New York Academy of Sciences 1012, 1–13. https://doi.org/10.1196/annals.1306.001

Parent, A., Elduque, X., Cornu, D., Belot, L., Le Caer, J.-P., Grandas, A., Toledano, M.B., D'Autréaux, B., 2015. Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. Nat Commun 6, 5686. https://doi.org/10.1038/ncomms6686

Pastore, C., Adinolfi, S., Huynen, M.A., Rybin, V., Martin, S., Mayer, M., Bukau, B., Pastore, A., 2006. YfhJ, a molecular adaptor in iron-sulfur cluster formation or a frataxin-like protein? Structure 14, 857–867. https://doi.org/10.1016/j.str.2006.02.010

Paul, V.D., Mühlenhoff, U., Stümpfig, M., Seebacher, J., Kugler, K.G., Renicke, C., Taxis, C., Gavin, A.-C., Pierik, A.J., Lill, R., 2015. The deca-GX3 proteins Yae1-Lto1 function as adaptors recruiting the ABC protein Rli1 for iron-sulfur cluster insertion. eLife 4. https://doi.org/10.7554/eLife.08231

Pérard, J., Ollagnier de Choudens, S., 2017. Iron–sulfur clusters biogenesis by the SUF machinery: close to the molecular mechanism understanding. J Biol Inorg Chem 1–16. https://doi.org/10.1007/s00775-017-1527-3

Peters, J.W., Schut, G.J., Boyd, E.S., Mulder, D.W., Shepard, E.M., Broderick, J.B., King, P.W., Adams, M.W.W., 2015. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, SI: Fe/S proteins 1853, 1350–1369. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.021

Petersen, L., Downs, D.M., 1996. Mutations in apbC (mrp) prevent function of the alternative pyrimidine biosynthetic pathway in *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology 178, 5676–5682. https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5676-5682.1996

Pietro, A.S., Lang, H.M., 1958. Photosynthetic Pyridine Nucleotide Reductase I. Partial Purification and Properties of the Enzyme from Spinach. J. Biol. Chem. 231, 211–229.

Pinske, C., Sawers, R.G., 2012. A-Type Carrier Protein ErpA Is Essential for Formation of an Active Formate-Nitrate Respiratory Pathway in *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology 194, 346–353. https://doi.org/10.1128/JB.06024-11

Prischi, F., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Pastore, C., Adinolfi, S., Martin, S.R., Svergun, D.I., Pastore, A., 2010. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron–sulphur cluster assembly. Nature Communications 1, 95. https://doi.org/10.1038/ncomms1097

Przybyla-Toscano, J., 2017. Etude des protéines NFU, ISCA et FDX, impliquées dans la maturation des centres fer-soufre dans les mitochondries d'*Arabidopsis thaliana*. Université de Lorraine.

Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Gaymard, F., Couturier, J., Rouhier, N., 2018. Roles and maturation of iron–sulfur proteins in plastids. J Biol Inorg Chem 1–21. https://doi.org/10.1007/s00775-018-1532-1

Puig, S., Ramos-Alonso, L., María Romero, A., Teresa Martínez-Pastor, M., 2017. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. Metallomics 9, 1483–1500. https://doi.org/10.1039/C7MT00116A

Py, B., Gerez, C., Angelini, S., Planel, R., Vinella, D., Loiseau, L., Talla, E., Brochier-Armanet, C., Garcia Serres, R., Latour, J.-M., Ollagnier-de Choudens, S., Fontecave, M., Barras, F., 2012. Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe-S carrier. Molecular

Microbiology 86, 155–171. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08181.x

Py, B., Gerez, C., Huguenot, A., Vidaud, C., Fontecave, M., Choudens, S.O. de, Barras, F., 2018. The ErpA/NfuA complex builds an oxidation-resistant Fe-S cluster delivery pathway. J. Biol. Chem. 293, 7689–7702. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002160

Qi, W., Li, J., Chain, C.Y., Pasquevich, G.A., Pasquevich, A.F., Cowan, J.A., 2012. Glutathione Complexed Fe–S Centers. J. Am. Chem. Soc. 134, 10745–10748. https://doi.org/10.1021/ja302186j

