



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE 414 : Sciences de la Vie et de la Santé

UPR 2357 CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg

THÈSE DE DOCTORAT présentée par :

Nicolas CORRE

Soutenu le : 23 novembre 2022

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

CARACTÉRISATION DE L'ATTACHEMENT DU MITORIBOSOME A LA MEMBRANE INTERNE DES MITOCHONDRIES CHEZ LES PLANTES TERRESTRES.

THÈSE dirigée par :

Dr Philippe GIEGÉ

Directeur de recherche, IBMP, CNRS Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr Nathalie BONNEFOY

Directrice de recherche, I2BC, CNRS Paris-Saclay

Dr Yves CHOQUET

Directeur de recherche, IBPC, CNRS Paris

EXAMINATEURS :

Dr Magali FRUGIER

Directrice de recherche, IBMC, CNRS Strasbourg

MEMBRE INVITÉ :

Dr Aline PROBST

Directrice de recherche, GReD, CNRS Clermont-Ferrand

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier tous les membres de mon jury, Yves Choquet, Nathalie Bonnefoy et Magali Frugier, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également Aline Probst d'avoir accepté de participer à ma thèse en tant que membre invité.

Je remercie chaleureusement Philippe de m'avoir accepté au sein de l'équipe alors que je n'étais jamais venu à Strasbourg et de m'avoir fait confiance. Tu restes optimiste et dynamique même quand tout ne va pas comme prévu, et ça fait du bien au moral. Je suis très heureux d'avoir postulé pour cette offre de thèse et d'avoir rencontré toute une équipe chaleureuse !

En parlant de l'équipe, je vous remercie tous pour votre soutien, votre enthousiasme, et tout ce que vous m'avez apporté durant ces quatre années à vos côtés dans le laboratoire. Géraldine qui est récemment partie à la retraite, de très bons conseils, et qui va manquer au laboratoire et à l'institut (l'âme de l'IBMP !), Anthony toujours prêt à rigoler et qui m'a guidé sur la technique de CRISPR malgré les déconvenues, Mathilde qui est toujours là pour aider sur une technique nouvelle ou pour discuter du projet entre deux expériences.

Bien sûr je n'oublie pas Yifat avec qui j'ai passé de très bon moment pendant deux ans et demi au travail et en dehors du boulot, tu as été un bon ami et d'une aide précieuse. Bon courage pour ta thèse !

Merci à tous les autres doctorants de l'équipe avec qui j'ai travaillé, en commençant par Florent sans qui beaucoup de résultats (passés et futurs) n'existeraient pas, Mathieu qui m'a fait me sentir à l'aise dans l'équipe, et Jérémy, Léna et Vassileios qui vont continuer après moi, ne lâchez rien vous allez y arriver !

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé dans l'institut, avec qui j'ai discuté ou même celles qui m'ont croisé et dit bonjour, avec des remerciements particuliers à Nicolas pour la production et purification de protéine et Malek et Sandrine pour l'HRM et les nombreux séquençages. Merci aussi à Lauriane, Philippe et Johana de la plateforme de protéomique de l'IBMC à qui j'ai envoyé de nombreux échantillons et qui m'ont aidé avec l'analyse de mes résultats. Discuter avec vous de mon projet a toujours été un plaisir. Je remercie également au passage Hélène et son script R, et son aide précieuse pour savoir le manier correctement.

Merci à tous les autres doctorants présents et passés de l'IBMP avec qui j'ai discuté ou suis sorti pour me changer les idées, Anne, Caroline, Déborah, Emilie, Erwan, Hélène, Herrade, Lucas, Lucie, Sébastien, Valentin, ... (liste non exhaustive, par ordre alphabétique pour qu'il n'y ait pas de jaloux)

Je remercie bien sûr mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes études, même lors des périodes difficiles et des changements de cap, papa, maman, merci du fond du cœur.

Je remercie enfin Mathilde de m'avoir soutenu pendant toutes les dernières années de ma thèse et d'avoir rendu cette fin stressante de thèse douce et réconfortante. J'espère que j'arriverais à faire la même chose pour toi l'année prochaine Mathoux.

« Parfois, le chemin est dur. »

Abréviations

a.a. : acide aminé	GDP : Guanosine diphosphate
ADN : acide désoxyribonucléique	GFP : Green Fluorescent Protein
ADNk : ADN kinétoplastique	GST : Glutathion-S-Transférase
ADN-T : AND de transfert	GTP : Guanosine triphosphate
ADP : Adénosine diphosphate	His : Histidine
AGI : Arabidopsis Genome Initiative	HRM : High Resolution Melting
ARN : acide ribonucléique	IMM : Membrane Interne Mitochondriale
ARNg : ARN guide	IMS : Espace Inter Membranaire
ARNi : ARN interférence	IP : Immuno-précipitation
ARNm : ARN messenger	IPTG : isopropylthio- β -galactoside
ARNr : ARN ribosomique	LC-MS/MS : Liquid Chromatography-mass spectrometry
ARNt : ARN de transfert	LECA : Last Eukaryotic Common Ancestor
Asn : Asparagine	LSU : grande sous-unité du ribosome
ATP : Adénosine triphosphate	MAM : Membranes Associées aux Mitochondries
Ca²⁺ : Calcium	MCP : Mort Cellulaire Programmée
CAT : Cycle de l'Acide Tricarboxylique	Met : Methionine
CDS : séquence ADN codante	MTS : Séquence de Ciblage vers la Mitochondrie
Co-IP : co-Immuno-précipitation	NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide
CORR : Co-location for Redox Regulation	NEP : Nuclear-Encoded Polymerase
CP : Protubérance centrale	Ni-NTA : Nickel-Acide Nitrilotriacétique
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	Oxa : Oxydase assembly factor
Cryo-EM : microscopie électronique cryogénique	OXPHOS : Phosphorylation Oxydative
Cryo-ET : tomographie électronique cryogénétique	PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
CTE : Chaîne de transport des électrons	PCR : Polymerase Chain Reaction
Da : Dalton	Phe : Phénylalanine
FAD : Flavin adenine dinucleotide	P_i : Phosphate inorganique
Fe/S : Fer/Soufre	

PMF : proton motive force
PNPase : polynucléotide phosphorylase
PPR : pentatricopeptide repeats
PRORP : protein only RNase P
PS : Photosystème
PTC : centre peptidyl transférase
PVDF : Polyvinylidene fluoride
RBD : Ribosome Binding Domain
rPPR : PPR ribosomique
SCM : Sites de Contact Membranaire
SD : Shine-Dalgarno

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SSU : petite sous-unité du ribosome
TIM : Translocase de la Membrane Interne
TM : transmembranaire
TPR : tetratricopeptide repeats
UTR : Région non traduite
UV : Ultraviolets
VDAC : Canal Ionique Voltage Dépendant
Val : Valine
WT : Sauvage

Liste des figures

Figure 1 : L'arbre du vivant.

Figure 2 : Structure et organisation générale des mitochondries.

Figure 3 : La chaîne de transport des électrons et la phosphorylation oxydative (OXPHOS).

Figure 4 : Comparaison de la taille et de la composition des génomes mitochondriaux.

Figure 5 : Structure des protéines PPR et mode de reconnaissance canonique des ARNs simples brins.

Figure 6 : Répartition du nombre de protéines PPR exprimées parmi les différents groupes d'eucaryotes.

Figure 7 : L'édition des ARN mitochondriaux de C en U par des protéines PPR.

Figure 8 : La traduction des protéines chez les eucaryotes et les bactéries.

Figure 9 : La formation du complexe d'initiation de la traduction mitochondriale chez les mammifères.

Figure 10 : Différences de taille et de composition en protéines des ribosomes mitochondriaux chez différents organismes.

Figure 11 : Comparaison des structures des ribosomes mitochondriaux chez des organismes variés.

Figure 12 : Structure et composition du ribosome mitochondrial de plante.

Figure 13 : Structure des différentes insertases de la famille Oxa1/YidC/Alb3.

Figure 14 : Mode de fonctionnement des insertases Oxa1/YidC/Alb3 pour l'insertion de domaines membranaires dans la membrane plasmique.

Figure 15 : Oxa1a, l'insertase de la membrane interne des mitochondries de plante.

Figure 16 : Comparatif des mécanismes d'attachement à la membrane mitochondriale interne chez les mammifères et chez la levure.

Figure 17 : Le mécanisme d'attachement à la membrane mitochondriale interne chez l'Homme.

Figure 18 : Le mécanisme d'attachement à la membrane mitochondriale interne chez *Chlamydomonas*.

Figure 19 : Génotypage de lignées d'*Arabidopsis* décrites comme possédant une insertion d'ADN-T dans le gène Oxa1a.

Figure 20 : Conception des ARN guides et sélection des mutants CRISPR-cas9.

Figure 21 : Vérification de la présence du transgène CRISPR-cas9 dans la descendance des plantes agrotransformées.

Figure 22 : Génotypage des mutants d'Oxa1a obtenus par CRISPR-cas9.

Figure 23 : Schéma des différentes constructions génétiques réalisées pour les expériences de complémentation chez *Arabidopsis thaliana*.

Figure 24 : Tests d'inductions de la protéine recombinante 6His-GST-Oxa1aC-ter et analyse de sa solubilité par Western Blot.

Figure 25 : Production et purification de la protéine 6His-GST-Oxa1RBD par chromatographie d'affinité avec de la résine Ni-NTA en « batch », et visualisation des différentes fractions par Western Blot.

Figure 26 : Co-immunoprécipitation de la protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter en présence de lysat de mitochondries de chou-fleur.

Figure 27 : Profil d'absorbance à 260nm d'un gradient de sucrose 10-30% pour la purification de mitoribosomes de plante.

Figure 28 : Co-immunoprécipitation de la protéine 6His-GST-Oxa1a C-ter en présence de ribosomes mitochondriaux de chou-fleur purifiés.

Figure 29 : Western Blot des co-immunoprécipitation entre myc-Oxa1aRBD et des protéines candidates étiquetées HA coexprimées transitoirement dans *N. benthamiana*.

Figure 30 : Analyse du mitoribosome de plante par cryo-EM.

Figure 31 : Analyse des mitoribosomes de plante par cryo-ET.

Figure 32 : Génotypage de lignées d'Arabidopsis décrites comme possédant une insertion d'ADN-T dans les gènes mtIF2 et mtIF3.

Figure 33 : Prédiction de domaines structuraux coiled-coil pour Oxa1.

Figure 34 : Site de contact potentiel entre le ribosome mitochondrial de plante et la membrane interne mitochondriale.

Figure 35 : Comparaison des séquences protéiques des RBD d'Oxa1a et d'Oxa1L et des protéines uL24m chez Arabidopsis et chez l'Homme.

Table des matières

INTRODUCTION	1
L'APPARITION DES ORGANITES : L'ACCELERATEUR DE L'EVOLUTION DES EUCARYOTES	2
<i>Les mitochondries dans l'évolution</i>	2
<i>Les usines énergétiques des eucaryotes</i>	4
CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DU GROUPE DES PLANTES (VIRIDIPLANTAE)	7
VUE D'ENSEMBLE DE LA MITOCHONDRIE CHEZ LES PLANTES TERRESTRES	9
<i>Structure générale de la mitochondrie</i>	9
<i>Fonctions métaboliques de la mitochondrie</i>	12
LE GENOME MITOCHONDRIAL	14
Taille et contenu en gènes.....	14
Organisation et structure	17
La conservation du génome mitochondrial	18
L'EXPRESSION DES GENES MITOCHONDRIAUX	19
<i>La transcription</i>	20
<i>Maturation et dégradation</i>	21
Les protéines PPR	21
Protection et maturation des extrémités 3' et 5'	25
Édition de l'ARN mitochondrial	25
Épissage des introns	27
LA SYNTHÈSE DES PROTEINES DANS LA MITOCHONDRIE.....	28
<i>Généralités sur la traduction des protéines</i>	28
<i>Caractéristiques des ribosomes mitochondriaux</i>	33
<i>Spécificités du ribosome mitochondrial des plantes</i>	42
STRUCTURES ET CARACTERISTIQUES DE L'INSERTASE OXA1.....	48
<i>La superfamille d'insertases YidC/Alb3/Oxa1</i>	49
Caractéristiques des YidC	51
Caractéristiques des Alb3	56
Les insertases du réticulum endoplasmique	57
<i>Fonctions d'Oxa1 dans la membrane interne des mitochondries</i>	58
Oxa1 chez les plantes terrestres.....	60
L'ATTACHEMENT DU MITORIBOSOME A LA MEMBRANE	62
<i>Caractéristiques de l'attachement à la membrane chez la levure, les mammifères et Chlamydomonas</i> ...	64
OBJECTIF DE LA THESE	68
RESULTATS	69

RECHERCHE DE PLANTES MUTANTES POUR OXA1A	70
OBTENTION D'UN MUTANT D'OXA1A A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DE CRISPR-CAS9	72
CREATION DE CONSTRUCTIONS POUR DES EXPERIENCES DE COMPLEMENTATION	77
PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE PROTEINE DE FUSION 6HIS-GST-OXA1AC-TER.....	79
CO-IMMUNOPRECIPITATIONS A L'AIDE DE LA PROTEINE DE FUSION 6HIS-GST-OXA1AC-TER.....	83
<i>Utilisation d'extraits de mitochondries totales de chou-fleur</i>	83
<i>Utilisation d'extraits de mitoribosome purifié</i>	87
EXPERIENCES D'EXPRESSION TRANSITOIRE DANS <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> POUR TESTER L'INTERACTION DIRECTE ENTRE OXA1ARBND ET DES PROTEINES CANDIDATES.....	91
ANALYSE PAR CRYO-EM DES MITORIBOSOMES DE PLANTE	93
ETUDE STRUCTURALE DE L'INTERACTION DE OXA1ARBND AVEC LE MITORIBOSOME.....	93
ANALYSE <i>IN SITU</i> DES MITORIBOSOMES DE PLANTE PAR CRYO-TOMOGRAPHIE ELECTRONIQUE (CRYO-ET)	97
AUTRES ASPECTS DE L'ETUDE DES SPECIFICITES DE LA TRADUCTION DES MITOCHONDRIES DE PLANTE.....	99
<i>Initiation de la traduction mitochondriale chez les plantes</i>	99
Génotypage de lignées mutantes pour les gènes codant pour mtlF2 et mtlF3.....	101
Constructions de vecteurs pour exprimer mtlF2 et mtlF3 étiquetées sous contrôle de leur promoteur endogène	101
DISCUSSION	102
<i>Importance du Ribosome Binding Domain d'Oxa1a pour la survie de la plante</i>	103
<i>Stabilité du domaine de liaison au ribosome d'Oxa1a</i>	104
<i>Résultat des expériences de Co-IP et choix de protéines candidates qui pourraient interagir directement avec Oxa1a-RBD</i>	107
PERSPECTIVES A COURT TERME.....	112
PERSPECTIVES A LONG TERME	112
CONCLUSION GENERALE.....	113
MATERIEL ET METHODES	115
MATERIEL BIOLOGIQUE.....	115
<i>Lignées de plantes</i>	115
<i>Souches bactériennes</i>	115
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	116
<i>Plasmides</i>	116
<i>Amorces et oligonucléotides</i>	118
<i>Anticorps</i>	120
Primaires.....	120
Secondaires	120
METHODES	120
<i>Méthodes d'analyse des acides nucléiques</i>	120

Clonage GATEWAY.....	120
Clonage GoldenBraid.....	121
Transformation bactérienne par choc thermique.....	121
Amplification de l'ADN par PCR.....	122
Electrophorèse sur gel d'agarose.....	123
Extraction d'ARN totaux de plantes.....	123
Purification des plasmides.....	123
Quantification.....	124
Séquençage Sanger.....	124
Extraction rapide de l'ADN de plante pour génotypage.....	124
HRM.....	125
<i>Méthodes d'analyse des protéines</i>	125
Extraction de protéines totales.....	125
Quantification des protéines.....	126
<i>Expression de protéines</i>	127
Test d'induction.....	127
Purification de protéine.....	127
<i>Co-immunoprecipitation de protéines</i>	128
<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)</i>	129
<i>Transfert des protéines sur une membrane PVDF en système liquide</i>	129
<i>Immunodétection des protéines (Western Blot)</i>	130
<i>Analyses LC-MS/MS</i>	130
<i>Agroinfiltration par floraldip</i>	131
<i>Criblage des graines transformées</i>	131
<i>Expression transitoire de protéines dans des feuilles de Nicotiana benthamiana</i>	132
<i>Stérilisation de graines</i>	132
<i>Purification de mitochondries</i>	132
<i>Purification de ribosomes à partir de mitochondries</i>	134
<i>Cryo Microscopie électronique</i>	134
Préparation des grilles.....	134
Collecte de données par cryo microscopie électronique.....	135
Acquisition des données de tomographie cryo-électronique.....	135
Évaluation des échantillons de ribosomes par microscopie électronique à transmission.....	135
Analyse des images de cryo-EM.....	136
Analyse des tomogrammes.....	136
<i>Analyses bioinformatiques</i>	136
BIBLIOGRAPHIE	138
ANNEXES	162

Introduction

L'apparition des organites : l'accélérateur de l'évolution des eucaryotes

Les mitochondries dans l'évolution

Les premières traces de vie avérées remontent à 3,8 milliards d'années, soit un peu plus de 500 millions d'années après la formation de la Terre, ce qui est relativement tôt dans l'histoire de la Terre. Avant l'émergence de la cellule, une ère « pré-biotique » a vu le développement des composants moléculaires nécessaires à la vie. Une des théories les plus répandues est celle du « monde ARN », supposant que la première molécule complexe à être apparue lors de cette période « pré-biotique » était l'ARN. Au début de l'évolution de la Terre, des molécules d'ARN auto-répliquatives auraient proliféré avant l'apparition de l'ADN et des protéines (Bernhardt, 2012). Cette théorie est soutenue par le fait que plusieurs composants centraux de la cellule, comme le ribosome – la machine cellulaire universelle qui synthétise les protéines – sont composés principalement d'ARN. De plus, l'existence de ribozymes et de riboswitches, des ARN capables de favoriser une réaction chimique à la manière d'une enzyme, soutient l'hypothèse que des ARN pouvaient catalyser des réactions complexes avant l'apparition des protéines. Les exemples principaux de ribozymes sont celui de la RNase P, catalysant le clivage de la liaison entre deux ribonucléotides pour maturer les ARNt en 5' et le ribozyme présent dans le ribosome, qui est la principale molécule responsable de la réaction de peptidyl-transférase, permettant la liaison de deux acides aminés, même si des protéines partenaires additionnelles sont indispensables (Westhof, 2012). L'ADN serait apparu plus tard dans l'Histoire de la Terre, sa plus grande stabilité permettant une conservation et une transmission d'informations sur le long terme.

Pendant environ 2 milliards d'années, la Terre fut ensuite peuplée d'organismes unicellulaires simples. Les organismes vivants « complexes » ne sont apparus que beaucoup plus tard, il y a environ 1,6 à 2 milliards d'années. Tous les organismes morphologiquement complexes (comme les plantes, les animaux et les champignons) et les « protistes » unicellulaires (comme *Trypanosoma brucei* ou *Plasmodium falciparum*) descendent d'un ancêtre commun unique que l'on nomme LECA pour Last Eukaryotic Common Ancestor. Ils forment donc un groupe phylogénétique que l'on dit monophylétique, appelé Eukarya (littéralement « vrai noyau »)

ou plus communément Eucaryotes, nommé historiquement d'après leur principale caractéristique morphologique qui consiste en la présence d'un noyau enfermé dans une membrane contenant l'information génétique de la cellule. L'autre grand groupe d'organismes, les premiers à être apparus sur Terre, est appelé procaryotes en opposition aux eucaryotes car ils ne possèdent pas de noyau. Il regroupe les bactéries et les archées. Même si la présence ou non d'un noyau était initialement la base de classement des eucaryotes, de nombreux autres traits cellulaires et moléculaires caractéristiques permettent de définir si un organisme appartient aux eucaryotes. On peut citer par exemple que le noyau doit abriter des pores nucléaires, et que l'on trouve une lamelle nucléaire et des chromosomes linéaires avec des télomères à l'intérieur du noyau, facilitant la reproduction sexuée. On retrouve des mécanismes de régulation complexes comme la chromatine (présence d'histones), des systèmes d'ARNi et de petits ARN non-codants qui orchestrent l'expression des gènes à différents niveaux. La transcription et la traduction sont découplées et impliquent un traitement poussé de l'ARNm (notamment l'épissage des introns, la dépose d'une coiffe et la polyadénylation). La traduction met en action des ribosomes spécifiques aux eucaryotes et de nombreux facteurs de traduction supplémentaires. On trouve en outre toujours un système de régulation et de recyclage des protéines élaboré, composé du protéasome et d'un système de signalisation par l'ubiquitine. La cellule eucaryote est de plus fortement compartimentée et possède un système endomembranaire sophistiqué composé du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, des endosomes, des peroxysomes et des lysosomes. Le trafic intracellulaire et la motilité cellulaire est permise par un cytosquelette, à base d'actine et de tubuline et des protéines motrices associées. Celui-ci permet aussi de posséder un cycle cellulaire complexe incluant la méiose permettant la reproduction sexuée. Un large éventail de lipides et de phospholipides sont synthétisés par les eucaryotes spécifiquement (comme les stérols et les sphingolipides). Et enfin, les eucaryotes sont bien sûr les hôtes de mitochondries aérobies (ou facultativement aérobies) qui descendent d'une alphaprotéobactérie vivant autrefois librement.

Originellement, les travaux de Carl Woese et de son équipe ont montré que toute la vie cellulaire pouvait être divisée en trois grandes lignées évolutives : les Eucaryotes, les Bactéries et les Archées. De nos jours, avec les nombreuses analyses phylogénétiques moléculaires réalisées et une meilleure compréhension des archées, on favorise un arbre à deux domaines, les eucaryotes et les archées étant des groupes frères (Fig. 1) (Zaremba-Niedzwiedzka et al.,

2017). Les eucaryotes sont malgré cela des organismes chimériques. Si l'on examine les génomes eucaryotes, on constate qu'une grande partie des gènes peuvent être rattachés à des procaryotes (36% chez la levure (Cotton & McInerney, 2010)), la plupart pouvant être attribués à des bactéries (55 à 70%). Cette énorme proportion de gènes d'origine bactérienne provient en partie du caractère symbiotique des mitochondries. Lynn Margulis proposait déjà dans les années 60 que les eucaryotes résultaient d'une série d'événements d'endosymbiose, qu'il appelait « théorie de l'endosymbiose sérielle » (Sagan, 1967). Cette théorie stipule que plusieurs bactéries ont coopéré si étroitement que certaines cellules se sont logées dans d'autres et ont conduit à la formation de toute la compartimentation complexe des eucaryotes et celle du noyau. Cette théorie bien que fautive pour la compartimentation eucaryote, ne l'est pas entièrement, car des événements d'endosymbiose ont bien eu lieu au moins deux fois au cours de l'évolution des eucaryotes (Fig. 1) (Lane, 2017). L'endosymbiose a eu lieu une première fois au cours de l'évolution précoce des eucaryotes avant l'apparition de LECA, il y a plus de 2 milliards d'années, conduisant à ce que nous connaissons maintenant comme la mitochondrie, qui est conservée parmi presque tous les eucaryotes. La seconde endosymbiose se serait produite plus tard, il y a environ 1,5 milliard d'années, amenant à l'acquisition du chloroplaste et l'apparition du phylum des « plantes vertes » ou Viridiplantae (regroupant les algues vertes et les plantes terrestres) au sein des eucaryotes (Fig. 1) (Dorrell & Howe, 2012). Ces deux composants des cellules eucaryotes, communément appelés « organites », sont principalement des compartiments producteurs d'énergie.

Les usines énergétiques des eucaryotes

Ces compartiments peuvent tous deux produire de l'énergie grâce à la présence dans leur système membranaire d'une chaîne de transport des électrons (CTE). Celle-ci repose sur une série de complexes protéiques qui transfèrent les électrons des donneurs d'électrons aux accepteurs d'électron, par le biais de réactions d'oxydoréduction. Ce transfert d'électrons est couplé avec le transfert de protons à travers une membrane. Le flux de protons à travers la membrane crée un gradient électrochimique, entraînant l'ATP synthase ce qui permet, tous les dix protons qui la traversent, la rotation complète de la tête de l'ATP synthase et de transformer 3 molécules d'ADP en 3 molécules d'ATP, la molécule qui sera utilisée comme énergie dans tous les processus métaboliques (Abrahams et al., 1994). Ce processus dans les

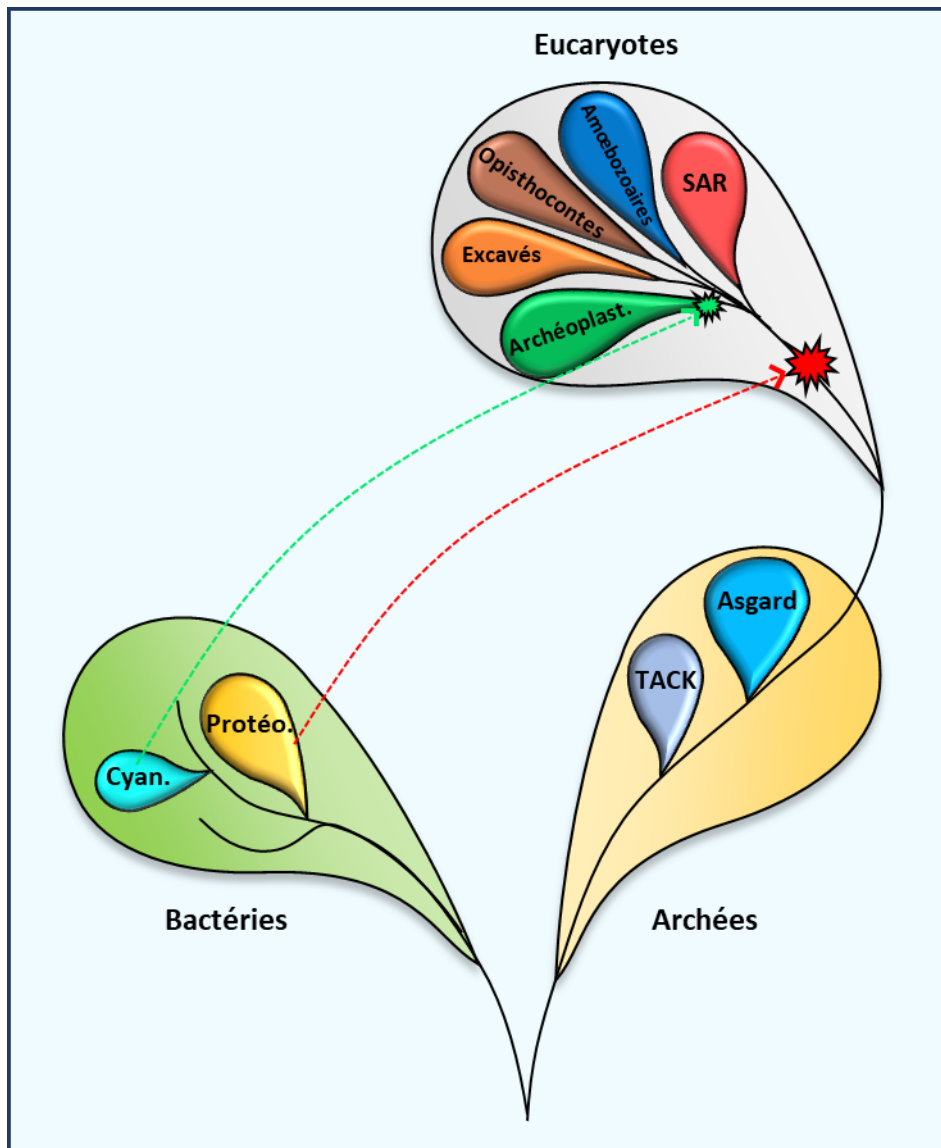


Figure 1 : L'arbre du vivant

Représentation schématique de l'arbre du vivant. Originellement, toute la vie cellulaire a été divisée entre trois grandes lignées évolutives : les Eucaryotes, les Bactéries et les Archées. Mais il a été découvert par la suite que les eucaryotes étaient issus des archées, d'où un arbre du vivant à deux domaines. Les flèches rouges et vertes pointillées représentent les deux principaux événements d'endosymbiose : en rouge, entre une α -protéobactérie et l'ancêtre des eucaryotes, et en vert, entre une cyanobactérie et l'ancêtre des Archéoplastidiés.

mitochondries s'appelle la phosphorylation oxydative. Un phénomène assez similaire se produit dans le chloroplaste, la photophosphorylation, mais ce processus est dépendant de la lumière contrairement à la phosphorylation oxydative. La principale innovation évolutive par rapport à cette dernière est l'ajout des pigments de chlorophylle permettant d'utiliser l'énergie du soleil pour créer un électron à très haute énergie qui scinde une molécule d'eau, libérant du dioxygène (O₂) et des protons. Les électrons se déplacent ensuite spontanément du donneur à l'accepteur à travers la chaîne de transport des électrons.

Le fait que les mitochondries aient été conservées sous une forme ou une autre par tous les eucaryotes (sous forme par exemple de mitosomes ou d'hydrogénosomes), à l'exception d'un protiste parasite monocercaromonade qui a entièrement perdu ses mitochondries, atteste de la nature symbiotique des eucaryotes à l'origine (Karnkowska et al., 2016). Contrairement à ce que le terme employé peut faire croire, cette coopération n'était certainement pas aussi symbiotique que ce qu'on imagine, l'hôte initial ayant plus ou moins asservi l'endosymbiote initial *in fine*. En effet, la mitochondrie est désormais non autonome et la grande majorité des gènes initialement codés dans l'endosymbiote ont été soit perdus, soit transférés dans le noyau de la cellule hôte. Ces mitochondries ont été transformées en usines énergétiques au profit de la cellule hôte, libérant la contrainte énergétique de ces cellules et donnant un énorme coup de pouce à l'évolution. En effet, en comparant l'énergie disponible par gène entre un procaryote et un eucaryote, un gène nucléaire eucaryote bénéficie de près de 5000 fois plus de flux énergétique qu'un gène procaryote (Lane, 2011; Lane & Martin, 2010). Les procaryotes ne pouvant générer de l'énergie qu'en pompant des protons à travers leur membrane cellulaire, l'énergie qu'ils peuvent produire est donc limitée par leur taille. En revanche, les eucaryotes possèdent des centaines de mitochondries dans une seule cellule, ce qui leur permet de produire beaucoup d'énergie. Avec cette nouvelle puissance disponible, les eucaryotes ont pu développer de nombreuses nouvelles fonctions, mais ont surtout pu se libérer de cette contrainte structurelle de la taille de la cellule et de leur génome. Les cellules eucaryotes sont beaucoup plus grandes (10 à 100 fois environ), avec des génomes beaucoup plus grands (40 à 600 fois environ), et la structure cellulaire elle-même est beaucoup plus complexe par rapport aux procaryotes. C'est aussi cette abondance énergétique qui a probablement contribué à l'expansion rapide des eucaryotes, que l'on regroupe en cinq supergroupes d'organismes aujourd'hui (Adl et al., 2012).

Dans l'ensemble, l'endosymbiose a eu un impact profond sur tous les eucaryotes. L'acquisition des mitochondries marque une étape cruciale dans l'émergence des eucaryotes et constitue l'un des plus frappants exemples de transition évolutive. Outre les questions liées à l'évolution, la mitochondrie est très étudiée pour la santé humaine, car son dysfonctionnement est associé à un nombre croissant de troubles héréditaires, ainsi que des maladies plus courantes, telles que les cardiomyopathies, les troubles neurodégénératifs, le cancer et même l'obésité (De Silva et al., 2015; Nunnari & Suomalainen, 2012). Chez les plantes, cet organite attire aussi l'attention car des mutations de son génome spécifient un trait largement répandu qui conduit à une incapacité des plantes à produire du pollen fonctionnel, que l'on appelle « stérilité mâle cytoplasmique ». Comprendre les mitochondries végétales présente donc un intérêt agronomique important (L. Chen & Liu, 2014; Horn et al., 2014).

Caractéristiques principales du groupe des plantes (Viridiplantae)

Le terme « plante » désigne un groupe d'organismes eucaryotes qui possèdent les caractéristiques suivantes : multicellularité, possession d'une paroi cellulaire composée de cellulose et capacité à réaliser la photosynthèse à l'aide de chloroplastes, en utilisant la lumière, l'eau et le dioxyde de carbone pour synthétiser des nutriments, ce qui en fait des organismes autotrophes. Le clade des Viridiplantae ou « plantes vertes » englobe comme dit précédemment les algues vertes, principalement aquatiques, et les plantes terrestres ou embryophytes), qui ont émergé en leur sein. Les embryophytes comprennent les plantes vasculaires, comme les fougères, les conifères et les plantes à fleurs (ou angiospermes). Les plantes terrestres, contrairement à d'autres organismes photosynthétiques, ne se déplacent pas au cours de leur croissance, ce sont des organismes que l'on dit sessiles. Cela les expose à de nombreux stress biotiques et abiotiques inévitables, forçant les plantes terrestres au cours de l'évolution à développer des stratégies de défense et de réponse au stress radicalement différentes des organismes mobiles. Ainsi, de nombreux mécanismes cellulaires et voies métaboliques sont régulés de façon beaucoup plus complexe que chez d'autres groupes d'eucaryotes.

Chez les plantes, trois compartiments cellulaires distincts possèdent une information génétique : le noyau, les mitochondries et les chloroplastes. L'expression génétique se déroule différemment dans ces compartiments, et est orchestrée par le dialogue inter-organellaire, les mitochondries et les chloroplastes étant complètement dépendants du noyau. Comme décrit plus haut, ces deux organites ont été acquis par deux événements d'endosymbiose consécutifs : un premier événement il y a plus d'1,5 milliard d'année, aboutissant à l'acquisition des mitochondries, puis un événement d'endosymbiose secondaire il y a plus d'un milliard d'années conduisant à la formation des plastides. La bactérie d'origine ayant donné les mitochondries serait une alphaprotéobactérie (Gray et al., 1999), mais cette hypothèse est aujourd'hui reconsidérée, et l'on suppose maintenant que l'ancêtre de la mitochondrie appartient une bactérie d'un groupe frère des alphaprotéobactéries (Martijn et al., 2018). Le deuxième événement d'endosymbiose aurait eu lieu entre un eucaryote et une cyanobactérie, un organisme photosynthétique, expliquant la capacité des chloroplastes à réaliser ce processus, et donnant naissance au phylum des « plantes vertes » (Dorrell & Howe, 2012).

Au cours de l'évolution, la plupart des gènes initialement codés dans les endosymbiotes originaux ont été soit transférés vers le noyau de la cellule hôte, soit entre les différents endosymbiotes (Hao et al., 2010), soit perdus (J. R. Brown, 2003). La taille initiale du génome des endosymbiotes (de 4 500 gènes environ) a diminué jusqu'à un nombre extrêmement faible compris entre 3 et 67 gènes dans les mitochondries et entre 23 et 200 gènes dans les chloroplastes, rendant maintenant les deux organites semi-autonomes. Par exemple, 18% des gènes nucléaires d'*Arabidopsis thaliana* semblent provenir d'une cyanobactérie, probablement de l'endosymbiote du chloroplaste (Martin et al., 2002). L'expression génétique dans le noyau et dans le cytosol des plantes est similaire à ce que l'on peut trouver chez les autres eucaryotes, mais dans le chloroplaste et les mitochondries, près de 2 milliards d'années d'évolution ont conduit à l'apparition de mécanismes d'expression génétique spécifiques à chaque organite. Ces mécanismes combinent des traits ancestraux bactériens à des caractéristiques nouvelles qui ont évolués dans la cellule hôte. Les différences les plus impressionnantes de ces mécanismes sont observées entre les mitochondries des différents grands groupes d'eucaryotes. En effet, comme la radiation évolutive vers les cinq grands groupes d'eucaryotes semble s'être produite rapidement après l'acquisition des mitochondries, chacun d'eux a développé des caractéristiques spécifiques.

Vue d'ensemble de la mitochondrie chez les plantes terrestres

Structure générale de la mitochondrie

Les mitochondries sont composées de deux membranes différentes : la membrane externe et la membrane interne. Ces deux membranes de natures distinctes délimitent deux compartiments biochimiquement différents : l'espace intermembranaire (IMS) et la matrice. La membrane extérieure est plutôt perméable grâce à la présence de porines en forme de tonneaux β , appelées Canal Ionique Voltage Dépendant (VDAC) (Hodge & Colombini, 1997; Mihara & Sato, 1985). Ces protéines VDAC jouent un rôle dans la régulation du flux métabolique et énergétique en permettant le transport de plusieurs métabolites comme l'ATP, l'ADP, le pyruvate, le malate, ... Outre les VDAC, la membrane externe contient également des complexes appelés TOM pour « Translocase of the Outer Membrane » ou Translocase de la Membrane Externe (Ahting et al., 1999; Dekker et al., 1998). Les TOMs permettent l'entrée de molécules plus grandes dans les mitochondries, principalement des protéines, qui sont reconnues si une séquence de signalisation à leur extrémité N-terminale nommée MTS (Mitochondria Targeting Sequence ou séquence de ciblage à la mitochondrie) est présente, ce qui déclenche alors une importation active de la protéine (Emanuelsson et al., 2007; Omura, 1998). Avec la relocalisation de la majorité des gènes de l'endosymbiote d'origine dans le noyau, la plupart du protéome mitochondrial doit d'abord être traduit par les ribosomes cytosoliques (souvent associés aux mitochondries lorsqu'ils traduisent des protéines ciblées vers la mitochondrie (Gold et al., 2017)) pour être ensuite importées dans la mitochondrie. Les mécanismes d'importation sont donc d'une importance capitale pour la biogénèse mitochondriale. Les protéines passent d'abord par l'IMS où elles seront triées : soit pour être insérées dans la membrane externe, soit pour rester dans l'IMS, soit pour aller dans la matrice ou la membrane interne à travers la Translocase de la Membrane Interne ou TIM (Translocase of the Inner Membrane) (Fig. 2) (Koehler et al., 1998; Sirrenberg et al., 1996). La membrane interne entoure la matrice, très riche en protéines, et est le siège de toute la machinerie permettant la phosphorylation oxydative. Elle est riche en cardiolipine, un phospholipide inhabituel qui constitue environ 20% de la Membrane Mitochondriale Interne

(IMM) et contribue peut-être à l'imperméabilité de la membrane interne (Hoch, 1992). En effet, contrairement à la membrane externe, la membrane interne est seulement perméable à l'oxygène, au dioxyde de carbone et à l'eau. Elle est cependant beaucoup moins perméable aux ions et aux petites molécules que la membrane externe, et ces molécules nécessitent des transporteurs membranaires spéciaux pour entrer ou sortir de la matrice. C'est une caractéristique essentielle pour le bon fonctionnement de la chaîne de transport des électrons, où les protons doivent être pompés hors de la matrice vers l'IMS pour être utilisés par l'ATP synthase. La membrane interne est très fortement pliée, formant de nombreuses invaginations appelées *cristae* (Griparic & Van Der Bliet, 2001), augmentant considérablement la surface totale de cette membrane. L'augmentation de la surface totale augmente également l'espace de travail disponible pour la chaîne de transport des électrons. La jonction qui relie les *cristae* à la membrane interne est tubulaire (Daems & Wisse, 1966). Ces structures internes peuvent varier considérablement entre les organismes et même entre les tissus. Leur structure semble régie par le Système d'Organisation des *cristae* et des Contacts Mitochondriaux (MICOS) au niveau des jonctions des *cristae*, mais aussi par les ATP synthases dimérisées (Hahn et al., 2016), organisées en rangées, qui est une caractéristique commune aux mitochondries de toutes les espèces examinées à ce jour (Fig. 2). Par exemple chez les champignons, les métazoaires et les plantes, les dimères sont en forme de V et s'associent en rangées le long des crêtes très incurvées des *cristae* lamellaires, mais chez *Paramecium tetraurelia* ils sont en forme de U, formant des *cristae* tubulaires (Mühleip et al., 2016).

De plus, les mitochondries ne sont pas isolées dans la cellule. En effet, un grand nombre d'études récentes a montré que les mitochondries sont en contact étroit avec le réticulum endoplasmique. Ces sites de contact appelés MMA (Membranes Mitochondriales Associées), ou plus généralement Sites de Contact Membranaire (SCM), ont été principalement étudiés chez les mammifères et les levures (Vance, 2014). Même si ces sites de contact sont plus discrets dans les plantes, il semblerait que ces contacts soient également présents (Mueller & Reski, 2015).

On retrouve en plus des sites de contact entre les mitochondries et d'autres compartiments, notamment entre les mitochondries et la vacuole. Enfin, des contacts entre les mitochondries

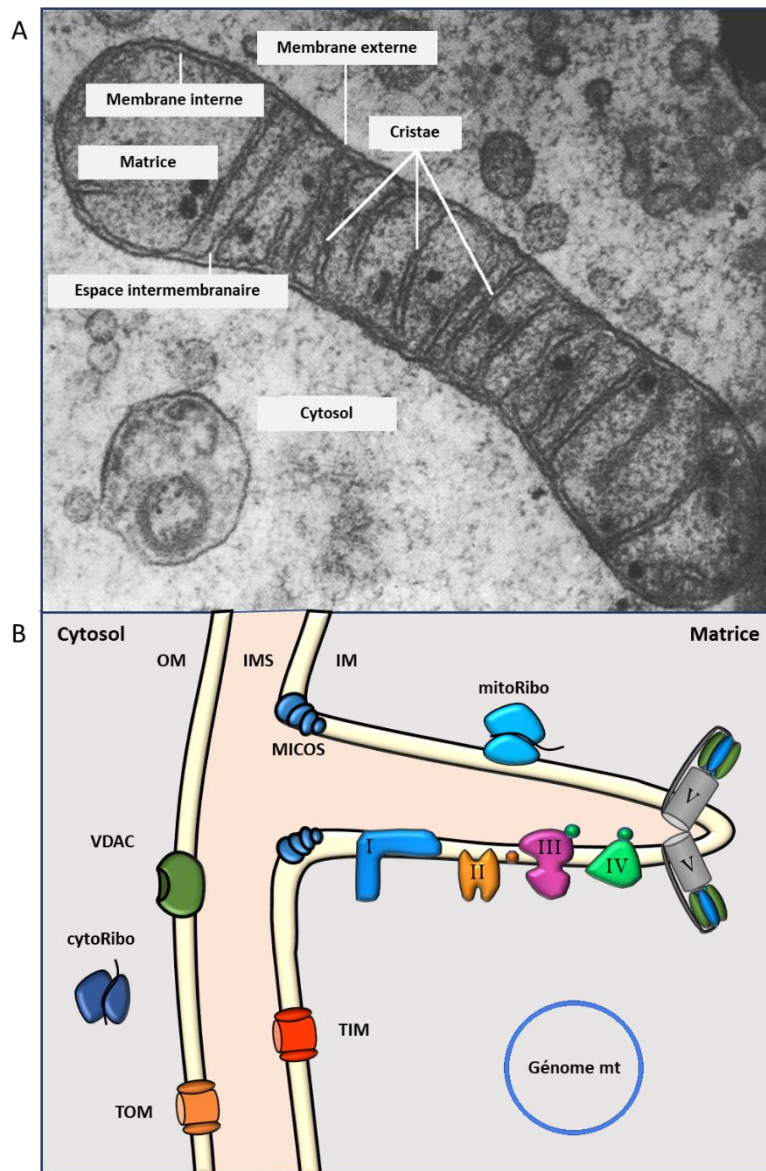


Figure 2 : Structure et organisation générale des mitochondries

A. Image de microscopie électronique d'une mitochondrie animale, les différents composants structuraux sont indiqués

B. Représentation schématique des différents composants et complexes de la mitochondrie. Les complexes sont décrits plus en détail dans le texte. OM : membrane externe, IM : membrane interne, IMS : espace intermembranaire.

et les plastes ont aussi été observés par microscopie confocale et électronique (Barton et al., 2018; Jouhet et al., 2004). Tous ces sites de contact contribuent à la communication inter-organelle, à la modulation de la morphologie mitochondriale ainsi qu'aux processus de synthèse des lipides, d'apoptose et d'homéostasie du calcium intracellulaire. Les contacts avec la vacuole et le réticulum jouent un rôle important dans la biogénèse des membranes mitochondriales (Elbaz-Alon et al., 2014; Jouhet et al., 2019).

Fonctions métaboliques de la mitochondrie

Les mitochondries sont avant tout les centrales énergétiques des cellules eucaryotes, mais sont le site de nombreuses autres réactions métaboliques importantes. Parmi celles-ci, on peut citer le métabolisme des acides aminés et des nucléotides, la biosynthèse des lipides, des stéroïdes et des quinones, et enfin la biogénèse des centres fer-soufre (Fe/S). En tant que producteur d'énergie, leur rôle principal est d'utiliser les agents réducteurs issus des réactions cataboliques comme le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide tricarboxylique abrégé en CAT) et l'oxydation des acides gras, pour alimenter la phosphorylation oxydative. En canalisant les électrons à travers les complexes de la chaîne respiratoire et en créant un gradient électrochimique transmembranaire, l'ATP synthase est activée, ce qui permet la conversion de l'ADP+P_i en ATP, la monnaie énergétique de la cellule (Fig. 3). Les mitochondries sont essentielles pour maintenir un rapport ATP/ADP élevé, nécessaire au fonctionnement des nombreuses réactions biochimiques qui ont lieu dans les cellules eucaryotes. De plus le CAT génère de nombreux intermédiaires métaboliques qui sont utilisés par diverses voies anaboliques. Par ce biais les mitochondries soutiennent plusieurs réactions métaboliques cruciales et produisent la majorité de l'ATP cellulaire, faisant des mitochondries des organelles bioénergétiques et biosynthétiques.

Outre leurs fonctions métaboliques, les mitochondries jouent également un rôle crucial dans la régulation de la mort des cellules. Chez les animaux, les mitochondries jouent un rôle central dans le contrôle de l'apoptose, un événement de mort cellulaire programmée (MCP). Il semble que la signalisation calcique et la libération du cytochrome *c* soient essentielles à son induction (C. Wang & Youle, 2009). Les mitochondries de plantes semblent également être impliquées dans la MCP. Lors de son induction, les mitochondries des plantes s'agrègent et gonflent, un processus connu sous le nom de transition morphologique mitochondriale, et

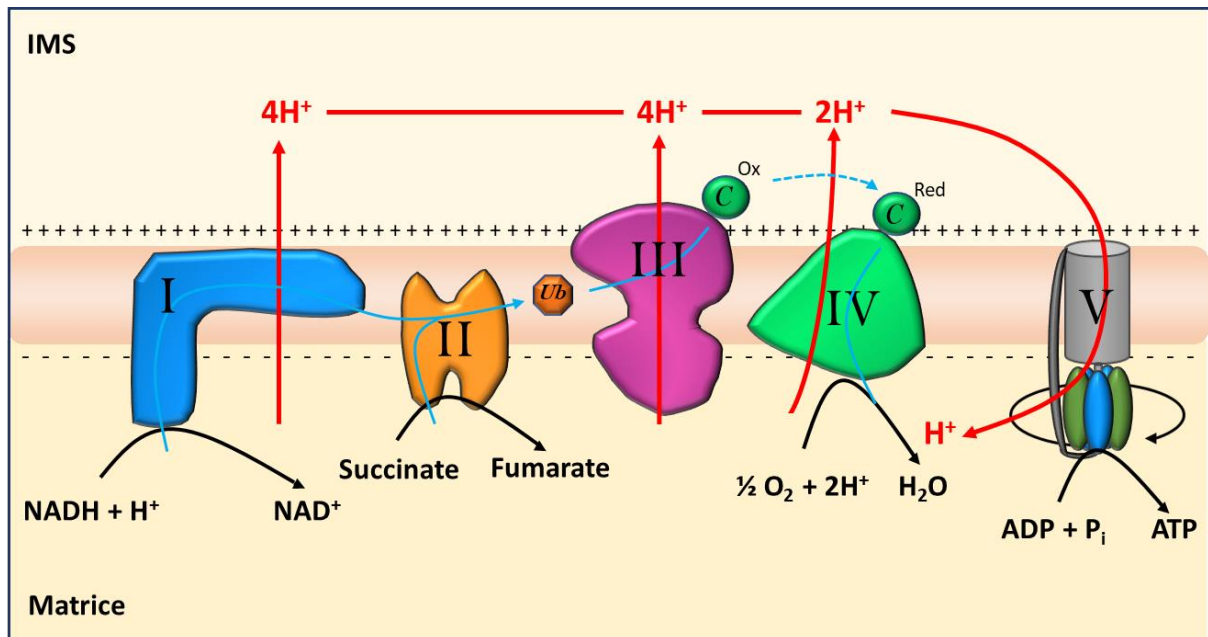


Figure 3 : La chaîne de transport des électrons et la phosphorylation oxydative (OXPHOS)

Représentation schématique de la chaîne respiratoire et de ses différents composants, c'est-à-dire les complexes respiratoires I à IV et l'ATP synthase (complexe V). Une molécule de NADH ou de $FADH_2$ donneur est oxydée et cède un électron. Cet électron se déplacera à travers chaque complexe jusqu'à atteindre l'accepteur final, l' O_2 . Ce processus entraîne le pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, formant un gradient de pH ce qui entraîne un potentiel électrique transmembranaire et crée une force électromotrice. Les protons retournent vers la matrice en traversant l'ATP synthase, ce qui entraîne sa rotation. L'énergie qui en résulte est alors utilisée pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de Phosphate inorganique.

l'on observe des événements similaires lors de l'apoptose (Van Aken & Van Breusegem, 2015). Les mitochondries sont également des acteurs clés dans la régulation du Ca^{2+} , impliqué dans la signalisation cellulaire, en raison de leur capacité à l'accumuler ou le rejeter rapidement et transitoirement (Clapham, 2007).