Rey, P., Becuwe, N., Tourrette, S., Rouhier, N., 2017. Involvement of Arabidopsis glutaredoxin S14 in the maintenance of chlorophyll content. Plant Cell Environ. 40, 2319–2332. https://doi.org/10.1111/pce.13036

Richards, T.A., van der Giezen, M., 2006. Evolution of the Isd11–IscS Complex Reveals a Single α-Proteobacterial Endosymbiosis for All Eukaryotes. Mol Biol Evol 23, 1341–1344. https://doi.org/10.1093/molbev/msl001

Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., Barras, F., 2013. Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. Biochim. Biophys. Acta 1827, 455–469. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.12.010

Roche, B., Huguenot, A., Barras, F., Py, B., 2015. The iron-binding CyaY and IscX proteins assist the ISC-catalyzed Fe-S biogenesis in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 95, 605–623. https://doi.org/10.1111/mmi.12888

Roret, T., Tsan, P., Couturier, J., Zhang, B., Johnson, M.K., Rouhier, N., Didierjean, C., 2014. Structural and Spectroscopic Insights into BolA-Glutaredoxin Complexes. J. Biol. Chem. 289, 24588–24598. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.572701

Rubio, L.M., Ludden, P.W., 2008. Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. Annu. Rev. Microbiol. 62, 93–111. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162737

Sánchez, L.A., Gómez-Gallardo, M., Díaz-Pérez, A.L., Cortés-Rojo, C., Campos-García, J., 2019. Iba57p participates in maturation of a [2Fe–2S]-cluster Rieske protein and in formation of supercomplexes III/IV of *Saccharomyces cerevisiae* electron transport chain. Mitochondrion 44, 75–84. https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.01.003

Schaedler, T.A., Thornton, J.D., Kruse, I., Schwarzländer, M., Meyer, A.J., Veen, H.W. van, Balk, J., 2014. A Conserved Mitochondrial ATP-binding Cassette Transporter Exports Glutathione Polysulfide for Cytosolic Metal Cofactor Assembly. J. Biol. Chem. 289, 23264–23274. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.553438

Schneider, D., Berry, S., Volkmer, T., Seidler, A., Rögner, M., 2004. PetC1 is the major Rieske iron-sulfur protein in the cytochrome b6f complex of *Synechocystis sp.* PCC 6803. J. Biol. Chem. 279, 39383–39388. https://doi.org/10.1074/jbc.M406288200

Schwenkert, S., Netz, D.J.A., Frazzon, J., Pierik, A.J., Bill, E., Gross, J., Lill, R., Meurer, J., 2010. Chloroplast HCF101 is a scaffold protein for [4Fe-4S] cluster assembly. Biochem J 425, 207–218. https://doi.org/10.1042/BJ20091290

Seaton, B.L., Vickery, L.E., 1994. A gene encoding a DnaK/hsp70 homolog in *Escherichia coli*. PNAS 91, 2066–2070. https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2066

Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M., Dean, D.R., 2009. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. Annual Review of Biochemistry 78, 701–722. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812

Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Netz, D.J.A., Kerscher, S., Elsässer, H.-P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U., Lill, R., 2009. Human Ind1, an Iron-Sulfur Cluster Assembly Factor for Respiratory Complex I. Molecular and Cellular Biology 29, 6059–6073. https://doi.org/10.1128/MCB.00817-09

Sheftel, A.D., Wilbrecht, C., Stehling, O., Niggemeyer, B., Elsässer, H.-P., Mühlenhoff, U., Lill, R., 2012. The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. Mol. Biol. Cell 23, 1157–1166. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0772

Smith, A.D., Jameson, G.N.L., Dos Santos, P.C., Agar, J.N., Naik, S., Krebs, C., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., Johnson, M.K., 2005. NifS-Mediated Assembly of [4Fe−4S] Clusters in the N- and C-Terminal Domains of the NifU Scaffold Protein †. Biochemistry 44, 12955–12969. https://doi.org/10.1021/bi051257i