Le génome mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre génome, vestige de leur ancêtre bactérien autonome. Ce génome est localisé dans la matrice mitochondriale. Au cours de l'évolution, la majorité du génome original de l'endosymbiote a été transféré vers le noyau ou perdu. Par conséquent, seuls quelques gènes restent codés dans le génome mitochondrial (Gray, 2012). De plus, le rayonnement évolutif des eucaryotes a très probablement eu lieu après l'acquisition des mitochondries, par conséquent, même si le transfert de gènes était déjà un processus en cours, de grandes différences en termes de structure, de taille, de contenu génétique et de mécanismes d'expression peuvent être observées entre les différents groupes d'eucaryotes.

Taille et contenu en gènes

La taille du génome mitochondrial varie fortement entre les organismes. Il peut être très réduit comme chez *Plasmodium falciparum*, qui est le plus petit génome mitochondrial connu avec seulement 6 kb de taille, abritant seulement trois gènes codant pour des protéines, des gènes d'ARNr très fragmentés et aucun gène d'ARNt (Feagin et al., 2012). Il peut également être extrêmement grand, celui de *Silene conica* étant le plus grand avec un génome mitochondrial multi-chromosomique de 11 Mb, dépassant la taille de celui de certaines bactéries et même de certains génomes nucléaires (Sloan et al., 2012). Les grands génomes mitochondriaux sont également une caractéristique commune de la famille des Cucurbitacées (Alverson et al., 2011), mais pour la plupart des plantes, les génomes mitochondriaux ont une taille d'environ 300 à 500 kb. Cette grande diversité de tailles de génomes chez les plantes est une cause directe de leur composition, de grandes séquences répétées favorisant les recombinaisons (Gualberto & Newton, 2017). Mais des génomes plus grands ne signifient pas la présence d'un plus grand nombre de gènes. Chez les métazoaires, le génome est

relativement petit et conservé, entre 15 et 17 kb, et environ 16 kb chez l'Homme. Le contenu en gènes est également assez constant, avec une moyenne de 37 gènes. Chez *Arabidopsis*, le génome fait 368 kb et contient 58 gènes, soit seulement 20 gènes de plus, pour un génome 20 fois plus grand que celui des métazoaires (Fig. 4) (Unsel et al., 1997; (Park et al., 2021)). Parmi les 33 protéines codées par le génome mitochondrial d'*Arabidopsis*, on retrouve 6 protéines ribosomiques, une maturase (*matR*) et une protéine de fonction inconnue (MttB), toutes hydrophiles, les 25 autres gènes codant pour des protéines hydrophobes de la chaîne de transport des électrons ou impliquées dans la synthèse du cytochrome c.

Les gènes encore codés dans le génome mitochondrial sont plutôt conservés chez les eucaryotes, et peuvent être classés en deux groupes : ceux qui codent les protéines « ribosomiques » et ceux qui codent les protéines « bioénergétiques ». Mais des protéines supplémentaires appartenant à d'autres catégories sont parfois codées dans les génomes mitochondriaux. La première catégorie est impliquée dans la synthèse des sous-unités ribosomiques et est principalement présente dans les génomes mitochondriaux des protistes et des plantes, la seconde catégorie code pour les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire ainsi que pour les protéines de maturation du cytochrome c. Les gènes codant pour les ARNr mitochondriaux sont également toujours présents dans le génome mitochondrial (à l'exception de l'ARNr 5S). Ils font partie des quelques gènes universellement codés par l'ADN mitochondrial chez les eucaryotes (Gray, 2012). On trouve aussi des gènes codant des ARNt, nécessaires à la traduction des quelques protéines codées dans le génome mitochondrial, cependant la présence d'un ensemble complet de gènes d'ARNt suffisant pour traduire toutes les protéines mitochondriales codés par le génome est plus une exception qu'une règle générale (Salinas-Giegé et al., 2015). Chez les champignons, *Saccharomyces cerevisiae* code un ensemble complet d'ARNt, mais chez les trypanosomatidés (par exemple *Trypanosoma brucei*, *Leishmania tarentolae*) et les alvéolates comme *Plasmodium*, les génomes mitochondriaux peuvent être complètement dépourvus de gènes d'ARNt (Salinas-Giegé et al., 2015). Il est intéressant de noter que les génomes mitochondriaux des angiospermes contiennent des gènes provenant du chloroplaste, en remplacement des ARNtHis et des ARNtAsn qui ont été perdus chez tous les angiospermes étudiés (Fey et al., 1997).

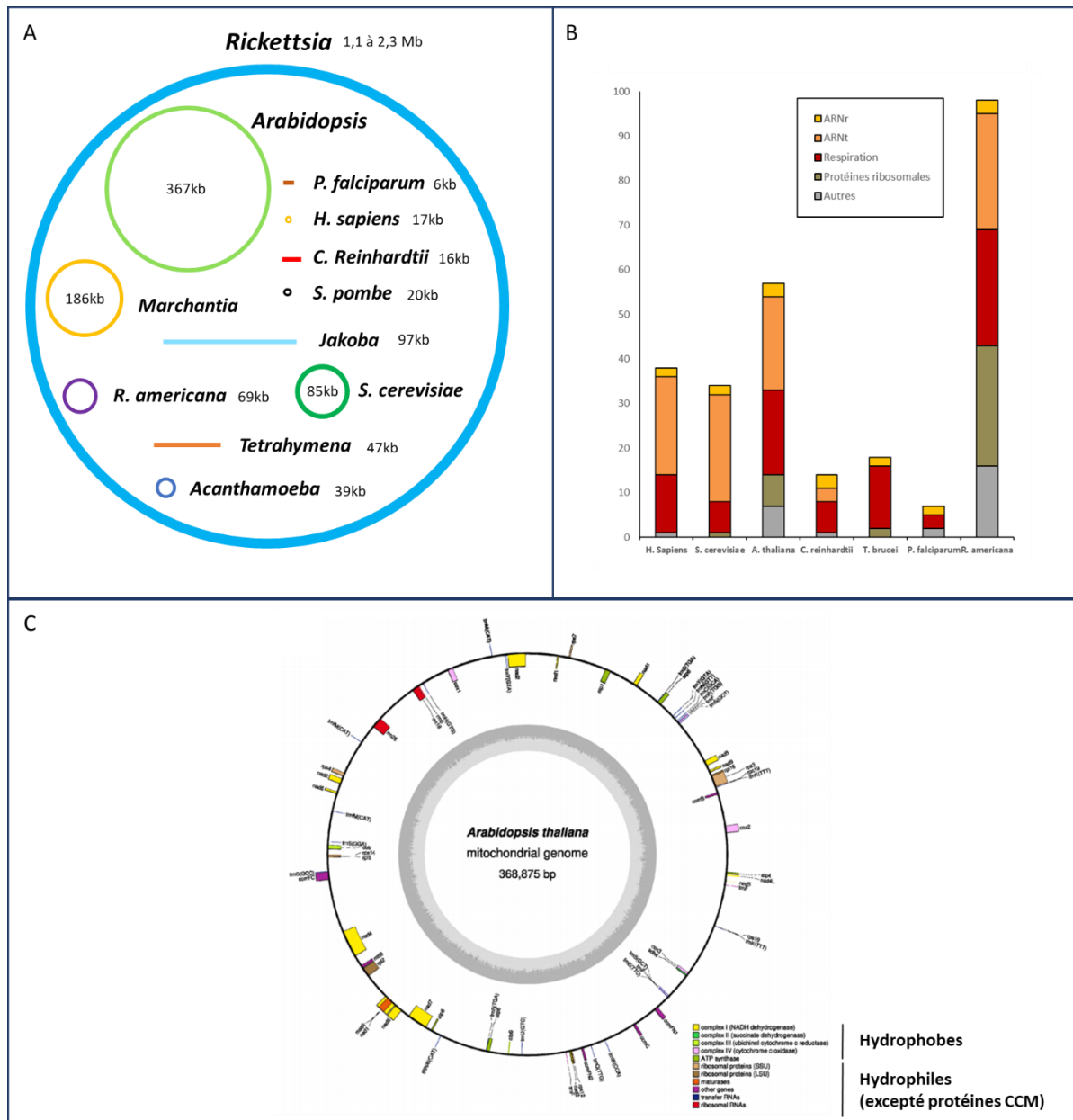


Figure 4 : Comparaison de la taille et de la composition des génomes mitochondriaux

A. Représentation de la taille en paires de bases des génomes mitochondriaux de différents organismes, en comparaison de celui de *Rickettsia*, un descendant d' α -protéobactérie. Les génomes circulaires sont représentés sous forme de cercles tandis que les génomes linéaires sont représentés sous forme de lignes, la taille exacte de chaque génome est indiquée.

B. Histogramme représentant le nombre d'ARN et de protéines transcrits à partir du génome mitochondrial de différents organismes.

C. Carte schématique du génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* et la position de ses 58 gènes. Sur les 33 protéines exprimées par le génome mitochondrial, 25 sont hydrophobes et 8 sont hydrophiles. D'après (Park et al., 2021).

Les noms d'espèces complets sont : *Plasmodium falciparum*, *Homo Sapien*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Saccaromyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma brucei* et *Reclinomonas americana*.

Organisation et structure

L'organisation des génomes mitochondriaux diffère également beaucoup entre les eucaryotes. Chez les métazoaires, les génomes sont assez réduits, avec des régions intergéniques très réduites ou inexistantes, et aucune séquence d'intron dans l'ADN mitochondrial des vertébrés. Tous les gènes codant pour des protéines et les ARNr sont flanqués d'ARNt (à l'exception de la jonction COIII – ATP6). Cela permet la production de grands polycistrons qui seront traités par les enzymes de maturation des pré-ARNt, RNase P et RNase Z, libérant les ARNm, ARNr et ARNt individuels matures (Ojala et al., 1980). Chez les plantes, les gènes sont séparés par de grandes régions non codantes qui ne sont pas conservées d'une espèce à l'autre, ce qui contribue à la taille considérable des génomes mitochondriaux des végétaux. Ces séquences non codantes sont le résultat d'un transfert horizontal de gènes, très probablement dérivés d'ADN chloroplastique, nucléaire ou viral (Gualberto & Newton, 2017). Plusieurs gènes contiennent des introns, principalement du groupe II, qui sont des ribozymes autocatalytiques (Cech, 1986). Chez *Arabidopsis*, 23 introns du groupe II sont présents. Il est intéressant de noter qu'*Arabidopsis* et toutes les plantes angiospermes possèdent le gène *matR*, codé dans l'intron 4 de *nad1*. Ce gène code pour la maturase MatR, une protéine qui se lie à plusieurs introns du groupe II *in vivo*, mais ses rôles putatifs dans l'épissage restent à déterminer (G. G. Brown et al., 2014; Unseld et al., 1997).

Les génomes mitochondriaux sont généralement représentés comme des molécules circulaires singulières. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Chez *Cucumis sativus*, le génome mitochondrial s'assemble en trois chromosomes circulaires de longueurs différentes (Alverson et al., 2011). Chez les protistes kinétoplastides tels que *Trypanosoma*, le génome mitochondrial est composé d'environ 50 maxi-cercles et de milliers de mini-cercles. Les maxi et mini-cercles forment un réseau compact d'ADN circulaire qui constitue le kinétoplaste (appelé ADNk). Cette disposition spatiale contribue à des modifications post-transcriptionnelles spécifiques où des uridines sont soit insérées soit retirées des ARNm précurseurs (Aphasizhev & Aphasizheva, 2014). Ce mécanisme exclusivement retrouvé chez les organites a été baptisé « RNA editing » ou édition de l'ARN. Mais les génomes mitochondriaux ne sont pas toujours organisés en molécules circulaires. Il existe aussi des génomes linéaires. Cela a été décrit chez l'algue verte *Chlamydomonas* (Smith et al., 2010), *Plasmodium*, certains champignons, et plusieurs animaux cnidaires (Nosek & Tomáška, 2003).

Une situation inhabituelle a été identifiée chez un protiste unicellulaire apparenté aux animaux, *Amoebidium parasiticum*, dont le grand ADN mitochondrial (>200 kb) se compose de plusieurs centaines de chromosomes linéaires qui partagent des motifs de séquences spécifiques terminaux élaborés (Burger et al., 2003). Dans le cas des génomes linéaires, ils sont protégés par des structures terminales spécialisées, telles que des extrémités d'ADN monocaténaire fermées de manière covalente ou des protéines protectrices. Elles possèdent de plus généralement des répétitions ressemblant à celles des télomères (Burger et al., 2003; Nosek & Tomáška, 2003).

La conservation du génome mitochondrial

La question reste ouverte de savoir pourquoi les mitochondries (et les chloroplastes) ont conservé un génome. Il serait certainement plus avantageux, en termes d'énergie, que la cellule n'ait pas besoin de disposer d'une deuxième machinerie complète d'expression génétique dans la mitochondrie, avec un système de réplication de l'ADN complètement différent, une ARN polymérase et des ribosomes, tout cela simplement pour exprimer un très petit ensemble de gènes. Plusieurs modèles ont été proposés pour comprendre pourquoi les mitochondries ont effectivement conservé un génome. L'une des hypothèses est que l'impossibilité de transférer les gènes restants dans le noyau repose sur les différences entre le code génétique nucléaire et celui utilisé dans les mitochondries. En effet, chez les animaux, les levures et plusieurs protistes (De Grey, 2005), l'usage des codons est différent. Par exemple, UGA est un codon de terminaison dans le code universel et dans les mitochondries végétales, mais il code pour le tryptophane dans les mitochondries des animaux et des champignons. Cependant ce n'est pas le cas chez les plantes. Il a également été proposé que le transfert de gènes mitochondriaux est toujours un processus en cours et que nous n'assistons qu'à une phase intermédiaire de l'évolution des interactions entre les eucaryotes et leurs mitochondries. À terme, tous les gènes devraient/pourraient être transférés vers le noyau - les chercheurs tentent même, par le biais du génie génétique, de transférer artificiellement des gènes mitochondriaux vers le noyau, non sans difficultés. Par exemple, une copie codée nucléaire du cytochrome b fusionnée à un signal de ciblage mitochondrial n'est pas importée dans les mitochondries car elle forme des agrégats de protéines (Claros et al., 1995).

Ceci a conduit à l'hypothèse de l'hydrophobie qui stipule que le produit des quelques gènes restants est trop hydrophobe pour être synthétisé dans le cytoplasme et ensuite importé dans les mitochondries (von Heijne, 1986). Ceci est soutenu par l'observation que les deux grands ARN ribosomiques, ainsi que les protéines hautement hydrophobes comme le cytochrome b et Cox1 sont ceux universellement encore codés dans tous les génomes mitochondriaux.

Une explication alternative est que la rétention de ces génomes petits mais fonctionnels persiste parce que l'expression des gènes organellaires doit être sous contrôle redox direct (Allen et al., 2003). Cette hypothèse est appelée CORR (Co-location for Redox Regulation), et explique que les gènes des mitochondries et des chloroplastes sont contrôlés directement par l'état d'oxydation de leurs produits pour permettre le réglage fin de l'expression des gènes mitochondriaux en réponse aux changements métaboliques. Un tel mécanisme a été décrit chez la levure : Mss51, un activateur traductionnel de Cox1, est capable de se lier à l'hème B. Il pourrait donc détecter les niveaux d'oxygène pour moduler la synthèse de Cox1 et son assemblage ultérieur dans le Complexe IV, la principale enzyme mitochondriale consommant de l'oxygène (Soto et al., 2012).

L'expression des gènes mitochondriaux

L'expression des gènes mitochondriaux est un mécanisme complexe et disparate qui dépend entièrement de facteurs codés par le noyau. En effet, seuls quelques gènes impliqués dans l'expression des gènes mitochondriaux sont codés dans son propre génome, et il s'agit le plus souvent de l'ARN ribosomal et des protéines ribosomiques nécessaires à la dernière étape de l'expression des gènes, la traduction. Pour leur expression, les gènes mitochondriaux doivent être transcrits, leurs ARN subissent ensuite un certain nombre de maturations post-transcriptionnelles et ils sont traduits. Ainsi, la majorité des facteurs impliqués dans ces processus sont codés dans le noyau, exprimés dans le cytosol et importés dans les mitochondries. Les ARNt, qui sont cruciaux pour la traduction, sont également, dans certains organismes, importés du cytosol. Chez l'homme et la levure par exemple, l'importation d'ARNt n'est pas nécessaire car un ensemble complet d'ARNt est présent, mais elle se produit néanmoins (Salinas-Giegé et al., 2015). En revanche, les génomes mitochondriaux de *Trypanosoma* et de *Plasmodium* ne possèdent pas de gènes d'ARNt, qui doivent donc tous être importés (Hancock & Hajduk, 1990; Salinas-Giegé et al., 2015). Chez les plantes, des

ARNt doivent être importés du cytosol pour assurer la traduction, car tous les ARNt ne sont pas présents dans leurs génomes mitochondriaux. Chez *Arabidopsis*, 6 ARNt doivent être importés (Salinas-Giegé et al., 2015; Salinas et al., 2008). En raison de la dispersion évolutive précoce des eucaryotes et de l'origine bactérienne des mitochondries, l'expression des gènes dans les mitochondries combine des caractéristiques de type bactérien, héritées de l'endosymbiote d'origine, avec des traits eucaryotes provenant de la cellule hôte (Adl et al., 2012; Gray, 2012). De plus, des caractéristiques spécifiques d'expression génétique ont évolué indépendamment dans les différents groupes d'eucaryotes. Par conséquent, les mécanismes d'expression des gènes dans les mitochondries sont uniques et diversifiés entre les espèces.

La transcription

L'expression des gènes commence par la transcription pour synthétiser l'ARN. Pour réaliser la transcription mitochondriale, la plupart des eucaryotes possèdent une ARN polymérase de type phagique codée par le noyau (mtRNAP ou NEP pour Nuclear-Encoded Polymerase) qui a remplacé l'ARN polymérase ancestrale de type bactérien (Liere et al., 2011). En revanche, chez les Jakobides, des protistes dont fait partie *R. americana*, le génome mitochondrial code encore pour une ARN polymérase de type bactérien (BF et al., 1997). Chez les plantes, plusieurs promoteurs sont nécessaires à la transcription du génome. Dans le génome mitochondrial d'*Arabidopsis*, parmi les 57 gènes, cinq transcrits sont produits sous forme polycistronique, trois transcrits sont trans-épissés et les autres sont monocistroniques (Forner et al., 2007). Deux gènes nucléaires codent pour deux ARN polymérases, RpoTm qui est ciblé vers les mitochondries et RpoTmp qui est ciblé à la fois vers les mitochondries et le chloroplaste. Enfin, une autre polymérase, RpoTp, est ciblé uniquement vers le chloroplaste. (Liere et al., 2011). RpoTm est impliqué dans la transcription de la majorité du génome mitochondrial, et le rôle de RpoTmp est encore mal compris, mais des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'un sous-ensemble de gènes mitochondriaux dépendent de RpoTmp pour leur expression (Kumazaki, Chiba, et al., 2014). Chez l'Homme, seuls deux transcrits polycistroniques sont synthétisés. La transcription commence à partir de deux promoteurs, un promoteur sur chaque brin (Pearce et al., 2017), qui vont générer les deux pré-transcrits qui seront ensuite traités. Chez la levure, on trouve plusieurs sites de début de transcription qui produisent des précurseurs polycistroniques portant deux séquences codantes ou plus (Christianson &

RabinowitzS, 1983). Chez les plantes supérieures, les gènes mitochondriaux sont chacun transcrits à partir de promoteurs multiples. Les séquences de ces promoteurs semblent faiblement conservées, même si quelques éléments ont été trouvées comme faisant partie de séquences promotrices mitochondriales (Fey & Maréchal-Drouard, 1999; Kühn et al., 2005) Mais dans l'ensemble, les exigences en matière de séquence promotrice dans les mitochondries végétales ne semblent pas être strictes, et il a été conclu que l'initiation de la transcription mitochondriale n'est pas étroitement contrôlée chez les plantes (Holec et al., 2006).

Maturation et dégradation

La régulation de l'expression des gènes mitochondriaux s'effectue principalement au stade post-transcriptionnel. Les transcrits sont d'abord exprimés sous forme de précurseurs et subissent les étapes suivantes : épissage, édition de l'ARN, maturation des extrémités 5' et 3' du transcrit ... Ces processus de maturation, bien que dérivant de processus bactériens ancestraux, comportent de nombreuses étapes, comme l'édition de l'ARN, et de modes d'action qui sont entièrement spécifiques aux mitochondries. La plupart de ces mécanismes de maturation impliquent des protéines spécifiques des eucaryotes comme les protéines PPR.

Les protéines PPR

Les protéines à « pentatricopeptide repeat » ou PPR sont des protéines composées de multiples motifs PPR, chacun de ces motifs étant défini comme un domaine de 35 acides aminés (d'où lui vient le nom pentatricopeptide) qui forme un motif hélice-tour-hélice. Ces motifs sont groupés et forment une structure en superhélice capable de se fixer de manière séquence spécifique à un ARN simple brin. Cette capacité à fixer spécifiquement une séquence ARN lui est conférée par ce qu'on appelle un « code PPR », où chaque répétition reconnaît un ribonucléotide spécifique (Fig. 5) (Barkan et al., 2012; Barkan & Small, 2014). L'interaction des protéines PPR avec l'ARN a largement été confirmée *in vitro* et *in vivo* en utilisant des expériences de retard sur gel, des tests d'affinité et du cross-linking aux UV (Prikryl et al., 2011; Shikanai & Okuda, 2011). La spécificité de chaque répétition pour un ribonucléotide serait principalement déterminée par 2 acides aminés de chaque répétition aux positions 5 et 35 du

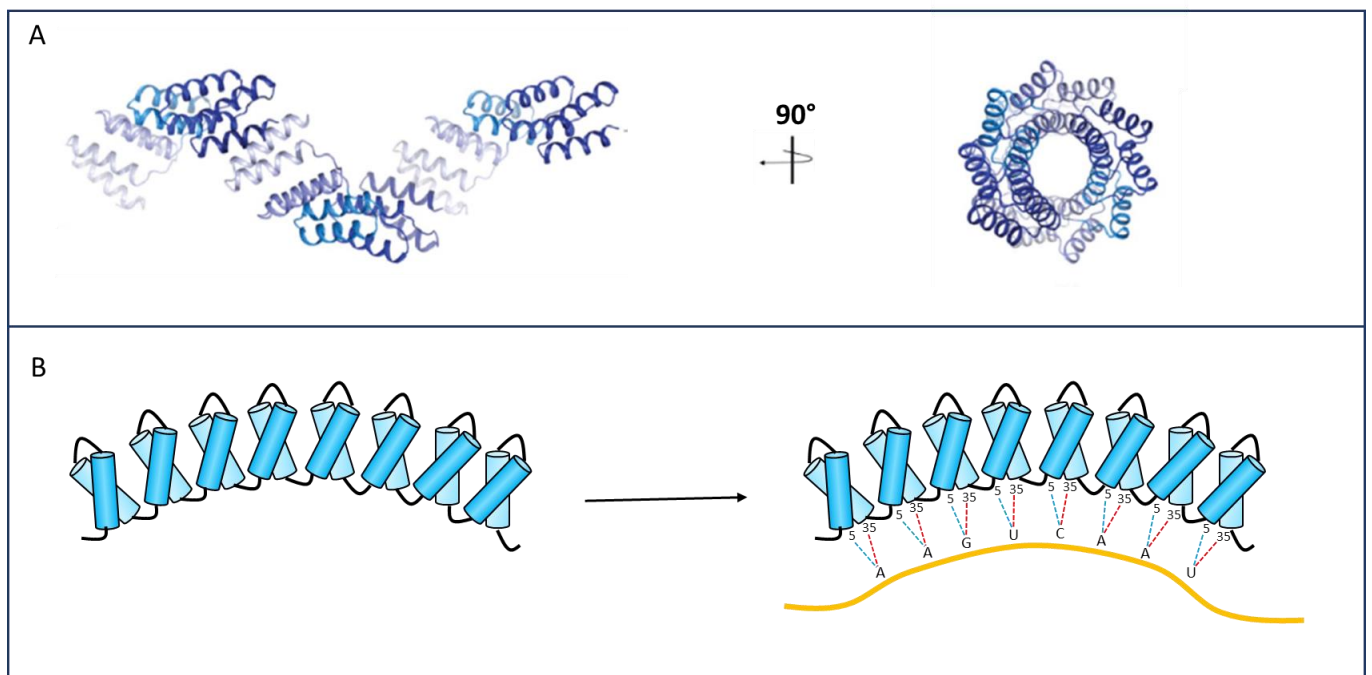


Figure 5 : Structure des protéines PPR et mode de reconnaissance canonique des ARNs simples brins

A. Représentation tridimensionnelle de la structure globale d'une protéine PPR de classe P. Chaque motif PPR se replie en une paire d'hélices alpha antiparallèles, qui forment un motif hélice-tour-hélice. La série de motifs PPR forment une super-hélice avec un sillon central qui permet à la protéine de se lier à l'ARN. Image adapté de (Gully et al., 2015).

B. Chaque motif PPR est impliqué dans la reconnaissance d'une base ribonucléique spécifique. La reconnaissance de la base est médiée par deux acides aminés spécifiques en position 5 et 35 de chaque motif.

motif (Cheng et al., 2016). Cependant, le code est dégénéré, et on trouve plusieurs combinaisons de deux acides aminés différentes qui spécifient le même nucléotide, et certaines combinaisons capable de reconnaître plus d'un nucléotide (Barkan & Small, 2014). Enfin d'autres acides aminés à d'autres positions dans le motif influencent peut-être le mécanisme de fixation, rendant la détermination de l'ARN cible d'une protéine PPR ardue si l'on se réfère uniquement à sa séquence (Yagi et al., 2013). Le mode de reconnaissance des protéines PPR fait tout de même l'objet de nombreuses études pour utiliser ce code PPR comme outil moléculaire pour cibler des ARN spécifiques (Coquille et al., 2014; Miranda et al., 2018; Shen et al., 2016). On notera toutefois que le « code PPR » de reconnaissance d'ARN simple brin ne s'applique pas à l'ensemble des protéines PPR (Waltz et al., 2021).

En se basant sur la distribution des protéines PPR parmi les organismes, il semble probable que cette classe de protéines soit dérivée des protéines TPR (tetratricopeptide repeat), une famille de protéine possédant des motifs d'interaction protéine-protéine (Small & Peeters, 2000). Les protéines PPR sont spécifiques aux eucaryotes à l'exception de quelques bactéries pathogènes ou symbiotiques des eucaryotes, qui ont sûrement obtenus ces gènes PPR par transfert horizontal (Cazalet et al., 2010). La répartition des protéines PPR dans tous les eucaryotes semble indiquer qu'elles ont été acquises très tôt dans l'évolution, potentiellement lié à l'acquisition de la mitochondrie. La plupart des eucaryotes ne possèdent qu'un très petit nombre de gènes codant des protéines PPR, mais chez les plantes terrestre cette famille de gène s'est grandement développée (O'Toole et al., 2008). En effet, on trouve 7 protéines PPR chez l'Homme, 28 chez *T. brucei* et 15 chez *S. cerevisiae* (Herbert et al., 2013; Lightowlers & Chrzanowska-Lightowlers, 2013; Pusnik et al., 2007). Chez les plantes vertes, la colonisation des terres semble correspondre avec l'explosion du nombre de gènes PPR. En effet, la plupart des algues vertes aquatiques ont à peu près le même nombre de gènes PPR que le reste des eucaryotes, contrairement aux plantes terrestres qui ont 100 gènes PPR ou plus. Il y a environ 400 à 600 gènes PPR dans la plupart des génomes des angiospermes, *A. thaliana* ayant plus de 450 gènes PPR (Fig. 6) (Cheng et al., 2016; O'Toole et al., 2008). La majorité de ces protéines sont prédites comme ciblées vers la mitochondrie ou le chloroplaste. On retrouve ces protéines PPR impliquées dans tous les processus de l'expression des gènes des organelles, et de la mitochondrie en particulier.

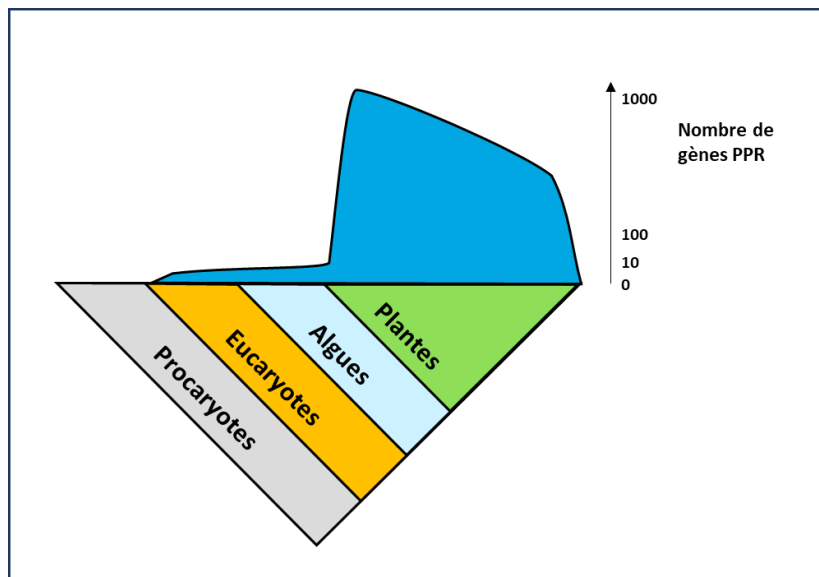


Figure 6 : Répartition du nombre de protéines PPR exprimées parmi les différents groupes d'eucaryotes.

Les gènes codant pour les protéines PPR sont absents chez les procaryotes (à part quelques exceptions de pathogènes végétaux qui ont acquis des gènes PPR par transfert horizontal), en petit nombre chez les eucaryotes, et en grand nombre chez les plantes terrestres. La plupart des eucaryotes codent entre 5 et 15 protéines PPR. L'expansion des gènes PPR dans le phylum vert est en corrélation avec la colonisation de la terre.

Protection et maturation des extrémités 3' et 5'

En premier lieu, dans les mitochondries végétales, les extrémités 5' et 3' des ARNm, ainsi que des ARNt et des ARNr, passent par plusieurs étapes de maturation pour devenir fonctionnelles. En effet, dans le cytosol, pour améliorer leur stabilité, les ARNm sont coiffés à l'extrémité 5' et polyadénylés en 3' (Schaefer et al., 2018). Ce n'est pas le cas dans les organites, où aucune coiffe n'est ajoutée en 5' des ARNm. De plus, la polyadénylation dans le cytosol stabilise les ARNm, alors que dans les mitochondries, la polyadénylation des ARN codants et non codants les oriente vers une dégradation par la polynucléotide phosphorylase (PNPase) (Gagliardi & Leaver, 1999; Holec et al., 2006). On sait que la maturation des extrémités 5' et 3' des ARN des organites fait intervenir plusieurs ribonucléases distinctes. Pour les extrémités 3' des ARNm, il a été montré que des protéines PPR (MTSF1 dans le cas du transcrit nad4) pouvaient se lier au pré-messager et potentiellement bloquer la progression des 3'-5' exonucléases mitochondriales (Haïli et al., 2013) comme la PNPase et RNR1 (Perrin et al., 2004). En ce qui concerne la maturation en 5' des ARNm, on sait peu de choses, mais un nombre croissant d'études tendent également à indiquer que les protéines PPR peuvent agir comme des " délimiteurs " de transcrit en se liant à une séquence spécifique de l'ARN (Hauler et al., 2013; Stoll et al., 2014). L'activité enzymatique en 5' est réalisée par une ribonucléase encore inconnue, même si deux ribonucléases potentielles, MNU1 et MNU2, ont été proposées pour être impliquées dans ce processus (Stoll & Binder, 2016). Dans le cas des ARNt des mitochondries végétales, ils sont d'abord transcrits en tant que pré-ARNt qui sont ensuite traités afin de devenir fonctionnels. Tout d'abord, la séquence leader 5' est clivée par une enzyme à activité RNase P appelée « PRORP » (Protein Only RNase P) (Gobert et al., 2010). L'extrémité 3' est clivée par une RNase Z (Canino et al., 2009). Ensuite, de multiples bases spécifiques sont modifiées, ce qui permet la stabilisation de la structure 3D et enfin, le triplet CCA est ajouté en 3' des ARNt (Salinas-Giegé et al., 2015).

Édition de l'ARN mitochondrial

Dans les organelles de plante, l'édition de l'ARN est un processus dans lequel des changements ponctuels sont effectués à des sites spécifiques dans une molécule d'ARN après qu'elle ait été transcrite. Les événements d'édition peuvent inclure l'insertion, la délétion, et la substitution de bases de nucléotides à l'intérieur de la transcription, généralement pour restaurer une

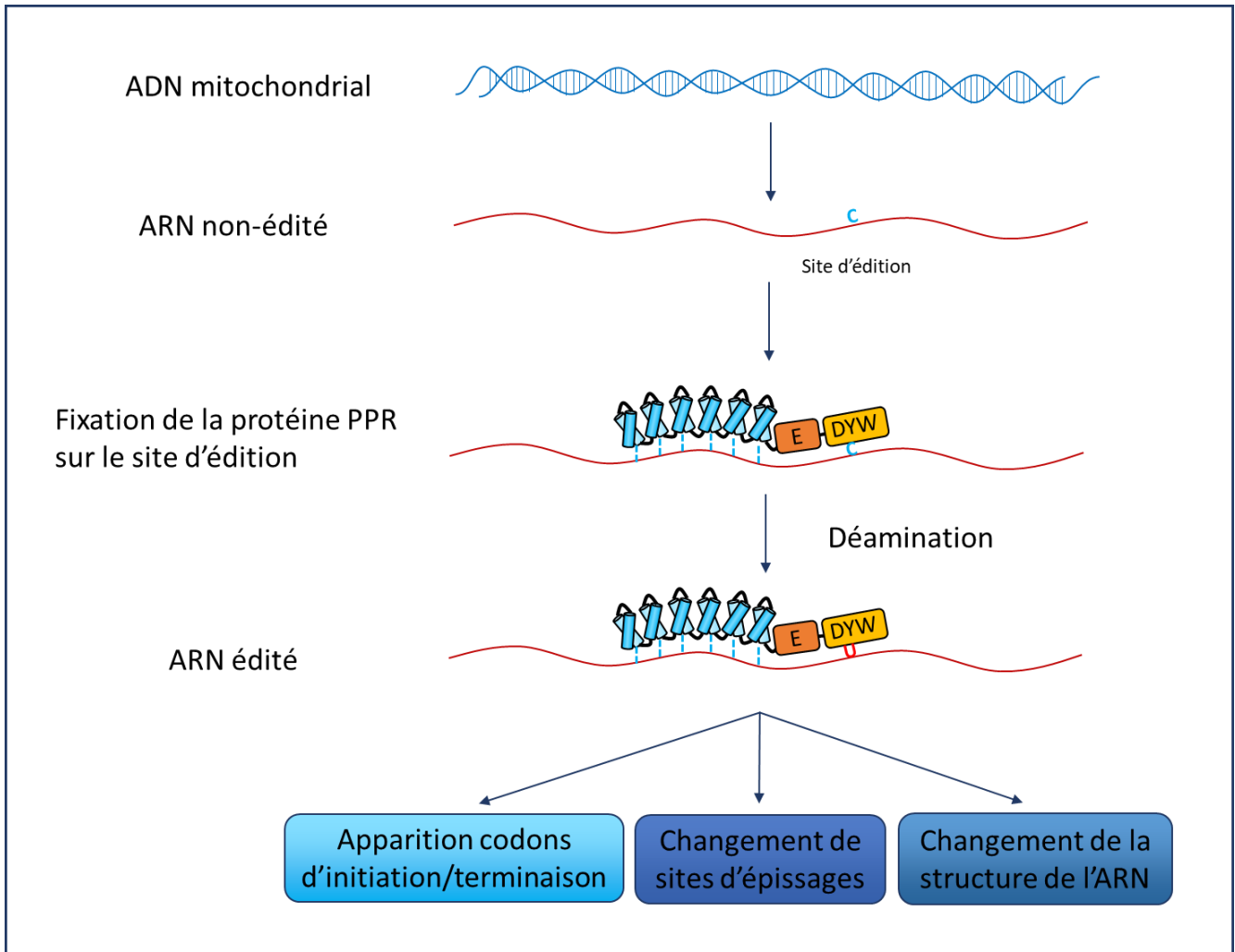


Figure 7 : L'édition des ARN mitochondriaux de C en U par des protéines PPR

La séquence des sites d'édition de Cytosine en Uridine des ARN tout juste transcrits et non-édités va être reconnues par les motifs PPR, plaçant le domaine DYW de la protéine au niveau du ribonucléotide à modifier. Le domaine DYW qui porte l'activité déaminase de la protéine PPR va alors déaminer la Cytosine et permettre la conversion en Uridine.

L'édition des ARN mitochondriaux permet de modifier la structure des ARN et de modifier radicalement la séquence d'acides aminés encodée par les ARNm, les sites d'édition se retrouvant principalement sur les premier ribonucléotides d'un codon. Le changement des C en U résulte alors le plus souvent en un changement d'acide aminé.

séquence appropriée pour la synthèse des protéines. Dans les mitochondries végétales, le principal type d'édition de l'ARN est la conversion de C en U, qui a lieu sur des centaines de sites (plus de 500 chez *Arabidopsis*), et plus rarement de U en C (Fig. 7) (Giege & Brennicke, 1999; Gualberto et al., 1989). Ces modifications se produisent généralement sur le premier ou deuxième nucléotide d'un codon, modifiant le plus souvent l'acide aminé codé, et ces sites d'édition non-synonymes sont très conservés (Edera et al., 2018). Ce mécanisme d'édition permet aussi de diminuer les effets des mutations de l'ADN mitochondrial, ces substitutions restaurant généralement des codons hautement conservés chez les plantes ou les ancêtres bactériens des mitochondries (Maier et al., 2008; Small et al., 2020). La composition complète du complexe d'édition de l'ARN n'a pas encore été établie, mais plusieurs protéines ont été identifiées (Yan et al., 2018). Il a été proposé que les protéines PPR pourrait spécifier le site d'édition, étant donné qu'une certaine classe de protéines PPR possèdent un domaine supplémentaire appelé domaine E qui s'est avéré être essentiel pour l'édition. Elles peuvent également posséder un domaine DYW, qui présente une similitude avec les domaines cytidine désaminase trouvés dans d'autres systèmes, et il a été montré que c'est le domaine catalytique de l'édition des ARNm dans les mitochondries végétales (Takenaka et al., 2021). Une étude récente a même pu compléter la fonction de la protéine PPR CWM1 chez *Arabidopsis thaliana* par les protéines PPR responsables du même site d'édition chez *Physcomitrium patens* et chez *Macadamia integrifolia*, nommées PPR79 et une protéine CWM1-like respectivement (Oldenkott et al., 2020). Cette étude montre que les sites d'édition et l'activité cytidine déaminase des domaines DYW sont très conservés au cours de l'évolution du monde végétal. D'autres facteurs ont également été identifiés, comme les facteurs d'édition RIP/MORF, où la mutagenèse d'un seul gène codant pour un RIP/MORF affecte des dizaines voire des centaines de sites d'édition (Bentolila et al., 2012). Il a aussi été démontré que les familles de protéines ORRM et OZ sont également impliquées dans l'édition de l'ARN (Sun et al., 2016).

Épissage des introns

Selon l'organisme, les transcrits mitochondriaux peuvent contenir des introns. Les deux types d'introns présents dans les mitochondries sont du groupe I et du groupe II. Contrairement à ce que l'on trouve dans le noyau, les introns mitochondriaux sont des ribozymes auto-

catalytiques capables de s'auto-épisser *in vitro* (Cech, 1986) mais qui nécessitent des protéines pour un épissage efficace *in vivo*, afin de stabiliser la structure d'ARN responsable de l'activité catalytique. La présence et/ou la prévalence de chaque type d'intron est variable entre les eucaryotes. Chez les animaux par exemple, les introns mitochondriaux n'ont été décrits que chez les métazoaires basaux comme les éponges ou les cnidaires (Huchon et al., 2015). Chez l'homme, aucun intron n'est retrouvé. Plus généralement Les introns du groupe II sont moins fréquents que ceux du groupe I, sauf chez les plantes terrestres où on les retrouve en très grand nombre. En effet, dans les génomes mitochondriaux des végétaux, tous les introns sont de groupe II, à l'exception d'un seul intron de groupe I présent dans le gène *cox1* de certaines plantes, très probablement acquis par transfert horizontal de gènes (Cho et al., 1998). Chez *Arabidopsis*, en plus des introns classiques, trois trans-introns sont présents dans les ARNm des gènes *nad1*, *nad2* et *nad5*. Par rapport à l'épissage normal, l'épissage en trans génère un seul transcrit ARN à partir de plusieurs pré-ARNm séparés dans le (Malek & Knoop, 1998). Les protéines PPR sont également impliquées dans les événements d'épissage chez les plantes (G. G. Brown et al., 2014).

La synthèse des protéines dans la mitochondrie

Généralités sur la traduction des protéines

La synthèse des protéines, ou traduction, est le processus final par lequel l'information génétique intermédiaire (ARNm) est lue pour produire des protéines. La traduction est effectuée par les ribosomes, des machines moléculaires qui lisent les ARNm et catalysent l'assemblage des acides aminés pour former une chaîne polypeptidique. La définition du code génétique, par lequel des triplets de nucléotides (codons) spécifient un acide aminé, est assurée par les ARNt. Les ribosomes facilitent donc la reconnaissance des anticodons des ARNt avec les codons des ARNm et détiennent l'activité peptidyl transférase pour relier les acides aminés portés par les ARNt (Lafontaine & Tollervey, 2001).

Les ribosomes sont des machines moléculaires complexes que l'on trouve dans toutes les cellules vivantes. Ils sont organisés en deux grandes parties fonctionnelles : la petite sous-unité ribosomique (SSU), qui lit l'ARNm, et la grande sous-unité ribosomique (LSU), qui contient le site catalytique ribosomique appelé "peptidyl transferase center" (PTC), qui joint

les acides aminés pour former une chaîne polypeptidique (Melnikov et al., 2012). Chacune de ces sous-unités est un énorme complexe ribonucléoprotéique, composé d'un ou de plusieurs ARN ribosomiaux (ARNr) et d'une variété de protéines ribosomiques. Ils ont été observés pour la première fois dans les années 50 par George Emil Palade, à l'aide de la microscopie électronique (Palade, 1955), et cette découverte lui a valu, conjointement avec Albert Claude et Christian de Duve, le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1974. Même si les ribosomes sont omniprésents dans tous les organismes vivants, leurs structures et leurs compositions, ainsi que les facteurs qui contribuent à la traduction, sont étonnamment différents d'un organisme à l'autre. Les ribosomes sont particulièrement divergents entre procaryotes et eucaryotes, mais aussi entre bactéries et archées (Eme et al., 2017). Dans le cas de la SSU, la SSU procaryote contient l'ARNr 16S et 21 protéines ribosomiques (chez *E.coli*), et on trouve davantage de protéines chez les archées apparentées aux eucaryotes. La SSU eucaryote contient l'ARNr 18S et 33 protéines ribosomiques (Melnikov et al., 2012). Ce nombre peut varier entre les espèces, par exemple une protéine ribosomique supplémentaire spécifique aux kinétoplastes a été récemment identifiée chez *T.brucei* (Brito Querido et al., 2017). Dans le cas du LSU, les procaryotes possèdent deux ARNr, le 5S et 23S, et 33 protéines ribosomiques (chez *E.coli*). Comme pour la SSU, un plus grand nombre de protéines sont trouvées chez les organismes archéens (Eme et al., 2017). La grande sous-unité eucaryote contient trois ARNr : 5S, 5.8S et 25S/28S (allant de 3396 à 5034 nucléotides) ainsi que 46 à 47 protéines ribosomiques (46 chez la levure et 47 chez les animaux). Par conséquent, par rapport aux procaryotes, les ribosomes des eucaryotes ont acquis en moyenne 25 protéines ribosomiques et possèdent un ARNr supplémentaire dans la LSU. Plusieurs protéines ribosomiques et ARNr sont conservés tout au long de l'évolution, formant le noyau fonctionnel du ribosome (Melnikov et al., 2012). Si on écarte les mito- et chloro-ribosomes, 15 protéines ribosomiques dans la SSU et 18 protéines ribosomiques dans la LSU sont considérées comme universelles entre les eucaryotes et les procaryotes (Ban et al., 2014).