Stehling, O., Jeoung, J.-H., Freibert, S.A., Paul, V.D., Bänfer, S., Niggemeyer, B., Rösser, R., Dobbek, H., Lill, R., 2018. Function and crystal structure of the dimeric P-loop ATPase CFD1 coordinating an exposed [4Fe-4S] cluster for transfer to apoproteins. PNAS 115, E9085–E9094. https://doi.org/10.1073/pnas.1807762115

Stehling, O., Vashisht, A.A., Mascarenhas, J., Jonsson, Z.O., Sharma, T., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Wohlschlegel, J.A., Lill, R., 2012. MMS19 Assembles Iron-Sulfur Proteins Required for DNA Metabolism and Genomic Integrity. Science 337, 195–199. https://doi.org/10.1126/science.1219723

Ströher, E., Grassl, J., Carrie, C., Fenske, R., Whelan, J., Millar, A.H., 2016. Glutaredoxin S15 Is Involved in Fe-S Cluster Transfer in Mitochondria Influencing Lipoic Acid-Dependent Enzymes, Plant Growth, and Arsenic Tolerance in Arabidopsis. Plant Physiology 170, 1284–1299. https://doi.org/10.1104/pp.15.01308

Takahashi, Y., Tokumoto, U., 2002. A Third Bacterial System for the Assembly of Iron-Sulfur Clusters with Homologs in Archaea and Plastids. J. Biol. Chem. 277, 28380–28383. https://doi.org/10.1074/jbc.C200365200

Takubo, K., Morikawa, T., Nonaka, Y., Mizutani, M., Takenaka, S., Takabe, K., Takahashi, M., Ohta, D., 2003. Identification and molecular characterization of mitochondrial ferredoxins and ferredoxin reductase from Arabidopsis. Plant Mol. Biol. 52, 817–830.

Teplyakov, A., Obmolova, G., Sarikaya, E., Pullalarevu, S., Krajewski, W., Galkin, A., Howard, A.J., Herzberg, O., Gilliland, G.L., 2004. Crystal Structure of the YgfZ Protein from *Escherichia coli* Suggests a Folate-Dependent Regulatory Role in One-Carbon Metabolism. J. Bacteriol. 186, 7134–7140. https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7134-7140.2004

Tokumoto, U., Takahashi, Y., 2001. Genetic Analysis of the isc Operon in *Escherichia coli* Involved in the Biogenesis of Cellular Iron-Sulfur Proteins. J Biochem 130, 63–71. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002963

Torraco, A., Ardissone, A., Invernizzi, F., Rizza, T., Fiermonte, G., Niceta, M., Zanetti, N., Martinelli, D., Vozza, A., Verrigni, D., Nottia, M.D., Lamantea, E., Diodato, D., Tartaglia, M., Dionisi-Vici, C., Moroni, I., Farina, L., Bertini, E., Ghezzi, D., Carrozzo, R., 2017. Novel mutations in IBA57 are associated with leukodystrophy and variable clinical phenotypes. J Neurol 264, 102–111. https://doi.org/10.1007/s00415-016-8312-z

Touraine, B., Vignols, F., Przybyla-Toscano, J., Ischebeck, T., Dhalleine, T., Wu, H.-C., Magno, C., Berger, N., Couturier, J., Dubos, C., Feussner, I., Caffarri, S., Havaux, M., Rouhier, N., Gaymard, F., 2019. Iron–sulfur protein NFU2 is required for branched-chain amino acid synthesis in Arabidopsis roots. J Exp Bot 70, 1875–1889. https://doi.org/10.1093/jxb/erz050

Tse, E.C.M., Zwang, T.J., Barton, J.K., 2017. The Oxidation State of [4Fe4S] Clusters Modulates the DNA-Binding Affinity of DNA Repair Proteins. J. Am. Chem. Soc. 139, 12784–12792. https://doi.org/10.1021/jacs.7b07230

Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.-A., Lill, R., Mühlenhoff, U., 2013. The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. MBoC 24, 1830–1841. https://doi.org/10.1091/mbc.e12-09-0644