Le mécanisme de traduction peut être décomposé en trois étapes principales : L'initiation, l'élongation et la terminaison (Fig. 8). Lors de l'initiation, la petite sous-unité du ribosome, associée à un ARNt^{Met} initiateur va se lier à la région 5' de l'ARNm où est localisé le codon d'initiation (Dyson et al., 1993; Kolitz & Lorsch, 2010). Plusieurs facteurs, appelés facteurs d'initiation, sont impliqués dans ce processus. Chez les eubactéries, le processus de traduction implique trois facteurs d'initiation, IF1, IF2 et IF3 (Gualerzi & Pon, 1990). IF1 et IF2 sont

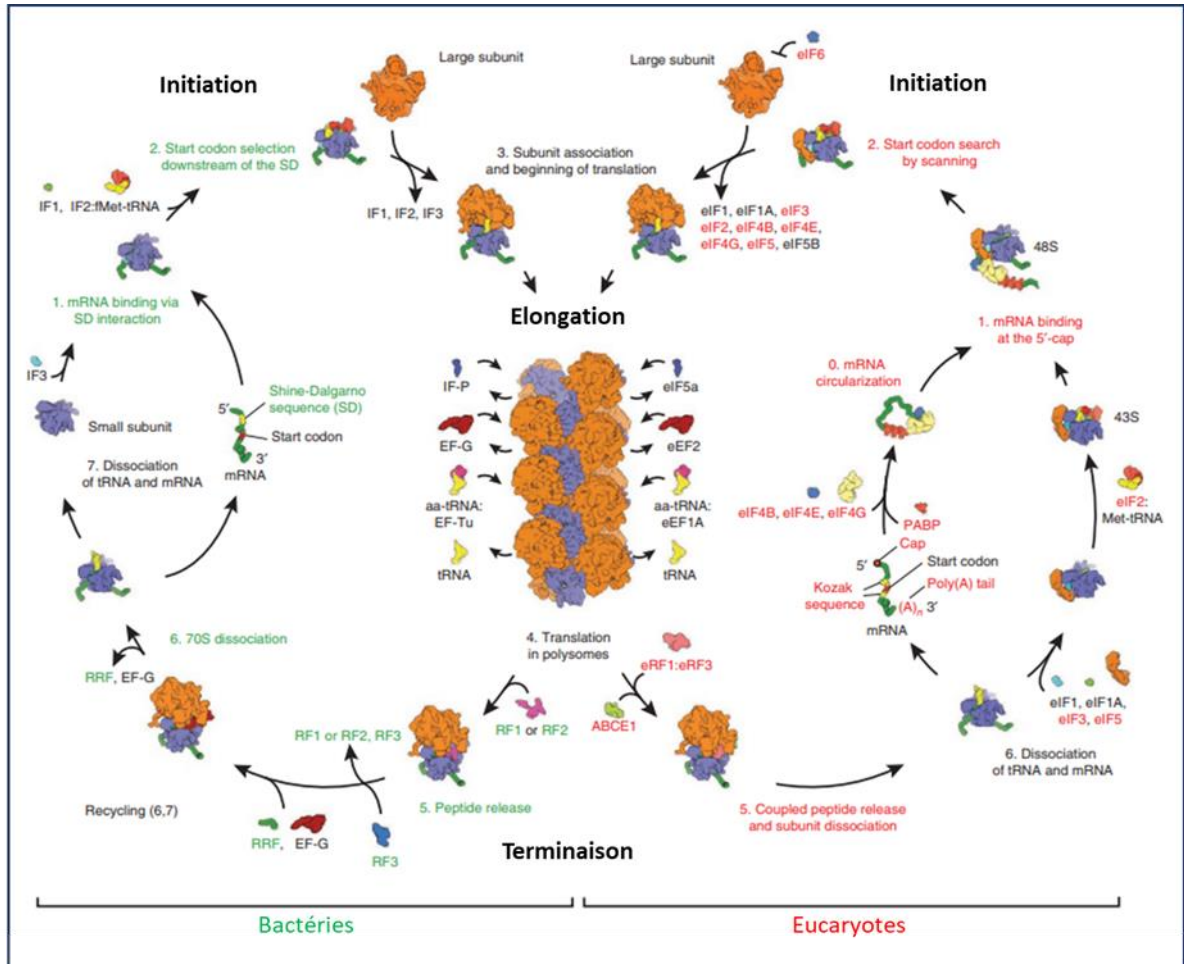


Figure 8 : La traduction des protéines chez les eucaryotes et les bactéries

Représentation schématique des différentes étapes de la traduction et comparaison entre les eucaryotes et les bactéries. Les étapes principales sont l'initiation, l'élongation de la chaîne polypeptidique, la terminaison et le recyclage des ribosomes. Les différents facteurs impliqués sont indiqués. Image adaptée de (Melnikov et al., 2012).

appelés "facteurs universels d'initiation de la traduction" car ils ont des homologues fonctionnels et structurels conservés chez les eucaryotes ainsi que chez les Archées (Roll-Mecak et al., 2001). Dans les mitochondries, même si le processus général d'initiation de la traduction semble être conservé, où un ARNt^{Met} formylée participe à l'initiation de la traduction de façon similaire aux bactéries, la différence la plus importante avec la traduction bactérienne réside dans la nature des facteurs de traduction orchestrant le processus. En effet, parmi les trois facteurs d'initiation, l'IF2 mitochondrial (mtIF2) est universellement présent, mtIF3 est presque universel (chez la levure, Aim23p est un orthologue de mIF3), et mtIF1 est universellement absent (Atkinson et al., 2012). Par conséquent, dans les mitochondries, l'un des trois facteurs cruciaux de l'initiation de la traduction a été perdu. Il a été démontré que, le mtIF2 bovin est capable de remplir les rôles biologiques essentiels de IF1 et de IF2 chez les bactéries (Fig. 9) (Gaur et al., 2008). Ainsi, la fonction de IF1 semble avoir été transférée à mIF2 grâce à une insertion conservée de 37 acides aminés dans mtIF2, mais cette insertion n'est pas retrouvée chez tous les organismes, en particulier pas chez les plantes (Gaur et al., 2008; Kuzmenko et al., 2014). De plus chez les plantes, la protéine mtIF3 possède aussi une très grande extension (non reliée à celle de mtIF2 des mammifères). La fonction de IF1 pourrait être portée par cette extension ou par une autre protéine encore inconnue dans les mitochondries de plante. Une fois la petite sous-unité correctement positionnée sur le codon d'initiation, la grande sous-unité est recrutée et l'élongation commence. Les facteurs impliqués et les processus par lesquels les ribosomes sont recrutés sur les ARNm diffèrent entre les procaryotes et les eucaryotes (Myasnikov et al., 2009). Par exemple, chez certains procaryotes, le SSU se lie à l'ARNm grâce à une séquence consensus appelée séquence Shine-Dalgarno, alors que chez les eucaryotes le recrutement de l'ARNm implique la reconnaissance de la coiffe en 5' de l'ARNm (Merrick, 2004; Yonath, 2009; Yusupova et al., 2006). Au début de l'élongation, l'ARNt initiateur est placé dans le site P du LSU, et le site A est prêt à recevoir le premier ARNt-aminoacylé. Le site A et le site P sont, avec le site E, deux des trois sites actifs du ribosome. Le site A est le point d'entrée du nouvel ARNt aminoacylé. Le site P est l'endroit où la liaison peptidique est formée dans le ribosome. Et le site E est le site de sortie de l'ARNt non chargé après qu'il ait transféré son acide aminé à la chaîne peptidique en élongation. La traduction se termine par la terminaison. Cette étape est déclenchée lorsqu'un codon de terminaison (UAA, UAG, ou UGA) entre dans le site A. Ces codons de terminaison ne sont reconnus par aucun ARNt. Au lieu de cela, ils sont reconnus par des protéines appelées

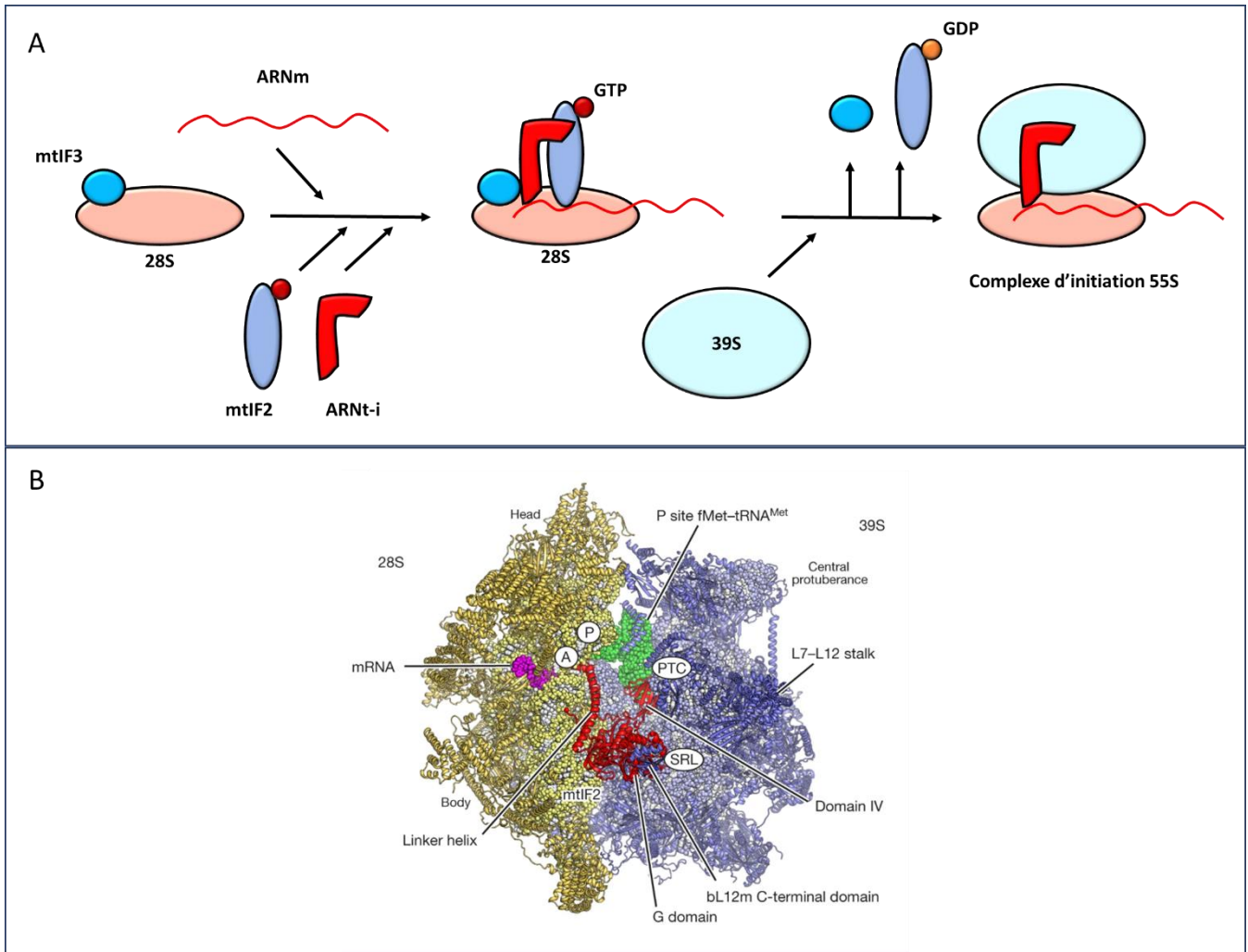


Figure 9 : La formation du complexe d'initiation de la traduction mitochondriale chez les mammifères

A. Représentation schématique des différentes étapes de la formation du complexe d'initiation de la traduction mitochondriale chez les mammifères. Le facteur mtIF3 se fixe sur la SSU du mitoribosome, puis l'ARNt-initiateur, mtIF2 et l'ARNm sont recrutés pour former un complexe de pré-initiation. La LSU est alors recrutée, ce qui entraîne le départ de mtIF3 puis mtIF2 pour permettre l'initiation de la traduction.

B. Représentation de la structure tridimensionnelle du complexe d'initiation de la traduction avec l'ARNm, l'ARNt^{met}, mtIF2 et les deux sous-unités du ribosome mitochondrial bovin. Image issue de (Kummer et al., 2018).

facteurs de libération qui activent l'hydrolyse de la liaison ester sur l'ARNt-peptidyl pour libérer la protéine nouvellement synthétisée du ribosome. Pour finir, les deux sous-unités du ribosome se dissocient de l'ARNm et l'une de l'autre, pour être réutilisées dans un autre cycle de traduction. Chez les eucaryotes, on trouve des ribosomes supplémentaires localisés dans les organelles, les mitochondries et le chloroplaste, pour effectuer la traduction des ARNm encore codés par les génomes organellaires. Alors que le ribosome du chloroplaste ressemble fortement aux ribosomes bactériens (Boerema et al., 2018), les ribosomes mitochondriaux, ou mitoribosomes, ont divergé de manière significative de leurs homologues bactériens au cours de l'évolution des eucaryotes.

Caractéristiques des ribosomes mitochondriaux

Les mitoribosomes sont évolutivement dérivés des ribosomes d'une α -protéobactérie, hérités de l'endosymbiote original. Cependant, les premières études biochimiques ainsi que les récentes structures à haute résolution ont montré qu'ils ont fortement divergé de leur homologue bactérien en termes de composition, de fonction et de structure (Desai et al., 2017; Greber et al., 2015; Bieri et al., 2018). De plus, non seulement les ribosomes mitochondriaux ont radicalement divergé des ribosomes bactériens, mais la dérive évolutive a également produit des mitoribosomes très différents à travers les différentes lignées eucaryotes. En effet, même si certains composants mito-spécifiques ont été acquis tôt au cours de l'évolution des eucaryotes et sont très probablement partagés par tous les mitoribosomes, une partie des composants des mitoribosomes sont spécifiques à certains groupes d'eucaryotes. Par exemple, certaines protéines ribosomiques sont spécifiques à la levure, d'autres aux animaux et d'autres aux plantes (Bonen & Calixte, 2006; F et al., 2019; Goldschmidt-Reisin et al., 1998; Kitakawa et al., 1997; Koc et al., 2000).

Compositions

Les mitoribosomes étant des dérivés évolutifs des ribosomes bactériens ancestraux, leur composition et leur structure reposent donc sur un échafaudage procaryote. En effet, des études biochimiques et structurales montrent que, malgré leur origine évolutive, les mitoribosomes ont considérablement divergé des ribosomes bactériens et des différentes lignées eucaryotes. La caractéristique commune des ribosomes mitochondriaux est qu'ils

contiennent un nombre considérablement accru de protéines ribosomiques par rapport aux 54 trouvées dans *E.coli*. Les analyses protéomiques ont permis de fournir une liste détaillée des protéines ribosomiques mitochondriales chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez les mammifères (Goldschmidt-Reisin et al., 1998; Kitakawa et al., 1997; Koc et al., 2000, 2001). Chez les plantes, des analyses similaires ont été réalisées récemment dans notre équipe et ont permis de connaître la composition exacte des mitoribosomes d'*Arabidopsis* (Waltz et al., 2019, 2020). Certaines protéines du noyau bactérien ont été perdues, c'est le cas de bS20, qui est absente de tous les eucaryotes étudiés, ce qui suggère qu'elle a été perdue tôt au cours de l'évolution des eucaryotes (Smits et al., 2007). Parmi les protéines ribosomiques mitochondriales supplémentaires, certaines sont conservées chez tous les eucaryotes (mS29, mS33, mL40, mL41 ...) et semblent former un noyau de protéines ribosomiques mito-spécifiques qui ont sûrement été acquises relativement tôt au cours de l'évolution des eucaryotes. En plus de ces protéines communes, des protéines ribosomiques supplémentaires sont trouvées spécifiquement dans chaque lignée eucaryote (Bieri et al., 2018; Greber & Ban, 2016; Ott et al., 2016). L'homme, le porc, la levure, le trypanosome et plus récemment *Tetrahymena*, *Arabidopsis* et *Chlamydomonas* sont les seuls organismes pour lesquels la structure haute résolution a confirmé la composition protéique des mitoribosomes. Les mammifères et la levure possèdent respectivement 36 et 30 protéines ribosomiques mito-spécifiques, ce qui correspond à 45% et 37% de leurs protéines ribosomiques totales. Parmi celles-ci, la moitié est commune à la levure et aux mammifères et l'autre moitié est spécifique à chacun d'eux (Fig. 9). Les plantes ont quant à elle 32 protéines ribosomiques mito-spécifiques, soit presque 40% des protéines le constituant. Toutes ces protéines forment un vaste réseau d'interaction à la surface du noyau de l'ARNr et ont contribué à la spécialisation des mitoribosomes (Bieri et al., 2018). Les ARNr mitochondriaux sont de longueur très variable. Les premières appréciations les décrivaient comme fortement réduits, comme observé chez les métazoaires, les kinétoplastidés ou les apicomplexes (Feagin et al., 2012; Kirby & Koslowsky, 2017; Taanman, 1999). Cependant, chez les plantes et les champignons, ils sont considérablement étendus par rapport aux (Marienfeld et al., 1999; Sloan et al., 2018; Waltz et al., 2019; Wolters et al., 2015). Leur organisation est parfois inhabituelle, par exemple chez *Chlamydomonas* et *Plasmodium* les ARNr de la LSU et de la SSU sont fragmentés dans le génome mitochondrial (Feagin et al., 2012; Salinas-Giegé et al., 2017; Waltz et al., 2021). L'ARNr 5S n'est pas toujours conservé. Chez les animaux et les levures, il est absent du génome

mitochondrial, et on a longtemps soupçonné qu'il était importé du cytosol (Smirnov et al., 2011). Mais chez les mammifères, un ARNt remplace structurellement l'ARNr 5S. Il est intéressant de noter que chez l'Homme, l'ARNt^{Val} compense l'absence de 5S, alors que dans les mitoribosomes de *Sus scrofa*, on trouve un ARNt^{Phe} (A. Brown et al., 2014; Greber et al., 2014; Ott et al., 2016). L'incorporation de l'ARNt mitochondrial dans le mitoribosome chez ces deux organismes semble résulter de son emplacement dans le génome mitochondrial. En effet, ces deux ARNt mitochondriaux flanquent l'ARNr de la SSU avec lequel ils sont co-transcrits (Chrzanowska-Lightowlers et al., 2017). Chez la levure, le 5S est également absent, mais cette perte est compensée par une extension de l'ARNr 21S (Ott et al., 2016). Chez plasmodium et le trypanosome, le 5S est également absent, mais chez les plantes, *Chlamydomonas* et *Reclinomonas*, l'ARNr 5S est toujours codé dans le génome mitochondrial, et fait toujours partie du mitoribosome dans le cas des plantes et de *Chlamydomonas* (Lang et al., 1997; Marienfeld et al., 1999; Waltz et al., 2019, 2020, 2021). L'ARNr 5S chez *Chlamydomonas* a cependant une séquence hautement dégénérée et une structure différente de l'ARNr 5S bactérien, rendant son identification difficile pendant de nombreuses années. Par conséquent, le rapport ARN/protéines des mitoribosomes est différent de celui des ribosomes bactériens et du cytosol. En effet, pour ce dernier, le rapport est de 2/1, les ARNr contribuant beaucoup plus à la composition par rapport aux protéines. Dans les mitoribosomes des mammifères, ce rapport est complètement inversé et passe à 1/2, ce qui se traduit par un ribosome moins dense (55S) par rapport au ribosome bactérien (70S) (Amunts et al., 2015; A. Brown et al., 2017). On retrouve un contenu en ARNr réduit pour *Chlamydomonas* et sont ARNr fragmenté (Waltz et al., 2021). Chez la levure, le rapport est de 1/1, les ARNr de la SSU et de la LSU possédant des extensions, et la levure a acquis des protéines ribosomiques supplémentaires associées à ces extensions (Bieri et al., 2018; Desai et al., 2017). Le changement le plus spectaculaire s'est produit chez *Trypanosoma brucei*, où le rapport grimpe jusqu'à 1/6 (Ramrath et al., 2018).

Structures

Au cours des deux dernières décennies, des efforts considérables ont été déployés pour purifier et résoudre la structure des mitoribosomes de différents organismes. Plusieurs structures de moyenne résolution sont devenues disponibles pour divers organismes : à savoir

le mitoribosome bovin, les mitoribosomes du champignon *Neurospora crassa* et du protozoaire *Leishmania tarentolae* (Sharma et al., 2003, 2009; Van Der Sluis et al., 2015). A ce jour sept structures 3D à haute résolution de ribosomes mitochondriaux complets ont été déterminées par cryo-EM, chez la levure *Saccharomyces*, deux espèces de mammifères l'Homme et un bovin, un trypanosome, un cilié du groupe *Tetrahymena*, l'algue *Chlamydomonas* et enfin la plante *Arabidopsis* (Amunts et al., 2015; Desai et al., 2017; Greber et al., 2015; Ramrath et al., 2018; Tobiasson & Amunts, 2020; Waltz et al., 2019, 2020, 2021). L'obtention d'une structure à haute résolution des mitoribosomes est un défi pour de multiples raisons. Tout d'abord, les mitoribosomes sont peu abondants dans la cellule par rapport aux ribosomes cytosoliques (ou aux chlororibosomes chez les organismes qui possèdent des chloroplastes). Par conséquent, il est nécessaire de purifier les mitochondries, ce qui peut déjà être un processus difficile. Même à partir de mitochondries pures, plusieurs composants de coefficient de sédimentation similaire se co-purifient avec les mitoribosomes, en particulier les composants abondants de la chaîne respiratoire, mais aussi les ribosomes cytosoliques qui sont attachés à la membrane externe des mitochondries (Gold et al., 2017). De plus, les mitoribosomes s'associent aux membranes, ce qui peut entraîner une faible solubilité et une agrégation lorsqu'ils sont retirés de cet environnement hydrophobe. Pour ces raisons, les méthodes classiques de détermination de la structure, à savoir la cristallographie aux rayons X, qui est déjà difficile pour les grands complexes moléculaires comme les ribosomes, sont presque impossibles avec les mitoribosomes. C'est principalement grâce aux progrès technologiques réalisés avec la cryo-microscopie électronique que des structures à haute résolution des mitoribosomes ont pu être obtenues (Kühlbrandt, 2014). En 2015, l'équipe de Nenad Ban et le groupe de Ramakrishnan ont tous deux publié des structures des mitoribosomes 55S de mammifères, respectivement une structure de 3,8 Å du mitoribosome porcine et une structure de 3,6 Å de celui de l'homme (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015). En 2017, Desai et ses collègues ont publié la reconstruction cryo-EM du mitoribosome complet de la levure 74S à une résolution de 3,3 Å (Desai et al., 2017). Ces structures ont révélé les principales caractéristiques des mitoribosomes et donnent des indices sur les fonctions de leurs composants supplémentaires. Le mitoribosome 55S de mammifère est composé d'un total de 82 protéines ainsi que de deux ARNr et d'un ARNt remplaçant l'ARNr 5S, appelé ARNt de la protubérance centrale ou ARNt-CP. La LSU est appelée 39S et est constituée de l'ARNr 16S et l'ARNt-CP ainsi que 52 protéines ribosomiques, la SSU est appelée 28S et est composée

de 30 protéines et de l'ARNr 12S (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015; Greber & Ban, 2016). Le mitoribosome 74S de la levure est composé d'un total de 80 protéines et de deux ARNr, le 21S et le 15S, l'ARNr 5S étant complètement absent. La LSU est appelée 54S et est constituée de l'ARNr 21S qui est plus grand que son homologue bactérien, ainsi que de 46 protéines ribosomiques. La SSU est appelée 37S et se compose de 34 protéines ribosomiques et de l'ARNr 15S, qui est également plus grand que celui de la bactérie. (Bieri et al., 2018; Desai et al., 2017). Les équipes de Nenad Ban et André Schneider ont publié une structure de 7,8 Å de résolution du ribosome mitochondrial de *Trypanosoma brucei*, qui est le ribosome le plus riche en protéines décrit à ce jour, avec 127 protéines différentes, 70 dans la LSU et 57 dans la SSU, ainsi que des ARNr 9S et 12S fortement réduits (Ramrath et al., 2018). La structure haute résolution des mitoribosomes de *Chlamydomonas* et de plante sont plus récentes (Waltz et al., 2020). Elles comportent de nombreuses différences structurales avec les autres ribosomes mitochondriaux. Chez *Chlamydomonas* le mitoribosome est composé de 80 protéines et de 4 fragments d'ARNr pour la SSU et 9 fragments ARNr pour la LSU, dont un homologue du 5S. Le mitoribosome de plante (78S) est composé de 82 protéines et de trois ARNr, le 26S et le 18S possédant de longues insertions comparé à leurs homologues bactériens, et de l'ARNr 5S (Fig.10). Ces structures ont révélé que parmi les protéines ribosomiques supplémentaires spécifiques aux mitochondries, certaines remplissent une fonction architecturale en stabilisant et protégeant le noyau de l'ARNr, tandis que d'autres fournissent des fonctionnalités additionnelles. Des travaux plus récents, utilisant des approches protéomiques et structurales, tentent désormais d'élucider les mécanismes d'assemblage des mitoribosomes (Bogenhagen et al., 2018; Desai et al., 2017; Zeng et al., 2018).

Les centres fonctionnels du ribosome, à savoir le centre peptidyl-transférase (PTC) de la LSU et le centre de décodage de la SSU du ribosome, les plus importants, sont encore exclusivement formés par les ARNr. Par conséquent, les mécanismes de base de la traduction sont toujours conservés et réalisés par un ribozyme. Les sites A, P et E, qui accueillent les ARNt dans la LSU, sont également conservés. Cependant, chez l'homme, ils ont tous évolué conjointement avec les ARNt mitochondriaux pour s'adapter à leur variabilité structurale considérable (Greber et al., 2015; Salinas-Giegé et al., 2015). Les sites des levures sont comparables à ceux des bactéries. Chez *Trypanosoma*, les sites de liaison des ARNt sont entourés de résidus d'ARNr non conservés, mais occupent des positions équivalentes dans la

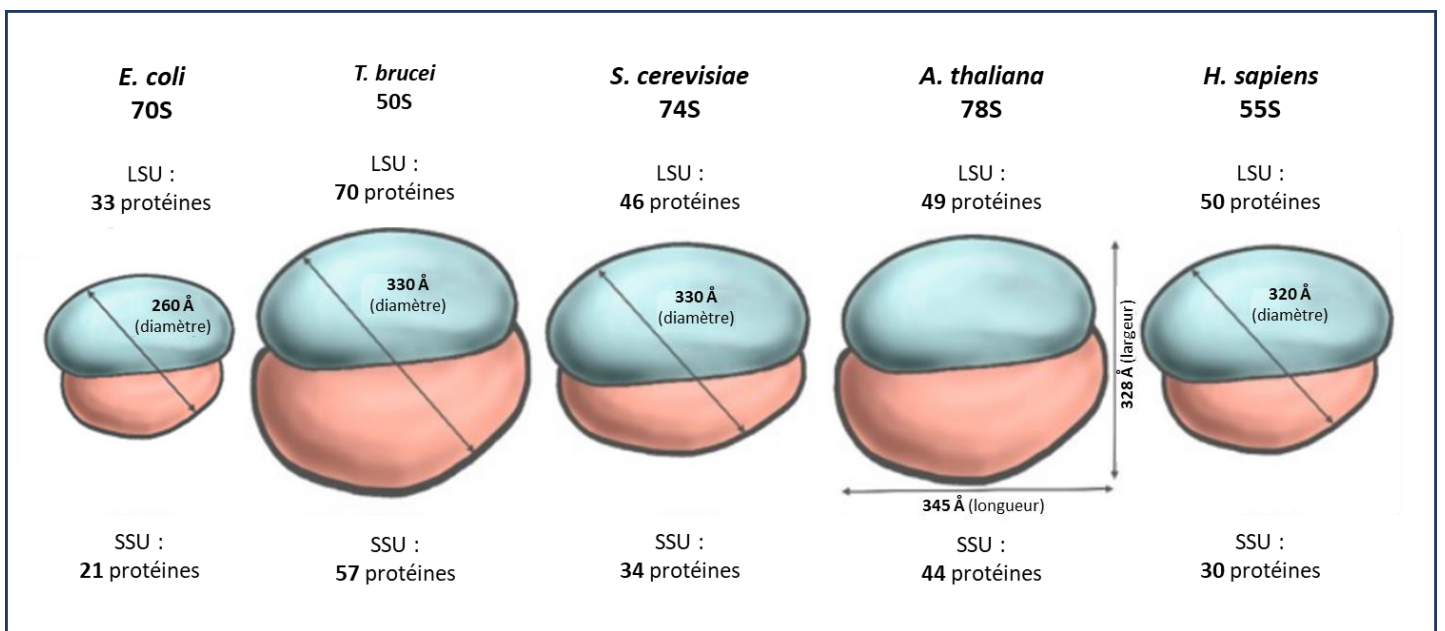


Figure 10 : Différences de taille et de composition en protéines des ribosomes mitochondriaux chez différents organismes.

Représentation schématique des ribosomes mitochondriaux de cinq espèces appartenant à différents groupes d'organismes : une bactérie (*E. coli*), une levure (*C. cerevisiae*), une plante à fleur (*A. thaliana*), un kinétoplaste (*T. brucei*) et un mammifère (*H. sapiens*). Le nombre de protéines identifiées dans chaque sous-unité et le coefficient de sédimentation de chaque mitoribosome est indiqué, ainsi que le diamètre moyen de chaque mitoribosome. Modifié d'après (Tomal et al., 2019).

structure par rapport aux bactéries, jouant ainsi un rôle structural conservé. De plus, même si plusieurs morceaux d'ARNr et de protéines ont été perdus dans le mitoribosome de *T.brucei*, le CPT et le centre de décodage sont encore hautement conservés (Ramrath et al., 2018). Chez la levure et chez *T.brucei*, le mitoribosome a acquis la protéine mS47, qui forme une des deux grandes protubérances corporelles. La protéine présente une homologie avec des enzymes impliquées dans le catabolisme de la Valine. La structure a montré que les résidus catalytiques sont conservés et que la cavité pour la liaison du substrat est accessible, par conséquent mS47 peut encore exercer son activité enzymatique, mais sa fonction claire n'est toujours pas comprise (Desai et al., 2017; Ramrath et al., 2018). Le fait qu'elle ne soit pas présente chez les mammifères - elle est également présente chez les plantes - suggère une perte secondaire de cette protéine chez les animaux.

Pendant longtemps, le recrutement des ARNm au mitoribosome a été énigmatique, mais des études structurales ont permis de mieux le comprendre. En effet, chez les bactéries, le recrutement de l'ARNm au SSU et le placement correct du codon d'initiation dans le canal de l'ARNm sont médiés par l'interaction de la séquence Shine-Dalgarno (SD) sur l'ARNm avec la séquence anti-SD de l'ARNr 16S (Shine & Dalgarno, 1974). Dans les mitochondries, les ARNm et l'ARNr SSU ont perdu leurs séquences SD et anti-SD, il fallait donc acquérir de nouvelles caractéristiques structurales pour favoriser le mécanisme d'initiation de la traduction (Kuzmenko et al., 2014). Chez les animaux, ce mécanisme était encore moins compris car les ARNm ne possèdent pas d'UTR 5', qui abrite généralement des motifs pour recruter le ribosome ou des facteurs impliqués dans l'initiation. Les données sur les structures à haute résolution des mitoribosomes ont permis de comprendre le recrutement de l'ARNm chez les mammifères et les levures. Dans le mitoribosome des mammifères, la protéine ribosomique mS39, qui est une protéine PPR, est située à la tête de la SSU près du canal d'entrée de l'ARNm. Il a déjà été spéculé que mS39 serait impliqué dans la liaison des ARNm sans leader pour aider leur insertion dans le canal d'entrée d'ARNm remodelé, pour amener l'ARNm vers le centre de décodage (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015). La structure récente du complexe d'initiation de la traduction (reconstitué in vitro) a confirmé ces résultats (Fig. 11). En effet, les motifs PPR de mS39 ne se lient apparemment pas aux ARNm d'une manière clairement spécifique à la séquence, contrairement aux protéines PPR dites « canoniques ». Il semble plutôt que les mS39 reconnaissent des séquences riches en U qui sont conservées à partir du codon 7 dans les 11 ARNm des mitochondries de mammifères. Ces tronçons de U peuvent

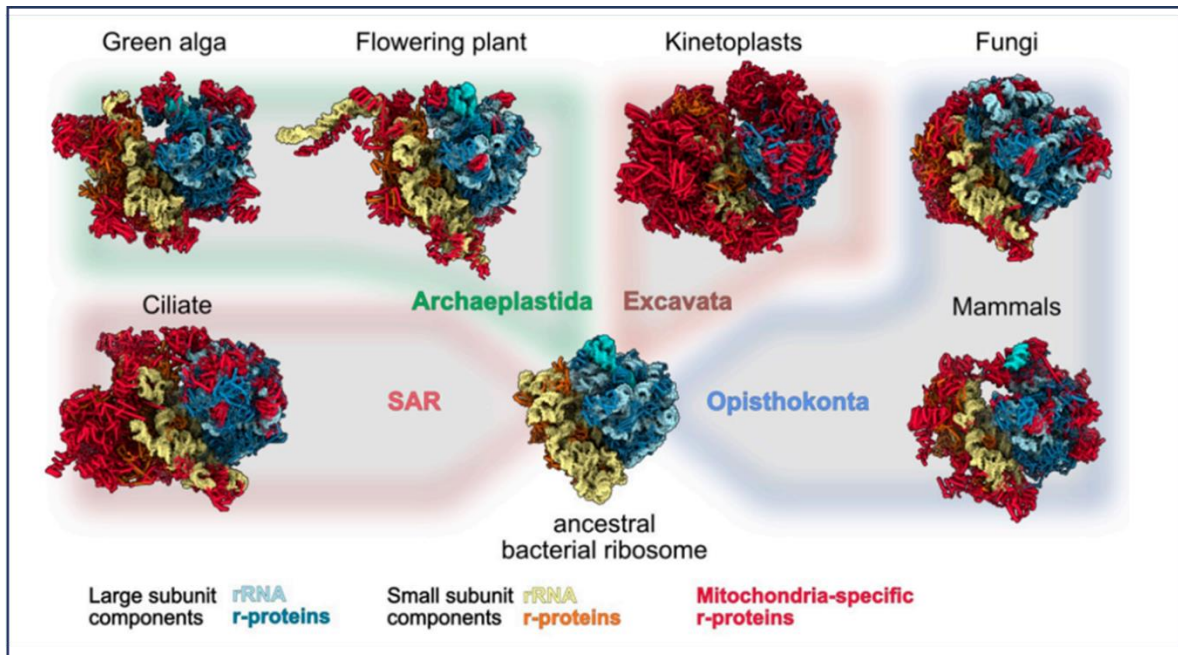


Figure 11 : Comparaison des structures des ribosomes mitochondriaux chez des organismes variés.

Afin de mettre en évidence la divergence des mitoribosomes par rapport aux bactéries et leur diversité en termes de taille et de forme chez les eucaryotes, les structures haute résolution de mitoribosomes sont superposées à un arbre évolutif schématisé des eucaryotes. De gauche à droite, les structures de mitoribosomes proviennent d'un cilié (*T. thermophilus*), d'une algue verte (*C. reinhardtii*), d'une plante à fleurs (*A. thaliana*), d'un kinétoplaste (*T. brucei*), d'un champignon (*N. crassa*) et un mammifère (*H. sapiens*). La structure centrale est celle d'un mitoribosome de *E. coli* pour la comparaison. Les composants des grandes sous-unités sont représentés en nuances de bleu et ceux des petites sous-unités en nuances de jaune. Les protéines ribosomiques spécifiques de chaque mitochondrie (qui comprennent les protéines partagées par tous les mitoribosomes et celles spécifiques à l'espèce) sont mises en évidence en rouge. SAR = Stramenopiles, Alvéolates et Rhizaria. D'après (Scaltssoyiannes et al., 2022)

être le déterminant de la liaison initiale des ARNm mitochondriaux au mitoribosome (Bieri et al., 2018; Kummer et al., 2018). Dans le mitoribosome de la levure, la situation est différente car les ARNm ont de longs UTR 5'. Il est bien établi chez la levure que ces 5' UTR se lient à des activateurs de traduction. Ces activateurs de traduction sont généralement spécifiques à un transcrit particulier et sont essentiels pour la traduction des transcriptions respectives (Derbikova et al., 2018). Le canal de sortie de l'ARNm du mitoribosome de la levure est fortement remodelé, composé de protéines mitoribosomiques spécifiques à la levure. Ces protéines forment un canyon en forme de V à la sortie du canal qui est donc plus large. Le canyon est composé de la protubérance constituée de mS42 et mS43 d'un côté et d'une série d'extensions de protéines de l'autre côté. Dans la reconstruction 3D du mitoribosome de levure, une densité supplémentaire a été détectée sur le canyon en forme de V, suggérant que ce canyon agit comme une plateforme de liaison pour les activateurs de traduction (Fig. 11) (Desai et al., 2017). En ce qui concerne les plantes, plusieurs hypothèses ont été avancées mais aucune n'a été encore étudiée en détail. Une de ces hypothèses repose sur une protéine spécifique à la SSU du mitoribosome de plante, mS83 ou rPPR10, une protéine PPR. D'après sa position dans la structure du mitoribosome de plante, mS83 pourrait interagir avec un motif d'acides nucléique riche en adénine et purines nommé AxAAA, que l'on retrouve 19 nucléotides en amont du codon d'initiation, présent dans le 5'UTR de la moitié des ARNm mitochondriaux, ce qui pourrait permettre leur alignement et l'initiation de la traduction, à la manière de mS39 chez les mammifères. Il existerait cependant au moins un autre mécanisme pour l'adressage des ARNm au mitoribosome. Une autre hypothèse se rapprocherait d'un mécanisme déjà observé chez la levure, et l'existence de protéines PPR spécifiques à chaque ARNm mature, qui permettraient de les diriger vers le mitoribosome. Il a déjà été montré que la protéine PPR MTL1 est nécessaire à l'expression de Nad7, et qu'elle pourrait diriger son ARNm vers le ribosome en interagissant avec son 5' UTR (Haïli et al., 2016). Cette protéine PPR pourrait faire partie d'un mécanisme plus général pour l'initiation de la traduction impliquant une protéine PPR spécifique à chaque ARNm mitochondrial.

Spécificités du ribosome mitochondrial des plantes

Les ribosomes mitochondriaux des plantes possèdent de nombreuses spécificités structurales ainsi que des protéines spécifiques au règne des plantes. Ces spécificités sont décrites en détails dans la revue *Specificities of the plant mitochondrial translation apparatus* (Annexe 1). Ci-dessous un résumé des principales caractéristiques de ces ribosomes.

Le mitoribosome de plante contient l'ARNr 18S de la SSU et de l'ARNr 26S de la LSU. En comparaison aux ribosomes bactériens, les ARNr du mitoribosome végétal ont de grandes extensions à la fois dans la SSU et la LSU. Sur l'ARNr de la SSU, une grande extension caractéristique de 370 nucléotides forme un nouveau domaine d'ARNr unique aux mitoribosomes végétaux. Il est principalement formé par une jonction à quatre voies prolongée par deux hélices parallèles d'ARNr double brin, interagissant avec deux protéines PPR, l'une parallèle aux deux hélices d'ARNr et l'autre perpendiculaire (Waltz et al., 2020). Cette structure est très flexible puisqu'elle peut effectuer des mouvements de grande amplitude (30°) par rapport au corps de la SSU (Fig.12 A). La fonction de ce nouveau domaine de la tête du mitoribosome reste néanmoins complètement inconnue.

Le protéome du mitoribosome de la plante est lui aussi plus étendu avec 82 protéines ribosomiques, par rapport aux 54 protéines du ribosome d'*E. coli*. Parmi ces protéines mitoribosomiques, 19 sont entièrement spécifiques aux plantes, la moitié d'entre elles étant des protéines PPR et les autres sont principalement des protéines hélicoïdales de fonctions inconnues. L'identification des protéines PPR comme faisant partie de ce ribosome est en accord avec la prévalence des protéines PPR pour tous les processus d'expression génétique dans les mitochondries végétales. La composition des mitoribosomes végétaux pourrait également être hétérogène car plusieurs familles de gènes ont été observées pour certaines protéines ribosomiques canoniques et spécifiques aux plantes, alors que des copies uniques des protéines respectives sont observées dans la structure du ribosome. C'est par exemple le cas pour bL12m qui a quatre paralogues (Delage et al., 2007) mais aussi pour uS8m, uS15m, uL22m ou pour la nouvelle PPR ribosomique mS83 (Fig. 12 B). Pourtant, à ce stade, aucune preuve n'a été fournie pour suggérer l'existence de différents mitoribosomes végétaux fonctionnellement spécialisés (Tomal et al., 2019).

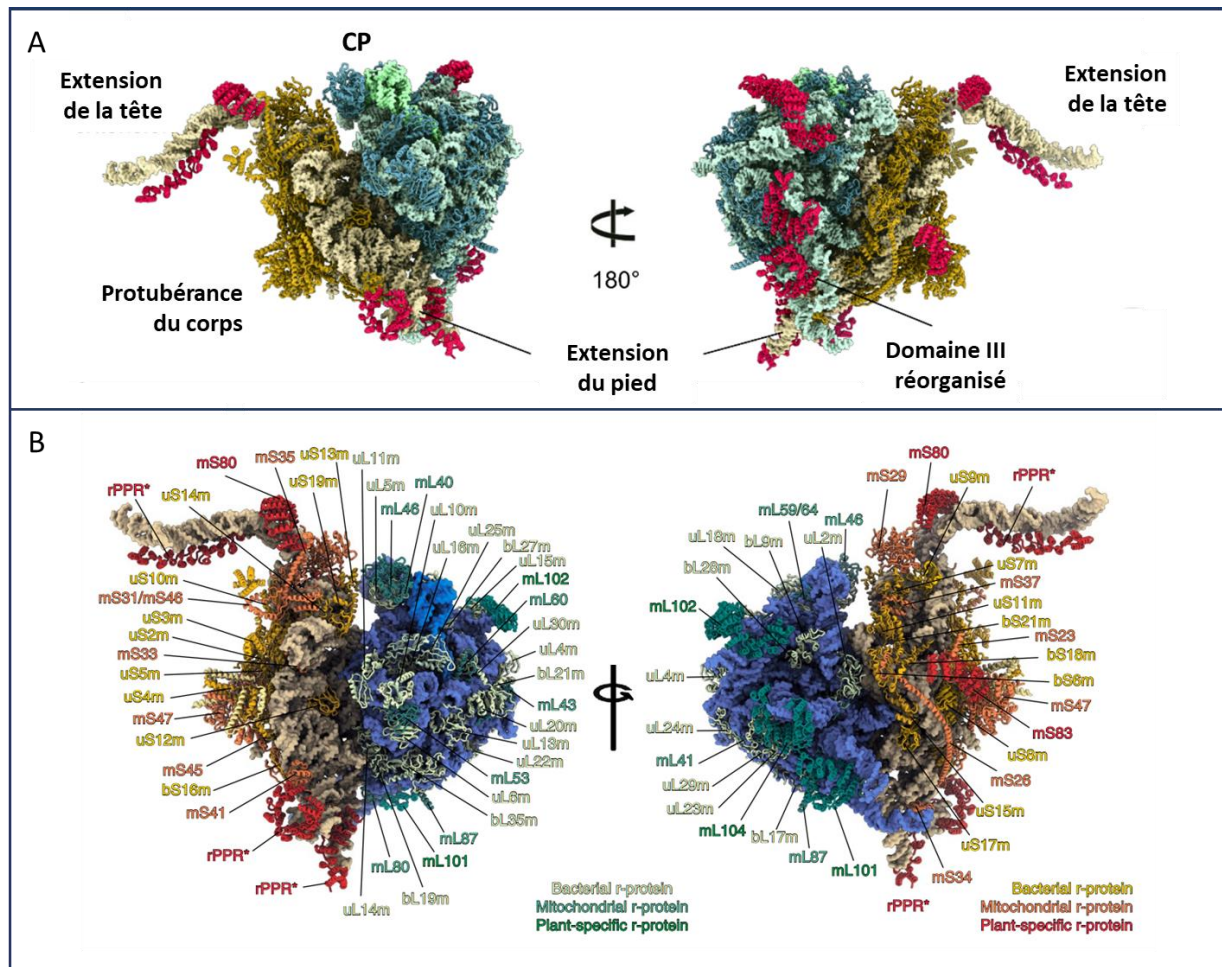


Figure 12 : Structure et composition du ribosome mitochondrial de plante.

A. Structure haute résolution du mitoribosome de plante. Les domaines possédant des expansions de l'ARNr sont indiqués. Les composants de la grande sous-unité sont représentés en nuances de bleu et ceux de la petite sous-unité en nuances de jaune. Les protéines rPPR sont indiquées en rouge.

B. Structure détaillée du mitoribosome de plante, le nom de chaque protéine composant les deux sous-unités sont indiqués. Modifié d'après (Waltz et al., 2020, 2021).

Au-delà des extensions d'ARNr, la SSU contient également une protubérance caractéristique en son cœur. La structure à haute résolution a révélé que cette protubérance de fonction inconnue est composée de mS47, mS45 et d'une extension de uS4m. Le pied de la SSU, essentiellement les hélices h44 et h6, est également allongé et stabilisé par des protéines PPR. Le mitoribosome végétal est également caractérisé par une protubérance centrale distinctive sur la LSU. Cette protubérance permet le contact entre les sous-unités avec la tête de la SSU et contient l'ARNr 5S comme chez le ribosome bactérien. Néanmoins, elle contient également les protéines mL40, mL46, mL59/64 et mL60, spécifiques aux mitochondries, augmentant le volume global de la protubérance centrale de la mitochondrie végétale (Waltz et al., 2020). De plus, le domaine III de la LSU est complètement réorganisé et allongé, remodelant drastiquement l'arrière de la LSU. La SSU est particulièrement développée avec ses grandes extensions d'ARN et ses nombreuses protéines supplémentaires. Au-delà des récentes avancées dans la caractérisation de l'appareil de traduction mitochondrial des plantes, des progrès ont également été réalisés récemment dans la caractérisation du « traductome » des mitochondries végétales. Pour cela, la technologie de profilage des ribosomes (Ribosome Profiling) a été utilisée pour obtenir une vue générale à un instant t à l'échelle du transcriptome de la traduction mitochondriale chez *Arabidopsis* (Planchard et al., 2018). Il a été observé tout d'abord que les empreintes des mitoribosomes sont longues de 27 ou 28 nucléotides chez les plantes terrestres, contrairement aux mitochondries animales où les empreintes de mitoribosomes ont une longueur allant de 24 à 37 nucléotides (Mai et al., 2017). Cela a également révélé que l'occupation des ribosomes pour des ARNm spécifiques, et donc le taux de traduction, sont plus ou moins corrélés avec l'abondance de leurs protéines respectives dans les mitochondries. Par exemple, les sous-unités du complexe de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase sont traduites à des taux plus élevés que les protéines ribosomiques ou les protéines de maturation du cytochrome c. L'occupation des mitoribosomes sur les ARNm semble également suivre la stœchiométrie des sous-unités présentes dans leurs complexes respectifs, en particulier pour le complexe V où, par exemple, l'ATP1 présente dans le complexe sous forme de trimère est plus traduite que l'ATP6 présente en un seul exemplaire (Guo & Rubinstein, 2018).

Le traductome mitochondrial a également été analysé dans différents mutants génétiques, pour analyser la fonction de nouvelles protéines ribosomiques (Waltz et al., 2019). Il a également été analysé pour des mutants du complexe I (Planchard et al., 2018) ainsi qu'avec

des mutants de *rps10* (Kwasniak-Owczarek et al., 2019). Cela nous a permis d'observer que les profils d'occupation des ribosomes étaient modifiés par rapport à celui de plantes sauvages. On observe par exemple une réduction de l'occupation des ribosomes pour certains ARNm de l'ATP synthase dans les mutants du complexe I (Planchard et al., 2018), et des taux de traduction plus élevés des protéines ribosomiques chez les mutants *rps10* (Kwasniak-Owczarek et al., 2019). Ces observations démontrent directement que la traduction mitochondriale des plantes est un processus dynamique qui peut s'adapter à un environnement mitochondrial modifié. Il n'est toujours pas clair cependant si l'appareil de traduction opère un contrôle de qualité des ARNm dans les mitochondries végétales. Une caractéristique importante de la maturation des ARNm dans les mitochondries végétales est l'édition de l'ARN. Elle modifie des centaines de codons dans le transcriptome mitochondrial (Giege & Brennicke, 1999; Small et al., 2020). Des comparaisons de séquences protéiques ont montré que seules les protéines traduites à partir d'ARNm entièrement modifiés devraient donner lieu à des protéines conservées et fonctionnelles au cours de l'évolution (Gualberto et al., 1989). Néanmoins, la traduction d'une collection d'ARNm partiellement édités mènerait à une grande diversité d'isoformes de protéines qui pourraient être utilisées pour des fonctions alternatives ou régulatrices. Une analyse ancienne effectuée dans des mitochondries de maïs en utilisant des anticorps générés contre des fragments de *rps12* non édités, partiellement édités et entièrement édités avait suggéré que les ARNm partiellement édités peuvent être traduits et que le mitoribosome ne discrimine pas le statut d'édition de ses substrats d'ARNm (Phreaner et al., 1996). Ceci a été corroboré par l'analyse récente du profilage des ribosomes qui a confirmé que la traduction effective des ARNm ne dépend pas de l'état d'édition des ARNm (Planchard et al., 2018). De même, il semble également que les mitoribosomes puissent prendre des ARNm non épissés comme substrats (Kwasniak-Owczarek et al., 2019). Pourtant, le séquençage direct de différentes protéines comme l'ATP9 du blé, NAD9 de la pomme de terre et l'ATP6 du pétunia (Graves et al., 1990; Grohmann et al., 1994; Lu & Hanson, 1994) et les protéomes de mitochondries de plantes (Millar et al., 2001) ont montré que seules les protéines correspondant à des protéines entièrement éditées et épissées sont présentes dans les complexes fonctionnels des mitochondries végétales. Ceci suggère que l'accumulation à l'équilibre des produits de traduction est régulée au niveau post-traductionnel, c'est-à-dire pendant l'assemblage des complexes fonctionnels. (Giegé et al., 2005). Les ARN messagers semblent être traduits sans distinction et seules les protéines fonctionnelles peuvent être

assemblées dans des complexes respiratoires ou dans le ribosome, tandis que les protéines aberrantes ne sont pas incorporées dans les complexes fonctionnels et sont très probablement rapidement dégradées. A l'appui de cette hypothèse, un certain nombre de facteurs impliqués dans la maturation et/ou la dégradation des protéines a été identifiés dans les fractions contenant des mitoribosomes (Rugen et al., 2019; Waltz et al., 2019).

La caractérisation détaillée des mitoribosomes végétaux aux niveaux biochimique et structural a confirmé que les protéines PPR sont effectivement présentes en tant que protéines ribosomiques centrales. Ces protéines ont été baptisées "PPR ribosomique" ou rPPR et PPR336 et PNM1, les premières ayant été identifiées comme telles ont été renommées rPPR1 et rPPR9 (Waltz et al., 2019). Alors que l'analyse biochimique a montré que 11 protéines PPR peuvent être trouvées dans le mitoribosome végétal (Waltz et al., 2019), seules 8 ont été observées dans la structure à haute résolution du mitoribosome (Waltz et al., 2020). Cela suggère que certaines protéines rPPR sont fonctionnellement redondantes, par exemple rPPR3a et rPPR3b, et/ou que des sous-populations spécifiques de mitoribosomes avec différentes compositions de sous-unités coexistent dans les mitochondries. Alternativement, il ne peut pas être exclu que certaines protéines rPPR soient mobiles ou flexibles, ce qui empêche leur visualisation dans la structure de cryo-EM, en particulier lorsqu'elles sont liées à des extensions de l'ARNr hautement flexibles. A l'exception de la protéine rPPR10/mS83 localisée dans le canal de sortie de l'ARNm SSU, il est frappant de voir que toutes les protéines rPPR interagissent et stabilisent les extensions d'ARNr spécifiques aux plantes. Par exemple, rPPR4 et rPPR9 se lient aux extensions d'ARNr de la LSU. La protéine rPPR5 contribue à la stabilité globale de la LSU par des interactions à longue distance avec le segment d'extension des hélices H16 et H31, tandis que rPPR6 et une autre rPPR non déterminée lient et façonnent la grande extension de la tête de la SSU du mitoribosome (Waltz et al., 2020). Il semble donc que dans la plupart des cas, le recrutement des protéines PPR dans le mitoribosome de plante et les extensions des ARNr de la LSU et de la SSU se sont produites comme un processus co-évolutif. Néanmoins, l'intérêt fonctionnel des extensions spécifiques aux plantes et des rPPR associées reste encore inconnu. Les plantes réagissent différemment à la mutation de ces protéines PPR ribosomiques. Par exemple, la mutation knock-out de rPPR9 entraîne la létalité alors que celle de la protéine rPPR4 n'entraîne qu'un retard de croissance de la plante, bien que les deux protéines partagent des fonctions apparemment similaires en interagissant avec les extensions voisines dans la LSU du mitoribosome.

L'identification et la caractérisation des protéines rPPR mettent également en lumière la diversité des modes d'action des protéines PPR. Les protéines PPR peuvent être divisées en deux grandes sous-familles : les protéines PPR P (pour « pure PPR ») et les protéines PPR PLS (pour « pure, longue, courte ») (Barkan & Small, 2014). Tandis que les PPR du type PLS sont presque exclusivement impliqués dans l'édition de l'ARN, les protéines de type P sont impliquées dans de nombreux mécanismes de l'expression génétique incluant la transcription, l'édition de l'ARN, l'épissage, la maturation et la stabilité des extrémités des ARNm ainsi que la traduction (Cheng et al., 2016). Jusqu'à présent, le mode d'action des protéines PPR habituellement caractérisées impliquait la reconnaissance spécifique de cibles d'ARN, les motifs PPR individuels reconnaissant des bases individuelles selon un code de reconnaissance combinatoire comme décrit plus haut (Barkan et al., 2012). Ce processus a lieu lors de la reconnaissance de bases contiguës dans une séquence d'ARN, ou lors de la reconnaissance de bases non appariées spécifiques dans un ARN structuré comme l'ARNt, comme cela a été observé pour l'enzyme à activité RNase P, PRORP (Gobert et al., 2013; Pinker et al., 2017). Dans ces cas-là, la reconnaissance de l'ARN par la PPR implique des interactions entre le côté concave d'une super-hélice de la PPR et des bases non appariées de l'ARN. La détermination des structures à résolution quasi atomique des rPPR dans le contexte du mitoribosome a montré que les protéines rPPR ont un mode d'action complètement différent. Ces protéines PPR se fixent principalement sur le côté convexe, c'est-à-dire le squelette phosphate, des hélices d'ARN appariées (Waltz et al., 2020). En particulier, les résidus chargés positivement semblent entrer en contact avec le squelette phosphate de l'ARN, créant ainsi une interaction de charges positives/négatives (Waltz et al., 2020). Cette observation est en accord avec le fait que les résidus aux positions 5 et 35 des protéines rPPR ne semblent pas suivre le code PPR canonique et ne permettent pas de prédire les cibles ARN. Le mécanisme permettant aux protéines rPPR d'obtenir une spécificité pour des hélices particulières d'ARNr reste à déterminer. On ne sait pas non plus si ce mécanisme d'interaction est répandu parmi les protéines PPR non ribosomiques ou s'il est spécifique aux rPPR.