Uzarska, M.A., Nasta, V., Weiler, B.D., Spantgar, F., Ciofi-Baffoni, S., Saviello, M.R., Gonnelli, L., Mühlenhoff, U., Banci, L., Lill, R., 2016. Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. eLife 5. https://doi.org/10.7554/eLife.16673

Uzarska, M.A., Przybyla-Toscano, J., Spantgar, F., Zannini, F., Lill, R., Mühlenhoff, U., Rouhier, N., 2018. Conserved functions of Arabidopsis mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron-sulfur clusters. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1865, 1250–1259. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.06.003

Van Vranken, J.G., Jeong, M.-Y., Wei, P., Chen, Y.-C., Gygi, S.P., Winge, D.R., Rutter, J., 2016. The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. eLife 5, e17828. https://doi.org/10.7554/eLife.17828

Vignols, F., Bréhélin, C., Surdin-Kerjan, Y., Thomas, D., Meyer, Y., 2005. A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. PNAS 102, 16729–16734. https://doi.org/10.1073/pnas.0506880102

Vinella, D., Brochier-Armanet, C., Loiseau, L., Talla, E., Barras, F., 2009. Iron-Sulfur (Fe/S) Protein Biogenesis: Phylogenomic and Genetic Studies of A-Type

Carriers. PLOS Genetics 5, e1000497. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000497

Vo, A., Fleischman, N.M., Froehlich, M.J., Lee, C.Y., Cosman, J.A., Glynn, C.A., Hassan, Z.O., Perlstein, D.L., 2018. Identifying the Protein Interactions of the Cytosolic Iron–Sulfur Cluster Targeting Complex Essential for Its Assembly and Recognition of Apo-Targets. Biochemistry 57, 2349–2358. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00072

Volz, K., 2008. The functional duality of iron regulatory protein 1. Current Opinion in Structural Biology, Folding and Binding / Protein-nucleic acid interactions 18, 106–111. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.12.010

Vranish, J.N., Das, D., Barondeau, D.P., 2016. Real-Time Kinetic Probes Support Monothiol Glutaredoxins As Intermediate Carriers in Fe–S Cluster Biosynthetic Pathways. ACS Chem. Biol. 11, 3114–3121. https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00632

Wada, K., Hasegawa, Y., Gong, Z., Minami, Y., Fukuyama, K., Takahashi, Y., 2005. Crystal structure of *Escherichia coli* SufA involved in biosynthesis of iron–sulfur clusters: Implications for a functional dimer. FEBS Letters 579, 6543–6548. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.046

Waller, J.C., Alvarez, S., Naponelli, V., Lara-Nuñez, A., Blaby, I.K., Silva, V.D., Ziemak, M.J., Vickers, T.J., Beverley, S.M., Edison, A.S., Rocca, J.R., Gregory, J.F., Crécy-Lagard, V. de, Hanson, A.D., 2010. A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron-sulfur clusters in all domains of life. PNAS 107, 10412–10417. https://doi.org/10.1073/pnas.0911586107

Waller, J.C., Ellens, K.W., Alvarez, S., Loizeau, K., Ravanel, S., Hanson, A.D., 2012. Mitochondrial and plastidial COG0354 proteins have folate-dependent functions in iron–sulphur cluster metabolism. J Exp Bot 63, 403–411. https://doi.org/10.1093/jxb/err286

Wang, W., Huang, H., Tan, G., Si, F., Liu, M., Landry, A.P., Lu, J., Ding, H., 2010. In vivo evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in *Escherichia coli*. Biochem. J. 432, 429–436. https://doi.org/10.1042/BJ20101507

Webert, H., Freibert, S.-A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlenhoff, U., Banci, L., Lill, R., 2014. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. Nature Communications 5, 5013. https://doi.org/10.1038/ncomms6013

Wollers, S., Layer, G., Garcia-Serres, R., Signor, L., Clemancey, M., Latour, J.-M., Fontecave, M., Choudens, S.O. de, 2010. Iron-Sulfur (Fe-S) Cluster Assembly the SufBCD complex is a new type of Fe-S scaffold with a flavin redox cofactor. J. Biol. Chem. 285, 23331–23341. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.127449