Enfin, l'analyse des séquences des ARN ribosomique dans les bases de données génomiques révèle une énorme diversité des ribosomes mitochondriaux dans la lignée verte. Par exemple, parmi les embryophytes (plantes terrestres), la grande extension de l'hélice 39 (h39) de la petite sous-unité de l'ARNr 18S, qui correspond à un nouveau domaine de la tête de la SSU chez *Arabidopsis* est très variable. Elle est dans l'ensemble conservée chez les angiospermes,

mais elle peut être plus longue chez certaines espèces, par exemple chez *Vitis*, ou plus courte, comme chez le riz. Chez la plupart des monocotylédones (par exemple le maïs et le blé), on retrouve une longue extension comme chez les dicotylédones. Ensuite, les extensions de h39 sont plus courtes chez les gymnospermes et les mousses et extrêmement réduites chez les fougères (Waltz et al., 2019). De même, l'extension de la grande sous-unité de l'ARNr 26S est également très divergente parmi les Viridiplantae, avec des extensions de l'ARNr du domaine III de tailles variables, ici aussi plus longues chez les angiospermes et plus courtes chez les gymnospermes, les fougères et les mousses. De plus, des extensions spécifiques sont observées chez certaines mousses dans la partie 3' de l'ARNr 26S (Waltz et al., 2019).

Au-delà de la nature des ARNr et de la composition des mitoribosomes, d'autres caractéristiques de la traduction mitochondriale sont très divergentes au sein de la lignée verte. Par exemple, la nature des ARNm matures traduits varie. Chez les embryophytes, tels qu'*Arabidopsis*, ils contiennent de longues séquences 5' UTR (Hammani & Giegé, 2014), alors que chez les Chlorophytes tels que *Chlamydomonas*, on ne retrouve aucun 5' UTR et les ARNm matures commencent par le codon d'initiation de la traduction, comme dans les mitochondries des mammifères (Salinas-Giegé et al., 2017). De plus, chez *Chlamydomonas*, les extrémités 3' des ARNm sont définies par des queues de poly-cytidine ajoutées de manière post-transcriptionnelle, spécifiques aux ARNm mitochondriaux des Chlorophytes (Salinas-Giegé et al., 2017). Ces queues poly-C pourraient définir les ARNm matures qui peuvent être recrutés par la machinerie d'initiation de la traduction.

Structures et caractéristiques de l'insertase Oxa1

Les protéines membranaires représentent 25 à 30 % des protéines d'une cellule. Pour assembler les protéines dans la bicouche lipidique de la membrane, des mécanismes de translocation et d'insertion sont nécessaires dans les cellules. De nombreuses machineries d'insertion existent dans les cellules, comme la principale voie de translocation chez les eucaryotes, Sec, ou la machinerie d'insertion GET (guided entry of tail-anchored) dans le réticulum endoplasmique. Chez les eucaryotes, les insertases responsables de la majeure partie de l'insertion des protéines membranaires dans la membrane interne des mitochondries, que ce soit post-traductionnellement ou co-traductionnellement, sont les protéines Oxa1 et Oxa2 de la famille YidC/Alb3/Oxa1.

La superfamille d'insertases YidC/Alb3/Oxa1

La famille YidC/Alb3/Oxa1 est une grande famille d'insertases responsables de l'insertion, du repliement et de l'assemblage des protéines dans la membrane cytoplasmique bactérienne, la membrane des thylakoïdes du chloroplaste et la membrane interne de la mitochondrie. Elles sont particulièrement importantes pour l'assemblage des complexes de transfert d'énergie, vitaux pour la respiration cellulaire et la photosynthèse. Contrairement aux translocases Sec, les insertases YidC/Oxa1/Alb3 ne peuvent transloquer que de courtes régions hydrophiles des protéines membranaires à travers la membrane et semblent jouer un rôle plus important dans le repliement des substrats protéiques membranaires. Tous les membres de cette famille protéique partagent une région structurellement très conservée, composée de cinq régions transmembranaires, et possèdent des extrémités N-terminale externe/C-terminale interne (Fig. 13). Ces protéines médient l'insertion membranaire d'un groupe varié de protéines, allant des sous-unités respiratoires dans les mitochondries et des protéines de liaison à la chlorophylle dans les chloroplastes aux sous-unités de l'ATP synthase dans les bactéries. Les premiers membres caractérisés de cette famille proviennent d'études dans la mitochondrie ainsi que dans *E. coli*. En 2004, Herrmann et al. ont déterminé que Oxa1 était important pour l'insertion de protéines avec des domaines hautement chargés dans la membrane interne des mitochondries, et plus spécifiquement, pour les protéines avec des charges négatives dans leurs régions transmembranaires. Il a été également proposé que le rôle conservé de YidC pour les protéines respiratoires pourrait être dû au fait que les protéines respiratoires ont souvent des charges négatives qui sont essentielles à leur fonction.

Les données structurales suggèrent que les membres de la famille de protéines YidC/Oxa1/Alb3 ne fonctionnent pas comme des canaux. Ils favoriseraient plutôt le transport des régions hydrophiles des protéines membranaires à l'aide d'un sillon hydrophile dans le feuillet interne de la membrane. Cette caractéristique structurale n'a pour le moment pas été trouvée dans d'autres familles de translocases.

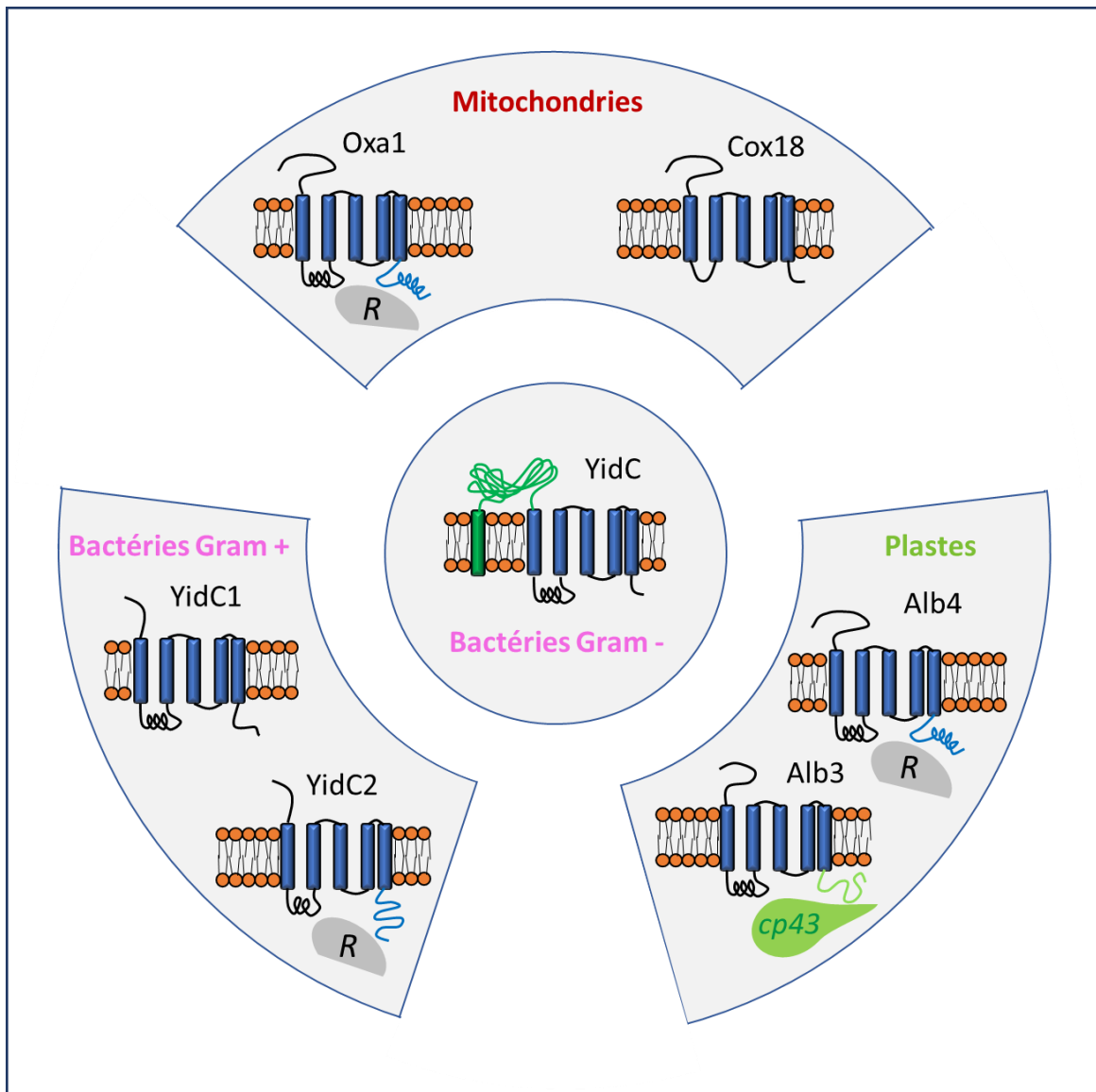


Figure 13 : Structure des différentes insertases de la famille Oxa1/YidC/Alb3.

Représentation schématique de la structure des différentes insertases de la famille Oxa1/YidC/Alb3 retrouvées chez les bactéries et dans les organelles. Toutes ces insertases possèdent cinq domaines transmembranaires conservés, à l'exception du seul paralogue de YidC trouvé chez les bactéries Gram négatives qui possède un domaine supplémentaire et un domaine périplasmique en forme de fente (indiqué en vert). L'extrémité C-terminale d'Oxa1, YidC2 et Alb4 est capable d'interagir avec le ribosome (indiquée en bleu) et celle d'Alb3 avec cp43 (protéine du photosystème II, indiquée en vert clair).

Caractéristiques des YidC

Les protéines de la famille YidC sont trouvées dans pratiquement tous les organismes. Cependant, le nombre de paralogues de YidC et le nombre de régions membranaires qu'ils possèdent chacun peuvent varier chez différentes bactéries. Dans la plupart des bactéries Gram-positives, on trouve deux paralogues (YidC1 et YidC2), et ils traversent tous les deux la membrane à cinq reprises (Hasona et al., 2005; Tjalsma et al., 2003). Les protéines YidC2 possèdent une longue région C-terminale qui peut se lier directement au ribosome, alors que YidC1 ne possède pas un tel domaine (Funes et al., 2004). Chez les bactéries Gram-négatives, on ne trouve qu'une seule protéine YidC, qui possède un domaine transmembranaire supplémentaire à l'extrémité N-terminale de la protéine et un grand domaine périplasmique entre le premier (TM1) et deuxième (TM2) domaine transmembranaire (Sääf et al., 1998). Dans certains organismes, il peut y avoir plusieurs paralogues. Par exemple, la plupart des plantes ont quatre membres de la famille YidC : deux paralogues dans les mitochondries et deux dans les chloroplastes.

La fonction cellulaire des membres de la famille YidC est importante pour l'assemblage des complexes transducteurs d'énergie (Van Der Laan et al., 2005). La protéine YidC bactérienne et l'Oxa1 mitochondrial ont tous les deux comme fonction principale d'insérer et d'assembler les complexes protéiques impliqués dans la respiration (Altamura et al., 1996; Bauer et al., 1994; Bonnefoy et al., 1994; Szyrach et al., 2003a; Van der Laan et al., 2003; Van Der Laan et al., 2005), tandis que les paralogues d'Alb3 du chloroplaste sont nécessaires pour la photosynthèse et la biogenèse des thylakoïdes (Bellafiore et al., 2002; Göhre et al., 2006; Spence et al., 2004; Sundberg et al., 1997). L'activité enzymatique de ces insertases est remarquablement conservée (Benz et al., 2009; Dong et al., 2008; Jiang et al., 2002; Preuss et al., 2005; Van Bloois et al., 2005). Par exemple, l'Oxa1 mitochondriale et la YidC bactérienne (avec le domaine supplémentaire de liaison au ribosome en C-terminal de la protéine) peuvent se substituer fonctionnellement l'une à l'autre (Preuss et al., 2005; Van Bloois et al., 2005), et les Alb3 et Alb4 du chloroplaste d'*Arabidopsis thaliana* peuvent remplacer la protéine YidC d'*E. coli* fonctionnellement, insérant des protéines dans la membrane cytoplasmique bactérienne (Benz et al., 2009; Jiang et al., 2002). Le rôle de YidC dans la biogenèse des protéines membranaires a été déterminé six ans après la découverte de YidC dans la bactérie (Bonnefoy et al., 1994), puis il a été montré que YidC peut être cross-linké à la protéine FtsQ

nouvellement synthétisée pendant son insertion dans la membrane et que YidC est co-purifiée avec SecYEG et SecDFyajC, deux composants de la machinerie d'insertion Sec, une translocase bactérienne que l'on retrouve aussi dans la membrane des thylakoïdes (Scotti et al., 2000). De plus, il s'avère que YidC est essentiel à la croissance d'*E. coli* et qu'il favorise l'insertion de la protéine de l'enveloppe du phage M13 de manière indépendante de Sec, dont on pensait auparavant qu'elle s'insérait sans l'aide d'autres protéines (Samuelson et al., 2001). On pense que le nombre de substrats insérés par la protéine YidC bactérienne est beaucoup plus important que le nombre de substrats insérés par Oxa1 dans les mitochondries et Alb3 dans les chloroplastes, ce qui serait expliqué en partie par la capacité de YidC de fonctionner à la fois indépendamment et en coopération avec la machinerie d'insertion Sec. Par exemple, en tant qu'insertase indépendante, il a été montré que YidC peut insérer Foc (la sous-unité c de l'ATP synthase F_1F_0), MscL, les protéines phagiques de la capsid et de l'enveloppe du phage M13, et TssL, une protéine membranaire ancrée par la queue (Aschtgen et al., 2012; M. Chen et al., 2002; Facey et al., 2007; Samuelson et al., 2001; Van Bloois et al., 2004; Yi et al., 2003). De la même façon, avec la translocase Sec, YidC favorise l'insertion de la protéine Foa et Fob (les sous-unités de l'ATP synthase F_1F_0), NuoK (la sous-unité K de la NADH-quinone oxidoréductase), et CyoA (la sous-unité 2 de la cytochrome b oxidase) (Celebi et al., 2006; Du Plessis et al., 2006; Kol et al., 2009; Price & Driessen, 2010; Van Bloois et al., 2006; Yi et al., 2004).

Des études de l'impact de la structure sur la fonction de la protéine ont révélé que la région conservée du cinquième segment transmembranaire (TM5) de la protéine YidC d'*E. coli* est essentielle pour sa fonction d'insertion des protéines membranaires (Jiang et al., 2003). Cependant, la grande région périplasmique du YidC d'*E. coli* n'est pas essentielle à la fonction d'insertase. Des études cristallographiques aux rayons X ont montré que le domaine périplasmique se replie sous forme d'un sandwich de feuilletés bêta, une structure que l'on trouve dans les protéines capables de lier les sucres, ce qui pourrait jouer un certain rôle dans le pliage des protéines nouvellement insérées (Oliver & Paetzel, 2008; Ravaud et al., 2008). Une étude de cryo-Electron Microscopy (cryo-EM) a montré que YidC était lié au ribosome en tant que monomère (Seitl et al., 2014), mais une autre expérience de cryo-EM a montré que YidC pourrait former des homodimères (Kohler et al., 2009). Il n'est donc pas encore clair quel est l'état de la protéine native *in vivo*, même si les dernières données suggèrent que l'unité fonctionnelle de YidC est un monomère (Kedrov et al., 2013).

En 2014, la première structure en cristallographie à rayons X de YidC est publiée (Kumazaki, Kishimoto, et al., 2014). Cette structure de YidC a été obtenue à partir de *Bacillus halodurans* à une résolution de 2,4 Å, une bactérie Gram-positif. Fait intéressant, la structure a montré que les cinq segments transmembranaires de YidC intégrés à la membrane protègent une cavité hydrophile dans le feuillet interne de la membrane, qui est fermée du côté extracellulaire de la membrane. La cavité hydrophile est donc ouverte sur le cytoplasme et sur les lipides de la membrane (Kumazaki, Kishimoto, et al., 2014). À l'entrée de la cavité hydrophile, du côté cytoplasmique de la membrane, se trouve un domaine hélicoïdal en épingle à cheveux qui pourrait être impliqué dans le recrutement des substrats de YidC. Des études suggèrent que la cavité hydrophile recrute très probablement la région hydrophile du substrat, lui permettant ainsi de se transférer à mi-chemin de la membrane. Il est ensuite libéré du sillon hydrophile d'une manière qui n'est pas encore complètement comprise et traverse le feuillet externe de la membrane. En plus du sillon hydrophile, la structure a également fourni des informations supplémentaires sur la dynamique de YidC. En effet, il semblerait que les moitiés cytoplasmiques des segments transmembranaires, qui constituent le sillon, sont flexibles et changent de position (Hennon & Dalbey, 2014; Kumazaki, Kishimoto, et al., 2014). Ceci a été corroboré par des simulations de dynamique moléculaire (Wickles et al., 2014). Cela entraîne un amincissement de la membrane lors des simulations de dynamique moléculaire, ce qui pourrait contribuer au mécanisme de translocation. Étant donné que la cavité hydrophile ne s'étend que sur le feuillet interne de la membrane, l'amincissement de la membrane pourrait permettre de diminuer l'énergie nécessaire pour terminer la translocation à travers le feuillet externe. La structure cristalline de la protéine YidC d'*E. coli*, une bactérie Gram-négative, a également été publiée fin 2014 à 3,2 Å, apportant des résultats similaires à *Bacillus halodurans* (Kumazaki, Chiba, et al., 2014). Il est probable que les résidus faisant face au centre de la cavité hydrophile soient impliqués dans la liaison de la région hydrophile transloquée du substrat, alors que ceux faisant face à la membrane aident à insérer et à intégrer latéralement le segment hydrophobe du substrat dans la membrane. De plus, il semblerait que la charge positive du sillon hydrophile soit essentielle pour l'activité de YidC (Y. Chen et al., 2014), ainsi que pour la majorité des insertases de la famille YidC/Alb3/Oxa1. Certaines exceptions ont cependant été rapportées pour *E. coli* et les YidC du chloroplaste, mais pour le Oxa1 mitochondrial la charge positive conservée est importante pour son activité (Lemaire et al., 2004). Des variations ont été observées quant à l'importance de la charge

lorsque différents substrats ont été analysés, ce qui suggère qu'Oxa1 requiert différentes caractéristiques en fonction du substrat pour permettre l'insertion (Herrmann & Bonnefoy, 2004).

Les structures cristallines de YidC permettent également de comprendre le mécanisme par lequel YidC et les autres protéines de la famille Oxa1/YidC/Alb3 fonctionnent comme des translocases (Fig.14). Dans l'étape initiale, un substrat de YidC se lie à la membrane. Ensuite, la région de la queue N-terminale du substrat est recrutée dans le sillon hydrophile de YidC, et, dans certains cas, est facilitée par l'interaction des résidus chargés négativement dans la queue N-terminale avec les arginines chargées positivement dans la cavité hydrophile. La queue N-terminale est ensuite libérée du sillon et traverse le feuillet externe de la membrane. Cette dernière étape serait catalysée par l'action du potentiel électrique (côté positif dans l'espace périplasmique) agissant sur les résidus chargés négativement dans la région transloquée du sous-état et par des interactions hydrophobes entre le segment TM du substrat et YidC. Le segment TM du substrat se déplace très probablement le long d'une lame grasse formée par le TM3 et le TM5 du YidC d'*E. coli* pour former une configuration transmembranaire. Dans l'étape finale, la protéine membranaire insérée est libérée de YidC. On peut supposer qu'un mécanisme similaire serait utilisé pour le substrat de YidC, TssL. La seule différence serait que c'est l'extrémité C-terminale qui est transloquée.

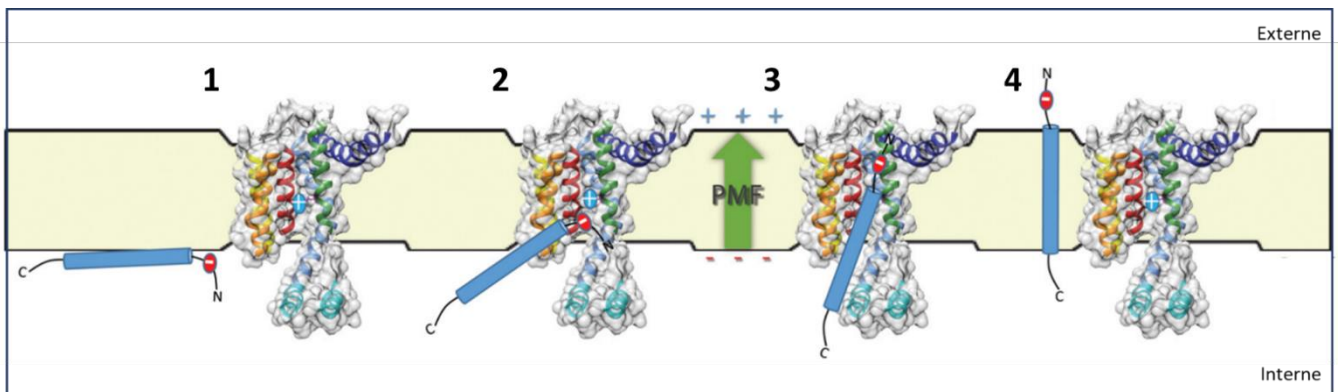


Figure 14 : Mode de fonctionnement des insertases Oxa1/YidC/Alb3 pour l'insertion de domaines membranaires dans la membrane plasmique.

Le substrat est associé à la périphérie de la membrane, et l'insertase est à l'état de repos. Puis, la région hydrophile à transloquer s'associe au sillon hydrophile de l'insertase, probablement par des interactions électrostatiques. On pense qu'ensuite divers facteurs facilitent la libération du substrat, notamment : la force motrice des protons (PMF), les interactions hydrophobes entre l'insertase et le substrat, et l'amincissement de la membrane par le changement de conformation de l'insertase. Enfin, après une translocation et une insertion réussies, l'insertase retourne à l'état de repos. Ce modèle a été adapté de (Hennon et al., 2015).

Caractéristiques des Alb3

Dans les chloroplastes, la création de lignées d'insertion de T-DNA chez *Arabidopsis thaliana* a mis en évidence que le gène Alb3 code pour une protéine cruciale pour la photosynthèse. Le knock-out du gène ALBINO3 (codant pour Alb3) engendre un mutant déficient en photosynthèse, lui conférant une apparence d'albinos, d'où son nom (Sundberg et al., 1997). Alb3 est indispensable pour l'insertion post-traductionnelle de la protéine de liaison à la chlorophylle (LHCP) dans les thylakoïdes (Moore et al., 2000). La LHCP est une protéine codée par le noyau, qui est synthétisée sous forme de précurseur contenant un peptide de ciblage vers le stroma. Elle est importée du cytosol dans le chloroplaste via le complexe TOC-TIC situé dans l'enveloppe. Après l'importation dans le stroma et l'élimination du peptide signal, la LHCP forme un complexe de transit avec la SRP du chloroplaste (cpSRP) (Schuenemann et al., 1998). La cpSRP est une SRP particulière car elle est dépourvue d'ARN, et contient une nouvelle sous-unité protéique nommée cpSRP43, en plus de la sous-unité cpSRP54 chez *Arabidopsis thaliana*. Elle est également impliquée à la fois dans le ciblage co-translationnel et le ciblage post-traductionnel. Le complexe de transit LHCP-cpSRP54-cpSRP43 est ensuite dirigé vers le récepteur de SRP (cpFtsY) de la membrane des thylakoïdes (Moore et al., 2003). Au niveau de la membrane, Alb3 reconnaît la protéine cpSRP43, en utilisant un domaine de son extrémité C-terminale (Falk et al., 2010). De plus, une partie du domaine membranaire d'Alb3 est également impliquée dans l'étape de reconnaissance de cpSRP43 (Dünschede et al., 2011). Après le ciblage post-traductionnel de LHCP à la membrane par cpSRP, Alb3 insère la protéine LHCP dans la membrane du thylakoïde sans l'aide de SecY (Mori et al., 1999). En plus d'agir indépendamment, Alb3 peut fonctionner de manière coopérative avec la translocase cpSecYE du thylakoïde pour insérer les protéines de manière co-traductionnelle dans la membrane du thylakoïde, de la même manière que le YidC bactérien peut fonctionner de pair avec la translocase SecYEG (Klostermann et al., 2002; Pasch et al., 2005).

L'autre paralogue du chloroplaste, Alb4, présente un phénotype plus faible par rapport à la perturbation d'Alb3 lorsqu'une plante est mutée pour chacun des gènes. Néanmoins, Alb4 semblerait être impliqué dans la biogenèse des thylakoïdes, car l'ultrastructure des chloroplastes est fortement altérée dans le knock-out (Gerdes et al., 2006). En plus de jouer des rôles importants chez les plantes, il a été montré que les homologues d'Alb3 sont également impliqués dans des fonctions critiques chez les algues. Chez *Chlamydomonas*

reinhardtii, les deux homologues d'Alb3, Alb3.1 et Alb3.2, sont essentiels à la photosynthèse (Bellafiore et al., 2002; Göhre et al., 2006). Le paralogue Alb3.2 est important pour l'assemblage du photosystème II (PSII) dans la membrane du thylakoïde. Il a été montré qu'Alb3.2 peut interagir avec la sous unité centrale du PSII, et ainsi proposé qu'il fonctionne comme une chaperonne pendant l'assemblage du PSII (Göhre et al., 2006).

Les insertases du réticulum endoplasmique

Des études bio-informatiques récentes ont identifiées des homologues lointains de la superfamille YidC/Oxa1/Alb3 dans les complexes d'insertion membranaire du réticulum endoplasmique, étendant la famille aux protéines Get1, EMC3 et TMC01 (Anghel et al., 2017). En effet, ces protéines, bien que ne possédant pas les 5 domaines transmembranaires conservés dans cette famille, possèdent encore 3 de ces 5 domaines conservés, correspondant aux segments transmembranaires de YidC, les segments 2 et 3 et le segments 6 additionnel des bactéries Gram négatives (Anghel et al., 2017). De plus elles possèdent une structure particulièrement conservée ressemblant à celle des protéines YidC, d'après les structures cristallographiques et de cryo-EM disponibles (Kumazaki, Chiba, et al., 2014; Kumazaki, Kishimoto, et al., 2014; Tanaka et al., 2018; Xin et al., 2018). On retrouve un sillon hydrophile identique aux insertases YidC/Oxa1/Alb3, mais aussi une extension qui permettrait de sceller la cavité hydrophile, que l'on ne retrouve pas chez d'autres protéines de la famille (Bai et al., 2020; McDowell et al., 2020). Cependant, la présence de ce sillon délimité par trois hélices membranaires ne semble pas suffisante pour l'insertion des protéines dans la membrane, elles interagissent avec une seconde protéine pour être fonctionnelles et l'on retrouve ces insertases du réticulum dans de grands complexes protéiques. Pour Get1 et EMC3, la troisième hélice membranaire de ces protéines est en étroite interaction avec une seconde protéine qui possède elle aussi 3 hélices transmembranaires d'orientation inversée (Extrémité N-terminale in/C-terminale out), ce qui forme un domaine fonctionnel hexa-hélicoïdale, respectivement Get2 et EMC6 (Pleiner et al., 2020; F. Wang et al., 2011; Yamamoto & Sakisaka, 2012). Pour soutenir cette observation, le mécanisme d'insertion semble être similaire entre ces insertases et Oxa1. Une expérience très récente a permis de compléter une levure K.O. pour Oxa1 avec une version modifiée de la fusion de EMC3 et EMC6 (fusion modifiée avec l'ajout d'une séquence d'adressage, et un domaine C-terminal de liaison au ribosome)

(Güngör et al., 2022). D'autres protéines sont recrutées et permettent de former les complexes d'insertion EMC et GET. On retrouve aussi une extension entre les segments transmembranaires 2 et 3 qui forme une structure en forme d'hélices enroulées (coiled-coil domain), déjà présente chez les autres membres de la famille YidC/Oxa1/Alb3, responsable de l'interaction avec différents substrats (Anghel et al., 2017; Bai et al., 2020; Kumazaki, Chiba, et al., 2014; Kumazaki, Kishimoto, et al., 2014; Miller-Vedam et al., 2020; O'donnell et al., 2020; Pleiner et al., 2020; Xin et al., 2018). Pour l'insertase EMC3, ce domaine est replié en 3 hélices qui interagissent avec le domaine TPR de la protéine EMC2, l'échafaudage central du complexe EMC (Volkmar et al., 2019). Dans le cas de Get1, ce domaine interagit de façon dynamique avec l'ATPase homodimérique Get3, permettant de relâcher la protéine à insérer dans la membrane du réticulum (Bozkurt et al., 2009; Mariappan et al., 2011; Stefer et al., 2011; Suloway et al., 2009; F. Wang et al., 2011). Enfin, pour TMC01, il semblerait que le coiled-coil domain positivement chargé interagisse avec le canal de sortie du ribosome près de l'ARNr 28S et de la protéine uL24, comme pour YidC (McGilvray et al., 2020).

Fonctions d'Oxa1 dans la membrane interne des mitochondries

Chez les plantes, il existe plusieurs membres de la famille YidC/Oxa1/Alb3 : Oxa1 et Oxa2 (Cox18) dans la membrane interne de la mitochondrie et Alb3 et Alb4 dans la membrane thylakoïde du chloroplaste (Funes et al., 2004; Gerdes et al., 2006). Les deux paralogues de chaque système diffèrent dans leur région C-terminale. L'Oxa1 mitochondrial contient une longue région C-terminale chargée positivement qui constitue le domaine de liaison au ribosome mitochondrial, alors que Oxa2 est dépourvu de ce domaine (Funes et al., 2004). Oxa1 peut insérer les protéines de façon co-translationnelle, alors que Oxa2 fonctionne en insertion post-translationnelle uniquement (Bonney et al., 2009; Preuss et al., 2005; Szyrach et al., 2003). Les protéines Oxa1 de la superfamille YidC/Oxa1/Alb3 ont été découvertes en 1994 par des scientifiques travaillant sur les mitochondries. Les principaux résultats étant qu'une mutation dans une nouvelle protéine appelée Oxa1 (pour oxidase assembly factor 1) affectait la biogénèse de la cytochrome c oxydase, et la formation de la F₁F₀-ATP synthase (Altamura et al., 1996; Bauer et al., 1994; Bonney et al., 1994). Il a été déterminé que Oxa1

est essentiel pour la translocation dans la membrane interne de la mitochondrie des queues N- et C-terminales de Cox2 (He & Fox, 1997; Hell et al., 1997). D'autres études ont montré que la fonction de Oxa1 est en réalité un mécanisme général pour l'insertion des protéines de la matrice dans la membrane interne mitochondriale. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Oxa1 est le médiateur de l'insertion de toutes les protéines membranaires codées par la mitochondrie : Atp6, Atp9, Cox1, Cox2, Cox3, et les sous-unités du cytochrome *b* (Hell et al., 2001). En plus d'insérer les protéines membranaires codées par les mitochondries dans la membrane interne, Oxa1 permet l'insertion des protéines mitochondriales codées par le noyau dans la membrane interne. En effet, Oxa1, codée par le noyau, est impliquée dans sa propre biogenèse (Hell et al., 1997). Oxa1 est synthétisée dans le cytosol et ensuite importée dans les mitochondries où elle s'assemble dans la membrane interne. Pour ce processus, la machinerie d'Oxa1 qui réside déjà dans la membrane interne est essentielle pour la translocation de la queue N-terminale de l'Oxa1 nouvellement transportée, qui est initialement importée dans la matrice de la mitochondrie (Bohnert et al., 2010). Une caractéristique distinctive d'Oxa1 est qu'il contient une longue queue C-terminale chargée positivement, exposée à la matrice mitochondriale. Ce domaine que l'on nomme Ribosome Binding Domain (RBD) permet à Oxa1 d'être lié au ribosome localisé dans la matrice (Jia et al., 2003; Szyrach et al., 2003). Chez la levure, il a été démontré que les cellules exprimant des versions tronquées de l'extrémité C-terminale d'Oxa1 ont des fonctions respiratoires altérées et des difficultés à utiliser des sources de carbone non fermentables (Jia et al., 2003). De plus, les levures dépourvues de la région C-terminale accumulent des protéines mitochondriales mal insérées dans la matrice alors qu'elles auraient dû être insérées dans la membrane interne (Szyrach et al., 2003). La mutation knock-out d'Oxa1 entraîne une déficience critique des complexes respiratoires III, IV et V, en particulier pour les deux sous-unités du complexe IV (cytochrome oxydase *c*), les protéines Cox1 et Cox2, toutes deux codées par la mitochondrie. L'insertion de protéines membranaires indispensables dans la membrane interne, comme la protéine cytochrome *b*, qui fait partie du complexe III (cytochrome *bc1*), est également gravement réduite. Le RBD d'Oxa1 lié au ribosome est à proximité des protéines de la grande sous-unité ribosomique Mrp20 et Mrp40 chez la levure (Jia et al., 2003, 2009), qui sont homologues aux protéines ribosomiques bactériennes L23 et L34 et connues pour être situées au niveau du canal de sortie du polypeptide dans la grande sous-unité du ribosome. Il est intéressant de noter que les délétions des protéines mitochondriales Mrb20 et Mrp40, qui n'affectent pas la synthèse

des protéines ribosomiques, ont des effets profonds sur l'assemblage des complexes de phosphorylation oxydative dans la membrane interne (Jia et al., 2003; Kaur & Stuart, 2011). Ces études et d'autres soulignent l'importance des complexes Oxa1-ribosomes pour l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire (Jia et al., 2003; Keil et al., 2012). Oxa2 (également appelé Cox18), l'autre paralogue d'Oxa1, est important pour l'assemblage de la cytochrome *c* oxydase et spécifiquement pour la biogénèse de Cox2, qui est codé dans le génome mitochondrial et transfère l'électron du cytochrome *c* à Cox1. Oxa2 facilite la translocation post-traductionnelle du domaine C-terminal de Cox2 chez *S. cerevisiae* et *Neurospora crassa* (Fiumera et al., 2007; Funes et al., 2004; Saracco & Fox, 2002). Dans la membrane interne, Oxa2 forme un complexe avec Pnt1 et Mss2 dans lequel ils coopèrent à la biogénèse de Cox2 (Saracco & Fox, 2002). Il est intéressant de noter que la translocation et l'assemblage de Cox2 dans la membrane interne de la mitochondrie peuvent se produire en l'absence d'Oxa2 ; cependant, cela nécessite la surexpression d'Oxa1 et de la protéine Yme1 (une protéase mitochondriale ATP-dépendante résidant dans la membrane interne qui est également impliquée dans le repliement des protéines) pour agir comme chaperonne afin d'aider à plier et à assembler Cox2, ce qui conduit à un complexe cytochrome *c* oxydase fonctionnel (Fiumera et al., 2009; Koppen & Langer, 2007).

Oxa1 chez les plantes terrestres

Chez *Arabidopsis thaliana*, on trouve quatre homologues de Oxa1 : Oxa1a, Oxa1b, Oxa2a, et Oxa2b, qui ont tous été localisés dans la membrane interne mitochondriale en utilisant une combinaison de techniques d'étiquetage GFP des protéines et d'expériences d'importation *in vivo* (Benz et al., 2013; Sakamoto et al., 2000). Des lignées homozygotes d'ADN-T pour Oxa1a, Oxa2a et Oxa2b ne survivent pas après les premiers stades de l'embryogénèse (Benz et al., 2013), indiquant que chacun d'eux exerce une fonction essentielle pendant la biogénèse des mitochondries. Oxa1a semble être responsable de l'insertion des protéines dans la membrane interne des mitochondries chez les plantes. En effet, Oxa1a peut remplacer fonctionnellement le Oxa1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Hamel et al., 1997), ce qui indique qu'il pourrait fonctionner comme la machinerie générale d'insertion des protéines membranaires du côté de la matrice mitochondriale. De plus, Oxa1a possède un domaine à son extrémité C-terminale dirigé vers la matrice, ressemblant à celui de Oxa1 chez la levure citée plus haut, et une

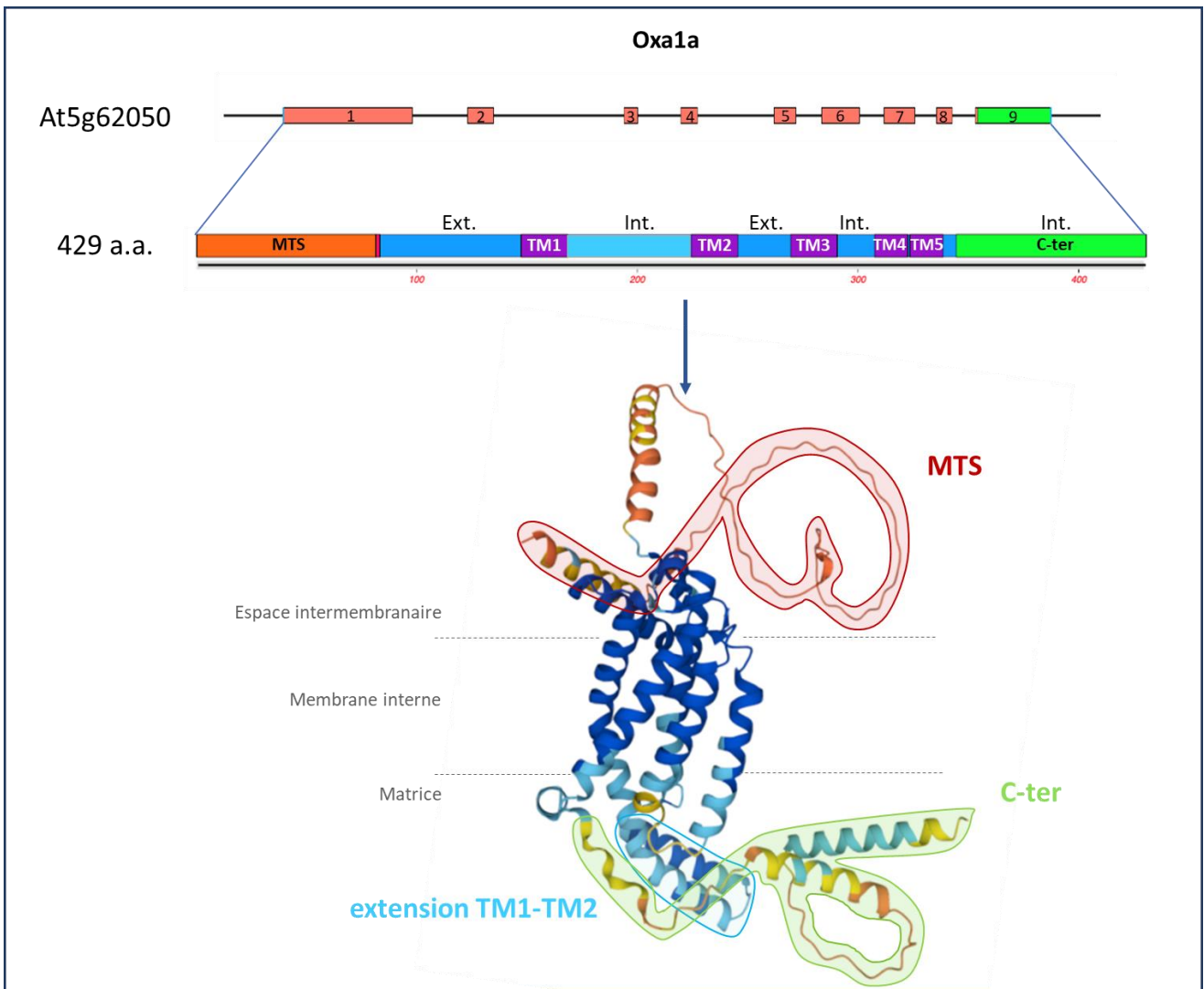


Figure 15 : Oxa1a, l'insertase de la membrane interne des mitochondries de plante.

De haut en bas :

Représentation schématique du gène codant la protéine Oxa1a , At5g62050, et de ses 9 exons.

Représentation de la séquence de la protéine Oxa1a après traduction dans le noyau et de la position des différents domaines qui la compose. MTS = séquence d'adressage à la mitochondrie, TM1 à 5 = segments transmembranaires, C-ter = extrémité C-terminale. L'orientation des segments entre chaque domaine transmembranaire est indiquée, soit interne vers la matrice (Int.) soit externe vers l'espace intermembranaire (Ext.).

Prédiction de la structure d'Oxa1a à l'aide d'AlphaFold v2.0. La fiabilité de la prédiction est très faible pour l'extrémité N-terminale comportant le MTS et faible pour l'extrémité C-terminale. La séquence d'adressage à la mitochondrie indiquée en rouge est normalement clivée après l'entrée de la protéine dans la mitochondrie. Les deux domaines dirigés vers la matrice sont indiqués en bleu clair (extension entre les segments membranaires 1 et 2) et en vert (domaine potentiel de fixation au ribosome).

extension entre les domaines transmembranaires 1 et 2 que l'on retrouve chez la levure et chez l'Homme (Fig. 15). Bien que ressemblant, la séquence C-terminale d'Oxa1a diverge très fortement de celle d'Oxa1L ou d'Oxa1 de levure. Ces deux derniers possèdent une structure en coiled-coil, qui n'est pas prédite par les outils bio-informatiques pour Oxa1a, dû à une forte variabilité de séquence, même si cette extrémité possède sûrement une structure similaire.

L'attachement du mitoribosome à la membrane

Chez tous les organismes étudiés, la traduction mitochondriale est concomitante avec l'insertion des protéines transmembranaires. Le peptide néoformé est directement pris en charge par l'insertase, et inséré dans la membrane pendant la traduction. Ce mécanisme permet de traduire, modifier et contrôler la qualité de la protéine juste avant son insertion dans la membrane. Le contact direct avec la protéine Oxa1 semble une caractéristique essentielle à la traduction mitochondriale, car on retrouve cette interaction quel que soit l'organisme d'étude. Pour permettre la localisation des mitoribosomes au niveau de l'insertase Oxa1, l'extrémité C-terminale de l'insertase dirigée vers la matrice, nommée RBD, permet de recruter le ribosome mitochondrial en se fixant sur la LSU près du canal de sortie du peptide néosynthétisé. Le mécanisme et les protéines permettant la liaison entre Oxa1 et le mitoribosome sont très différents selon l'organisme étudié : celui chez la levure et chez les mammifères sont bien caractérisés, en revanche il y a très peu d'informations sur le mécanisme permettant cette fixation chez les plantes. Voici une vue d'ensemble de différents systèmes déjà caractérisés (Voir aussi Annexe 2).

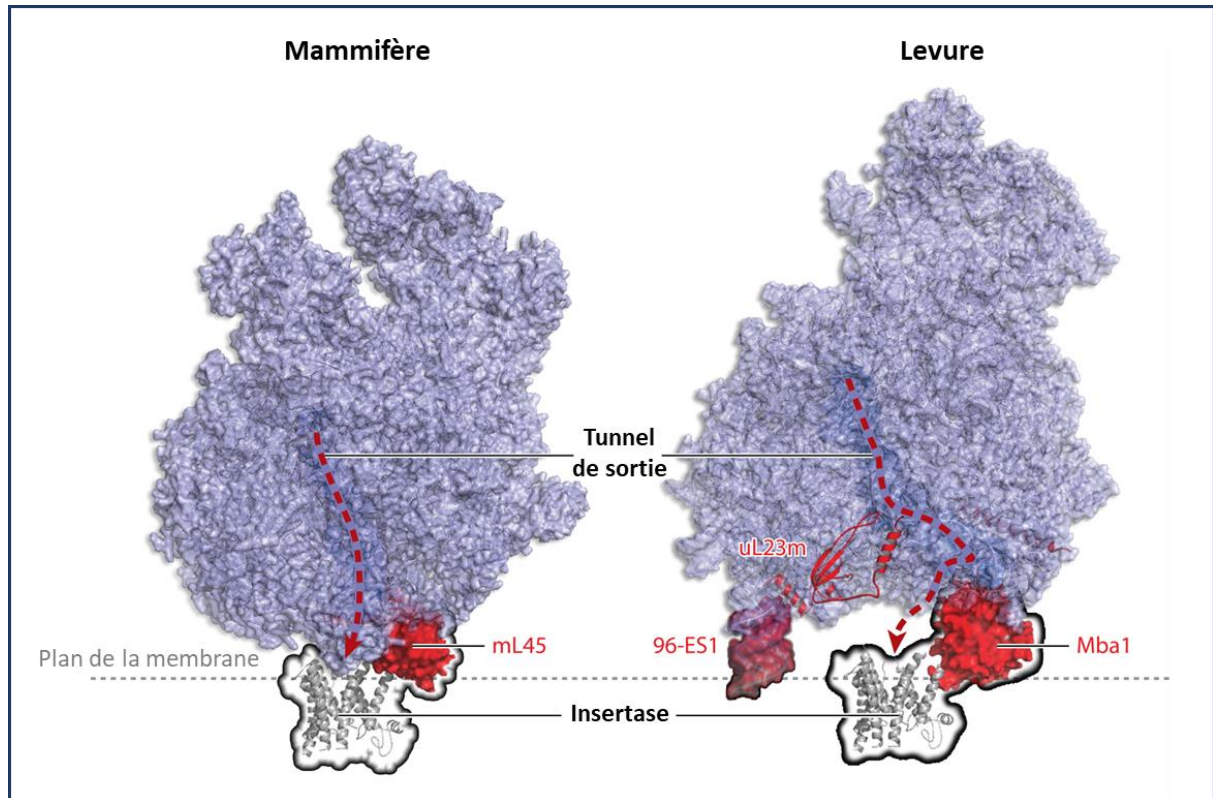


Figure 16 : Comparatif des mécanismes d'attachement à la membrane mitochondriale interne chez les mammifères et chez la levure.

Modèles d'attachement à la membrane des mitoribosomes de la levure et de l'Homme. Dans les deux cas, la protéine mL45/Mba1, représentée en rouge, est impliquée dans l'association avec Oxa1L/Oxa1, l'insertase mitochondriale. Chez la levure, le segment d'expansion 96 de l'ARNr 21S semble entrer en contact avec la membrane, ce qui stabilise l'interaction. Contrairement à mL45, Mba1 ne fait pas partie intégrante du mitoribosome. Dérivé de (Ott et al., 2016).

Caractéristiques de l'attachement à la membrane chez la levure, les mammifères et *Chlamydomonas*

Chez *S. cerevisiae*, l'attachement à la membrane interne de la mitochondrie a été bien décrit. D'après les images de tomographie et les reconstructions 3D, le mitoribosome possède deux sites de contact avec la membrane interne de la mitochondrie (Pfeffer et al., 2015). Un premier contact est médié par une protéine accessoire qui ne fait pas partie du mitoribosome, Mba1 (Ott et al., 2006). Cette protéine interagit avec le RBD d'Oxa1 et les protéines du mitoribosome entourant le canal de sortie du peptide naissant, comme uL23m et uL24m (mrp20 et mrp40 chez la levure) (Jia et al., 2003; Szyrach et al., 2003). Le second site de contact est médié par une extension en forme d'hélice de l'ARNr de la LSU, l'hélice 96-ES1. Le site de contact précis du côté de la membrane interne n'est pas déterminé, mais aucune densité supplémentaire n'est observée à cet endroit, suggérant que le contact est effectué directement avec la membrane plasmique pour stabiliser la liaison du mitoribosome sur Oxa1 (Fig. 16).

Chez les mammifères, le mécanisme varie. On observe chez l'Homme seulement un seul et unique point de contact des ribosomes mitochondriaux avec la membrane interne de la mitochondrie. Ce site de contact est médié entre la protéine Oxa1L, un homologue de la protéine Oxa1 chez la levure, et la protéine mL45, une protéine possédant des fortes ressemblances avec la protéine Mba1, mais faisant partie intégrante de la LSU du mitoribosome (Englmeier et al., 2017; Kummer et al., 2018). De très récentes études de cryo-EM ont permis de résoudre en détail la nature de cette interaction (Itoh et al., 2021). On peut observer en réalité sur les reconstructions trois sites distincts de contact entre Oxa1 et le mitoribosome : Un premier site de contact indépendant de la protéine mL45, entre la dernière hélice à l'extrémité du RBD d'Oxa1L et trois constituants de la LSU du mitoribosome, bL28m, uL29m et l'ARNr de la LSU. Un second site de contact existe entre la partie centrale du RBD d'Oxa1L et la protéine uL24m, une fois de plus indépendant de mL45, et enfin un troisième site de contact entre mL45 et le cœur d'Oxa1L lui-même (Itoh et al., 2021). La résolution d'Oxa1L n'est pas suffisante pour déterminer quelle partie interagit précisément, mais il est probable que le contact soit médié par un segment protéique entre deux domaines

transmembranaires de la protéine (Fig. 17). Ce dernier site de contact explique de précédents résultats de microscopie haute résolution montrant que l'absence du RBD d'Oxa1L perturbe fortement mais pas totalement la co-localisation des mitoribosomes et d'Oxa1L (Lee et al., 2020). De façon intéressante, cette structure révèle une seconde fonction de mL45 et de son extrémité N-terminale. Lorsque Oxa1L n'est pas lié au mitoribosome, cette dernière entre dans le canal de sortie du peptide et le bloque, empêchant la traduction. Lors de la fixation à Oxa1L, mL45 subit un changement de conformation qui libère le canal et autorise la traduction. Ainsi le mitoribosome humain n'est actif que s'il est lié à l'insertase Oxa1L (Itoh et al., 2021).

Enfin, le mécanisme d'attachement à la membrane a été décrit récemment pour *Chlamydomonas reinhardtii* avec sa structure en cryo-EM ainsi que des résultats de cryo-tomographie électronique (Waltz et al., 2021). On retrouve deux points de contacts avec la membrane comme chez la levure, tous les deux médiés par des protéines faisant partie intégrante du mitoribosome : un premier site de contact avec la protéine mL119, qui interagit avec Oxa1, et un second contact direct avec la membrane interne à l'aide de la protéine mL113, à la manière de l'hélice 96-ES1 chez la levure (Fig. 18) (Waltz et al., 2021). Malgré la ressemblance de ce site de contact avec celui de la levure, le mécanisme d'interaction est différent (protéine à la place d'un ARN) et semble être le fruit d'une convergence évolutive entre les levures et les algues, questionnant l'importance de la stabilisation de l'interaction à l'aide d'un contact direct avec la membrane interne, sûrement perdu *a posteriori* chez les mammifères.

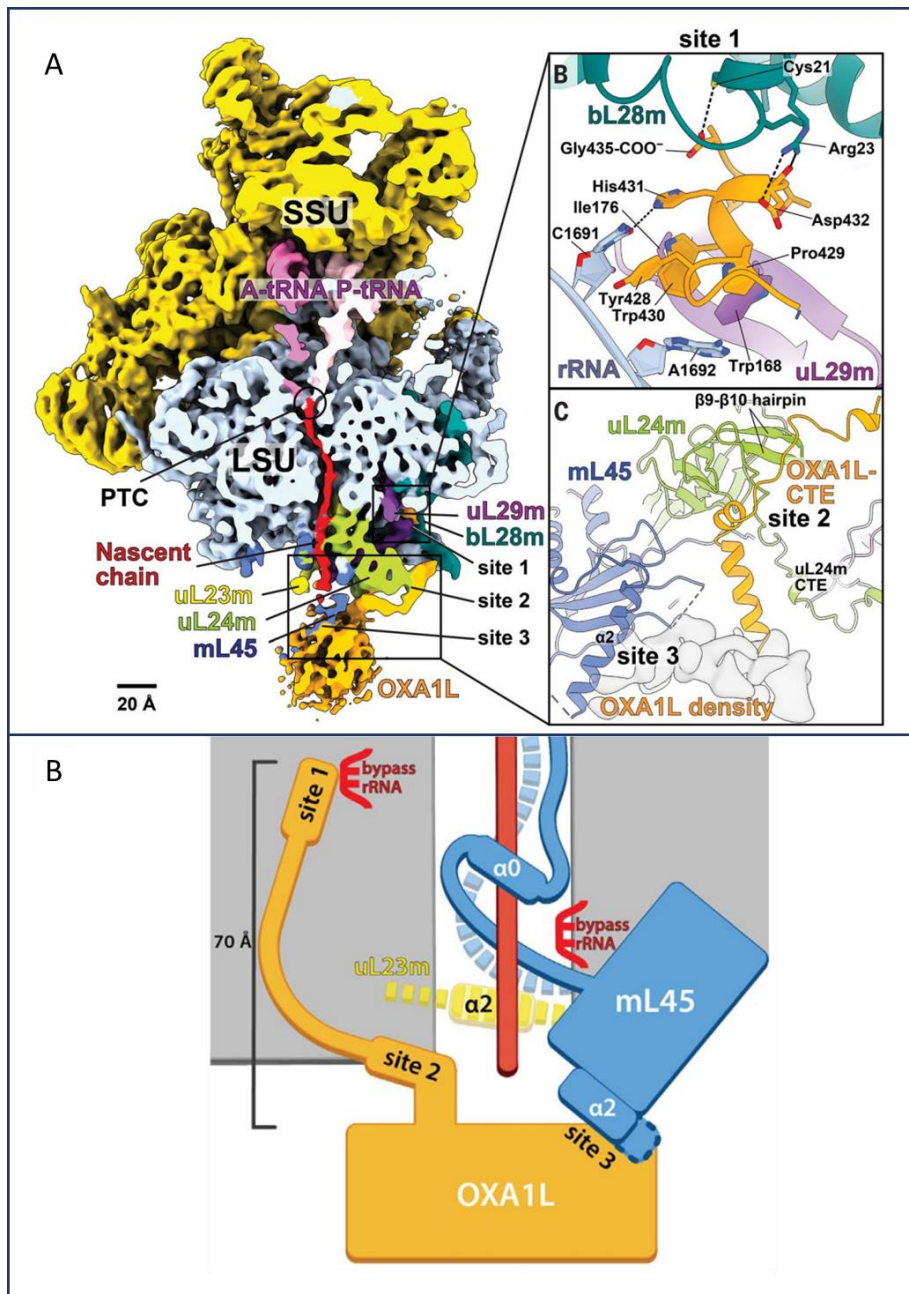


Figure 17 : Le mécanisme d'attachement à la membrane mitochondriale interne chez l'Homme.

A. Structure haute résolution d'un mitoribosome humain fixé sur l'insertase Oxa1L. On peut observer 3 sites de contacts distincts entre l'insertase et le mitoribosome.

B. et **C.** Grossissements du modèle des trois sites de contacts entre Oxa1L et le ribosome. Les protéines et l'ARNr ont été modélisées dans la densité optique.

D. Schéma résumant le mécanisme de fixation à l'insertase Oxa1L. Le site de contact 1 est formé par l'hélice C-terminale d'OXA1L liée à bL28m, uL29m, et l'ARNr. L'extension C-terminale d'OXA1L interagit avec uL24m (site 2), et le noyau d'OXA1L est associé à mL45- α 2 (site 3). Le segment α 0 de mL45 bloque le canal de sortie du peptide s'il n'est pas fixé à Oxa1L. D'après (Itoh et al., 2021).

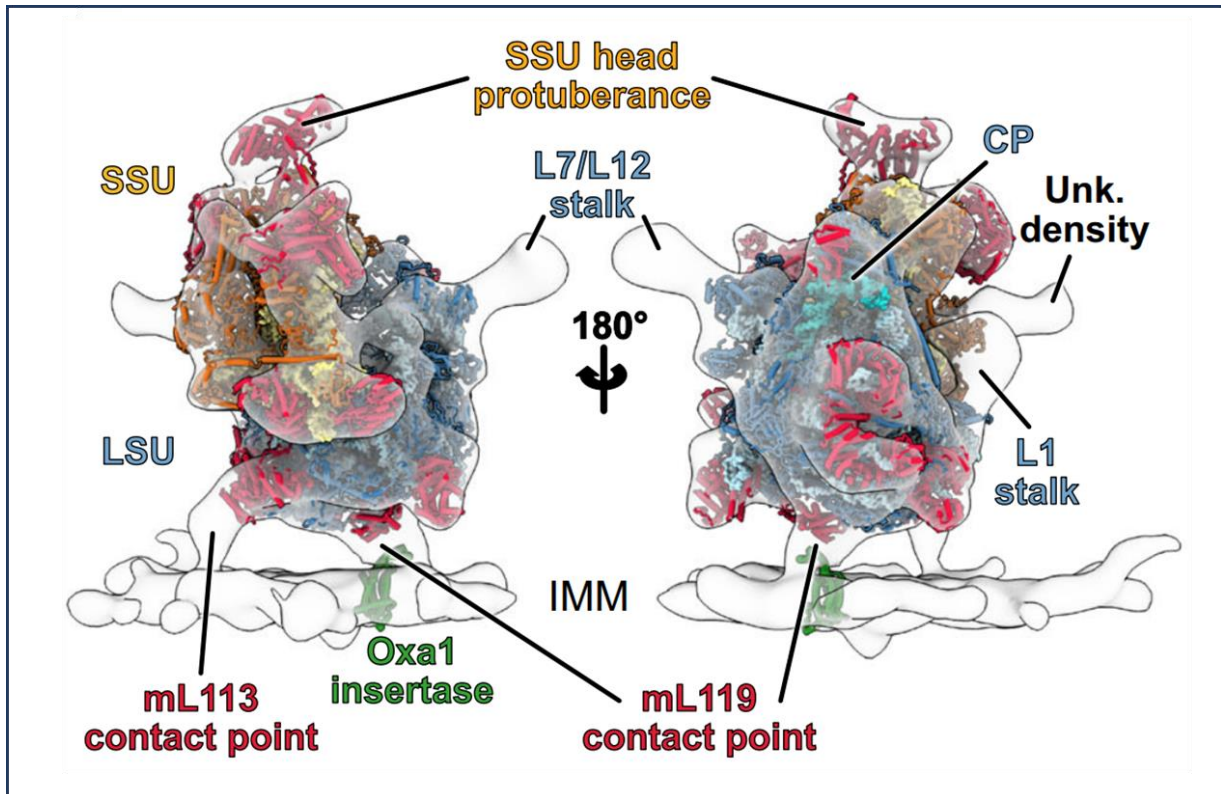


Figure 18 : Le mécanisme d'attachement à la membrane mitochondriale interne chez *Chlamydomonas*.

Ajustement du modèle atomique du mitoribosome de *Chlamydomonas* et de la densité moyenne des sous-tomogrammes du mitoribosome lié à la membrane. Le mitoribosome entre en contact avec la membrane mitochondriale interne (IMM) en deux points spécifiques. Ces contacts sont médiés par deux protéines spécifiques de *Chlamydomonas*, mL113 et mL119. Cette dernière est située à la sortie du canal peptidique, à côté de l'insertase Oxa1. Le modèle de l'homologue bactérien d'Oxa1 est représenté à titre d'illustration. D'après (Waltz et al., 2021).

Objectif de la thèse

Comme décrit plus haut, l'interaction entre le ribosome mitochondrial et l'insertase Oxa1 dans la membrane interne de la mitochondrie est médiée de façon très différente selon les organismes. Le point de contact varie et différentes protéines sont impliquées, qu'elles proviennent du mitoribosome directement ou qu'elles soient recrutées pour permettre l'interaction. Cette interaction chez les plantes terrestres n'a pas encore été décrite, et les protéines impliquées dans cette liaison sont encore inconnues. La seule évidence de cette interaction chez les plantes provient de la difficulté de purifier les mitoribosomes de plante sans utiliser de grandes quantités de détergent, suggérant qu'une partie de la population de mitoribosome au moins serait attachée à la membrane interne de la mitochondrie. De plus, aucun homologue des protéines précédemment décrites dans d'autres organismes comme impliquées dans cette liaison n'ont été trouvés dans le génome d'*Arabidopsis*, suggérant un mécanisme d'interaction différent.

L'objectif de cette étude est de mieux comprendre ce mécanisme de liaison du mitoribosome à la membrane interne dans son ensemble chez les plantes terrestres. Dans un premier temps, l'étude vise à déterminer s'il existe une interaction entre le ribosome et l'extrémité C-terminale d'Oxa1a, et à caractériser celle-ci *in vivo* et *in vitro*. Pour cela, j'ai créé des lignées mutantes pour Oxa1a à l'aide de la technologie CRISPR-cas9, afin d'étudier l'importance de son domaine C-terminal et son caractère essentiel pour la survie de la plante. Ensuite, j'ai réalisé des expériences de co-immunoprécipitation à l'aide d'une protéine de fusion du domaine C-terminal d'Oxa1a dans le but de caractériser l'interaction avec le mitoribosome, et de déterminer de potentielles protéines encore non décrites permettant cette interaction. J'ai testé les interactions de protéines candidates avec Oxa1a à l'aide de co-immunoprécipitations dans *N. benthamiana*. Enfin, des images de microscopie électronique ont été obtenues afin de confirmer les interactions protéiques à l'aide de la reconstruction 3D du mitoribosome interagissant avec l'extrémité C-terminale d'Oxa1a, ainsi que pour observer par tomographie la répartition des ribosomes mitochondriaux dans la mitochondrie et leur état d'attachement à la membrane.

Résultats

Recherche de plantes mutantes pour Oxa1a

La première étape de cette étude était d'obtenir une plante d'*Arabidopsis* mutante pour le gène codant pour Oxa1a, de nomenclature AGI (Arabidopsis Genome Initiative) At5g62050. Une telle lignée me permettrait de tester directement *in planta* l'interaction entre le ribosome mitochondrial et l'insertase, en complétant le phénotype observé à l'aide d'un transgène et en immuno-précipitant celui-ci pour observer plus en détail les interactions d'Oxa1a et des protéines ribosomiques. En particulier, le but était de compléter une plante mutante d'Oxa1a avec une version tronquée de la protéine, ne comportant pas une partie de l'extrémité C-terminale d'Oxa1a, afin de déterminer si ce domaine est essentiel ou non au bon développement de la plante.

J'ai en premier lieu regardé les lignées d'insertion de T-DNA disponibles sur le site du Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL) et commandé 3 différentes lignées au Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) : SALK_020304.29.95.x avec une insertion dans l'exon 5, SALKseq_135383.1 avec une insertion dans le 9^{ème} et dernier exon et SALK_025416.21.70.x, avec une insertion dans le 4^{ème} intron, utilisée dans de précédents travaux (Benz, 2013). Une fois les graines reçues et semées, j'ai génotypé 24 jeunes plantes âgées de 2 à 3 semaines par PCR pour chaque lignée, pour vérifier le site d'insertion à l'aide d'amorces spécialement dessinées. Étonnamment, aucune des plantes testées ne possédait d'insertion d'ADN-T dans le gène Oxa1a, et ce pour les 3 différentes lignées (Fig. 19). Ce type de situation se produit souvent dans le cas d'insertion d'ADN-T dans des gènes codant pour une protéine essentielle, dont les génotypes homozygotes ne sont pas viables. Même à l'état hétérozygote, les mutants d'insertion d'ADN-T dans le gène Oxa1a ont visiblement été perdus des banques de graines au cours des multiples générations de conservation des lignées mutantes.

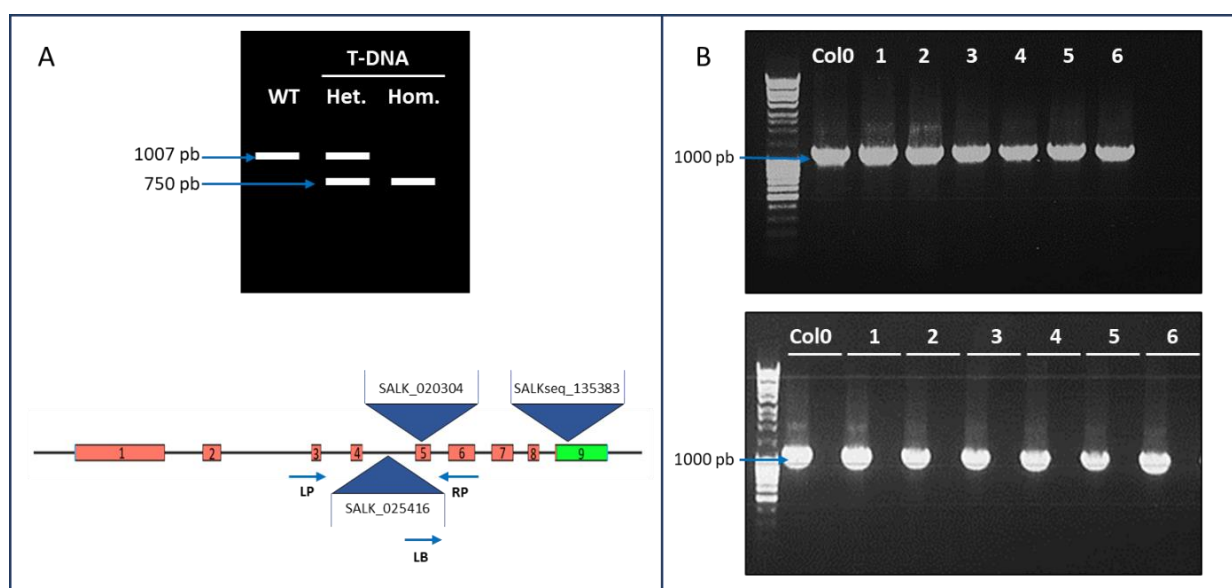


Figure 19 : Génotypage de lignées d'Arabidopsis décrites comme possédant une insertion d'ADN-T dans le gène *Oxa1a*

A. Représentation schématique de la position des insertions d'ADN-T dans le gène codant pour *Oxa1a* des lignées étudiées, ainsi que la taille des fragments d'ADN obtenus par amplification par PCR attendues pour des lignées Col0 ou mutantes. Les mutants hétérozygotes possèdent les deux amplifications.

B. Exemple de gel d'agarose 1% pour la lignée SALK_025416 du génotypage de 6 plantes. Image du haut : les PCR ont été réalisées à partir des 3 amorces dans la même réaction (LP+RP+LB). Image du bas : la PCR sauvage et la PCR mutante ont été réalisées séparément (LP+RP et LB+RP). Seule la bande correspondant à l'amplification de la séquence sauvage est visible.

Obtention d'un mutant d'Oxa1a à l'aide de la technique de CRISPR-cas9

L'obtention d'un modèle biologique pour mon étude d'Oxa1a étant primordiale et en l'absence de disponibilité de lignée d'ADN-T pour Oxa1a, j'ai décidé de construire des lignées mutantes pour Oxa1a à l'aide d'une technique de CRISPR-cas9 développée dans le laboratoire par Anthony Gobert. Cette technique d'édition du génome permet un ciblage direct du gène à muter, et peut induire des mutations ponctuelles permettant de simples substitutions d'acides aminés dans la séquence de la protéine, changeant l'affinité de l'interaction d'une protéine si la mutation est dans un domaine d'interaction ou modifiant son activité enzymatique si mutée dans son site catalytique. Toutefois, dans la plupart des cas, la mutation induit un décalage du cadre de lecture induisant ainsi un phénotype knock-out.

A partir de la séquence génomique d'Oxa1a et du logiciel CRISPOR, j'ai choisi 2 ARNs guide spécifiques d'Oxa1a, sans cible secondaire prédite dans le génome d'Arabidopsis. Le premier ARN guide (ARNg1) se situe dans le premier exon d'Oxa1a, de façon à obtenir des mutants K.O. n'exprimant plus la protéine après avoir induit un décalage du cadre de lecture par l'addition ou la délétion d'une courte séquence, résultant dans l'apparition d'un codon de terminaison dans la séquence d'Oxa1. Le second (ARNg2) est localisé dans le dernier exon, au milieu du domaine C-terminal d'Oxa1a, dans le but d'obtenir des mutants hypomorphes exprimant des protéines dont l'interaction du domaine C-terminal avec le ribosome est non-fonctionnelle ou réduite dû à des changements d'acides aminés dans sa séquence, ou directement des mutants dont une partie de l'extrémité C-terminale est manquante (Fig. 20 A). Des constructions plasmidiques contenant les séquences de ces ARNg ont été faites dans un vecteur d'entrée Gateway, pour être transférées dans un vecteur de destination pBlev1 sous le contrôle d'un promoteur actif uniquement au stade de la cellule œuf, lors de la création des gamètes. J'ai transformé ces vecteurs dans une souche d'agrobactéries, puis transformé à leur tour des plantes Col0 d'Arabidopsis avec ces agrobactéries par floral dip. Ces vecteurs contiennent une cassette exprimant la GFP dans la graine, j'ai pu donc sélectionner les graines transformées sous un microscope à fluorescence (Figure 20 B). Le génotypage des plantes obtenues à partir de ces graines a été fait en utilisant une technique de High Resolution Melting (HRM), permettant facilement de cribler plusieurs centaines

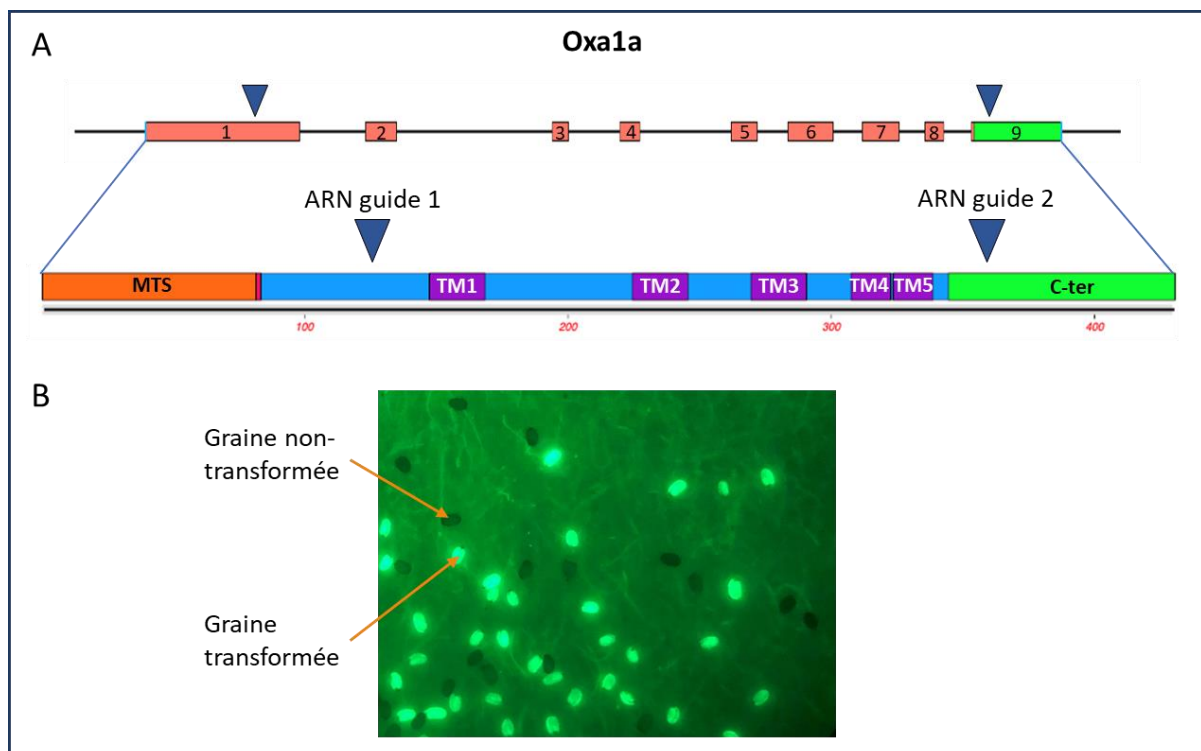


Figure 20 : Conception des ARN guides et sélection des mutants CRISPR-cas9

A. Schéma du gène *Oxa1a* et localisation des ARN guides sélectionnés pour la mutation par CRISPR-cas9 sur la séquence génomique et de la protéine. MTS : séquence d'adressage à la mitochondrie
 TM : domaine transmembranaire C-ter : extrémité C-terminale de la protéine.

B. Sélection des graines fluorescentes eGFP transformées contenant la construction CRISPR, composée de la cas9 sous contrôle promoteur s'exprimant uniquement dans la cellule œuf et de l'ARN guide.

d'échantillons pour un moindre coût. Les plantes identifiées comme mutantes pour Oxa1a en HRM sont ensuite analysées par séquençage pour confirmer la mutation et connaître la nature exacte de celle-ci.

La première série de plantes criblées comportait 96 graines sélectionnées au microscope après transformation pour chacun des deux ARNg, soit un total de 192 plantes. L'analyse par HRM n'a révélé aucune mutation du gène Oxa1a autour de la cible de l'ARN guide, et ce pour toutes les plantes testées, pour l'ARNg1 et l'ARNg2. Ce résultat était inattendu, j'ai donc en premier lieu vérifié la présence de la construction contenant l'ARN guide et la cas9 dans les plantes en amplifiant une partie de la séquence de la cas9 par PCR et observé qu'elle était bien présente dans 90% des plantes testées (Figure 21), confirmant que le criblage des graines par la fluorescence de la GFP était efficace pour la sélection des graines transformées. J'ai sélectionné des ARN guides différents sur CRISPOR et préparé d'autres constructions, tous les ARN guides ne permettant pas une coupure efficace et l'apparition de mutations dépendant du contexte génétique. J'ai cependant conservé une partie des plantes possédant les deux premières constructions et les ai transférées à plus haute température après la floraison (26°C), pour augmenter l'efficacité de cas9 et augmenter les chances de mutation dans les graines. J'ai ensuite récolté leur descendance, et sélectionné à nouveau 100 graines fluorescentes pour chaque ARN guide, provenant de 5 plantes mères différentes. Les résultats de HRM pour ce criblage ont révélé 9 plantes hétérozygotes mutantes potentielles, quatre pour l'ARNg1 et cinq pour l'ARNg2 (Fig. 22 A). Le séquençage a validé quatre mutants hétérozygotes pour l'ARNg1 et deux mutants hétérozygotes pour l'ARNg2 (Figure 22 B). Plusieurs plantes possèdent la même mutation, et les mutations correspondent à des insertions ou délétions de seulement un ou deux bases. Ces plantes mutantes Les graines de ces plantes ont été récoltées, puis contre-sélectionnées pour se débarrasser de la cassette contenant l'ARNg et cas9, évitant de nouvelles mutations du gène au cours des générations suivantes. Les graines criblées sont donc uniquement les graines ne possédant aucune fluorescence. J'ai semé ces graines et observé les siliques de ces plantes après 2 mois. Pour certains mutants de l'ARNg1, j'ai pu observer qu'une proportion d'environ un quart des graines de la silique semblent avoir avorté leur développement. Ceci suggère fortement que la mutation d'Oxa1a rendant la protéine non-fonctionnelle obtenue à l'état homozygote est létale pour la plante au stade embryonnaire (Fig. 22 C). Pour le moment, sur les plantes hétérozygotes de la mutation avec l'ARNg2, je n'ai pas observé de graines avortées, suggérant

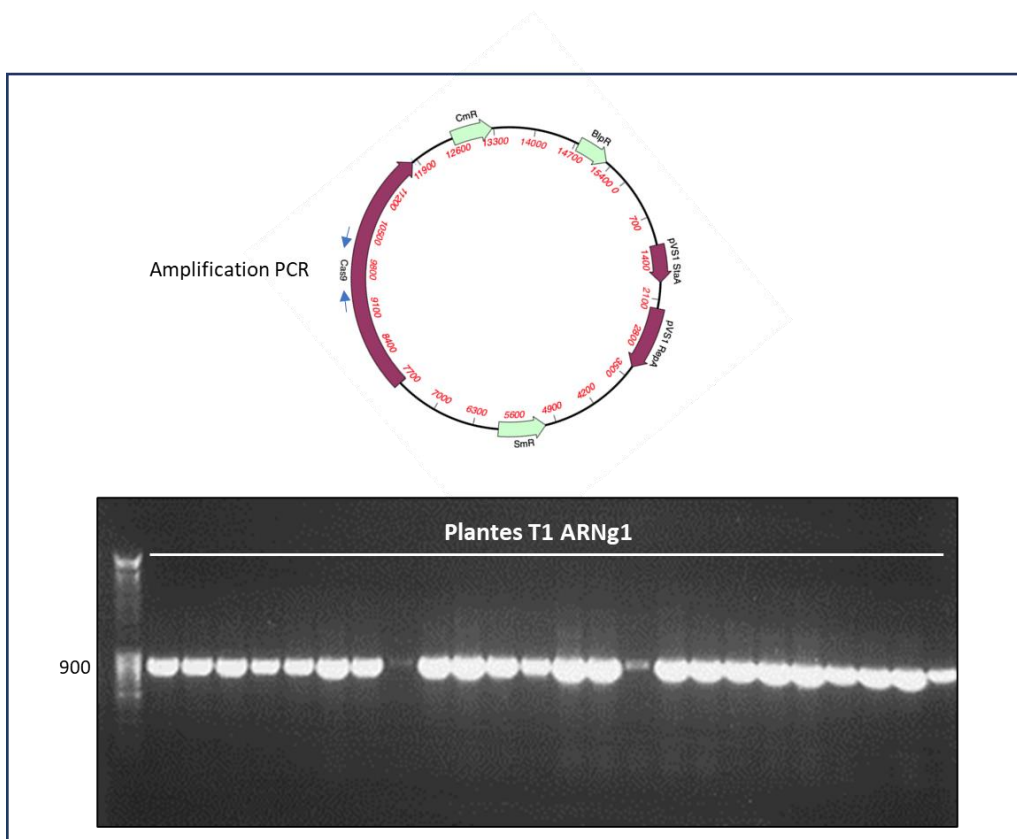


Figure 21 : Vérification de la présence du transgène CRISPR-cas9 dans la descendance des plantes agrotransformées

Représentation schématique du plasmide utilisé pour la transformation des plantes et gel d'agarose de la PCR avec des amorces spécifiques de cas9, réalisé sur l'ADN génomique des plantes exprimant la GFP dans la graine. 90% des plantes génotypées possèdent une amplification de cas9.

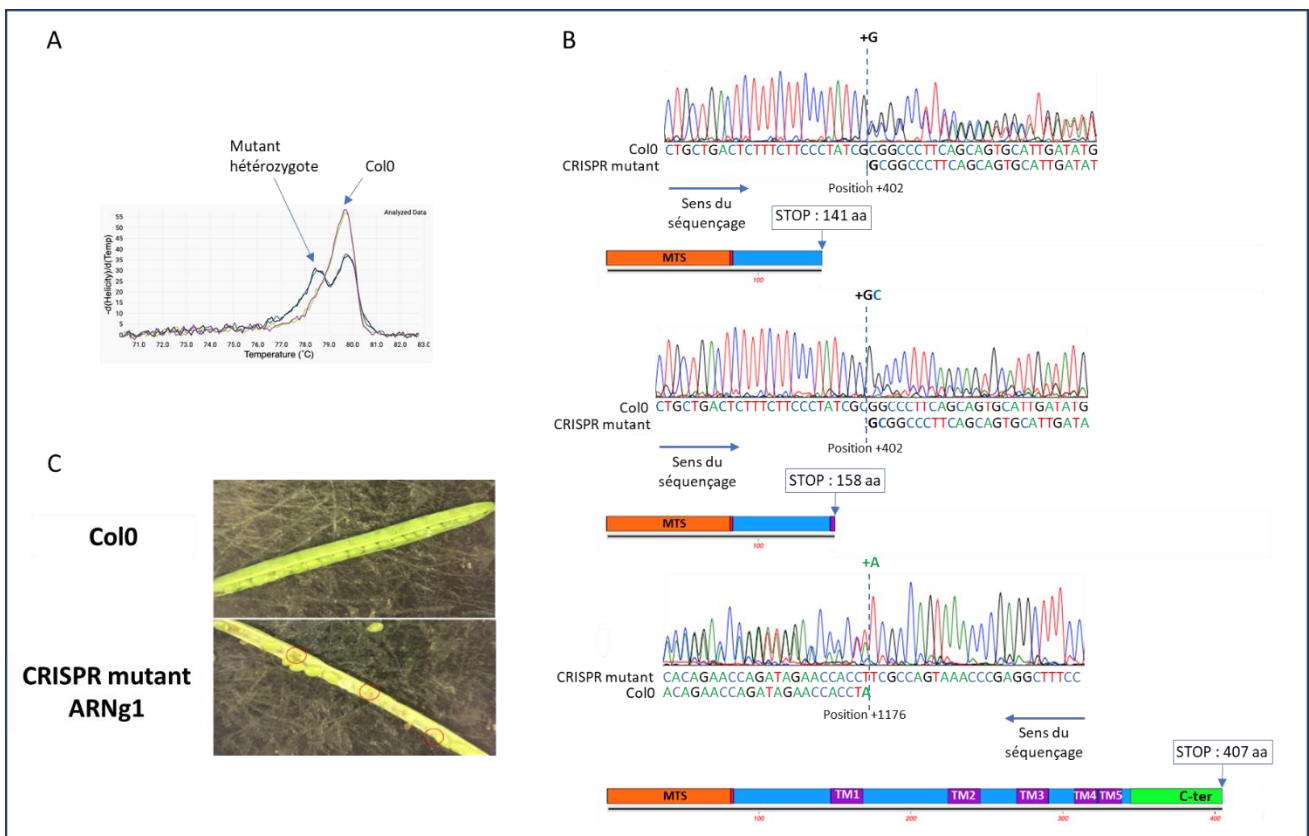


Figure 22 : Génotypage des mutants d'Oxa1a obtenus par CRISPR-cas9

A. Exemple d'une courbe obtenue en HRM pour une plante mutante. La courbe représentée est la dérivée de la courbe de fusion. La mutation d'une des deux allèles induit une modification de la pente de la courbe se traduisant par un pic sur sa dérivée, facilement observable en comparant à celle d'une plante sauvage.

B. Résultats de séquençage des plantes identifiées comme mutantes par HRM. Sont indiqués la localisation de la mutation et sa nature, ainsi que la protéine obtenue après traduction.

C. Photographie d'une silique ouverte d'une plante sauvage Col0 et d'une plante hétérozygote mutante pour Oxa1a. Les cercles rouges indiquent des graines avortées (embryonnaire léthal).

que le mutant homozygote n'est ni gamétophytique ni embryonnaire-létal. Il est toutefois nécessaire d'analyser les plantes de la prochaine génération pour savoir s'il est possible d'obtenir cette mutation à l'état homozygote et si l'on observe un phénotype macroscopique pour ces plantes à un stade de développement plus avancé. Des études plus poussées sur ces mutants sont à venir, ainsi que des expériences de complémentation pour valider le rôle indispensable du domaine C-terminal d'Oxa1a dans la survie de la plante.

Création de constructions pour des expériences de complémentation

Pour les expériences de complémentation, des constructions génétiques sont nécessaires. J'ai donc conçu et réalisé 3 constructions différentes : une construction ajoutant une étiquette 3xHA en C-terminal de la protéine Oxa1a, réalisée à partir de la séquence génomique comportant encore tous les introns et sous contrôle de son promoteur endogène (environ 1,5 kb en amont du codon d'initiation de la traduction), une construction similaire de la séquence génomique avec les introns et le promoteur endogène mais dont la séquence codant pour l'extrémité C-terminale libre d'Oxa1a est absente, formant une protéine tronquée Oxa1a Δ C-ter, et enfin une construction similaire à la première mais avec une étiquette HA à l'extrémité N-terminale de la protéine Oxa1a (Fig. 23). J'ai réalisé cette dernière construction par GoldenBraid[®] contrairement à la méthode Gateway utilisée classiquement pour mes autres constructions, de façon à pouvoir placer facilement l'étiquette HA après la séquence MTS dans la séquence génomique avec introns, tout en conservant le promoteur endogène. Cette construction n'a pas encore été testée, il est possible que le site de clivage de la MTS prédit *in silico* ne soit pas exact et que l'étiquette HA soit tronquée, ou bien que l'adressage de la protéine à la mitochondrie soit perturbé.

Les séquences étiquetées HA me permettront de tenter de compléter la perte de fonction d'Oxa1a dans une plante mutante homozygote, et de réaliser des immunoprécipitations *in vivo* pour caractériser l'interaction entre Oxa1a et le mitoribosome. La construction Oxa1a Δ C-ter ne devrait pas quant à elle compléter le phénotype du mutant si le domaine C-terminal est essentiel à l'interaction avec le mitoribosome. Les effets de la mutation sur la traduction mitochondriale ne seront pas restaurés par l'addition d'une protéine tronquée de son

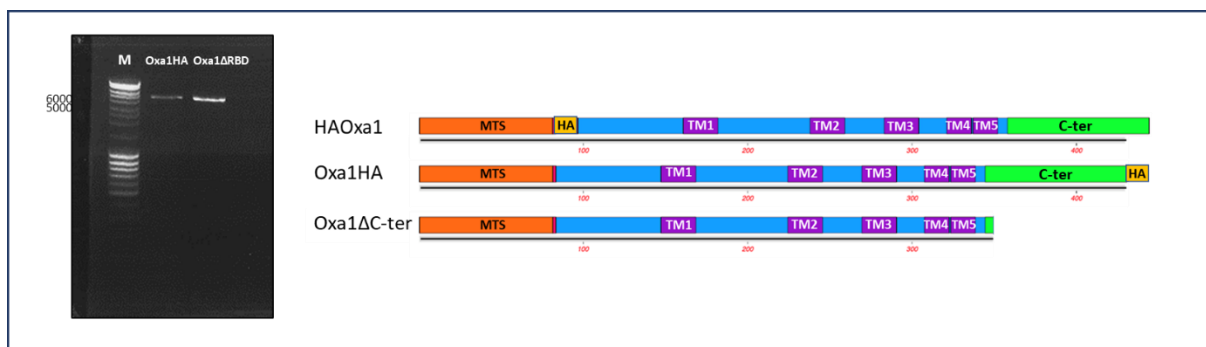


Figure 23 : Schéma des différentes constructions génétiques réalisées pour les expériences de complémentation chez *Arabidopsis thaliana*

Visualisation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR de la séquence des constructions Oxa1HA et Oxa1ΔC-ter.

Représentation des 3 protéines obtenues pour chaque construction : les protéines HaOxa1 et Oxa1HA devraient compléter les plantes mutantes pour Oxa1a, alors que la protéine Oxa1ΔC-ter ne devrait pas être capable de compléter la mutation si celle-ci est essentielle.

extrémité C-terminale, empêchant la fixation du ribosome sur l'insertase.

Production et purification d'une protéine de fusion 6His-GST-Oxa1aC-ter

Pour pallier au manque initial de lignée mutante pour Oxa1a chez *Arabidopsis*, des expériences similaires, mais réalisés *in vitro*, étaient nécessaires. Il s'agissait en particulier de tester l'interaction entre une protéine Oxa1a recombinante et des extraits de mitochondries et de fractions de mitoribosome purifié.

Pour tester l'interaction entre le mitoribosome et domaine C-terminal d'Oxa1a, j'ai donc créé une protéine synthétique composée d'une double étiquette 6 histidines et GST, fusionnée directement à la partie C-terminale d'Oxa1a correspondant au potentiel RBD. Les deux étiquettes me permettent d'utiliser l'une pour la purification de la protéine depuis une culture bactérienne, par chromatographie d'affinité à l'aide de résine Ni-NTA, et l'autre pour réaliser des immunoprécipitations. Le poids moléculaire total de cette protéine est de 37,5 kDa, ce qui en fait une protéine d'un poids proche de celui de la protéine Oxa1a entière qui est de 47,8 kDa, sans pour autant posséder de domaines transmembranaires et empêchant une potentielle multimérisation des protéines entre elles, facilitant grandement la purification de cette protéine et augmentant sa solubilité.

La séquence du domaine C-terminal d'Oxa1a a été insérée dans un vecteur p_hGGWA pour obtenir cette construction, en passant par un vecteur d'entrée Gateway[®] pDONR207. La construction finale a ensuite été transformée dans des bactéries Rosetta pour l'expression de la protéine en système bactérien. J'ai en premier lieu réalisé des tests d'induction et de solubilisation pour vérifier que la protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter est exprimée correctement, et que cette protéine de fusion est soluble et ne forme pas d'agrégats dans les solutions tampon utilisées. Les cultures de bactéries sont récupérées juste après induction de l'expression sur la nuit par l'ajout d'IPTG la veille, lysées, puis centrifugées et filtrées pour ne récupérer que la partie soluble du lysat, et enfin déposées sur gel. Après SDS-PAGE, j'ai transféré les protéines sur une membrane PVDF et contrôlé par Western Blot la pureté de la protéine produite avec un anticorps anti-His. On observe une seule bande au poids moléculaire théorique attendu, uniquement après induction (Figure 24). La protéine semble

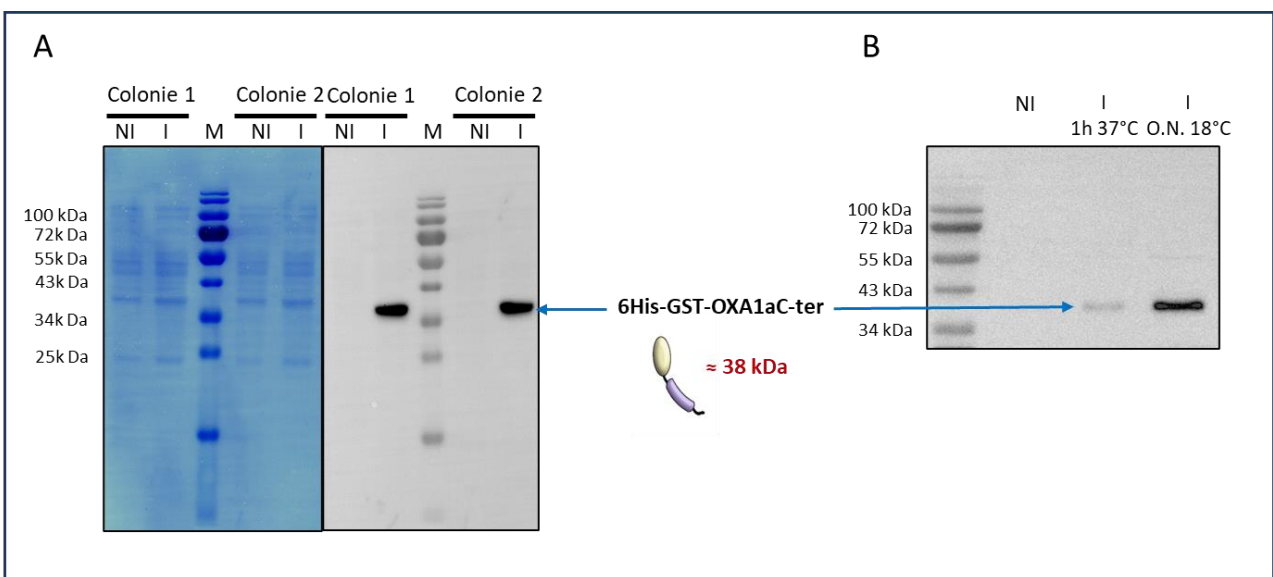


Figure 24 : Tests d'inductions de la protéine recombinante 6His-GST-Oxa1aC-ter et analyse de sa solubilité par Western Blot

A. Test de l'expression de la protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter de deux clones différents de bactéries de souche NiCo21 et visualisation par Western Blot de la protéine avec des anticorps @His. NI : non induit, I : induit sur la nuit à 18°C.

B. Test de différents temps d'induction de l'expression de la protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter dans des bactéries NiCo21 et visualisation par Western Blot de la protéine avec des anticorps @His. NI : non induit, I : induit.

soluble et intacte, aucune dégradation n'est visible. Le culot obtenu après centrifugation a aussi été analysé par Western Blot, on retrouve quelques traces de la protéine mais la quasi-totalité de la protéine produite reste soluble.

J'ai ensuite produit la protéine à plus grande échelle pour la purifier par chromatographie d'affinité à l'aide de résine Ni-NTA, basé sur l'affinité des acides aminés histidines pour les atomes de Nickel. Les éluions sont réalisées avec différentes concentrations d'imidazole (de 200 mM à 500 mM). Les différentes fractions récupérées tout au long de la purification ont été analysées par Western Blot. On observe ici dans les éluions plusieurs bandes en dessous du poids moléculaire attendu, ressemblant à une dégradation ou un clivage de la protéine (Figure 25 A). On peut de plus observer une bande faible supplémentaire d'une taille apparente s'approchant de 70 kDa, correspondant à une protéine bactérienne nommée ArnA, un contaminant connu des chromatographies d'affinité utilisant des résines Ni-NTA. Les différentes bandes ont été découpées sur le gel et envoyés à la plateforme de protéomique pour vérifier leur composition. L'analyse par LC-MS/MS confirme que les bandes inférieures correspondent à différents stades de dégradation de l'extrémité C-terminale de la protéine, la bande de plus faible poids moléculaire aux alentours de 29 kDa correspondant à l'étiquette 6His-GST seule, l'extrémité C-terminale de Oxa1a étant totalement dégradé. Cette dégradation semble commencer dès la lyse des bactéries, on observe déjà ces sous-produits lorsqu'on analyse le lysat juste après la lyse, avant clarification par centrifugation et avant d'être filtré. Ces bandes discrètes suggèrent un clivage enzymatique de l'extrémité plutôt qu'une simple dégradation mécanique de la protéine, où les intermédiaires de dégradations seraient moins faciles à distinguer (formation d'un smear sur le Western Blot).

Pour empêcher cette dégradation, j'ai essayé différentes approches. J'ai tout d'abord transformé une autre souche de bactéries nommées NiCo21, où deux protéases bactériennes sont absentes. Ce changement n'empêche pas la dégradation. Plusieurs cocktails d'inhibiteurs de protéases ont été testés sans succès, ainsi que l'ajout d'EDTA dans le tampon de lyse. Le changement de méthode de lyse des bactéries, en passant d'une lyse mécanique à l'aide d'un Microfluidizer ou d'une french press à une lyse par sonication douce, a permis de diminuer la proportion de protéine dégradée, mais pas d'empêcher totalement la dégradation. Entre 60 et 80% maximum de la protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter purifiée est intacte (Fig. 25 B). J'ai estimé que cette proportion de protéine intacte était suffisante pour l'utiliser dans les expériences *in vitro* de co-immunoprécipitations.

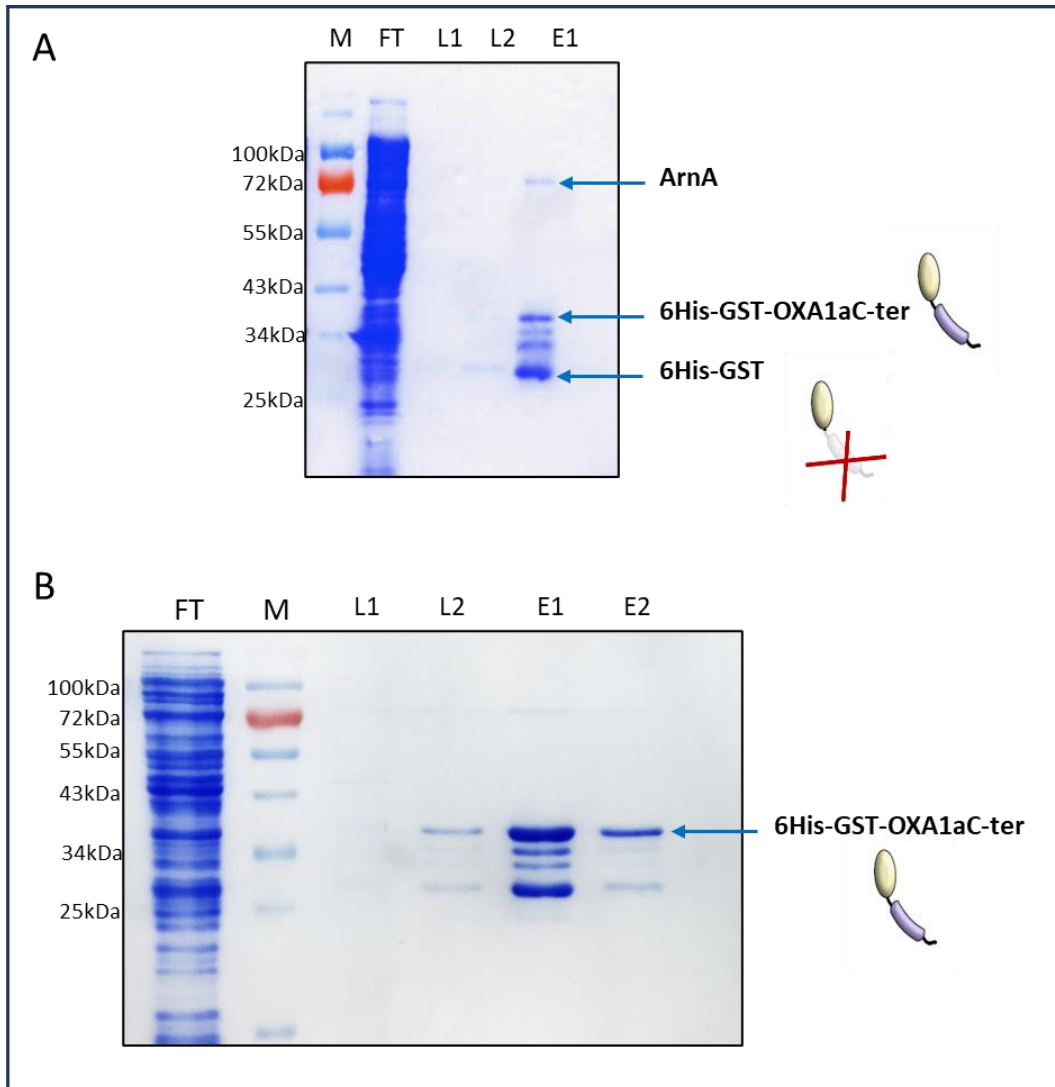


Figure 25 : Production et purification de la protéine 6His-GST-Oxa1C-ter par chromatographie d'affinité avec de la résine Ni-NTA en « batch », et visualisation des différentes fractions par Western Blot

A. Purification en vrac à l'aide de solutions tampons standards avant optimisation du protocole. Une forte dégradation de la protéine peut être observée. FT : flowthrough (écoulement à travers la colonne), L1 et L2 : lavage 1 et 2, E1 : élution 1 et 2

B. Purification en vrac à l'aide d'un protocole optimisé avec lyse par sonication. Une forte dégradation de la protéine peut être observée. FT : flowthrough (écoulement à travers la colonne), L1 et L2 : lavage 1 et 2, E1 et E2 : élution 1 et 2

Co-Immuno-précipitations à l'aide de la protéine de fusion 6His-GST-Oxa1aC-ter

La stratégie expérimentale a consisté à utiliser la protéine précédemment purifiée en tant qu'appât pour capturer des ribosomes mitochondriaux libres qui s'accrocheraient à l'extrémité C-terminale de ma protéine synthétique, soit (i) directement par l'intermédiaire de protéines ribosomiques à identifier ici et / ou (ii) au travers de protéines intermédiaires à identifier ici qui feraient le lien entre Oxa1a et le mitoribosome, comme observé chez la levure et les animaux.