Wydro, M.M., Sharma, P., Foster, J.M., Bych, K., Meyer, E.H., Balk, J., 2013. The Evolutionarily Conserved Iron-Sulfur Protein INDH Is Required for Complex I Assembly and Mitochondrial Translation in Arabidopsis. The Plant Cell 25, 4014–4027. https://doi.org/10.1105/tpc.113.117283

Xu, X.M., Lin, H., Latijnhouwers, M., Møller, S.G., 2009. Dual Localized AtHscB Involved in Iron Sulfur Protein Biogenesis in Arabidopsis. PLOS ONE 4, e7662. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007662

Xu, X.M., Møller, S.G., 2006. AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in Arabidopsis. EMBO J. 25, 900–909. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600968

Yabe, T., Nakai, M., 2006. Arabidopsis AtIscA-I is affected by deficiency of Fe–S cluster biosynthetic scaffold AtCnfU-V. Biochemical and Biophysical Research Communications 340, 1047–1052. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.104

Yakovlev, G., Reda, T., Hirst, J., 2007. Reevaluating the relationship between EPR spectra and enzyme structure for the iron–sulfur clusters in NADH:quinone oxidoreductase. PNAS 104, 12720–12725. https://doi.org/10.1073/pnas.0705593104

Yan, R., Adinolfi, S., Pastore, A., 2015. Ferredoxin, in conjunction with NADPH and ferredoxin-NADP reductase, transfers electrons to the IscS/IscU complex to promote iron–sulfur cluster assembly. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, Cofactor-dependent proteins: evolution, chemical diversity and bio-applications 1854, 1113–1117. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.02.002

Yan, R., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Roche, B., Kelly, G., Simon, L., Martin, S.R., Py, B., Barras, F., Svergun, D.I., Pastore, A., 2013. Ferredoxin Competes with Bacterial Frataxin in Binding to the Desulfurase IscS. J. Biol. Chem. 288, 24777–24787. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.480327

Yeung, N., Gold, B., Liu, N.L., Prathapam, R., Sterling, H.J., Willams, E.R., Butland, G., 2011. The E. coli Monothiol Glutaredoxin GrxD Forms Homodimeric and Heterodimeric FeS Cluster Containing Complexes. Biochemistry 50, 8957–8969. https://doi.org/10.1021/bi2008883

Yokoyama, N., Nonaka, C., Ohashi, Y., Shioda, M., Terahata, T., Chen, W., Sakamoto, K., Maruyama, C., Saito, T., Yuda, E., Tanaka, N., Fujishiro, T., Kuzuyama, T., Asai, K., Takahashi, Y., 2018. Distinct roles for U-type proteins in iron–sulfur cluster biosynthesis revealed by genetic analysis of the *Bacillus subtilis sufCDSUB* operon. Molecular Microbiology 107, 688–703. https://doi.org/10.1111/mmi.13907

Yuda, E., Tanaka, N., Fujishiro, T., Yokoyama, N., Hirabayashi, K., Fukuyama, K., Wada, K., Takahashi, Y., 2017. Mapping the key residues of SufB and SufD essential for biosynthesis of iron-sulfur clusters. Scientific Reports 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09846-2

Zhang, B., Bandyopadhyay, S., Shakamuri, P., Naik, S.G., Huynh, B.H., Couturier, J., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. Monothiol Glutaredoxins Can Bind Linear [Fe3S4]+ and [Fe4S4]2+ Clusters in Addition to [Fe2S2]2+ Clusters: Spectroscopic Characterization and Functional Implications. J. Am. Chem. Soc. 135, 15153–15164. https://doi.org/10.1021/ja407059n

Zhang, B., Crack, J.C., Subramanian, S., Green, J., Thomson, A.J., Brun, N.E.L., Johnson, M.K., 2012. Reversible cycling between cysteine persulfide-ligated [2Fe-2S] and cysteine-ligated [4Fe-4S] clusters in the FNR regulatory protein. PNAS 109, 15734–15739. https://doi.org/10.1073/pnas.1208787109

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., Dean, D.R., 1998. Assembly of Iron-Sulfur Clusters Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. J. Biol. Chem. 273, 13264–13272. https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.13264

Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Dean, D.R., 1994. Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalyzed by the *nifS* Gene Product. Biochemistry 33, 4714–4720. https://doi.org/10.1021/bi00181a031

Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., Dean, D.R., 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. PNAS 90, 2754–2758. https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.2754

Zuo, J., Wu, Z., Li, Y., Shen, Z., Feng, X., Zhang, M., Ye, H., 2017. Mitochondrial ABC Transporter ATM3 Is Essential for Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly. Plant Physiology 173, 2096–2109. https://doi.org/10.1104/pp.16.01760

Résumé :

De nombreux processus cellulaires tels que la respiration, la photosynthèse, l'assimilation du soufre et de l'azote ou encore la synthèse de vitamines ou de métabolites secondaires, dépendent de protéines à centre fer-soufre (Fe-S). Chez les plantes, la maturation de protéines Fe-S chloroplastiques, mitochondriales et cytosoliques ou nucléaires repose sur les machineries SUF, ISC et CIA respectivement. Dans le chloroplaste, un centre Fe-S, assemblé sur un complexe d'échafaudage $SUFBC_2D$, est transféré *via* un ensemble de protéines de transfert vers les protéines cibles. L'objectif était de comprendre le rôle des protéines de transfert SUFA1, IBA57.2 et NFU1 en analysant leur capacité à lier des centres Fe-S et en isolant leurs partenaires au sein de la machinerie SUF et parmi les cibles chloroplastiques connues afin d'élucider les mécanismes moléculaires de ces interactions. Les expériences de reconstitution de centres Fe-S *in vitro* à partir des protéines recombinantes ont montré que SUFA1, NFU1 et le complexe SUFA1-IBA57.2 lient différents types de centres Fe-S. De plus, NFU1 incorpore un centre [4Fe-4S] au sein d'un dimère qui peut être transféré vers SUFA1, mais aussi vers les protéines cibles ISPG et THIC, deux enzymes impliquées dans la synthèse des isoprénoïdes et de la thiamine. L'ensemble des interactions identifiées par double hybride en levure et/ou BiFC pour ces protéines, mais aussi pour NFU2, NFU3 et HCF101, ont permis d'affiner leurs rôles respectifs dans la maturation des quelques 50 protéines Fe-S chloroplastiques.

Mots-clés : chloroplaste, centres Fe-S, NFU, SUFA, IBA57, Arabidopsis

Abstract:

Numerous cellular processes such as respiration, photosynthesis, nitrogen and sulfur assimilation or vitamin and secondary metabolite synthesis, rely on iron-sulfur (Fe-S) proteins. In plants, the maturation of chloroplastic, mitochondrial and cytosolic or nuclear proteins depends on the SUF, ISC and CIA machineries respectively. In plastids, an Fe-S cluster is assembled on the $SUFBC_2D$ scaffold complex before being transferred to target proteins *via* transfer proteins. The objective was to understand the role of the SUFA1, IBA57.2 and NFU1 transfer proteins by analyzing their ability to bind Fe-S clusters and isolating their partners within the SUF machinery and among known chloroplastic targets in order to elucidate the molecular mechanisms of these interactions. *In vitro* Fe-S cluster reconstitution experiments using recombinant proteins have shown that SUFA1, NFU1 and the SUFA1-IBA57.2 complex bind different types of Fe-S clusters. In addition, NFU1 binds a [4Fe-4S] cluster within a dimer that can be transferred to SUFA1, but also to the target proteins, ISPG and THIC, two enzymes involved in the synthesis of isoprenoids and thiamine. All the interactions identified by yeast two-hybrid and/or BiFC for these proteins, but also for NFU2, NFU3 and HCF101, allowed refining their respective roles for the maturation of some of the 50 chloroplastic Fe-S proteins.

Keywords: Chloroplast, Fe-S cluster, NFU, SUFA, IBA57, Arabidopsis