Contrairement aux expériences de GST pull-down classiques qui utilisent des billes couplées à du glutathion pour capturer la GST et les protéines qui lui sont associées, j'ai utilisé directement des billes couplées à un anticorps contre la GST, comme une approche de co-immuno-précipitation classique. Le lysat de protéines mitochondriales est tout d'abord incubé avec une quantité fixe de protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter pendant 30 minutes pour permettre l'interaction entre la protéine purifiée et le mitoribosome, avant d'être mélangé aux billes magnétiques portant l'anticorps anti-GST qui se fixent sur la protéine de fusion. La solution totale obtenue est ensuite passée sur une colonne magnétique pour récupérer les protéines liées aux billes. Pour ne perdre aucune potentielle protéine interagissant avec l'extrémité C-terminale d'Oxa1a, j'ai récupéré les billes lors de l'élution avant transmission pour analyse à la plateforme de protéomique mutualisée IBMC-IBMP du campus de l'Esplanade.

Utilisation d'extraits de mitochondries totales de chou-fleur

J'ai tout d'abord réalisé des co-immuno-précipitations avec des mitochondries entières d'*Arabidopsis* purifiées à partir du protocole optimisé par Florent Waltz. J'ai lysé les mitochondries avec 1% de Triton X-100, pour me débarrasser au maximum des membranes mitochondriales et libérer les mitoribosomes dans le lysat. Après clarification, j'ai rajouté 5 ng de protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter avant de réaliser les immuno-précipitations. Les premières immuno-précipitations n'ont identifié que peu de protéines après analyse par la plateforme de spectrométrie de masse, 214 et 367 protéines respectivement pour les expériences 1 et 2.

J'observais déjà la présence de protéines de la LSU dans les immunoprécipitations, mais aucune protéine ne dépassait le seuil de significativité. La solution tampon contenait 200 mM de KCl, la concentration utilisée pour les immunoprécipitations de mitoribosomes avec la protéine rPPR336-HA. Oxa1a ne faisant pas partie du mitoribosome et l'interaction étant probablement transitoire et / ou moins stable que celle d'une protéine ribosomique avec ses autres partenaires du ribosome, il est possible que les conditions d'immunoprécipitation soient trop dissociatives. De plus, la protéine de fusion purifiée étant partiellement dégradée, seule une fraction de la quantité de protéines ajoutée est capable de se lier effectivement au mitoribosome. J'ai donc réalisé les expériences d'immunoprécipitation suivantes avec une concentration en sels plus basse, i.e. 50 mM de KCl et 20 mM de MgCl₂. J'ai également testé un détergent différent lors de la lyse, et remplacé le Triton X-100 par du NP-40 (Igepal), qui semblait donner des résultats plus reproductibles au vu d'expériences pilote. Les optimisations de protocole ont été conduites sur un autre matériel biologique plus facile à purifier en grande quantité, des mitochondries de chou-fleur, une plante de la même famille qu'Arabidopsis, les brassicacées, très similaire, avec des ribosomes mitochondriaux de même composition et même structure (Waltz, 2021). La suite des résultats présentés a été réalisés à l'aide de mitochondries de chou-fleur.

Dans tous les résultats qui vont suivre, les immunoprécipitations contrôles ont subies le même traitement que les co-IP, la différence étant que la protéine appât n'a pas été ajoutée au lysat de protéines. A la place, de la GST libre a été ajoutée dans les premiers contrôles, cette GST ne possède donc pas la partie C-terminale d'Oxa1a. D'autres contrôles ont été réalisés sans ajout ni de la protéine appât ni de GST, les principales interactions non spécifiques lors de ces IP étant liées aux billes magnétiques et aux anticorps qui les recouvre directement, et non à la protéine GST. Je n'ai observé aucune différence significative entre les IP avec de la GST libre ou sans aucune protéine appât ajoutée (Tableau annexe 1). Les résultats de co-IP présentés ici sous forme de « Volcano-Plot » où l'enrichissement de chaque protéine identifiée dans les expériences de co-IP par rapport aux expériences contrôles (représenté en abscisse) est mis en relation avec la significativité statistique de cet enrichissement (représenté en ordonné). Les résultats représentent trois expériences distinctes regroupant 7 IP contrôles et 8 co-IP à l'aide de la protéine de fusion 6His-GST-Oxa1aC-ter (Fig. 26).

On observe en premier lieu sur ces Volcano-Plot que l'extrémité C-terminale d'Oxa1a est bien capable d'immunoprécipiter le mitoribosome. En effet, il y a un fort enrichissement en

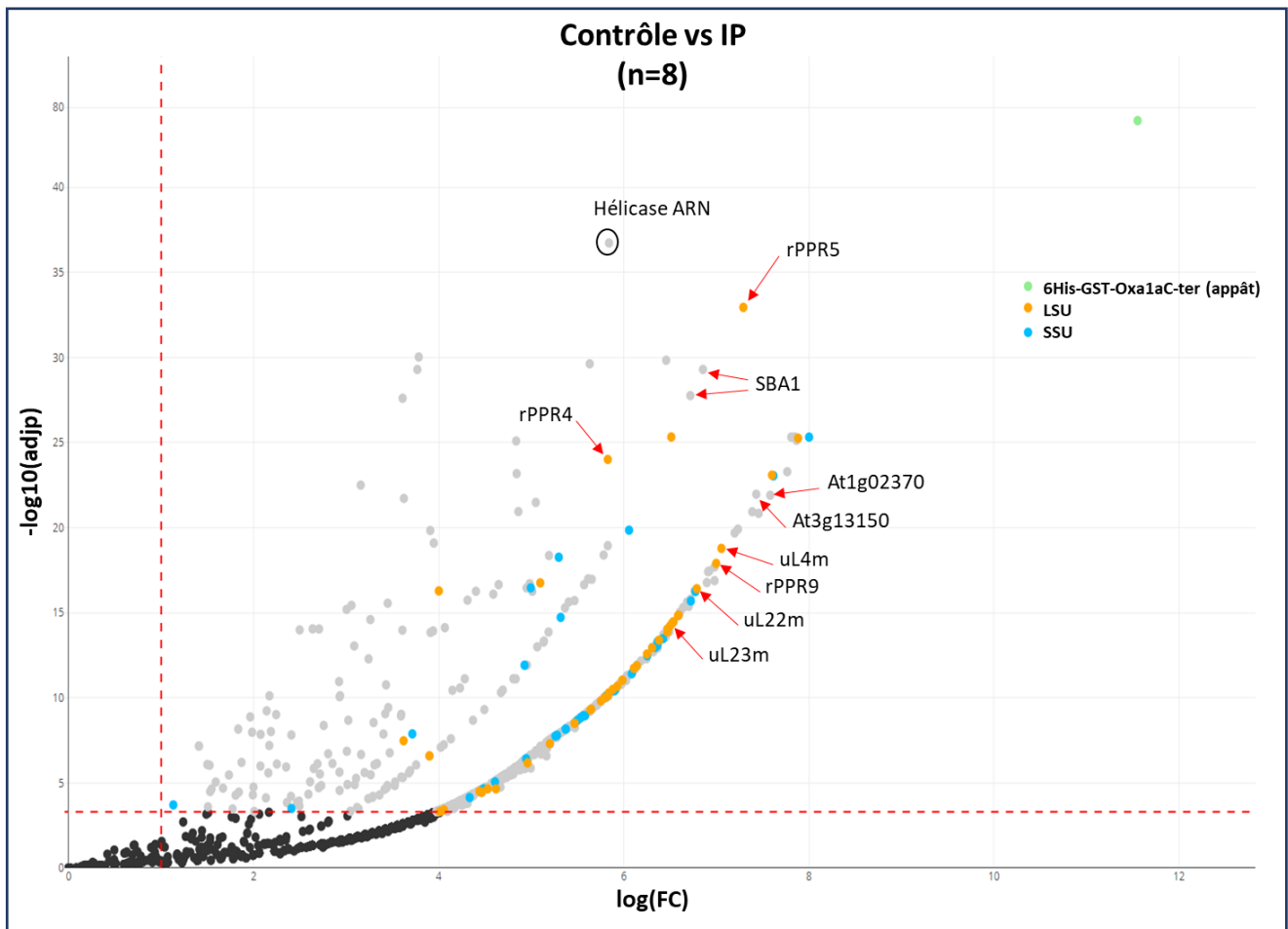


Figure 26 : Co-immunoprécipitation de la protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter en présence de lysat de mitochondries de chou-fleur

Représentation sous forme de Volcano-Plot de 3 expériences distinctes de co-immunoprécipitation @GST regroupant 7 contrôles et 8 IP. Chaque point correspond à une protéine. L'axe des abscisses (LogFC) représente l'enrichissement en protéine dans les IP par rapport aux contrôles, avec un seuil de significativité de $\text{LogFC} > 2$. L'axe des ordonnées ($-\log_{10}(\text{Adj}p)$) représente l'importance statistique de cet enrichissement, avec un seuil de significativité de $\text{adj}p\text{value} < 0.005$.

Les protéines candidates pour une interaction directe avec l'extrémité C-terminale d'Oxa1a sont indiquées à l'aide de flèches rouges. Le cercle noir indique la protéine la plus significativement enrichie lors des IP.

protéines ribosomiques par rapport aux IP contrôles. On retrouve dans les résultats de spectrométrie de masse toutes les protéines composant le cœur du mitoribosome, et 31/44 des différentes protéines pouvant être présentes dans la SSU au-dessus du seuil de significativité (adj p value < 0,005), ainsi que 40/49 protéines pouvant être présentes dans la LSU. Si l'on se concentre sur l'enrichissement en protéines mitoribosomiques, on remarque que les protéines ribosomiques présentant un plus grand enrichissement sont majoritairement des protéines de la LSU, (notamment les PPR ribosomiques rPPR4, rPPR5 et rPPR9), à l'exception de plusieurs protéines rPPR de la SSU (notamment rPPR2 et rPPR7). Cette observation est cohérente avec une interaction du domaine C-terminal d'Oxa1a avec la LSU du mitoribosome, comme décrit chez d'autres organismes. Parmi les protéines les plus significativement enrichies, on retrouve les rPPR présentes dans les deux sous-unités du mitoribosome mitochondrial. Au total, on retrouve 540 protéines enrichies qui dépassent le seuil de significativité, soit 460 protéines qui ne font pas partie du mitoribosome de plante. Parmi les protéines ne faisant pas partie du mitoribosome enrichies dans ces IP, une partie de ces protéines sont déjà caractérisées et appartiennent à des mécanismes de l'expression génétique autres que la traduction (transcription, modifications post-transcriptionnelles comme l'édition de l'ARN, hélicases, chaperonnes, facteurs d'élongation, etc.), à des complexes de la chaîne de transport des électrons (ou participent à la phosphorylation oxydative en général), ou est lié au métabolisme des acides aminés (Tableau annexe 2). En particulier, une des protéines les plus significativement enrichies (voir Fig. 26) est une hélicase ARN à DEAD-box, RH53. Cette hélicase semble être impliquée dans l'épissage des introns du groupe II et pourrait être un homologue de l'hélicase ARN MS116 que l'on retrouve chez la levure, malgré un faible pourcentage d'homologie (28%).

Environ 92 % des protéines enrichies par co-immunoprécipitation ont une localisation mitochondriale prédite, 5 % proviennent de contaminations chloroplastiques et 3 % d'autres compartiments contaminants. Plusieurs dizaines de protéines ont une fonction inconnue et ne sont pas ou peu caractérisées : ces protéines pourraient servir de lien entre le mitoribosome et Oxa1a, sans faire pour autant partie intégrante du ribosome à la manière de Mba1. Cependant ces IP seules ne nous permettent de dégager des candidats clairs qui pourraient jouer ce rôle. Basé sur leur enrichissement et leur localisation sur la structure du mitoribosome, j'ai tout de même choisi 9 protéines candidates (Fig. 26). Parmi ces protéines, j'ai sélectionné trois protéines PPR ribosomiques, rPPR5, rPPR4 et rPPR9, qui sont les

protéines du mitoribosome les plus enrichies dans les co-IP de mitochondries de chou-fleur. Toutes ces rPPR se situent sur le plan de la LSU qui pourrait reposer sur la membrane interne, et pourraient interagir avec Oxa1a. J'ai ensuite choisi trois protéines de fonction inconnue, les deux premières identifiées comme protéines PPR d'accension At3g13150 et At1g02370, et une seconde identifiée comme protéine de la famille des protéines à domaine AAA, nommée SBA1. Les protéines de la famille AAA sont retrouvées dans de nombreux mécanisme et sont capables d'une activité ATPase. J'ai enfin choisi trois protéines du mitoribosome, uL4m, uL22m et uL23m. La protéine homologue de uL23m chez la levure, Mrp20, a été montré comme interagissant avec Oxa1 par Cross-link (Jia et al., 2003), et se situe très proche du canal de sortie du peptide. uL4m et uL22m sont très enrichies dans les co-IP, mais ne sont pas localisées à la surface du mitoribosome. En effet ces protéines sont constitutives du canal de sortie du peptide, au centre de la LSU, et possèdent peu de chances de pouvoir interagir avec Oxa1a en surface, sauf si l'extrémité C-terminale entre dans le canal peptidique. J'ai utilisé toutes ces protéines pour des tests de co-expression transitoire chez *N. benthamiana*, que je décris plus bas. Ces expériences complémentaires vont permettre de tester de possibles interactions directes entre ces protéines et Oxa1a.

Utilisation d'extraits de mitoribosome purifié

Dans le but de caractériser si l'interaction entre l'extrémité C-terminale d'Oxa1a et le mitoribosome est une interaction directe avec les protéines cœur du ribosome, j'ai réalisé des expériences de co-IP similaires à celles réalisées précédemment, mais en utilisant des ribosomes mitochondriaux purifiés. Le lysat de mitochondries est clarifié puis passé sur un coussin de sucrose à 50 % avant d'être déposé sur un gradient de sucrose continu 10-30 % (Fig. 27). Après centrifugation de 16h, les différentes fractions du gradient sont prélevées à l'aide d'un collecteur de gradient pour séparer les différents complexes et ribosomes (des ribosomes cytosoliques sont souvent attachés à la membrane externe des mitochondries et sont donc également séparés sur les gradients), ainsi que les sous-unités séparées des ribosomes (Fig. 27). Ces mitoribosomes et leurs sous-unités ont été débarrassés de toutes les protéines accessoires liées à l'ARNm ou interagissant faiblement avec le ribosome en passant au travers du gradient. Le matériel récupéré est un mélange de mitoribosomes entiers et de sous unités de mitoribosome. Lorsque je réalise des co-immunoprécipitations en utilisant ces

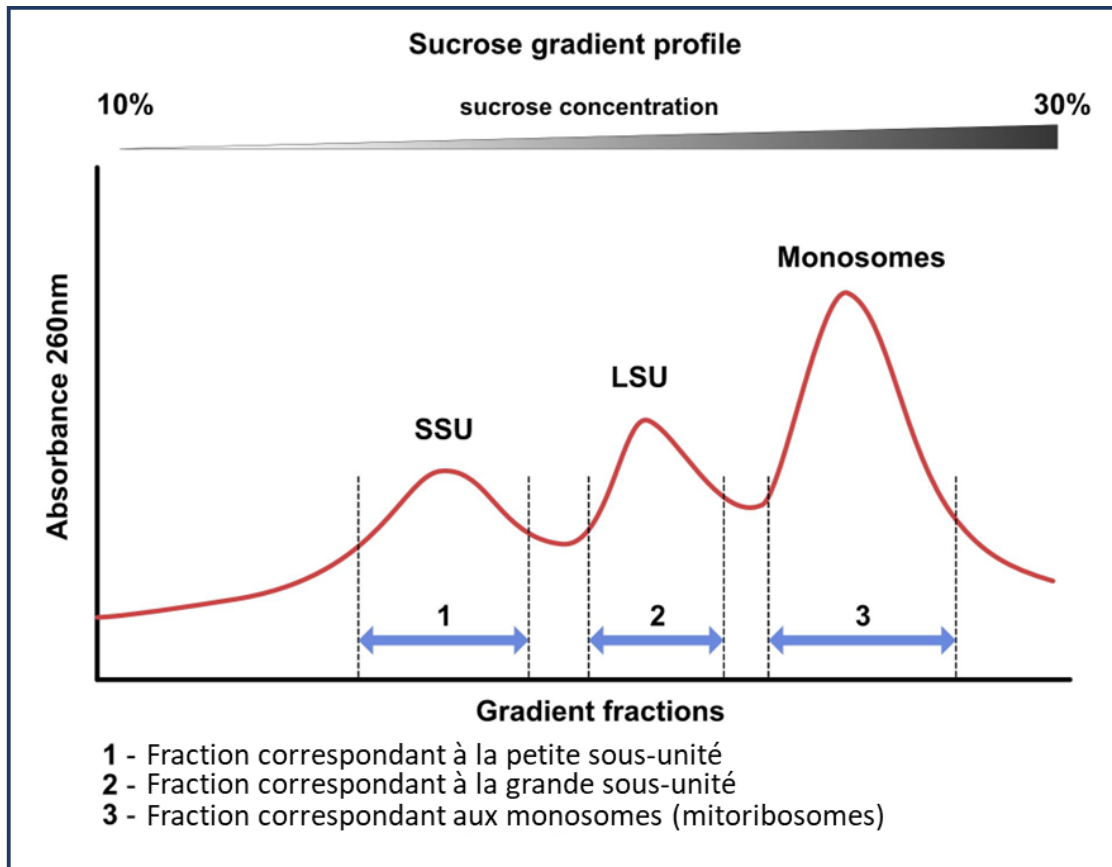


Figure 27 : Profil d'absorbance à 260nm d'un gradient de sucrose 10-30% pour la purification de mitoribosomes de plante.

Représentation sous forme de graphique du profil d'absorbance à 260nm des différentes fractions d'un gradient de sucrose 10-30% après dépôt de lysat de mitochondries de plantes et centrifugation. La fraction contenant des monosomes peut contenir des cytoribosomes, dont le coefficient de sédimentation est très proche de celui des mitoribosomes. Ces ribosomes cytosoliques se trouvaient attachés à la membrane externe des mitochondries et ont été co-purifiés avec les mitochondries de plante. D'après (Waltz et al., 2021).

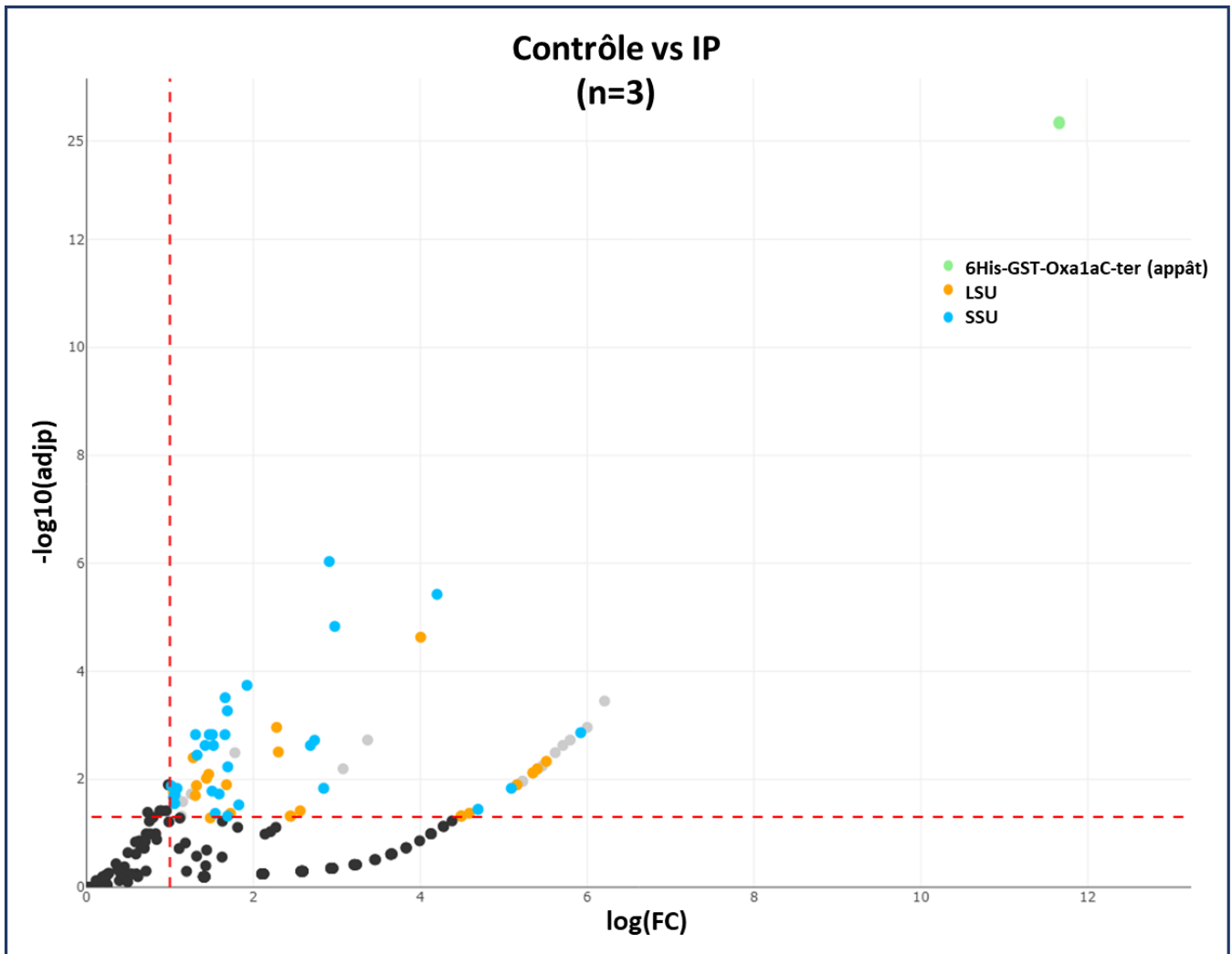


Figure 28 : Co-immunoprécipitation de la protéine 6His-GST-Oxa1aC-ter en présence de ribosomes mitochondriaux de chou-fleur purifiés

Représentation sous forme de Volcano-Plot de co-immunoprécipitations @GST regroupant 3 contrôles et 3 IP. Chaque point correspond à une protéine. L'axe des abscisses (LogFC) représente l'enrichissement en protéine dans les IP par rapport aux contrôles, avec un seuil de significativité de LogFC > 2. L'axe des ordonnées (-log₁₀(AdjP)) représente l'importance statistique de cet enrichissement, avec un seuil de significativité de adjpvalue < 0.005.

fractions purifiées, des protéines ribosomiques sont identifiées (Fig. 28). Le nombre de protéines différentes précipitées est plus faible que pour les co-IP utilisant les lysats totaux de mitochondries, et on retrouve très peu de protéines non ribosomiques.

Les mitoribosomes sont donc bien débarrassés de toutes les protéines partenaires accessoires. Au total, on trouve 200 protéines différentes, et 75 sont enrichies au-dessus du seuil de significativité. Parmi celles-ci, on retrouve 28 protéines de la LSU et 27 de la SSU. Ici on observe autant de protéines de chaque sous-unité contrairement à l'expérience précédente où plus de protéines de la LSU étaient retrouvées. Sur les 75 protéines enrichies significativement, il y a seulement 19 protéines non ribosomiques, toutes de fonctions connues (prohibitine, cation ATPase, facteur d'épissage, transporteur d'ATP, Dynamine, ...) et non lié à la traduction. 4 font partie de la phosphorylation oxydative, 3 sont des contaminants chloroplastiques et deux du cytoplasme/noyau. On ne retrouve aucune des protéines non ribosomiques que j'ai choisi pour les expériences d'interaction directe, et l'on ne retrouve pas non plus RH53. Ces résultats suggèrent fortement qu'il y a une interaction directe entre une ou plusieurs protéines constitutives du mitoribosome et la protéine appât possédant l'extrémité C-terminale d'Oxa1a. Comme contrôle négatif, j'ai également réalisé des co-IP à l'aide de fractions contenant une majorité de SSU de mitoribosomes, on retrouve aussi un enrichissement en protéines du mitoribosome. Toutefois ces expériences sont considérées comme non conclusives en raison de la détection de contamination de la fraction utilisée par de la LSU.

A la vue de ces résultats, nous pouvons conclure que l'extrémité C-terminale d'Oxa1a semble avoir le même rôle que celui observé chez les mammifères et la levure. Cette extrémité C-terminale d'Oxa1a constitue donc bien un domaine de liaison au ribosome. Pour le mécanisme d'interaction, l'hypothèse privilégiée est que l'interaction entre le RBD d'Oxa1a et le mitoribosome est directe, sans la nécessité d'une protéine intermédiaire non-ribosomique pour établir le lien entre les deux, contrairement aux situations observées chez les animaux et les levures. Il reste maintenant à déterminer quelle est exactement la ou les protéine(s) du mitoribosome qui permet(tent) l'interaction avec Oxa1a.

Expériences d'expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana* pour tester l'interaction directe entre Oxa1aRBD et des protéines candidates

Dans le but de déterminer la nature exacte de la/des protéine(s) responsable(s) de l'interaction directe, je me suis penché sur certaines des protéines retrouvées enrichies dans les expériences de co-IP. Pour déterminer si ces protéines étaient en directe interaction avec le RBD d'Oxa1a, j'ai opté pour une co-expression transitoire dans une feuille de *Nicotiana benthamiana* du RBD d'Oxa1a et d'une protéine candidate, toutes les deux étiquetées avec deux étiquettes différentes. J'ai ensuite réalisé des IP dirigées vers ces étiquettes pour observer par Western Blot si une protéine était capable d'immuno-précipiter l'autre protéine, révélant ainsi une interaction directe. J'ai réalisé ces essais sur les 9 protéines candidates décrites plus haut : rPPR4, rPPR5, rPPR9, SBA1, At3g13150, At1g02370, uL4m, uL22m et uL23m. SBA1, At3g13150 et At1g02370 n'ont pas été retrouvé dans les expériences de co-immunoprécipitation sur mitoribosomes purifiés, mais ces expériences ont été faites en parallèle basé uniquement sur les résultats précédents.

J'ai cloné la CDS de chacune de ces protéines dans des vecteurs possédant une étiquette HA en C-terminal de la protéine, et mon RBD d'Oxa1a dans un vecteur possédant une étiquette myc en N-terminal de la protéine. J'ai ensuite transformé des agrobactéries avec ces constructions et agroinfiltré des feuilles de *N. benthamiana* avec chaque construction pour tester l'expression transitoire de mes protéines. J'ai observé l'expression après 3 jours par SDS-PAGE suivi d'un Western Blot (Fig. 30 A). Par exemple pour At3g13150, on observe bien la protéine ayant une migration correspondant à la masse moléculaire calculée (environ 70 kDa), de même pour myc-Oxa1aRBD (environ 12 kDa). Sur les 10 constructions réalisées, seulement myc-Oxa1aRBD et 6 protéines candidates présentaient une expression (At1g02370, rPPR9 et uL23m ne s'expriment pas).

J'ai continué avec ces constructions : j'ai coexprimé myc-Oxa1aRBD avec chacune des 6 protéines restantes et un vecteur p19, inhibiteur de RNA silencing. Après co-IP anti-HA, j'ai observé par Western Blot si myc-Oxa1a était immunoprécipité avec la protéine candidate. A ce stade, aucune des co-IP réalisée n'a permis de révéler un enrichissement en myc-Oxa1aRBD

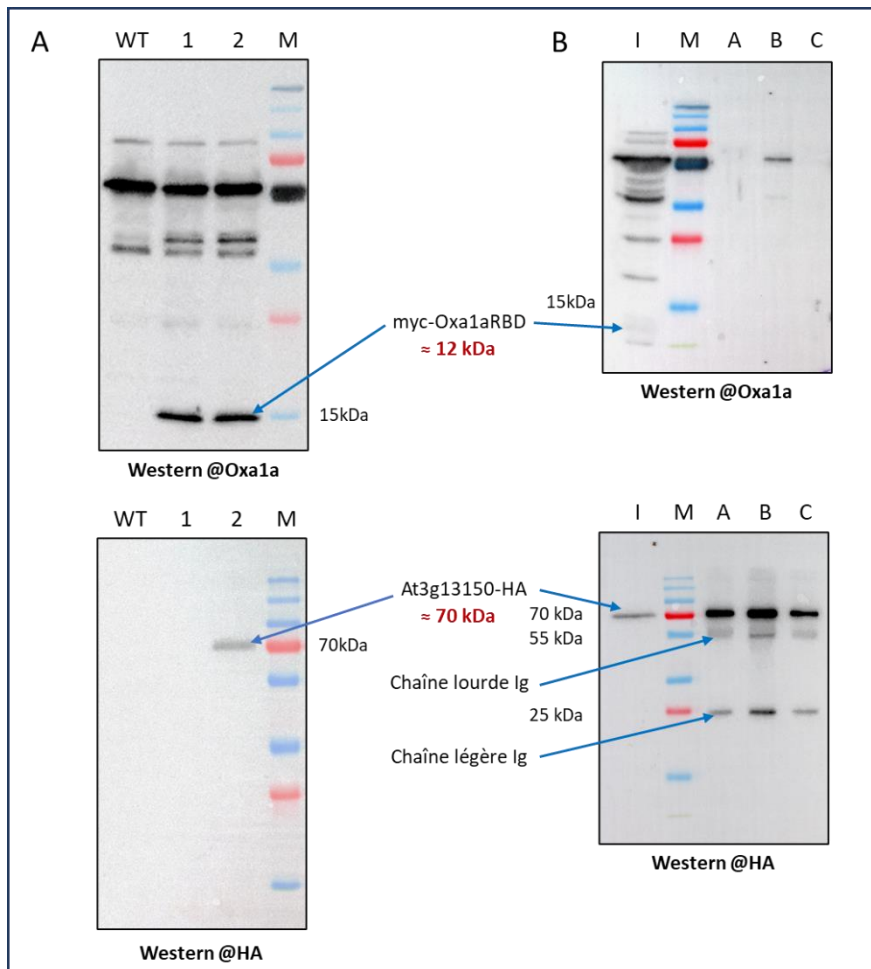


Figure 29 : Western Blot des co-immunoprécipitation entre myc-Oxa1aRBD et des protéines candidates étiquetées HA coexprimées transitoirement dans *N. benthamiana*

A. Tests de l'expression des protéines myc-Oxa1aRBD et At3g13150-HA agroinfiltrées dans une feuille de *N. benthamiana* après 3 jours. En haut, Western Blot avec anticorps @Oxa1a, en bas, Western Blot avec anticorps @HA. WT : Extrait protéique de feuille de *N. benthamiana* agroinfiltrée uniquement avec un vecteur p19, 1 : Extrait protéique de *N. benthamiana* agroinfiltrée avec les constructions myc-Oxa1aRBD et p19, 2 : Extrait protéique de *N. benthamiana* agroinfiltrée avec les constructions myc-Oxa1aRBD, At3g13150-HA et p19.

B. Immunoprécipitations @HA de feuilles de *N. benthamiana* agroinfiltrées avec myc-Oxa1aRBD, At3g13150 et p19 après 3 jours observées par Western Blot. En haut, anticorps @Oxa1a, en bas, anticorps @HA. I : Input, extrait protéique avant immunoprécipitation, A, B et C : trois réplicats d'immunoprécipitation @HA différents. On peut observer les chaînes légères et chaînes lourdes des anticorps @HA.

(Fig. 30 B). Cependant, lors de la co-expression, le niveau d'expression de la petite protéine de 12 kDa environ était fortement variable, parfois presque inexistante. Il n'est pas à exclure que le niveau d'expression de myc-Oxa1aRBD était trop faible pour être observé après immunoprécipitation des protéines candidates.

Pour conclure, aucune interaction directe n'a pu être visualisée entre le RBD d'Oxa1a et les protéines testées, avec la méthode utilisée. Plusieurs autres protéines mitoribosomiques pourraient encore à être testées, comme rPPR9 et uL23m qui ne s'exprimaient pas, ainsi que les autres protéines situées proches du canal de sortie du peptide comme uL24m et uL29m, même si on les retrouve moins enrichies dans les immunoprécipitations. Toutefois, la nature des protéines ribosomiques en interaction directe avec Oxa1a sera identifiée de manière plus directe par les analyses de cryo microscopie électronique du complexe formé par le mitoribosome et Oxa1a.

Analyse par cryo-EM des mitoribosomes de plante

Etude structurale de l'interaction de Oxa1aRBD avec le mitoribosome

Afin de connaître le site exact d'interaction entre le RBD d'Oxa1a et le ribosome mitochondrial de plante, j'ai réalisé des expériences de cryo-microscopie électronique (cryo-EM). Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Florent Waltz, laboratoire du Prof Ben Engel, Biozentrum, Université de Bâle, Suisse. La protéine recombinante purifiée 6His-GST-Oxa1aC-ter (renommée à partir de maintenant 6His-GST-Oxa1aRBD) a été mise en présence de mitoribosomes fraîchement purifiés, pour viser à obtenir *in fine* une reconstruction 3D du complexe à partir d'une collection de particules individuelles observées sur une série de micrographes. Le but de cette expérience est de pouvoir observer l'interaction entre le mitoribosome de plante et le RBD d'Oxa1a à l'échelle atomique. Selon la résolution obtenue, il sera possible de déterminer avec précision la ou les protéines du mitoribosome responsables de l'interaction avec le RBD.

La technique de cryo-EM implique une préparation particulière des échantillons biologiques permettant d'obtenir des informations structurales à haute résolution en utilisant un

microscope électronique à transmission. Cette technique permet de réduire les dommages d'irradiation causés par le faisceau d'électrons et permet également de préserver la structure des échantillons. Cette technique consiste à congeler très rapidement les échantillons biologiques en solution dans de l'éthane liquide, de manière à les figer dans leur état natif dans une glace vitreuse, qui ne forme pas de cristaux. Il est intéressant de noter que cette technique permet de capturer différentes conformations ou différents états des objets biologiques étudiés. Pour cela, un grand nombre d'images ou micrographes sont collectés. Sur chaque micrographe, des particules individuelles correspondant aux complexes étudiés sont prélevées informatiquement et classées en fonction de leur orientation dans l'espace (on parle de classification 2D). La somme de l'ensemble de ces particules disposées dans un maximum d'orientations possibles permet de reconstituer informatiquement le volume et la densité électronique occupés en trois dimensions par le complexe étudié (Fig. 30).

La réalisation des grilles et l'acquisition des images ont toutes deux été réalisées directement au Biozentrum à Bâle, où je me suis rendu à plusieurs reprises, avec l'aide du Dr Florent Waltz. Plusieurs types de grilles ont été réalisées. Cinq grilles de microscopie contenant ma protéine recombinante produite en système bactérien et purifiée par affinité, et des mitoribosomes de chou-fleur purifiés comme expliqué précédemment à l'aide d'un coussin de sucrose 50% et d'un gradient continu de sucrose 10-30% ont été obtenues, ainsi que des grilles contrôles contenant uniquement du mitoribosome. Chaque grille a été réalisée en déposant 4 μL d'échantillons, composés de mitoribosome de plante à une concentration de protéines de 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ soit 6 μg , et un excès molaire de la protéine 6His-GST-Oxa1aRBD à une concentration de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ soit 200 ng de protéine. Cette concentration de protéine assure un excès de 3 fois de protéine possédant un RBD intact disponible pour l'interaction, sans pour autant saturer la grille avec cette protéine. Les échantillons ont été déposés sur des grilles de carbone perforées Quantifoil R2/2 de 300 mailles, recouverte d'un mince film de carbone continu et déchargé par décharge lumineuse (2,5 mA pendant 20 sec). Les échantillons ont été incubés sur la grille pendant 30 secondes, puis épongé avec du papier filtre pendant 2 secondes avec un Vitrobot Mark IV à température et humidité contrôlées ($T = 4^\circ\text{C}$, humidité 100%, force de blotting 5), suivi d'une vitrification dans de l'éthane liquide préalablement refroidi dans de l'azote liquide. Avant les analyses cryo-EM, une des grilles d'échantillons de ribosomes et de protéine a été analysée par microscopie électronique classique, en coloration négative, pour évaluer l'intégrité et la pureté des échantillons. Les échantillons ont été visualisés avec un microscope

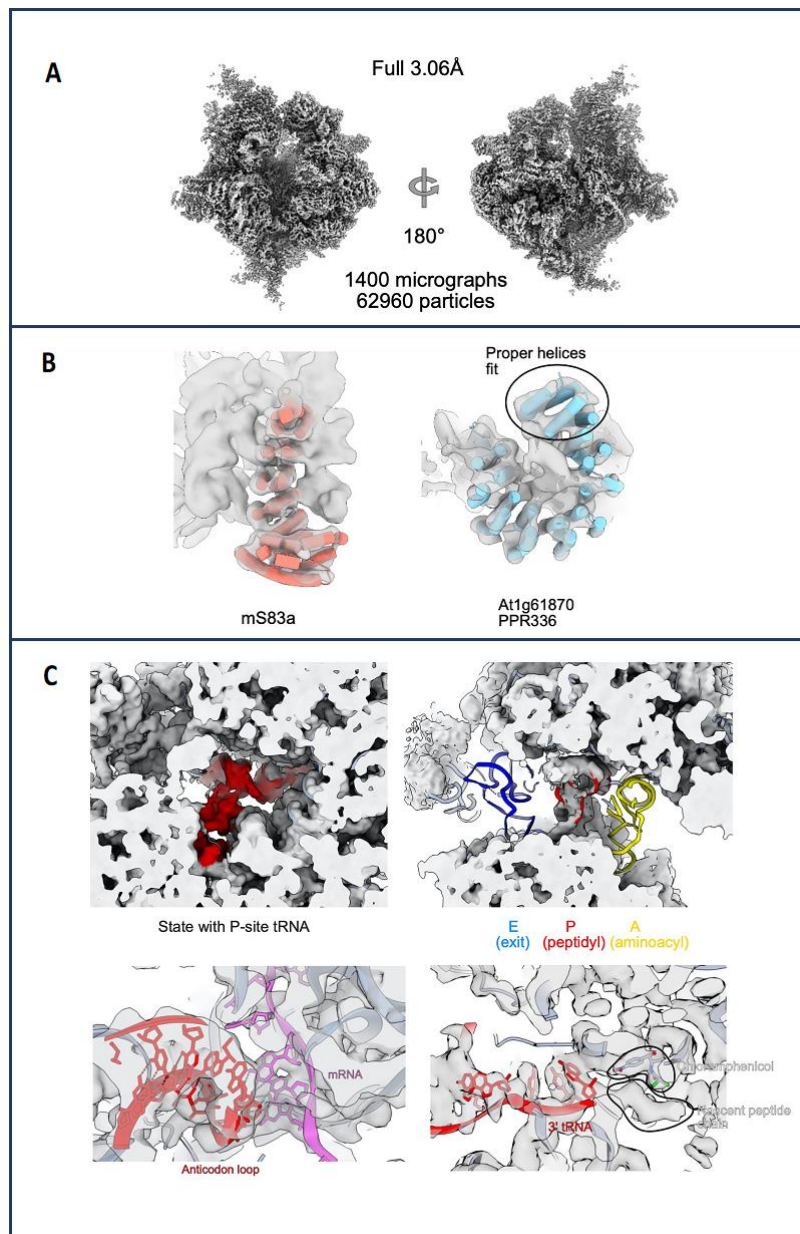


Figure 30 : Analyse du mitoribosome de plante par cryo-EM.

A. Représentation 3D de la densité électronique du mitoribosome de chou-fleur obtenues à une résolution moyenne de 3,06 Å.

B. Identification de protéines présentes à la base du pied de la SSU.

C. Visualisation en rouge de la densité électronique correspondant à un ARNt dans le site P du mitoribosome de plante. Des modèles d'ARNt sont représentés en bleu et en jaune respectivement pour indiquer la position des sites E et A dans la structure du ribosome. Un fragment d'ARNm est représenté en violet, en interaction avec l'anticodon de l'ARNt. Une molécule de chloramphenicol entourée en noir est visible, proche du peptidyl-ARNt bloqué dans le site P du ribosome.

électronique à transmission CM120 100Kv (FEI). Les particules sont clairement visibles, la densité en mitoribosome est optimale, et aucun agrégat des mitoribosomes ou de la protéine 6His-GST-Oxa1aRBD n'est visible à ce stade. Les micrographes ont été acquis sur un microscope électronique Titan Krios (FEI) de 300 kV. Toutes les images ont été acquises sur le microscope, mais l'analyse des micrographes pour obtenir des reconstitutions 3D n'a à ce stade été réalisée que sur les micrographes de grilles contrôles comportant du mitoribosome seul. Cette analyse a dû être réalisée en premier lieu afin d'obtenir une meilleure résolution du mitoribosome que celle précédemment publiée (Waltz et al., 2020). Il s'agissait en particulier d'obtenir une meilleure résolution locale du canal de sortie des peptides, un préalable nécessaire pour visualiser à la meilleure résolution possible l'interaction entre Oxa1a RBD et des protéines et / ou ARN ribosomiques. A partir de 1400 micrographes récoltés sur des grilles contenant uniquement des mitoribosomes de chou-fleur une reconstruction 3D du mitoribosome avec une meilleure résolution a été obtenue (Fig. 30A). La résolution moyenne du mitoribosome entier est de 3,06 Å, alors que la résolution de la LSU seule est de 2,93 Å (comparés aux résolutions de 3,86 et 3,96 Å obtenues précédemment (Waltz et al., 2020)). Cette meilleure résolution a permis de mieux visualiser de nombreux détails du mitoribosome, comme le canal de sortie des peptides. Elle a permis de lever les ambiguïtés sur la nature de certaines protéines du mitoribosome. En particulier l'analyse a montré que les protéines PPR constituant le pied de la SSU sont mS83 et rPPR1 / PPR336 (Fig. 30B). De manière très intéressante, les résultats ont également permis de visualiser le chloramphénicol, utilisé lors du protocole de purification pour bloquer les ribosomes, situé près du centre de décodage à l'entrée du tunnel des peptides. Le chloramphénicol se lie aux résidus A2451 et A2452 de l'ARNr 26S de la LSU pour inhiber l'activité peptidyltransférase. De manière très intéressante également, les résultats ont révélé pour la première fois le mitoribosome de plante dans son état actif, en complexe avec un ARNt dans le site P (peptidyl) de la grande sous-unité, ainsi qu'un fragment d'ARN messager en interaction avec l'anticodon de l'ARNt (Fig. 30C).

Analyse *in situ* des mitoribosomes de plante par cryo-tomographie électronique (cryo-ET)

De manière complémentaire aux approches décrites ci-dessus, une analyse de cryoET a été initiée afin de visualiser directement, *in situ*, à l'échelle de la mitochondrie l'organisation et la distribution des complexes étudiés, ici les mitoribosomes, au sein de l'organite. Ces expériences ont également été réalisées en collaboration avec le Dr. Florent Waltz, Biozentrum, Université de Bâle, Suisse.

La cryo-tomographie électronique (cryo-ET) est une méthode apparentée à la cryo-EM permettant d'obtenir la restitution tridimensionnelle d'objets biologiques, comme des complexes, dans un tissu ou un compartiment cellulaire *in situ*, sans passer par leur purification biochimique. La reconstitution 3D est obtenue ici à partir d'images bidimensionnelles, appelés tomogrammes, d'un tissu préalablement cryogénisé, vues sous différentes inclinaisons. Cette technique peut permettre d'obtenir des détails sur des structures cellulaires complexes d'une épaisseur allant jusqu'à 300 nm. Compte tenu de la longueur d'onde des électrons, la résolution est théoriquement limitée à environ 5 nm, mais l'analyse de particules individuelles de subtomogrammes cryoélectroniques permet d'atteindre des résolutions bien supérieures de l'ordre du nanomètre. Ainsi, la résolution atteignable, bien qu'inférieure à celle de la cryo-EM, doit être suffisante pour voir dans le cas de notre étude si une protéine additionnelle, qui jouerait le rôle d'intermédiaire, est présente entre Oxa1a et le mitoribosome.

Des études similaires ont déjà été réalisées sur des mitochondries de levure, des mitochondries humaines et plus récemment sur des mitochondries de l'algue *Chlamydomonas*, précisant les contacts qui existent entre les mitoribosomes et la membrane interne *in vivo* (Englmeier et al., 2017, 2019 ; Waltz et al., 2021). Ce type d'analyse permet aussi de connaître la proportion de mitoribosomes interagissant avec la membrane interne et s'il existe une sous-population de mitoribosome libre dans la matrice. Pour l'instant dans les trois études précédentes, l'entièreté ou la majorité des mitoribosomes ont été observés accrochés à la membrane interne des mitochondries. En ce qui concerne les plantes, dans la mesure certaines protéines codées par le génome mitochondrial sont solubles, on ne peut exclure que certains mitoribosomes soient spécialisés dans la traduction de ces protéines et

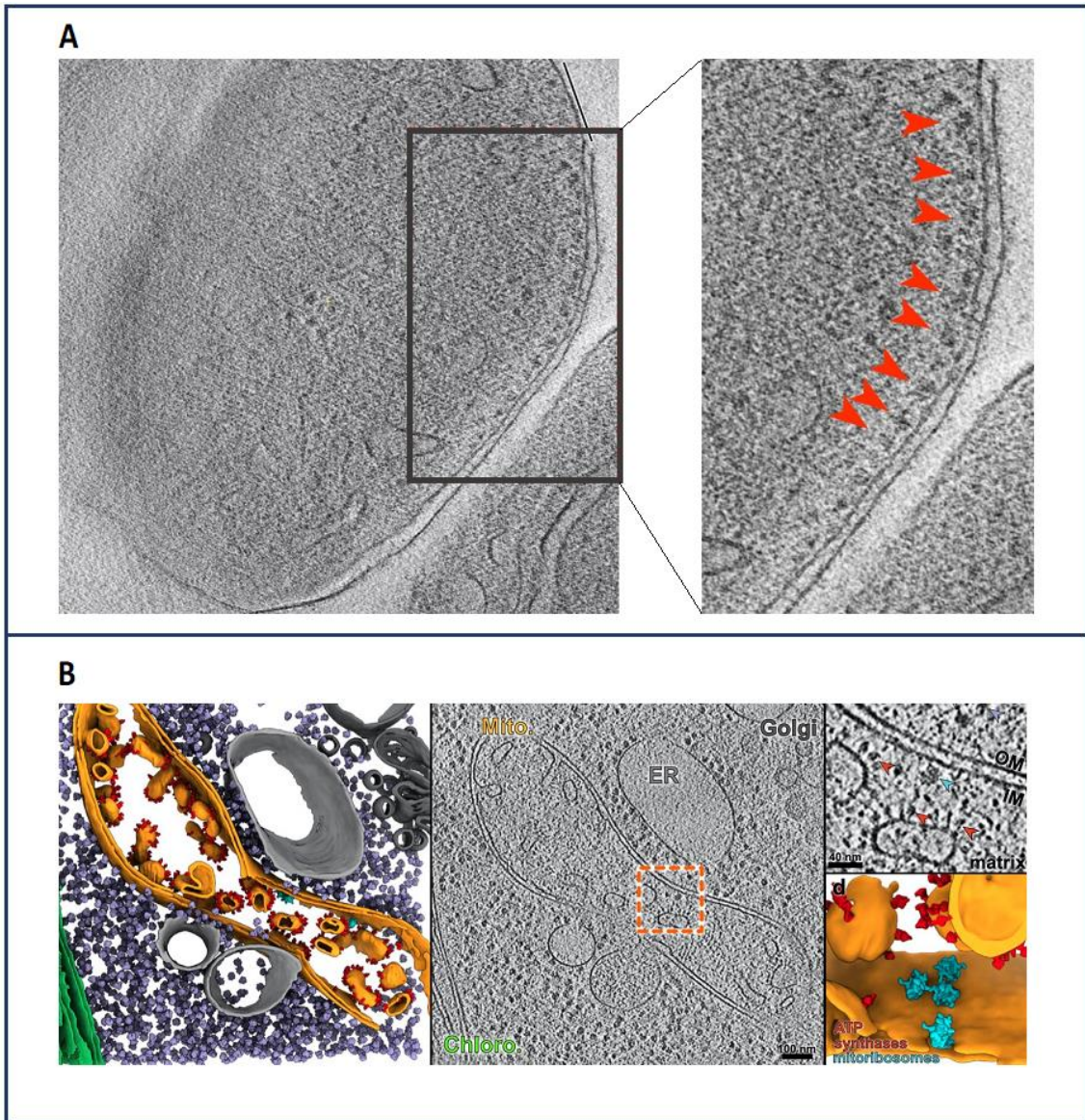


Figure 31 : Analyse des mitoribosomes de plante par cryo-ET.

A. Tomogramme de mitochondrie de chou-fleur purifiée avec une taille de pixel de 2,9 Å. Les flèches rouges représentent des mitoribosomes qui sont visibles à la surface de la membrane interne. A ce stade, on ne peut toutefois pas exclure que des mitoribosomes sont également présents dans la matrice

B. Figure extraite de l'article Waltz et al. 2021 illustrant une reconstitution 3D de mitoribosomes et d'ATP synthase *in situ* dans la mitochondrie de *Chlamydomonas*. Ce type de reconstruction 3D est attendue avec les mitochondries de plante. Elle devrait en particulier permettre de visualiser si des mitoribosomes sont présents ou non dans la matrice

qu'ils soient libres et solubles dans la matrice mitochondriale.

Les grilles de tomographie ont été réalisées à l'aide de mitochondries purifiées de chou-fleur. Les tomogrammes cellulaires ont été acquis sur un microscope Titan Krios (FEI) de 300 kV, équipé d'un filtre énergétique post-colonne Gatan (968 Quantum) et d'une caméra à détection directe (K2 summit, Gatan) fonctionnant en mode vidéo à 12 images par seconde. Les subtomogrammes ont été récoltés et sont en cours d'analyse pour la reconstruction tridimensionnelle des complexes contenus dans la mitochondrie. On peut déjà observer sur les tomogrammes différents complexes mitochondriaux, comme les ATP synthases et les mitoribosomes (Fig. 31). Jusqu'à présent, tous les mitoribosomes observés sur les tomogrammes avant reconstruction sont trouvés à proximité de la membrane interne de la mitochondrie, aucun n'est observé libre dans la matrice. La reconstruction tridimensionnelle permettra de confirmer cette information et d'observer plus en détail l'interaction entre le mitoribosome de plante et la membrane interne *in vivo*.

Autres aspects de l'étude des spécificités de la traduction des mitochondries de plante

Initiation de la traduction mitochondriale chez les plantes

Un autre projet du laboratoire lié à l'étude de la traduction mitochondriale chez les plantes est centré sur la caractérisation du mécanisme d'initiation de la traduction dans les mitochondries de plantes. Comme abordé en introduction, on ne connaît pas chez les plantes la composition du complexe d'initiation dans la mitochondrie. On retrouve des homologues de deux des trois facteurs d'initiation (mtIF2 et mtIF3), mais aucun homologue de IF1. De plus, le mécanisme qui permet à l'ARNm d'être recruté vers le mitoribosome et de l'aligner avec le codon d'initiation est encore inconnu.

Une des stratégies développées dans l'équipe est de tenter d'immuno-précipiter des complexes d'initiation à partir de lignées de plantes exprimant la protéine mtIF2 ou mtIF3 étiquetée, afin d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction. J'ai été impliqué dans le début de ce projet. En particulier, j'ai dû caractériser des lignées

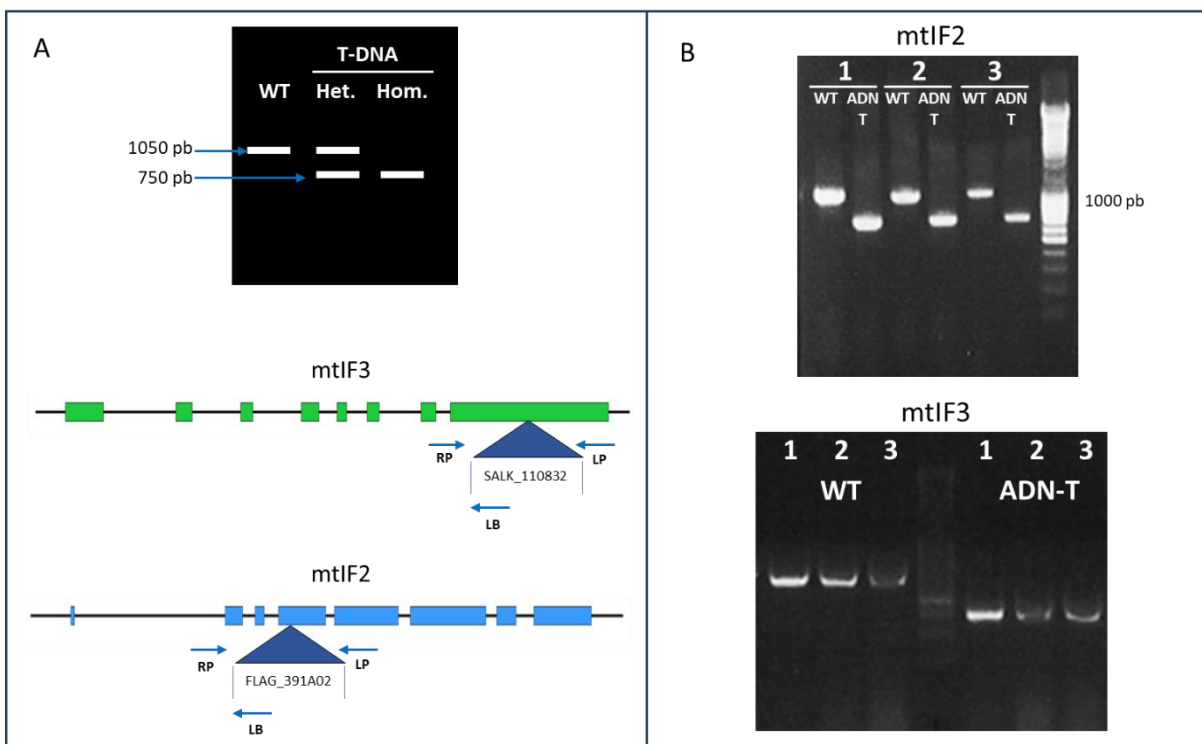


Figure 32 : Génotypage de lignées d'Arabidopsis décrites comme possédant une insertion d'ADN-T dans les gènes mtIF2 et mtIF3.

A. Représentation schématique de la position des insertions d'ADN-T dans le gène codant pour Oxa1a des lignées étudiées, ainsi que la taille des fragments d'ADN obtenus par amplification par PCR attendues pour des lignées Col0 ou mutantes. Les mutants hétérozygotes possèdent les deux amplifications.

B. Exemple de gel d'agarose 1% du génotypage de 3 plantes pour la lignée FLAG_391A02 pour mtIF2 (en haut) et la lignée SALK_110832 pour mtIF3 (en bas). La PCR sauvage et la PCR mutante ont été réalisées séparément (LP+RP et LB+RP). La PCR sauvage est à gauche et la PCR de l'ADN-T à droite. On ne retrouve aucune plante homozygote pour l'insertion.

mutantes pour mtIF2 et mtIF3, et créer des constructions plasmidiques afin d'exprimer dans ces plantes une version étiquetée des protéines d'intérêt.

Génotypage de lignées mutantes pour les gènes codant pour mtIF2 et mtIF3

Le gène codant pour mtIF2 est At4g11160 et celui pour mtIF3 est At1g34360, et pour chacune des protéines j'ai obtenu deux lignées d'insertion d'ADN-T du SALK Institute. Après génotypage (Fig. 32), j'ai conservé une lignée FLAG_391A02 mutante pour mtIF2 avec une insertion dans le 4^{ème} exon et une lignée SALK_110832.48.60 mutantes pour mtIF3 avec une insertion dans le 8^{ème} et dernier exon. Ces deux lignées mutantes sont utilisées pour des expériences d'immunoprécipitation du complexe d'initiation.

Constructions de vecteurs pour exprimer mtIF2 et mtIF3 étiquetées sous contrôle de leur promoteur endogène

Afin de pouvoir réaliser ces expériences d'immunoprécipitation dans des lignées mutantes pour mtIF2 et mtIF3 complémentées, j'ai réalisé des constructions plasmidiques de chacune des protéines à l'aide de techniques de Gateway® et de Goldenbraid®. J'ai produit et cloné trois constructions par protéine, une première avec le promoteur endogène et la séquence génomique comportant encore les introns fusionnés à une étiquette HA à son extrémité C-terminale, ainsi que deux constructions ne comportant que la CDS de la protéine, étiquetée en C ou N-terminal avec une étiquette HA, le tout sous le contrôle d'un promoteur 35S. Ces constructions ont été clonées dans des bactéries Top10 et confiées à Vasileios Skaltsogiannis, étudiant de thèse de l'équipe, qui continue en ce moment ces travaux sur l'initiation de la traduction mitochondriale chez la plante dans notre laboratoire.

Discussion

Importance du Ribosome Binding Domain d'Oxa1a pour la survie de la plante

L'obtention de plantes mutantes pour le gène Oxa1a est une étape très importante pour comprendre l'impact des interactions entre l'insertase et le ribosome mitochondrial sur la physiologie des cellules de plante. L'indisponibilité d'une lignée d'insertion d'ADN-T déjà caractérisée a freiné fortement les études *in vivo*, notamment les expériences de complémentation. Ces expériences représentent la première étape pour la caractérisation d'Oxa1a. Elles nous permettraient de connaître si le domaine identifié comme le RBD est essentiel à la survie de la plante, ou si des phénotypes macroscopiques ou moléculaires plus ou moins importants sont observés. Chez l'Homme par exemple, une délétion du RBD d'Oxa1L n'est pas létale pour la cellule mais entraîne de sévères retards de croissance et de développement, ce qui est en adéquation avec le mécanisme de fixation du mitoribosome sur l'insertase. En effet, il existe trois sites de contact chez l'Homme, dont un entre mL45 et le cœur de la protéine Oxa1L et non sur le RBD. Cette interaction avec le mitoribosome est toujours présente même en l'absence d'Oxa1a. Le phénotype d'une plante mutante exprimant une protéine Oxa1a dépourvue de RBD apporterait de nombreuses informations quant à la nature des interactions entre Oxa1a et le ribosome mitochondrial.

Ainsi la lignée mutante obtenue par CRISPR-cas9 à l'aide de l'ARN guide 2 dont il manque la plus grande partie du RBD peut nous apporter les mêmes informations que les expériences de complémentation.

L'obtention des mutants CRISPR-cas9 a été plus ardue qu'attendue : après l'agrotransformation des plantes et la récolte des graines des plantes transformées, j'ai criblé les graines transformées à l'aide de la GFP. La quantité de graines transformées après floral dip était plus faible que celle attendue, et parmi les graines transformées aucune graine testée n'a obtenu de mutation lors de la première génération de plante, alors que l'on s'attendait à obtenir une mutation sur 5% des graines transformées. Lors de la formation des graines de la seconde génération, les plantes ont été soumises à une température supérieure pour favoriser l'activité de la protéine cas9. En effet, cette dernière est plus efficace à des températures plus hautes, atteignant un pic d'efficacité à 37°C pendant 24h (Blomme et al., 2022). Malheureusement je ne pouvais pas soumettre mes plantes à de telles températures

sur de longues périodes, j'ai donc cultivé mes plantes d'Arabidopsis à 26°C après floraison. Malgré le passage à la seconde génération, un nouveau criblage des graines GFP et l'amélioration de l'efficacité de la protéine cas9, seulement 3% des graines criblées (soit 6 plantes sur 192) possédaient une mutation hétérozygote du gène. Parmi ces 6 différentes lignées mutantes indépendantes, on retrouve des insertions de 1 ou deux nucléotides dans la séquence, et aucune délétion conséquente. On retrouve même plusieurs fois les mêmes mutations dans deux lignées distinctes. Cette ressemblance des mutations obtenues avec le même ARN guide a déjà été observée sur des mutations induites pour d'autres protéines, et semble dépendre de l'ARN guide choisit et de l'environnement génomique, favorisant certaines mutations lors de la réparation de la cassure double brin induite par la protéine cas9.

Stabilité du domaine de liaison au ribosome d'Oxa1a

L'optimisation de la production de la protéine Oxa1a-RBD a permis d'obtenir une quantité suffisante de protéines solubles et a priori fonctionnelle, mais des dégradations de la protéine ont néanmoins toujours été observées. Comme déjà abordé dans la section décrivant les résultats, seulement 80% au maximum des protéines après purification sont intactes. Même avec les conditions de production et de purifications que j'ai utilisées, la qualité de la protéine varie beaucoup entre les préparations de protéines, oscillant entre 60 et 80% de protéine intacte, en utilisant des conditions expérimentales identiques. Cette variation dans la qualité peut être due à l'étape de lyse, qui semble être l'étape critique pour préserver l'intégrité de la protéine. Une première hypothèse est que la lyse de la bactérie libère une protéase dans le tampon de lyse capable de dégrader le RBD peu structuré qui dépasse de la protéine 6His-GST-Oxa1aRBD, ne laissant que la GST intacte. Cette protéase semble ne pas être inhibée par les cocktails d'inhibiteurs classiques utilisés ici. Une fois que la protéine est purifiée, elle semble stable dans le temps, son état de dégradation ne change pratiquement pas même après deux semaines de conservation au froid. La protéase potentielle serait donc perdue lors des étapes de purifications qui suivent la lyse des bactéries. Une seconde hypothèse est qu'une lyse trop violente fragmente de manière mécanique le domaine RBD d'Oxa1a. Il est possible que sans le reste de la protéine Oxa1a le RBD soit instable. Cette instabilité du RBD a également été observée lorsqu'il est exprimé sans le reste de la protéine Oxa1a chez *N. benthamiana* lors des expériences de co-expression transitoire de protéines étiquetées. En

effet, même si on n'observe pas le même profil de dégradation, la protéine composée uniquement du RBD d'Oxa1a étiquetée myc semble être extrêmement instable. Pour des raisons encore inconnues, la protéine semblait ne pas être exprimée dans certaines plantes, mais il est possible que son absence soit due à sa dégradation. Une plus petite protéine de 12 kDa comparé aux 37 kDa de la protéine 6His-GST-Oxa1aRBD et les 49 kDa d'Oxa1a entière pourrait être moins stable, de plus elle possède de nombreuses lysines et arginines chargés positivement. Sans la présence d'une étiquette d'un plus haut poids moléculaire pour stabiliser la structure de la protéine comme la GST, il est aussi possible que le RBD ne se replie pas correctement. A première vue, le RBD ne semble pas posséder de structure facilement prédictible si l'on utilise des outils informatiques de prédiction de structure comme Alphafold. Or une structure de type « coiled-coil » est observée dans le cas de l'humain. Il en va de même pour le segment de la protéine Oxa1L entre le 2^{ème} et 3^{ème} domaine transmembranaire, qui interagit avec des substrats d'Oxa1L et potentiellement avec mL45 chez l'Homme. Chez la levure, bien qu'il n'ait pas été observé par microscopie, un domaine « coiled-coil » est prédit dans le RBD grâce aux outils bio-informatiques. Chez la plante, la prédiction de domaines « coiled-coil » à l'aide des logiciels les plus récents, en particulier PCOILS et Alphafold, donne de faibles probabilités pour le RBD (entre 30 et 40%) d'en contenir un contrairement à l'Homme et la levure où les probabilités sont plus élevées. Cependant une structure « coiled-coil » est suggérée dans le RBD avec une probabilité non nulle (Fig. 33). Selon l'outil utilisé, on peut aussi remarquer que les probabilités des prédictions sont plus faibles chez l'Homme que chez la levure, alors que la structure en « coiled-coil » a été observée par cryo-EM, suggérant que les outils de prédictions ne sont pas encore assez efficaces pour déterminer la présence de ces structures à partir de la simple séquence de la protéine. Même si la séquence du domaine RBD est faiblement conservé celui de Oxa1a chez les plantes pourrait lui aussi être structuré comme ceux de la levure et les mammifères.

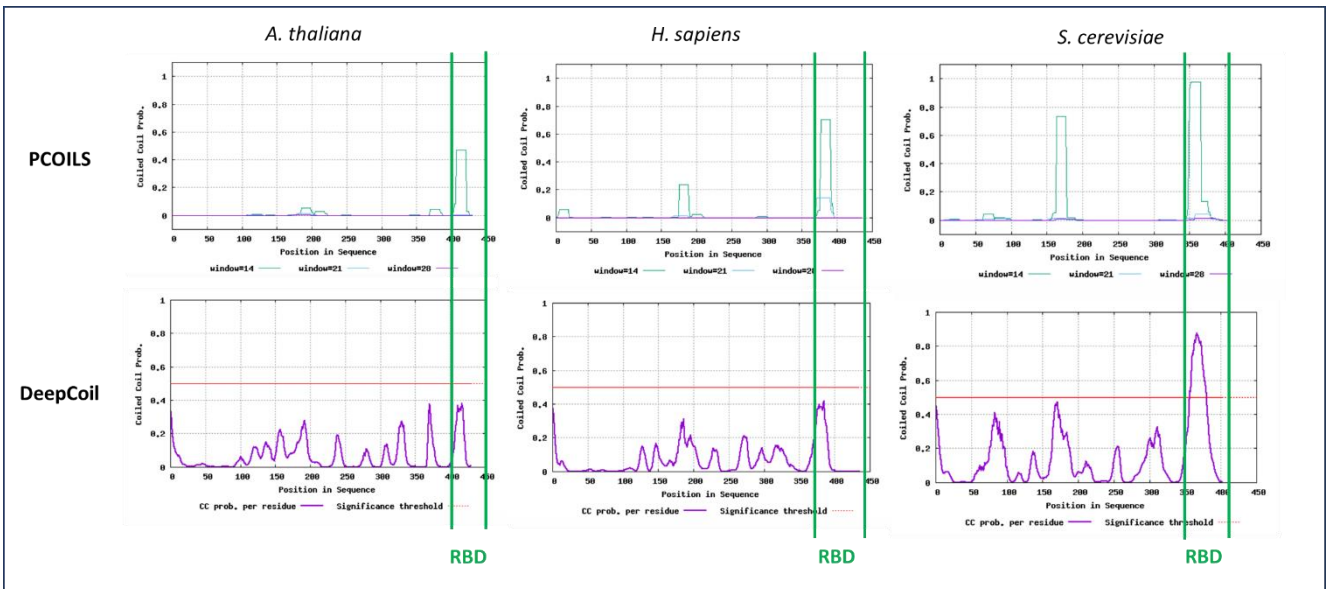


Figure 33: Prédiction de domaines structuraux coiled-coil pour Oxa1.

Prédiction de la présence de domaines structuraux coiled-coil à l'aide des logiciels de prédiction PCOILS et DeepCoil pour les protéines Oxa1a chez Arabidopsis, Oxa1L chez l'Homme et Oxa1 chez Saccharomyces. Le RBD est compris entre deux barres vertes sur la séquence. La prédiction de domaine donne une faible probabilité de domaine coiled-coil chez Arabidopsis contrairement à chez la levure, mais la probabilité n'est pas nulle. On peut remarquer que la probabilité est plus faible pour Oxa1L chez l'Homme, bien que la structure ait été observée par cryo-EM.

Résultat des expériences de Co-IP et choix de protéines candidates qui pourraient interagir directement avec Oxa1a-RBD

Les co-immunoprécipitations anti-GST, utilisant des extraits de mitochondries de chou-fleur lysés ainsi que la protéine 6His-GST-Oxa1aRBD comme appât, enrichissent un nombre élevé de protéine au-dessus du seuil de significativité. Afin de pouvoir diminuer le nombre d'interactants avec l'insertase et de candidats potentiels pour l'interaction entre le RBD d'Oxa1a et le mitoribosome, il aurait été intéressant d'identifier des conditions d'immunoprécipitation dans plus dissociatives sans toutefois abolir toute forme d'interaction avec le RBD. En effet, des conditions plus stringentes ont été testés, mais aucune protéine n'a été enrichie après immunoprécipitation. J'ai réalisé une expérience de « cross-linking » *in vitro* à l'aide d'un crosslinker chimique (Formaldéhyde), formant une liaison covalente entre les acides aminés des protéines comme les lysines, afin de figer l'interaction avec le mitoribosome et n'obtenir que les protéines aux alentours du RBD après un lavage stringeant, mais aucune protéine enrichie n'en est ressortie. Il serait intéressant d'optimiser le protocole de cross-link afin de lier uniquement les protéines de la LSU du mitoribosome directement à proximité du RBD d'Oxa1a, en utilisant un crosslinker plus spécifique des interactions protéines-protéines, comme par exemple le Disuccinimidyl tartrate (DST). Le Formaldéhyde n'est pas le meilleur crosslinker pour des études d'interaction protéine-protéine, car il permet aussi un crosslink protéine-ADN. En effet, bien qu'il possède une distance de crosslink courte (entre 2,3 et 2,7 Å), il peut rapidement former un réseau d'interaction complexe avec de nombreuses protéines et acides nucléiques, ce qui piège les protéines d'intérêt et empêche leur co-immunoprécipitation. L'autre optimisation à réaliser est le temps d'incubation avec le crosslinker. En effet, plus le crosslinker est appliqué longtemps plus le nombre de liaison covalente entre protéines augmente. Son utilisation sur des temps plus court permettra de réduire le nombre de crosslink protéine-protéine et de ne récupérer que les protéines très proches les unes des autre. Ainsi la protéine faisant office de point d'accroche du mitoribosome serait une des plus enrichies dans les immunoprécipitations, mais il faudra utiliser plus de matériel biologique pour détecter les événements de crosslink. L'enrichissement d'une protéine dans les conditions d'immunoprécipitation normale sans

crosslink ne permet pas de déduire sa proximité avec le RBD d'Oxa1a ou la force de l'interaction. En effet, les protéines enrichies proviennent ici d'un complexe de grande taille comme le mitoribosome, et non de protéines individuelles. L'interaction d'Oxa1a avec une de ces protéines lors de l'immunoprécipitation précipite à priori le complexe entier. Toutefois, nous d'observons une différence entre les enrichissements des protéines des deux sous-unités du mitoribosome. En effet, on trouve plus de spectres pour les protéines de la LSU, la sous-unité interagissant avec le RBD d'Oxa1a, car les extraits utilisés contiennent non seulement des ribosomes entiers mais aussi des sous-unités dissociées. De même, un enrichissement particulier de certaines protéines peut donner des indices quant à la nature des protéines en interaction directe avec le RBD, car les extraits contiennent également des protéines ribosomiques dissociées ainsi que des ribosomes en cours d'assemblage ou de dégradation. D'autres facteurs affectent le nombre de spectres obtenus pour une protéine donnée, comme sa séquence. Certaines protéines forment plus de peptides après la digestion trypsique, ainsi pour le même nombre de protéines immunoprécipitées certaines protéines formeront plus de spectres et apparaîtront comme plus enrichies. C'est le cas par exemple des protéines rPPR qui sont en moyenne plus longues que les autres protéines ribosomiques. Avec leurs répétitions de motifs, elles forment de nombreux peptides semi-trypsique, ce qui explique en partie le fait que plusieurs protéines rPPR sont identifiées dans le haut de la liste des protéine enrichies après co-IP, même celles faisant partie de la SSU comme PPR6 et PPR2. On peut d'ailleurs remarquer que les rPPR les plus enrichies et dont l'enrichissement est le plus statistiquement significatif sont celles qui possèdent le plus de répétitions et sont les plus longues (pour la LSU PPR5 avec ses 19 répétitions et pour la SSU PPR2 et ses 18 répétitions). En prenant toutes ces informations en compte, cela explique pourquoi il est difficile de prédire avec certitude quelles protéines candidates pourraient être en interaction directe avec le RBD d'Oxa1a à partir de ces seules expériences d'immuno-précipitation.

Lors de la détermination de la composition et de la structure du mitoribosome de plante, le Dr Florent Waltz a émis l'hypothèse que la protéine issue du gène At5g27395 pourrait interagir avec Oxa1a. En effet, des analyses de similarité de séquence avaient révélé que cette protéine reliée à TIM-44 possède des similarités avec la protéine mL45 chez l'Homme. Cette protéine n'est cependant pas du tout détectée dans les co-immunoprécipitations avec Oxa1a RBD. Il est donc certain qu'elle ne doit pas interagir avec Oxa1a par l'intermédiaire de son RBD. Il

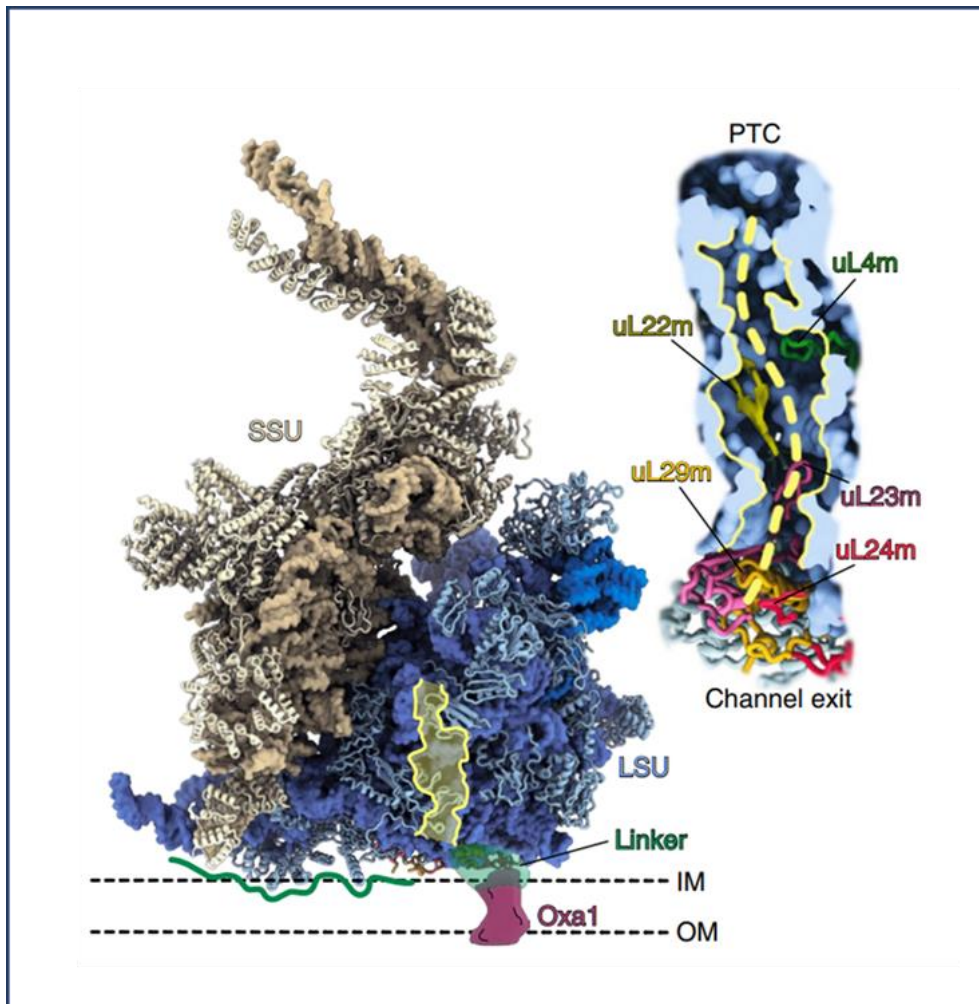


Figure 34 : Site de contact potentiel entre le ribosome mitochondrial de plante et la membrane interne mitochondriale.

Structure haute résolution du mitoribosome de plante orienté de façon à présenter la sortie du canal de sortie du peptide vers la membrane interne. La figure illustre l'architecture du tunnel du peptide du mitoribosome et représente en vert les points de contact potentiels entre Oxa1a et le ribosome, ainsi que la surface de la LSU qui pourrait reposer sur la membrane interne mitochondriale. Figure extraite de (Waltz et al. 2020).

reste cependant possible que cette protéine interagisse via une autre partie de la protéine Oxa1a.

Les immunoprécipitations effectuées sur des mitoribosomes purifiés m'ont permis de conclure qu'il est probable qu'aucune protéine intermédiaire ne médie la liaison entre le RBD d'Oxa1a et le mitoribosome. En effet, aucune protéine de fonction inconnue n'est retrouvée dans ces IPs. Même si le site de contact entre le ribosome et Oxa1a reste incertain sans les reconstructions tridimensionnelles de cryo-EM et de cryo-ET en cours d'analyse. La structure même du mitoribosome indique qu'il serait possible que plusieurs protéines puissent être à l'origine de l'interaction entre la LSU et la membrane interne de la mitochondrie. En effet, comme observé par Waltz et al. en 2020, on peut remarquer sur la structure de la LSU que lorsqu'on oriente le canal de sortie du peptide vers la membrane interne, la surface de la LSU forme un plan dans l'alignement de la membrane interne (Fig. 34). Ainsi, il est imaginable que le mitoribosome puisse reposer sur la membrane sur ce plan. On peut donc imaginer que l'interaction avec le RBD soit médiée par l'une ou plusieurs des protéines constituant cette surface, par exemple les protéines rPPR9 et rPPR4. L'hypothèse la plus probable reste toutefois que l'interaction se fasse au niveau des protéines entourant le canal de sortie du peptide comme observé chez d'autres organismes. Chez la levure et chez l'Homme, uL24m semble interagir avec le RBD en plus de la protéine Mba1 ou mL45. Si on regarde le site de fixation à la membrane du mitoribosome humain, trois zones de contacts sont décrites : une première à l'extrémité C-terminale du RBD avec les protéines uL29m et bL28m et une hélice de l'ARNr, mais cette extrémité n'est présente que chez les vertébrés (Fig. 35). Une deuxième zone de contact existe entre la protéine mL45 et le corps de la protéine Oxa1L. Cette interaction existe peut-être aussi chez les plantes, mais les résultats de tomographie nous donneront plus de détails. Enfin un troisième site de contact se situe au milieu du RBD d'Oxa1L, avec la protéine uL24m. La séquence de ce site de contact existe également chez les plantes, et on peut observer quelques acides aminés conservés entre le RBD d'Oxa1a de plante et le RBD d'Oxa1L humain, même si la séquence n'est pas très conservée (Fig. 35). On observe aussi peu de similarités de séquence pour uL24m humain et de plante, mais une interaction reste toujours possible. Les expériences de microscopie en cours devraient permettre d'apporter des réponses à ces questions.

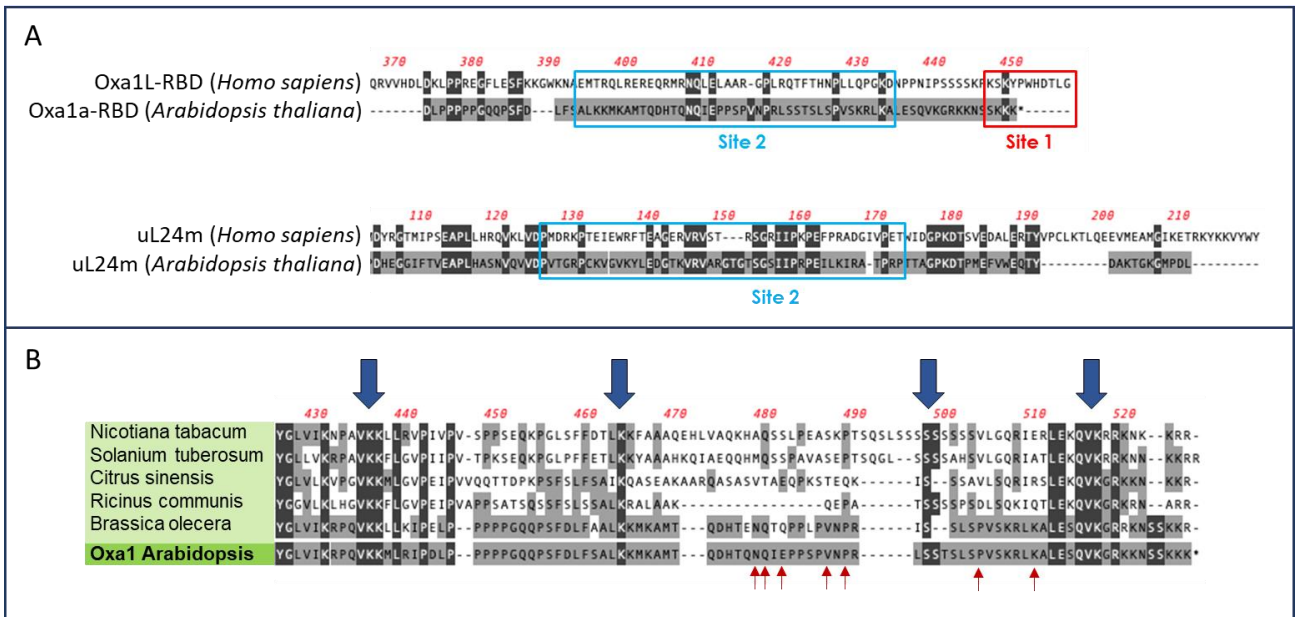


Figure 35 : Comparaison des séquences protéiques des RBD d'Oxa1a et d'Oxa1L et des protéines uL24m chez Arabidopsis et chez l'Homme.

A. Alignement des séquences protéiques du domaine RBD d'Oxa1a et d'Oxa1L et des protéines uL24m chez ces deux organismes. Les sites de contact entre Oxa1L et uL24m observés par cryo-EM chez l'Homme sont indiqués par des rectangles bleu clair (Site 2) et rouge (Site 1). On peut remarquer que l'extrémité C-terminale d'Oxa1L n'existe pas chez Oxa1a. Quelques similarités sont retrouvées au niveau du site 2.

B. Alignement des séquences des RBD d'Oxa1 chez différentes plantes terrestres. Les zones de similarités sont indiquées par des flèches pleines bleu foncé. Les flèches rouges indiquent les acides aminés conservés entre l'Homme et Arabidopsis observés au niveau du site 2 en **A**. On observe peu de conservation de ces résidus parmi les différentes séquences alignées.

Perspectives à court terme

A ce stade, les données obtenues ne permettent pas d'obtenir des conclusions définitives quant au mode de liaison du mitoribosome de plante à la membrane mitochondriale. Pour y remédier, dans un premier temps, les données collectées en cryo-microscopie électronique et de tomographie devraient nous donner une image plus précise du site de contact entre le mitoribosome et la membrane interne ainsi que les protéines du ribosome mitochondrial impliquées dans l'interaction avec Oxa1a. A partir de ces résultats, il sera alors intéressant de confirmer l'interaction directe entre Oxa1a et les protéines identifiées par une autre approche, par exemple des méthodes génétiques dans la levure, des immunoprécipitations réciproques avec chacune des protéines et le RBD d'Oxa1a, ou encore des méthodes biochimiques ou biophysiques comme la résonance plasmonique de surface ou la micro-calorimétrie qui sont disponibles dans notre institut. Par ailleurs, les mutants obtenus par CRISPR-cas9 vont nous permettre de valider *in vivo* les interactions observées *in vitro* à l'aide des constructions déjà prêtes pour des expériences de complémentation et d'immunoprécipitation. Selon le phénotype des plantes mutées manquant le RBD d'Oxa1a, des expériences de profilage des ribosomes pourraient apporter des informations sur l'impact de la perte de l'attachement à la membrane sur la traduction mitochondriale dans son ensemble.

Perspectives à long terme

Sur le plus long terme, ces études très descriptives peuvent conduire à des questions plus fonctionnelles sur le mécanisme de traduction des protéines et d'insertion dans la membrane de façon concomitante. En effet, les informations acquises sur la proportion de mitoribosomes libres/attachés à la membrane interne des mitochondries chez la plante à l'aide de la cryo microscopie et les études sur le caractère essentiel ou non du RBD d'Oxa1a peuvent être comparées aux observations chez d'autres organismes. Bien que les protéines impliquées diffèrent grandement, le mécanisme d'attachement à la membrane a été conservé au cours de l'évolution et il semble qu'il y ait des caractéristiques communes entre les mécanismes d'attachement à l'insertase Oxa1, comme la localisation du point d'attache près du canal de sortie du peptide, qui interagit avec les protéines ribosomiques uL23m et uL24m, l'orientation

du canal par rapport à la membrane interne, et l'interaction avec l'extrémité C-terminale d'Oxa1 malgré un degré de conservation de séquence très faible. Il serait intéressant de comprendre quelles sont les caractéristiques primordiales de l'interaction du mitoribosome avec la membrane interne communes entre les organismes malgré leurs spécificités. On pourrait ainsi étudier l'utilité du deuxième point de contact avec la membrane observé chez la levure et chez *Chlamydomonas*, que l'on suppose permettre de stabiliser l'interaction, mais que l'on ne retrouve pourtant pas chez d'autres organismes, suggérant que cette stabilisation n'est pas nécessaire au bon fonctionnement du mitoribosome. Cependant, il est intéressant de noter que ce deuxième site de contact avec la membrane est médié par une hélice d'ARNr pour la levure et par une protéine chez *Chlamydomonas*, ce qui met en lumière soit une convergence évolutive des deux mécanismes, soit une conservation du second point de contact mais dont la nature a été modifiée. Dans les deux cas, cela indiquerait que ce site de contact membranaire pourrait jouer un rôle important encore inconnu. Les expériences de profilage des ribosomes sur les plantes CRISPR-cas9 nous apprendront si la perte du RBD affecte toute la traduction mitochondriale dans son ensemble ou si certains gènes mitochondriaux sont plus touchés par cette perte que d'autres. En effet comme abordé brièvement en introduction, il existe chez *Arabidopsis* 8 protéines hydrophiles exprimées par le génome mitochondrial qui ne nécessiteraient pas un attachement à la membrane pour être correctement traduites. Ainsi les protéines ribosomiques solubles sont peut-être moins affectées que les protéines des complexes respiratoires par l'impossibilité d'ancrer le mitoribosome à la membrane.

Conclusion générale

Tous les ribosomes des mitochondries des différents organismes étudiés jusqu'à maintenant semblent dans une certaine mesure être attachés à la membrane interne via les insertases principale de ces organismes respectifs. Le mécanisme exact associé, bien que ressemblant, est différent d'un organisme à l'autre. Les protéines impliquées et le nombre de points de contact avec la membrane varient, mais tous semblent converger vers un mécanisme à un ou deux sites de contact, dont un médié par le RBD de l'insertase Oxa1. Cependant, pour certains organismes comme *Trypanosoma* ou *Arabidopsis*, une portion des protéines mitochondriales traduites sont solubles et il est possible qu'une partie des mitoribosomes soient libres dans la

matrice. Le mécanisme d'attachement à l'insertase semble aussi très différent, aucun homologue des protéines déjà identifiées chez la levure ou chez l'Homme n'est retrouvé dans ces organismes.

L'ensemble de mes travaux vont permettre une meilleure compréhension de l'interaction entre le ribosome mitochondrial de plante et la membrane interne de la mitochondrie. Ce rapprochement est important pour l'insertion concomitante des protéines membranaires néosynthétisées dans la membrane interne via l'insertase mitochondriale Oxa1a. J'ai montré qu'il existe comme chez d'autres organismes eucaryotes une fixation du mitoribosome au niveau du domaine de liaison au ribosome (RBD) de l'insertase Oxa1a dans des mitochondries de chou-fleur. Cette interaction semble intervenir directement entre ce domaine et une protéine faisant partie intégrante du mitoribosome. Les premières images de cryo-tomographie nous montrent clairement des mitoribosomes attachés à la membrane interne des mitochondries, et les reconstructions tridimensionnelles vont permettre d'élucider le mécanisme d'interaction et d'obtenir une image globale de la distribution des mitoribosomes dans les mitochondries de plantes terrestres. De manière générale, ce travail contribue à mettre en évidence la diversité des processus de traduction chez les eucaryotes.

Matériel et Méthodes

Matériel biologique

Lignées de plantes

Des plantes de lignée Col-0 d'*Arabidopsis thaliana* ont été obtenues du centre de stockage de l'INRA de Versailles. Les plantes ont été cultivées sur du terreau avec une exposition à la lumière correspondant à de longues journées (16h de lumière et 8h d'obscurité).

Des plantes mutantes ont été obtenues à partir de lignées d'insertion de T-DNA, provenant de collections SALK T-DNA et SALKseq T-DNA (O'Malley et coll., 2015).

Pour tous les mutants, les amorces de géotypage étaient conçues à l'aide du logiciel T-DNA Primer Design disponible sur le site Web de SIGnAL

(<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

Souches bactériennes

Escherichia coli

Top10 : Des cellules TOP10 thermo-compétentes ont été couramment utilisées pour l'amplification des plasmides. La souche est caractérisée par des mutations du gène *endA1*, inactivant l'activité des endonucléases intracellulaires, et du gène *recA* éliminant la recombinaison homologue, de façon à augmenter la quantité d'ADN plasmidique produit.

Génotype : *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galk rpsL (StrR) endA1 nupG*

DB3.1 : Cette souche est une souche dérivée de la souche HB101, contenant l'allèle *gyrA462* qui confère à la souche la résistance aux effets toxiques du gène *ccdB*. Elle est donc utilisée pour la propagation des vecteurs d'entrée Gateway et des vecteurs de destination.

Génotype : *gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 glnV44 (=supE44) ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl5 leuB6 mtI1*

Rosetta2 (DE3) pLysS : La souche Rosetta2 est dérivée de la souche BL21, et est conçue pour améliorer l'expression des protéines eucaryotes. En effet elle fournit sept gènes d'ARNt correspondant à des codons rares dans *E.coli* (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, CGG) sur un plasmide comportant une résistance au chloramphénicol.

Génotype : *F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (CamR)*

NiCo21 (DE3) : Cette souche dérivée de la souche BL21 et a été conçue pour minimiser la contamination par les protéines de *E. coli* lors des purifications des protéines étiquetées 6-His à l'aide de résine « immobilized metal affinity chromatography » (IMAC). Le gène *GlmS* est muté pour éliminer la liaison de la protéine bactérienne aux résines IMAC et trois autres protéines (*SlyD*, *ArnA* et *Can*) sont étiquetées pour permettre une élimination rapide par chromatographie d'affinité de la chitine. De plus deux protéases, *Lon* et *OmpT*, sont absentes de cette souche.

Génotype : *can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*

Agrobacterium tumefaciens

GV3101 (pMP90) : est un dérivé de la souche C58 résistante à la rifampicine, possédant le plasmide pTiC58 Ti conférant la résistance à la gentamycine. Ce plasmide a les séquences de la région de l'ADN-T supprimées, et la transformation avec un vecteur binaire contenant la région T manquante donne un système binaire fonctionnel d'ADN-T qui permet le transfert du matériel génétique dans le génome S d'une plante hôte. La souche est donc avirulente sans l'ajout d'un vecteur binaire. La souche est cultivée sous Gentamycine et Rifampicine, et un troisième antibiotique est utilisé pour le vecteur binaire (Holsters et al., 1980).

Plasmides

pDONR207 : Plasmide d'entrée Gateway® possédant les sites attP1 et attP2, une résistance à la Gentamycine et le gène *ccdB*.

pHGGWA : Plasmide de destination Gateway® possédant les sites attR1 et attR2, utilisé pour la production d'une protéine dans *E. coli*, sous promoteur T7 et portant une étiquette 6His-GST en N-terminal. Une résistance Ampiciline permet la sélection dans la bactérie.

pGWB14 : Plasmide de destination Gateway® possédant les sites attR1 et attR2, utilisé pour les transformations de plantes par *Agrobacterium tumefaciens*. Il possède une résistance Spectinomycine dans la bactérie, et une résistance Kanamycine et Hygromycine dans la plante. Il permet de cloner un gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur 35S avec la fusion d'une étiquette 3xHA en C-terminal de la protéine.

pGWB17 : Plasmide de destination Gateway® de la même série que PGWB14, mais permet le clonage d'un gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur 35S avec la fusion d'une étiquette 4xmyc en C-terminal de la protéine.

pB7FWG2 : Plasmide de destination Gateway® possédant les sites attR1 et attR2, utilisé pour les transformations de plantes par *Agrobacterium tumefaciens*. Il possède une résistance Spectinomycine dans la bactérie, et une résistance basta dans la plante. Il permet de cloner un gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur 35S avec la fusion d'une étiquette GFP en C-terminal de la protéine.

pUDP2 : vecteur d'entrée pour créer des modules GoldenBraid®, possède des sites d'enzyme de restriction BsmBI, la ligation avec un produit PCR possédant les bonnes séquences à ses extrémités forme des sites d'enzyme de restriction BsaI. Il possède une résistance au Chloramphenicol.

Amorces et oligonucléotides

Référence	Séquence	Numéro d'accension
Génotypage		
FLAG RB4	TCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGAC	T-DNA Flag
FLAG LB4	CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT	
Oxa1 SALK_025 RP	GCATGTCCACTCAGCTTTAGC	At5g62050
Oxa1 SALK_025 LP	AACAGGTTGGATGTGATCCAG	
RP SLK135 Oxa1	TTGCCGGTTATAACAGGATTG	
LP SLK135 Oxa1	TGGTCTTCTCAACCTGTTGC	
RP SLK020 Oxa1	GCATGTCCACTCAGCTTTAGC	
LP SLK020 Oxa1	GGCAGATCAGGTATGCGTAAC	
mtlF3 SALK_110 RP	GATGCACTTGTGGAATCTTGG	
mtlF3 SALK_110 LP	TGGTTGTGACCAAACAAAATATGAA	
mtlF2 FLAG_391 RP	TATGAAATTTGCAGGGCATTCT	At4g11160
mtlF2 FLAG_391 LP	ATCGCATTATTGATCGCAAC	
Clonages Oxa1a		
Oxa1a Fw Promo	CCCAAAGACGAAAACGTGATTGAAT	At5g62050
promo Oxa1 Rv	GCTTCTATCGTTATATGTCA	
Oxa1a Fw AUG	AGATTCTGCAATGGCTTTCAGGC	
Oxa1a Rv STOP	GCACCGTTTTAAATCACTTCTTCTTG	
Oxa1a Rv 3'UTR	TCAGTGAGAAAATTCTGTGTTTAC	
OXA1 TEV Rv	AGAAAGCTGGGTAAGATTGGAAGTAAAGGTTTTCTTCT	
OXA1 TEV Rv	AGAAAGCTGGGTACGCTTGGAAAGTACAGGTTTTCTTCT	
OXA1 ΔRBD Rv	AGAAAGCTGGGTTTTAACGCTTATCACTGTCATT	
HA Oxa1 Fw	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCAGTGCACCTGGT	
Oxa1:endo:TEV Fw	AAAAAGCAGGCTCCGCTTGGAAAGTACAGGTTTTCATG	
Oxa1:endo:STOP Rv	AGAAAGCTGGGTTACTCTTCTTCTTGCTGCTATTCTTC	
Fw Endo:Oxa1:X	AAAAAGCAGGCTTACCCTAGAGATTTGATTATATGGAAC	
Rv 35S:Oxa1:Tag	AGAAAGCTGGGTACTTCTTCTTGCTGCTATTCTTC	
Fw 35S:Oxa1:Tag	AAAAAGCAGGCTTACAATGGCTTTCAGGCAAACCTTT	
Rv Oxa1 RBD Cloning STOP	AGAAAGCTGGGTTTCACTTCTTCTTGCTGCTATTCT	
Fw Oxa1 RBD Cloning	AAAAAGCAGGCTTACAAGTGAAGAAGATGTTACGCATA	
Clonage mtlF2/mtlF3		
mtlF3 STOP Rv	GTTGTTTTACTTCGTTTTTGGGGTG	At1g34360
mtlF3 AUG Fw	GATTGGGTTCTATGGCTATATGGCG	
mtlF3 Promo Fw	ATTGGGGTAAGTTTGGAAAGAACTAAC	
mtlF3:endo:promo Fw	AAAAAGCAGGCTTAGCGAGACACCACATGAGT	
IF3 AttB1 v2 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGATTTG	
mtlF3 AttB2 Rv	GGGGACCACCTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCGTTT	
AUG:endo:mtlF3 Fw	AAAAAGCAGGCTTAATGGCTATATGGCGTATAATC	
mtlF3 TEV Rev	AGAAAGCTGGGTAAGATTGGAAGTAAAGGTTTTCTTCT	
Rv Endo:mtlF3:X	AGAAAGCTGGGTACTTCTGTTTTGGGGTGC	
Fw Endo:mtlF3:X	AAAAAGCAGGCTTAAAGTTTGGAAAGAACTAACCC	
mtlF2 STOP Rv	GCTCTCTCAGCATTCAATTCACAG	At4g11160
mtlF2 AUG Fw	TGACATATGAATGACGTCGAGGCAC	
mtlF2 Promo Fw	AGGTTAGCAATTTATCCAACACGATCC	
mtlF2:endo:promo Fw	AAAAAGCAGGCTTAATTAATGTAATCGTGTCCGATGG	
IF2 AttB1 v2 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGGAGATT	
mtlF2 AttB2 Rv	GGGGACCACCTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCATTCAA	
mtlF2 TEV Rev	AGAAAGCTGGGTAAGATTGGAAGTAAAGGTTTTCTGCA	
Fw Endo:mtlF2:X	AAAAAGCAGGCTTACCAACACGATCCTGAAAATC	
Rv Endo:mtlF2:X	AGAAAGCTGGGTAGCATTCAATTCACAGCTC	

CRISPR-cas9		
CRISPR oxa1 g2 Fw	CCATGACACAGGACCATACAC	At5g62050
CRISPR oxa1 g2 Rv	ACTAACAGGACTCAGCGATGT	
CRISPR oxa1 g1 Fw	ACATTGCAGAAAGTCATAACCGA	
CRISPR oxa1 g1 Rv	CAAAGCCTGTGAATGTATGCA	
Clonage candidats interaction directe		
uL22m AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTGAGACC	At1g52370
uL22m AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGCAGC	
uL22m STOP Rv	TTAGTGAGACGGTACCAACTCA	
uL22m AUG Fw	ATGGCGGGTTGGCAGA	
uL4m AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTACGGTTAA	At2g20060
uL4m AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGCTCT	
uL4m STOP Rv	TCAACGGTTAATAGGAGTGT	
uL4m AUG Fw	ATGGCTGCTCAATTTCAAG	
Oxa1a AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACTTCT	At5g62050
Oxa1a AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACAAGTGA	
SBA1 AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTTGAATC	At3g03060
SBA1 AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTCTA	
SBA1 STOP Rv	TCATTTTGAATCGACTCCAGC	
SBA1 AUG Fw	ATGGCTCAGAAATGTGCGAT	
SBA2 AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTTCTTCT	At5g16930
SBA2 AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAATA	
SBA2 STOP Rv	TCATTTCTTCTTGTACCTGCA	
SBA2 AUG Fw	ATGGCTCAGAAAATTGCGAT	
At3g13150 AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATCGTCCA	At3g13150
At3g13150 AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGCAAG	
At3g13150 STOP Rv	TTAATCGTCCAACAACCCAG	
At3g13150 AUG Fw	ATGAGCAAGGTAGGCTCGTC	
At1g02370 AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGGGACAA	At1g02370
At1g02370 AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGTAT	
At1g02370 STOP Rv	TTAGGGACAAACTGTTTTAAGC	
At1g02370 AUG Fw	ATGAATTTCCGTAATCTGATTG	
rPPR5 AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAGAGAAA	At2g37230
rPPR5 AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGACCA	
rPPR5 STOP Rv	CTATAGAGAAAACATTGTTTTGTTT	
rPPR5 AUG Fw	ATGGCTTTCATTTCCAGATC	
rPPR9 AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACTTCC	At5g60960
rPPR9 AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTCTG	
rPPR9 STOP Rv	AAGGAAAGAACAAGACAATAAT	
rPPR9 AUG Fw	CCCTTCTCTACTAACTCTCTA	
rPPR4 AttB2 Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACATCCT	At1g60770
rPPR4 AttB1 Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGCTCT	
rPPR4 STOP Rv	TCACACATCCTGAGATACTT	
rPPR4 AUG Fw	ATGGCGATGCGACATT	
Séquençage		
myc Tag Fw	GAAACTGATCTGTGAAGATCTG	myc Tag
AttB2 seq	TTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Gateway
AttB1 seq	GTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	
pGWB14 Fw	CTCAGAAGACCAAAGGGCAAT	pGWB14
Tag HA Rv	TCAGGAACATCGTATGGGTAA	
Seq OXA1 Fw	TCCCAGTACAAATGAGTTT	At5g62050
Seq OXA1 ΔRBD Rv	AGGACGCTTTATCACTGTCTT	
Adapter attB2	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Gateway
Adapter attB1	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	
CRISPR seq g2 Rv	ATTCTGTGTTCACTTTTCTGACTCAA	At5g62050
CRISPR seq g2 Fw	AAGATGTTACGCATACCTGATCTG	
CRISPR seq g1 Rv	TCCAGATGAGGTTTTTCTGACTTTTT	
CRISPR seq g1 Fw	TGGTGTGGTTCAGAGAAGATTGG	

Anticorps

Primaires

L'anticorps produit chez la souris contre le peptide HA, permettant de détecter les protéines étiquetées HA, a été obtenu auprès du fournisseur Sigma-Aldrich et utilisé à une dilution de 1/10 000^{ème}.

L'anticorps produit chez la souris contre le peptide 6-His, permettant de détecter les protéines étiquetées 6-His, a été obtenu auprès du fournisseur Sigma-Aldrich et utilisé à une dilution de 1/5 000^{ème}.

L'anticorps produit chez la souris contre la Glutathion-S-transférase (GST), permettant de détecter les protéines étiquetées GST, a été obtenu auprès du fournisseur Sigma-Aldrich et utilisé à une dilution de 1/10 000^{ème}.

L'anticorps produit chez le lapin, déjà présent dans le laboratoire, contre la partie C-terminale de Oxa1a d'Arabidopsis, a été utilisé à une dilution de 1/10 000^{ème} (Sakamoto et al., 2000).

Secondaires

Des anticorps de mouton anti-lapin ou de mouton anti-souris couplé à la horseradish (Raifort) peroxidase (Amersham, Grande Bretagne) ont été utilisés, en fonction de l'anticorps primaire, comme anticorps secondaire à une dilution de 1/10 000^{ème}. La luminescence a été induite à l'aide de réactifs chimio-luminescents (Amersham, Grande Bretagne).

Méthodes

Méthodes d'analyse des acides nucléiques

Clonage GATEWAY

La technologie Gateway[®] est une méthode de clonage universelle basée sur des propriétés de recombinaison site-spécifique du bactériophage lambda. Tout d'abord la séquence d'ADN d'intérêt est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiquement désigné possédant les sites attB1 et attB2 respectivement en 5' et 3' de la séquence du gène d'intérêt. Une fois les sites ajoutés, la première réaction Gateway[®] est réalisée à l'aide de l'enzyme BP Clonase[®] II

(ThermoFisher). Cette réaction permet la recombinaison entre les attB du produit PCR et les attP d'un vecteur d'entrée. Le clone d'entrée obtenu possède le gène d'intérêt flanqué de sites attL. Ce clone peut ensuite être utilisé pour la seconde réaction à l'aide de l'enzyme LR Clonase® II permettant la recombinaison entre les attL du vecteur d'entrée et les attR d'un vecteur de destination. Lors de mon étude, le seul vecteur d'entrée utilisé est pDONR207.

Clonage GoldenBraid

La technologie GoldenBraid® est une méthode de clonage basée sur l'utilisation d'enzymes de restriction du type II S qui clivent la séquence d'ADN en dehors de leur site de restriction (ici les enzymes BsmBI et BsaI). Ainsi, quand ces sites sont placés aux extrémités 5' et 3' d'une molécule d'ADN, le clivage élimine le site de restriction et génère des extrémités cohésives sur les séquences adjacentes. Ces séquences sont utilisées pour assembler des « modules » standards dans un ordre précis : chaque module est flanqué de séquences « signatures » qui génère des extrémités cohésives spécifiques lors de la digestion enzymatique, permettant leur ligation dans l'ordre souhaité sur le plasmide lors de la ligation. Pour créer les modules, le vecteur pUPD2 et un produit de PCR de la séquence à insérer flanquée des séquences signatures adaptées et du site de restriction de BsmBI sont mélangés avec l'enzyme BsmBI et la ligase T4. Le mélange est ensuite soumis à 26 cycles de digestion-ligation (37°C pendant 3 min, 16°C pendant 4 min), puis 5 min à 50°C suivi de 5 min à 80°C pour dénaturer les enzymes. Le mélange est ensuite utilisé pour transformer des bactéries et les clones sont sélectionnés sur boîtes de LB agar complétement en Chloramphénicol et/ou par crible blanc/bleu avec ajout d'IPTG et de X-Gal. Pour l'assemblage dans le vecteur de destination, les différents modules et le vecteur de destination sont mélangés à l'enzyme BsaI et à la ligase T4, puis soumis aux mêmes conditions que précédemment. La sélection se fait sur boîte de LB agar contenant un antibiotique spécifique au vecteur de destination.

Transformation bactérienne par choc thermique

50 µl de cellules thermo-compétentes préalablement préparé sont mélangés avec 100 ng à 1 µg de plasmide ou de produit de ligation et incubés 30 minutes sur de la glace.

Pour les transformations de *E. coli* :

Le mélange est soumis à un choc thermique de 40 secondes à 42°C pour permettre l'entrée du plasmide dans la bactérie. Il est ensuite placé 2min sur la glace. 400 µl de milieu LB sans antibiotiques sont ajoutés au mélange puis incubés pendant 1h à 37°C sous agitation pour permettre la reprise de la croissance des cellules et la reconstruction de la paroi cellulaire après le choc thermique. La totalité du mélange est enfin étalé sur une boîte avec un milieu sélectif.

Pour les transformations de ***A. tumefaciens*** :

Le mélange est soumis à un choc thermique de 5 minutes à 37°C pour permettre l'entrée du plasmide dans la bactérie. Il est ensuite placé 2min sur la glace. 400 µl de milieu LB sans antibiotiques sont ajoutés au mélange puis incubés pendant 2h à 28°C. La totalité du mélange est enfin étalé sur une boîte avec un milieu sélectif.

Amplification de l'ADN par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique utilisée pour obtenir rapidement une grande quantité d'un fragment spécifique d'ADN. Elle repose sur une succession de réactions de réplication de l'ADN à partir d'une matrice d'ADN double brin. Ces réactions utilisent deux amorces sous forme d'oligonucléotides dont les extrémités 3' se dirigent l'une vers l'autre sur la matrice ADN, déterminant la séquence amplifiée. Les réactions sont effectuées à l'aide d'un thermocycleur de façon automatique.

2 enzymes ont été utilisées dans le laboratoire :

GoTag® G2 Flexi DNA Polymerase : pour les amplification d'ADN de routine, par exemple les génotypages de plantes ou de plasmides en bactéries (fournisseur : Promega).

Phusion® High Fidelity DNA Polymerase : Utilisée pour sa haute-fidélité de séquence pour cloner les molécules d'ADN dont la séquence est importante (pour la production de protéine par exemple). Cette haute-fidélité lui est conférée par son activité exonucléase 3'/5' permettant une correction (New England Biotechnologies).

Electrophorèse sur gel d'agarose

La migration de l'ADN sur gel d'agarose est utilisée pour séparer les molécules d'ADN selon leur poids moléculaire. L'échantillon d'ADN est complété avec une solution de tampon de charge et est chargé sur le gel d'agarose (de 0,8 à 2% d'agarose (poids/volume) dans une solution de TAE 0,5X) auquel est ajouté 0.5 µg/mL de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est effectuée dans une solution de TAE 0,5X à un voltage constant de 100V. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant de l'ADN et sa fluorescence peut être observée sous une lampe UV, nous permettant d'observer les molécules d'ADN.

Solution tampon TAE : 40 mM Tris-acetate pH 8, 1 mM EDTA

Extraction d'ARN totaux de plantes

Pour l'extraction d'ARN, Une solution de TRIzol® a été utilisé. Les échantillons sont collectés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les échantillons congelés sont ensuite broyés à la main dans un mortier ou à l'aide d'un appareil comme le Silamat. Dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, pour chaque 100g de poudre d'échantillon, 1 mL de TRIzol® est ajouté. Le mélange est homogénéisé en vortexant et incubé à température ambiante pour 5 min. 200 µL de chloroforme pour chaque mL de Trizol® est ajouté et vigoureusement vortexé. L'échantillon est alors centrifugé à 15 000 g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse de la partie supérieure du tube contient exclusivement les ARN et les protéines et l'ADN se trouvent dans l'interphase et la phase organique de la partie inférieure du tube. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 1,5 volumes d'isopropanol est ajouté pour la précipitation de l'ARN. L'échantillon est homogénéisé et incubé à température ambiante pendant 10 min. L'ARN est culoté par centrifugation à 16 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec de l'éthanol 70%. Enfin le culot est séché à l'air libre puis re suspendu dans un volume adéquat d'eau ultrapure.

Purification des plasmides

La purification de plasmides de bactéries repose sur la lyse alcaline. Cela est réalisé dans le laboratoire à l'aide d'un kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel). Les bactéries sont tout d'abord culottées puis re suspendues dans une solution tampon TE qui contient des

RNases. Les cellules sont ensuite lysées dans une solution contenant du SDS et du NaOH. Le lysat est neutralisé par une troisième solution d'acétate de sodium. Ainsi, l'ADN plasmidique est renaturé tandis que l'ADN génomique est précipité avec les débris cellulaires. Ces deux derniers sont éliminés et le surnageant contenant l'ADN plasmidique est chargé sur une colonne de silice. Les sels et les autres composants solubles sont lavés avec de l'éthanol 70%. L'ADN plasmidique est enfin élué de la colonne avec de l'eau ultrapure.

Quantification

Pour la quantification des acides nucléiques, un spectrophotomètre Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c™ a été utilisé.

Séquençage Sanger

Afin de s'assurer que les matrices et vecteurs d'ADN ne contiennent aucune mutation, les clones sont tous vérifiés par séquençage. Le séquençage est effectué sur la plate-forme de séquençage de l'ADN à l'IBMP dirigée par Abdelmalek ALIOUA. Le séquençage est basé sur la méthode d'amplification asymétrique de Sanger (Sanger et coll., 1977). Les acides nucléiques sont ensuite séparés et analysés par électrophorèse sur capillaire à l'aide d'un appareil Applied Biosystems 3100 (Perkin Elmer).

Extraction rapide de l'ADN de plante pour génotypage

L'équivalent de 100 µL de billes de verre et 400 µL de solution d'extraction sont placés dans un tube de 2 mL à bouchon vissable. Une feuille d'environ 1cm² est collectée pour chaque plante et chaque génotype et placée dans ce tube. Pour la lyse cellulaire un appareil Precellys® a été utilisé, pour deux cycles de 30 sec à 5 500 rpm. Les débris sont culottés par centrifugation à 16 000 g pendant 5 min à 4°C. 200 µL de surnageant est transféré dans un nouveau tube Eppendorf contenant 150 µL d'isopropanol froid. Le mélange est vortexé et incubé 5 min à température ambiante. L'ADN est ensuite culotté par centrifugation à 16 000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70%, et enfin séché et re-suspendu dans un volume approprié d'eau ultrapure.

Solution d'extraction : 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA

HRM

La High Resolution Melting (HRM) est une technique utilisée pour discriminer une différence de quelques acides nucléiques entre deux molécules d'ADN. Elle permet de déterminer si des mutations ponctuelles ou des petites in/del sont présentes par rapport à la séquence sauvage. Cette technique a été utilisée pour l'analyse des mutant CRISPR-cas9. Les échantillons d'ADN sont mélangés dans un volume final de 10 μ L avec le matériel nécessaire à une amplification PCR d'une taille entre 80 et 100 nucléotides (Amorces conçues sur le logiciel du LightCycler[®] 480 de Roche) et de l'EvaGreen, un intercallant fluorescent de l'ADN plus saturant que le SYBR Green, permettant une plus grande sensibilité à une variation de taille et de composition (8 μ L de Precision Melt Supermix de chez Biorad, 1 μ L de matrice ADN, 0,5 μ L de chaque amorce concentrées à 10 μ M). Après amplification dans un LightCycler[®] 480 (Roche), une courbe de fusion est réalisée en augmentant progressivement la température, séparant les doubles brins d'ADN amplifiés et libérant l'EvaGreen, diminuant l'intensité de fluorescence enregistrée. Un changement même mineur dans la séquence d'ADN modifiera cette courbe de fusion, permettant de détecter une mutation en comparant ces courbes de fusions avec celle de la séquence initiale non mutée. Pour observer plus facilement les différences, on regarde généralement la dérivée de ces courbes de fusion, ou la différence par rapport à la courbe sauvage.

Méthodes d'analyse des protéines

Extraction de protéines totales

Pour une analyse rapide des protéines totales, les échantillons (semis, fleurs ou feuilles) sont collectés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les échantillons congelés sont ensuite broyés mécaniquement à l'aide d'un dispositif de mélange comme le Silamat. 200 μ L de tampon d'extraction de protéines chaud est ajouté et l'échantillon est vivement vortexé. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 min à 16 000 g et le surnageant est récupéré. Les protéines sont ensuite précipitées à l'aide d'acétone. 3 volumes d'acétone froid sont ajoutés et les échantillons sont mélangés avant d'être placés 20 min à -20°C. Enfin les échantillons sont centrifugés 10 min à 10 000 g, 4 °C. Les culots de protéines sont lavés avec de l'acétone

80% avant d'être séchés et enfin remis en suspension dans un volume suffisant de tampon d'extraction.

Tampon d'extraction de protéines : 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% glycérol, 2% SDS, 100 mM DTT, 4 M urea

Pour extraire les protéines de feuilles de *Nicotiana benthamiana* agro-infiltrées avant co-immunoprécipitation, 3 g de feuilles agro-infiltrées congelés sont broyées à la main dans l'azote liquide avec un mortier et un pilon (dans la chambre froide à 4°C) jusqu'à ce qu'il ne reste qu'une poudre fine et pâle. La poudre est transférée dans un mortier propre avec 3mL de tampon d'extraction par gramme de matériel biologique avec du quartz et un peu de PVP et broyée avec un nouveau pilon jusqu'à obtenir un mélange liquide. Le mélange est incubé 15 min à 4°C en continuant de broyer régulièrement, puis transféré dans des Eppendorf de 2 mL et centrifugé à 20 000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est centrifugé une seconde fois comme précédemment. Enfin, 2 mL de cette extraction est utilisé pour chaque immunoprécipitation. Une partie est conservée comme contrôle de la quantité de protéine initiale (Input).

Quantification des protéines

Bradford

Les protéines sont dosées par la méthode Bradford à l'aide de la solution Bio-Rad Protein Assay. Dans un volume total de 1 mL, 10 µL d'échantillon à doser sont ajoutés à 790 µL d'eau. 200 µl de réactif sont ajoutés, le mélange est homogénéisé et après deux minutes, la DO à 595 nm est mesurée. La valeur de la DO est comparée à une gamme standard préalablement établie pour déterminer la concentration en protéines.

NanoDrop

Pour la quantification des protéines, un spectrophotomètre Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c™ a été utilisé.

Expression de protéines

Test d'induction

Avant la purification de protéines exprimées dans la bactérie, des tests d'induction sont effectués pour confirmer que la protéine d'intérêt est bien exprimée par la bactérie. Pour cela, 3 mL de milieu LB contenant les antibiotiques nécessaires et 1% de glucose sont inoculés avec une colonie candidate pour l'expression. Le glucose réprime l'expression de la T7 polymérase et empêche la protéine d'être exprimée. La culture est incubée à 37°C jusqu'à atteindre une DO entre 0,6 et 0,8. Cette culture est séparée en deux, et chaque fraction bactérienne est ensuite culotée par centrifugation à 4 000 g pendant 10 min. Un des deux culots est re-suspendu dans 3 mL de milieu LB contenant les antibiotiques nécessaires et le glucose comme précédemment, et représentera la fraction non induite. L'autre fraction est re-suspendue dans 3 mL de milieu LB plus antibiotiques contenant 1 mM d'IPTG, permettant l'expression de la T7 polymérase et la transcription de la protéine d'intérêt. Les cultures sont ensuite incubées sous agitation à 16°C pendant 18h. Après l'incubation, 100 µL de chaque culture sont récupérés et centrifugés pendant 2 min à 16 000 g. Le culot est remis en suspension jusqu'à un volume total de 20 µL à l'aide d'un tampon de charge et d'un tampon Laemmli. Les bactéries sont ainsi lysées et les protéines totales sont analysées par SDS-PAGE. La protéine d'intérêt est alors visualisée directement sur le gel après coloration ou immuno-déTECTÉ par Western Blot (voir ci-dessous).

Purification de protéine

La protéine purifiée au cours de cette étude a été exprimée en fusion avec une double étiquette 6xHis-GST. Les purifications ont été réalisées par affinité à l'étiquette 6x His.

Tout d'abord, les bactéries induites sont lysées en utilisant soit un Microfluidizer, soit un sonicateur Vibracell. Le lysat obtenu est clarifié par centrifugation (30 000 g, 30 min, 4°C), puis le surnageant est passé à travers un filtre de 0,2 µm et le pH ajusté à 7,8. L'extrait de protéine est ensuite placé en présence de 200 µL de billes de Ni-NTA (Nickel-NitriloTricetic Acid) (Qiagen). Le mélange est incubé 2 à 16 h à 4°C sur une roue rotative. Il est ensuite transféré sur une colonne, préalablement équilibrée avec 1 ml de LBpET. La colonne est ensuite lavée avec 5 ml de WB1pET suivie de 5 ml de WB2pET pour éliminer les protéines non liées de façon

spécifique. Les protéines fixées sur les billes de Ni-NTA sont alors éluées avec 2 ml d'EL1pET suivi de 2 ml d'EL2pET. Les différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE et les fractions contenant la quantité la plus élevée et/ou la protéine d'intérêt la plus pure sont sélectionnées.

LBpET : 20 mM MOPS pH 7,8, 500 mM NaCl, 15 % (v/v) glycérol, 0,2 mM DTT, 1/175 inhibiteurs de protéases, imidazole 50 mM

WB1pET : 20 mM MOPS pH 7,8, 150 mM NaCl, 15 % (v/v) glycérol, 50 mM imidazole

WB2pET : 20 mM MOPS pH 7,8, 250 mM NaCl, 15 % (v/v) glycérol, 75 mM imidazole

EL1pET : 20 mM MOPS pH 7,4, 250 mM NaCl, 15 % (v/v) glycérol, 200 mM imidazole

EL2pET : 20 mM MOPS pH 7,4, 250 mM NaCl, 15 % (v/v) glycérol, 500 mM imidazole

Co-immunoprécipitation de protéines

Les immunoprécipitations ont été effectuées avec des extraits de protéines de mitochondries de chou-fleur, ou de protéines totales de feuilles de *Nicotiana benthamiana*, à l'aide d'un kit « μ MACS GST-tagged Protein Isolation Kit » (Miltenyi Biotec) ou « μ MACS HA-tagged Protein Isolation Kit », respectivement. Les mitochondries correspondant à 1 mg de protéines sont lysées dans 1 mL de tampon de lyse, pendant 30 min à 4 °C sur une roue en rotation. Le lysat est clarifié à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C et le surnageant est conservé et complété par l'ajout de 5 μ g de protéine appât (6His-GST-Oxa1aC-ter ou GST contrôle) si nécessaire, puis incubé 30 min en chambre froide sur une roue rotative. 50 μ l de billes magnétiques anti-GST sont ajoutés, et les échantillons sont incubés 30 min supplémentaires sur la roue en chambre froide avant d'être chargés sur la colonne. Après le passage au travers de la colonne, celle-ci est lavée six fois avec 200 μ l de tampon de lavage, et l'éluion est réalisée avec 120 μ l de tampon d'éluion (Miltenyi Biotec) à 90 °C, en récupérant les billes magnétiques. Les protéines Co-immunoprécipitées obtenues sont analysées par LC-MS/MS.

Tampon de lyse : 20 mM HEPES-KOH pH 7,6, 50 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 % de triton X-100 ou 1% de NP40 (Igepal), complété par des inhibiteurs de protéases (cOmplete sans EDTA)

Tampon de lavage : 20 mM HEPES-KOH pH 7,6, 50 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 % de triton X-100 ou 0,1% de NP40 (Igepal), complété par des inhibiteurs de protéases (cOmplete sans EDTA)

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Avant d'effectuer l'analyse SDS-PAGE, les échantillons sont préparés en re suspendant les solutions protéiques, jusqu'à un volume total de 20 μ L en utilisant le tampon de charge et le tampon Laemmli. Les échantillons sont ensuite dénaturés à 90°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont chargés sur le gel SDS-PAGE, composé de deux parties différentes : le gel de concentration, et le gel de séparation, où les protéines seront séparées en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines sont séparées en étant soumises à un ampérage constant de 25 mA. La migration se fait dans du tampon Laemmli. À la fin de la migration, le gel peut être coloré avec du bleu de Coomassie pour visualiser les protéines totales, ou transférer les protéines sur une membrane PVDF pour une analyse plus approfondie.

Tampon de charge : 100 mM Tris-HCl pH 6.8 ; 2% (w/v) SDS ; 10% (v/v) glycerol ; 3% (v/v) β mercaptoéthanol ; 0.01% (w/v) bleu de bromophénol

Tampon Laemmli : 25 mM Tris HCl pH 8.3 ; 200 mM glycine ; 0,1% (w/v) SDS

Gel de concentration 5% : 5% acrylamide/bisacrylamide 37.5/1 ; 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 ; 0.1% (w/v) SDS ; 0.1 % (v/v) APS ; 0.01 % TEMED

Gel de séparation X% : x% acrylamide/bisacrylamide 37.5/1 ; 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 ; 0.1% (w/v) SDS ; 0.1% (v/v) APS ; 0.01% TEMED

Transfert des protéines sur une membrane PVDF en système liquide

Pour que les protéines soient accessibles à la détection par des anticorps, elles sont électro-transférées à partir du gel SDS sur une membrane de PVDF (Immobilon-P, 0,45 μ m, Millipore). Tout d'abord, la membrane est activée à l'aide de méthanol, puis le gel et la membrane sont pré-équilibrés dans du tampon de transfert pendant 15 min. Le transfert des protéines est effectué dans un appareil Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) dans du tampon de transfert pendant 1 h à 4°C sous 350 mA. La membrane peut alors être colorée dans une solution de coloration pour membrane puis lavée avec une solution de décoloration.

Tampon de transfert : 15% MeOH, 20 mM Tris, 200 mM Glycine

Solution de coloration : 0.1% Coomassie Blue R-250, 50% méthanol, 7% acétate

Solution de décoloration : 50% méthanol, 7% acétate

Immunodétection des protéines (Western Blot)

Tout d'abord, la membrane est bloquée pour éviter la liaison non spécifique des anticorps. Ceci est réalisé par immersion de la membrane dans une solution de TBS-Tween 0,2% (v/v) (TBS-T) et de lait 5% (p/v) pour 1 heure à température ambiante. La solution de blocage est jetée et la membrane est ensuite incubée pour 1 heure dans une solution de TBS-T, 5% (p/v) de lait contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. La solution d'anticorps primaire est ensuite jetée et la membrane est lavée 3 fois de suite pendant 5 min dans du TBS-T. Enfin, la membrane est incubée pendant 30 min avec le anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dilué au 1/10 000^{ème} dans du TBS-T. La membrane est lavée trois fois pendant 5 min dans du TBS-T et placée en présence du substrat de la peroxydase (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche). Le substrat émet de la lumière lorsqu'il est en contact avec l'anticorps secondaire. La protéine d'intérêt est révélée grâce à la lumière émise, observée dans un transilluminateur ou impressionnée sur un film photographique.

Analyses LC-MS/MS

Toutes les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur la plateforme protéomique Strasbourg-Esplanade (<http://www-ibmc.u-strasbg.fr/proteo/Web/accueil.htm>), par Lauriane Kuhn, Johana Chicher et Philippe Hamman. En bref, les extraits protéiques ont été précipités (acétate d'ammonium 0,1 M à froid dans du méthanol 100 %) et digérés avec de la trypsine. Chaque échantillon a été analysé par nanoLC-ESI-MS/MS sur un spectromètre de masse QExactive+ couplé à un EASY-nanoLC-1000 (Thermo-Fisher Scientific), avec un gradient de 160 minutes. Les données ont été comparées à la base de données TAIR *Arabidopsis thaliana* ou *Brassica oleracea* Uniprot. Les peptides et les protéines ont été identifiés avec l'algorithme Mascot (version 2.5.1, Matrix Science) et les données ont été ensuite importées dans le logiciel Proline v1.4 logiciel (<http://proline.profiroteomics.fr/>). Le nombre total de spectres de fragmentation MS/MS a été utilisé pour quantifier chaque

protéine (quantification relative sans étiquette de comptage spectral). Dans le cas de co-IP, pour identifier les protéines significativement enrichies, une analyse statistique par le package R `msmsTests` en utilisant des dénombrements spectraux ont été effectués (Gregori J, Sanchez A, 2013). L'ensemble des données MS a d'abord été normalisé par le nombre total de spectres MS/MS (normalisation en colonne). Le modèle binominal négatif mis en œuvre, qui repose sur la solution fournie par le paquet `edgeR`, a été utilisé (Robinson et coll., 2010). Les valeurs P ont ensuite été ajustées à l'aide de la méthode de Benjamini & Hochberg. Les protéines qui ont été surreprésentées dans l'IP sont visualisées sur un « volcano plot » qui affiche le \log_2 -fold-change et $-\log_{10}$ -p.value sur les axes x et y, respectivement. Le graphique a été tracé à l'aide de la bibliothèque graphique R de `Plotly`.

Agroinfiltration par floraldip

Une préculture de 5 mL composée de milieu LB complétée par les antibiotiques appropriés est inoculée avec la souche d'*Agrobacterium* transformée avec la construction d'intérêt. La culture est incubée pour 2 jours à 28°C sous agitation. 50 μ L de préculture sont ensuite utilisés pour inoculer 100 mL de milieu de composition identique au précédent. La culture est incubée pendant 1 jour à 28°C sous agitation. Après incubation, les bactéries sont sédimentées par centrifugation à 4000 tr/min pendant 10 min à température ambiante. Elles sont ensuite remises en suspension dans du milieu de floraldip et incubées pendant 1 h dans ce dernier pour permettre l'activation des gènes de virulence. Les inflorescences des plantes à être agroinfiltrées sont trempées dans la solution pendant 30 secondes. Les plantes sont ensuite séchées et mises à l'obscurité pendant 24 heures, puis remises dans leurs conditions de culture d'origine.

Milieu de floraldip : 2,2 g/L de milieu MS (M0222 Duchefa), 5% saccharose, 0,025% Silvet L-77, 200 μ M d'acétosyringone

Criblage des graines transformées

Les graines transformées par *agrobacterium tumefaciens* par floral dip sont criblées à l'aide de leur fluorescence eGFP sous un microscope AxioZoom 2000 dans le cas des constructions CRISPR-cas9. Pour les graines transformées avec les différentes constructions d'Oxa1a, les

graines sont sélectionnées sur milieu MS agar complété en antibiotique approprié (Kanamycine), puis repiquées sur terreau à 14 jours.

Expression transitoire de protéines dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*

L'expression transitoire de protéine dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* est utilisée ici pour tester rapidement les interactions entre deux protéines étiquetées co-exprimées dans la feuille. Pour chaque construction d'intérêt, une culture d'agrobactéries transformées avec le plasmide de 10 mL de milieu LB et les antibiotiques nécessaires est incubé 16 à 24h à 28°C sous agitation. Puis les agrobactéries sont culottées et re suspendues dans un volume approprié de tampon d'agroinfiltration de façon à obtenir une D.O.₆₀₀ de 1. Une souche d'agrobactéries contenant un plasmide suppresseur de silencing (p19) est aussi mis en culture en parallèle, et ramenée à une D.O.₆₀₀ de 0,5. Le même volume de deux souches d'intérêt et de la souche p19 sont mélangés et laissés à incuber 1h à température ambiante. Enfin, 3 à 6 feuilles entière de *Nicotiana benthamiana* sont agroinfiltrées, en blessant la partie inférieure de la feuille et en injectant le mélange de souches à l'aide d'une seringue de 1 mL. Les feuilles sont récupérées 2 à 4 jours après et directement congelées dans l'azote liquide.

Tampon d'agroinfiltration : 1 mM MgCl₂, 50 µM acetosyringone

Stérilisation de graines

L'équivalent de 100 µL de graines est placé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL contenant 500 µL d'éthanol 70% et 10 µL de Tween 20. Le mélange est incubé pendant 15 min sur une roue rotative à température ambiante. Le liquide est retiré et les graines sont lavées trois fois pendant 5 min avec de l'éthanol 100%. Après le dernier lavage, les graines sont séchées et prêtes à être semées. L'ensemble de la procédure est effectué sous une hotte à flux laminaire.

Purification de mitochondries

Pour la purification de mitochondries, deux différents matériaux de départ ont été utilisés : des fleurs d'*Arabidopsis* ou un chou-fleur. Les premières expériences de co-IP utilisaient des

mitochondries de fleurs d'Arabidopsis, puis la majorité des travaux a été réalisée à l'aide de mitochondries de choux-fleurs, la quantité de mitochondries obtenue étant extrêmement plus haute qu'avec les fleurs.

Les solutions tampons diffèrent selon le matériel de départ, mais la procédure est similaire. Tout d'abord le matériel de départ est récolté, 30 g de fleurs d'Arabidopsis ou 1 kg de choux-fleurs. Le matériel est broyé dans du tampon d'extraction. Les fleurs sont broyées dans un mixeur et le chou-fleur à l'aide d'un extracteur de jus.

Le lysat est ensuite filtré à l'aide de Miracloth, et clarifié par centrifugation à 1 500 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est conservé et centrifugé à nouveau pendant 15 min à 18 000 g à 4°C. Le culot d'organites est re suspendu dans du tampon de lavage et les deux centrifugations précédentes sont répétées une seconde fois. Le culot obtenu est re suspendu dans du tampon de lavage et chargé sur un gradient de Percoll 10-23-40% pour les fleurs d'Arabidopsis et centrifugé 45 min à 40 000 g, et un coussin de Percoll de 30% pour le chou-fleur puis centrifugé 1h30 à 40 000g. Les mitochondries sont collectées à l'interphase 23-40%, et le Percoll est lavé en ajoutant au moins 10 fois le volume récupéré en tampon de lavage, puis centrifugé pendant 15 min à 18 000 g à 4°C pour culoter les mitochondries. Ce dernier lavage est répété une seconde fois.

Enfin, les mitochondries culotées sont re suspendues dans 1 à 2 mL de tampon de lavage et la quantité est estimée avec une méthode de Bradford.

Tampon d'extraction :

- Fleurs : 300 mM Sucrose, 15 mM tetrasodium-pyrophosphate decahydrate, 2 mM EDTA, 10 mM KH₂PO₄, 1% (m/v) PVP-40, 1% (m/v) BSA, 20 mM ascorbate, 5 mM cystéine, pH 7,5
- Chou-fleur : 300 mM Mannitol, 30 mM tetrasodium-pyrophosphate decahydrate, 3 mM EDTA, 0,8% (m/v) PVP-25, 0,5% (m/v) BSA, 20 mM ascorbate, 5 mM cystéine, 2 mM β-mercaptoéthanol, pH 7,5.

Tampon de lavage :

- Fleurs : 300 mM sucrose, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, pH 7,5
- Chou-fleur : 300 mM mannitol, 10 mM phosphate buffer, 1 mM EDTA, pH 7,5

Tampon de gradient :

- Fleurs : X% Percoll, 300 mM sucrose, 10 mM MOPS, pH 7,2

- Chou-fleur : : X% Percoll, 300 mM mannitol, 10 mM tampon phosphate, 1 mM EDTA, pH 7,5

Purification de ribosomes à partir de mitochondries

Pour purifier des ribosomes, les mitochondries ont été re suspendues dans du tampon de lyse à une concentration de 1 mg/mL (en partant au moins de 20 mg de mitochondries) et incubées pendant 15 min à 4°C. Le lysat est clarifié par centrifugation à 30 000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est ensuite chargé sur un coussin de sucrose 50% réalisé dans du tampon monosome (3 mL de coussin et 7 à 10 mL de surnageant), puis centrifugé à 235 000 g pendant 3h à 4°C dans une ultracentrifugeuse. Le culot de ribosomes est re suspendu dans du tampon monosome et chargé sur un gradient de sucrose continu 10-30% réalisé avec la même solution tampon, à l'aide d'une machine Gradient Master de BioComp, et centrifugé 16h à 65 000 g dans une ultracentrifugeuse. Les fractions correspondant aux mitoribosomes sont collectées à l'aide d'un collecteur de gradient BioComp et chaque fraction est culotée puis re suspendue dans du tampon monosome, à une concentration de protéines de 3 µg/µL.

Tampon de lyse : 20 mM HEPES-KOH pH 7,6, 100 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mg/ml héparine, 1.6% Triton X-100, 100 µg/ml chloramphénicol, complémenté avec des inhibiteurs de protéase (Complete EDTA-free)

Monosome buffer : 20 mM HEPES-KOH pH 7,6, 100 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 µg/ml chloramphénicol, complémenté avec des inhibiteurs de protéase (Complete EDTA-free)

Cryo Microscopie électronique

Les analyses de microscopie électroniques ont été réalisées au Biozentrum (Université de Bâle) dans le cadre d'une collaboration avec Florent Waltz dans l'équipe de Ben Engel.

Préparation des grilles

Pour les analyses de cryo microscopie électronique de type « single particle » (cryo-EM), 4 µl d'échantillons à une concentration de protéines de 1,5 µg/µl ont été déposés sur une grille de carbone perforé Quantifoil R2/2 à 300 mailles, revêtue d'un mince film de carbone continu

fait maison et déchargée par décharge lumineuse (2,5 mA pendant 20 s). L'échantillon a été incubé sur la grille pendant 30 s, puis épongé avec du papier filtre pendant 2 s dans un Vitrobot Mark IV à température et humidité contrôlées (T = 4 °C, humidité 100 %, force de blotting 5), suivi d'une vitrification dans de l'éthane liquide.

Collecte de données par cryo microscopie électronique

La collecte de données sur des particules uniques a été effectuée sur un microscope Titan Krios de 300 kV (FEI), en utilisant le logiciel SerialEM pour l'acquisition automatisée des données. Les données ont été recueillies à une sous-focalisation nominale de -0,5 à -2,5 μm , à des grossissements de 36 000 \times avec une taille de pixel de 1,13 Å pour le SSU, et de 45 000 \times avec une taille de pixel de 0,9 Å pour le LSU. Les micrographies ont été enregistrées sous forme de piles de films sur un détecteur d'électrons directs K2 (GATAN Company) ; chaque pile de films a été fractionnée en 65 images, pour une exposition totale de 6,5 s correspondant à une dose d'électrons de 45 e-/Å².

Acquisition des données de tomographie cryo-électronique

Les tomographies cellulaires ont été acquises sur un microscope Titan Krios de 300 kV (FEI), équipé d'un filtre énergétique post-colonne (Quantum, Gatan) et d'une caméra à détection directe (K2 summit, Gatan). Les séries d'inclinaison ont été enregistrées à l'aide du logiciel SerialEM90 avec des incréments d'inclinaison de 2° de -60° à +60° (en deux moitiés séparées à 0° ou -20°), une taille de pixel objet de 3,42 Å, 12 images par seconde, une défocalisation de -4 à -5,5 μm et une dose totale cumulée de ~ 100 e-/Å².

Évaluation des échantillons de ribosomes par microscopie électronique à transmission

Au cours de la sélection des échantillons, avant les analyses cryo-EM et LC-MS/MS, les échantillons de ribosomes ont été analysés par microscopie électronique afin d'évaluer l'intégrité et la pureté des échantillons. Les échantillons ont été visualisés avec un microscope électronique à transmission CM120 100Kv (FEI) équipé d'une caméra CCD ORIUS 1000 Gatan Camera à l'IGBMC (Illkirch).

Analyse des images de cryo-EM

La correction de la dérive et du gain, ainsi que la pondération de la dose ont été effectuées à l'aide du logiciel MotionCorr2 (Zheng et al., 2017). Une image moyenne pondérée par la dose de toute la pile a été utilisée pour déterminer la fonction de transfert de contraste avec le logiciel Gctf (Zhang, 2016). Enfin les processus suivants ont été réalisés avec RELION 3.0 (Zivanov et al., 2018). Les analyses initiales ont été effectuées dans CryoSPARC (Punjani et al., 2017) pour évaluer la composition de l'échantillon et générer une carte cryo-EM *ab-initio*. Après une classification 2D sans référence, les particules ont été extraites et utilisées pour la classification 3D. La reconstruction *ab-initio* de cryo-EM générée dans CryoSPARC a été filtrée en passe-bas à 30 Å, et utilisée comme référence initiale pour la classification 3D. Les particules ont subi un polissage bayésien avant reconstruction des sous-unités. La détermination de la résolution locale de la carte de densité finale a été effectuée à l'aide du logiciel ResMap (Kucukelbir et al., 2014).

Analyse des tomogrammes

Les vidéos provenant du détecteur K2 ont été corrigées en fonction du mouvement avec MotionCor2 (Zheng et al., 2017). À l'aide du logiciel IMOD, les séries d'inclinaison ont été alignées avec le patch-tracking, et les tomogrammes ont été reconstruits avec la rétroprojection pondérée. Le reste des reconstructions ont été réalisées à l'aide de PyTOM (Hrabe et al., 2012), et les pics de corrélation les plus élevés ont ensuite été inspectés manuellement dans Chimera pour éliminer les faux positifs. Les ribosomes 80S cytosoliques ont été localisés dans les tomogrammes avec un filtre EMDB- 1780 (Armache et al., 2010) à 40 Å et en l'utilisant comme modèle pour la correspondance de modèles sur les tomogrammes déconvolué (tom_deconv ; https://github.com/dtegunov/tom_deconv) en utilisant PyTOM.

Analyses bioinformatiques

TPpred 2.0 a été utilisé pour la prédiction des séquences d'adressage à la mitochondrie (Savojardo et al., 2014). La prédiction d'un domaine coiled-coil a été réalisée à partir des outils DeepCoil2 et Pcoil du MPI bioinformatic toolkit (Ludwiczak et al., 2019). Les similitudes entre

les protéines ont été analysées au moyen d'alignements MUSCLE (Edgar, 2004). Les prédictions tridimensionnelles de structures de protéines ont été établies avec Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (Kelley et coll., 2015) et AlphaFold (Jumper et al., 2021 ; Varadi et al., 2021). Pour identifier les régions de similarité entre les séquences biologiques, ou pour trouver des protéines homologues entre les organismes (Arabidopsis et chou-fleur par exemple), la fonction BLAST de NCBI a été utilisé.

Bibliographie

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., & Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 1994 370:6491, 370(6491), 621–628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. Le, Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., ... Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429–514. <https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.2012.00644.X>
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F. E., Neupert, W., & Nussberger, S. (1999). The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 147(5), 959–968. <https://doi.org/10.1083/JCB.147.5.959>
- Allen, J. F., Horner, D. S., Cavalier-Smith, T., Willison, K., Leaver, C. J., & Martin, W. (2003). The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1429), 19. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2002.1191>
- Altamura, N., Capitanio, N., Bonnefoy, N., Papa, S., & Dujardin, G. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Letters*, 382(1–2), 111–115. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00165-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00165-2)
- Alverson, A. J., Rice, D. W., Dickinson, S., Barry, K., & Palmer, J. D. (2011). Origins and Recombination of the Bacterial-Sized Multichromosomal Mitochondrial Genome of Cucumber. *The Plant Cell*, 23(7), 2499. <https://doi.org/10.1105/TPC.111.087189>
- Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S. H. W., & Ramakrishnan, V. (2015). Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 95–98. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA1193>
- Anghel, S. A., McGilvray, P. T., Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2017). Identification of Oxa1 Homologs Operating in the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum. *Undefined*, 21(13), 3708–3716. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.12.006>
- Aphasizhev, R., & Aphasizheva, I. (2014). Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie*, 100(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2014.01.003>
- Aschtgen, M. S., Zoued, A., Llobès, R., Journet, L., & Cascales, E. (2012). The C-tail anchored TssL subunit, an essential protein of the enteroaggregative *Escherichia coli* Sci-1 Type VI secretion system, is inserted by YidC. *MicrobiologyOpen*, 1(1), 71–82. <https://doi.org/10.1002/MBO3.9>
- Atkinson, G. C., Kuzmenko, A., Kamenski, P., Vysokikh, M. Y., Lakunina, V., Tankov, S.,

- Smirnova, E., Soosaar, A., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2012). Evolutionary and genetic analyses of mitochondrial translation initiation factors identify the missing mitochondrial IF3 in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, *40*(13), 6122. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS272>
- Bai, L., You, Q., Feng, X., Kovach, A., & Li, H. (2020). Structure of the ER membrane complex, a transmembrane-domain insertase. *Nature*, *584*(7821), 475–478. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2389-3>
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H. D., Dinman, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., Lafontaine, D. L. J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J. M., McAlear, M. A., Moore, P. B., Noller, H. F., Ortega, J., Panse, V. G., Ramakrishnan, V., Spahn, C. M. T., Steitz, T. A., Tchorzewski, M., ... Yusupov, M. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *24*(1), 165–169. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2014.01.002>
- Barkan, A., Rojas, M., Fujii, S., Yap, A., Chong, Y. S., Bond, C. S., & Small, I. (2012). A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genetics*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002910>
- Barkan, A., & Small, I. (2014). Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *65*, 415–442. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-050213-040159>
- Barton, K. A., Wozny, M. R., Mathur, N., Jaipargas, E. A., & Mathur, J. (2018). Chloroplast behaviour and interactions with other organelles in *Arabidopsis thaliana* pavement cells. *Journal of Cell Science*, *131*(2). <https://doi.org/10.1242/JCS.202275>
- Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G., & Pratje, E. (1994). PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Molecular & General Genetics : MGG*, *245*(3), 272–278. <https://doi.org/10.1007/BF00290106>
- Bellafiore, S., Ferris, P., Naver, H., Göhre, V., & Rochaix, J. D. (2002). Loss of Albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *The Plant Cell*, *14*(9), 2303–2314. <https://doi.org/10.1105/TPC.003442>
- Bentolila, S., Heller, W. P., Sun, T., Babina, A. M., Friso, G., Van Wijk, K. J., & Hanson, M. R. (2012). RIP1, a member of an *Arabidopsis* protein family, interacts with the protein RARE1 and broadly affects RNA editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(22). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1121465109>
- Benz, M., Bals, T., Gügel, I. L., Piotrowski, M., Kuhn, A., Schünemann, D., Soll, J., & Ankele, E. (2009). Alb4 of *Arabidopsis* promotes assembly and stabilization of a non chlorophyll-binding photosynthetic complex, the CF1CF0-ATP synthase. *Molecular Plant*, *2*(6), 1410–1424. <https://doi.org/10.1093/MP/SSP095>
- Benz, M., Soll, J., & Ankele, E. (2013). *Arabidopsis thaliana* Oxa proteins locate to mitochondria and fulfill essential roles during embryo development. *Planta*, *237*(2), 573–588. <https://doi.org/10.1007/S00425-012-1793-9>
- Bernhardt, H. S. (2012). The RNA world hypothesis: the worst theory of the early evolution of life (except for all the others)a. *Biology Direct*, *7*(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-23/FIGURES/1>

- Bieri, P., Greber, B. J., & Ban, N. (2018). High-resolution structures of mitochondrial ribosomes and their functional implications. *Current Opinion in Structural Biology*, *49*, 44–53. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2017.12.009>
- Boerema, A. P., Aibara, S., Paul, B., Tobiasson, V., Kimanius, D., Forsberg, B. O., Wallden, K., Lindahl, E., & Amunts, A. (2018). Structure of the chloroplast ribosome with chl-RRF and hibernation-promoting factor. *Nature Plants*, *4*(4), 212–217. <https://doi.org/10.1038/S41477-018-0129-6>
- Bogenhagen, D. F., Ostermeyer-Fay, A. G., Haley, J. D., & Garcia-Diaz, M. (2018). Kinetics and Mechanism of Mammalian Mitochondrial Ribosome Assembly. *Cell Reports*, *22*(7), 1935–1944. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.01.066>
- Bohnert, M., Rehling, P., Guiard, B., Herrmann, J. M., Pfanner, N., & Van Der Laan, M. (2010). Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Current Biology : CB*, *20*(13), 1227–1232. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2010.05.058>
- Bonen, L., & Calixte, S. (2006). Comparative analysis of bacterial-origin genes for plant mitochondrial ribosomal proteins. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(3), 701–712. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSJ080>
- Bonnefoy, N., Chalvet, F., Hamel, P., Slonimski, P. P., & Dujardin, G. (1994). OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *Journal of Molecular Biology*, *239*(2), 201–212. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1363>
- Bonnefoy, N., Fiumera, H. L., Dujardin, G., & Fox, T. D. (2009). Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1793*(1), 60–70. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2008.05.004>
- Bozkurt, G., Stjepanovic, G., Vilardi, F., Amlacher, S., Wild, K., Bange, G., Favaloro, V., Rippe, K., Hurt, E., Dobberstein, B., & Sinning, I. (2009). Structural insights into tail-anchored protein binding and membrane insertion by Get3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(50), 21131–21136. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0910223106>
- Brito Querido, J., Mancera-Martínez, E., Vicens, Q., Bochler, A., Chicher, J., Simonetti, A., & Hashem, Y. (2017). The cryo-EM Structure of a Novel 40S Kinetoplastid-Specific Ribosomal Protein. *Structure (London, England : 1993)*, *25*(12), 1785-1794.e3. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2017.09.014>
- Brown, A., Amunts, A., Bai, X. C., Sugimoto, Y., Edwards, P. C., Murshudov, G., Scheres, S. H. W., & Ramakrishnan, V. (2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*, *346*(6210), 718–722. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1258026>
- Brown, A., Rathore, S., Kimanius, D., Aibara, S., Bai, X. C., Rorbach, J., Amunts, A., & Ramakrishnan, V. (2017). Structures of the human mitochondrial ribosome in native states of assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, *24*(10), 866–869.

- <https://doi.org/10.1038/NSMB.3464>
- Brown, G. G., des Francs-Small, C. C., & Ostersetzer-Biran, O. (2014). Group II intron splicing factors in plant mitochondria. *Frontiers in Plant Science*, 5(FEB), 35. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00035/BIBTEX>
- Brown, J. R. (2003). Ancient horizontal gene transfer. *Nature Reviews. Genetics*, 4(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/NRG1000>
- Burger, G., Gray, M. W., & Lang, B. F. (2003). Mitochondrial genomes: Anything goes. *Trends in Genetics*, 19(12), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.012>
- Canino, G., Bocian, E., Barbezier, N., Echeverría, M., Forner, J., Binder, S., & Marchfelder, A. (2009). Arabidopsis encodes four tRNase Z enzymes. *Plant Physiology*, 150(3), 1494–1502. <https://doi.org/10.1104/PP.109.137950>
- Cazalet, C., Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Newton, H. J., Sansom, F. M., Jarraud, S., Zidane, N., Ma, L., Bouchier, C., Etienne, J., Hartland, E. L., & Buchrieser, C. (2010). Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS Genetics*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000851>
- Cech, T. R. (1986). The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell*, 44(2), 207–210. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90751-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90751-8)
- Celebi, N., Yi, L., Facey, S. J., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2006). Membrane biogenesis of subunit II of cytochrome bo oxidase: contrasting requirements for insertion of N-terminal and C-terminal domains. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), 1428–1436. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.01.030>
- Chen, L., & Liu, Y. G. (2014). Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 579–606. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-050213-040119>
- Chen, M., Samuelson, J. C., Jiang, F., Muller, M., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2002). Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7670–7675. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110644200>
- Chen, Y., Soman, R., Shanmugam, S. K., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2014). The role of the strictly conserved positively charged residue differs among the Gram-positive, Gram-negative, and chloroplast YidC homologs. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35656–35667. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.595082>
- Cheng, S., Gutmann, B., Zhong, X., Ye, Y., Fisher, M. F., Bai, F., Castleden, I., Song, Y., Song, B., Huang, J., Liu, X., Xu, X., Lim, B. L., Bond, C. S., Yiu, S. M., & Small, I. (2016). Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 85(4), 532–547. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13121>
- Cho, Y., Qiu, Y. L., Kuhlman, P., & Palmer, J. D. (1998). Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14244–14249.

- <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.24.14244>
- Christianson, T., & Rabinowitz, M. (1983). Identification of Multiple Transcriptional Initiation Sites on the Yeast Mitochondrial Genome by in Vitro Capping with Guanylyltransferase". *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 14025–14033. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44019-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44019-1)
- Chrzanowska-Lightowlers, Z., Rorbach, J., & Minczuk, M. (2017). Human mitochondrial ribosomes can switch structural tRNAs - but when and why? *RNA Biology*, 14(12), 1668–1671. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1356551>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.11.028>
- Claros, M. G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F. A., Popot, J. -L, & Jacq, C. (1995). Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Undefined*, 228(3), 762–771. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1995.0762M.X>
- Coquille, S., Filipovska, A., Chia, T., Rajappa, L., Lingford, J. P., Razif, M. F. M., Thore, S., & Rackham, O. (2014). An artificial PPR scaffold for programmable RNA recognition. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS6729>
- Cotton, J. A., & McInerney, J. O. (2010). Eukaryotic genes of archaeobacterial origin are more important than the more numerous eubacterial genes, irrespective of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17252–17255. https://doi.org/10.1073/PNAS.1000265107/SUPPL_FILE/PNAS.201000265SI.PDF
- Daems, W. T., & Wisse, E. (1966). Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *Journal of Ultrastructure Research*, 16(1), 123–140. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(66\)80027-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(66)80027-8)
- De Grey, A. D. N. J. (2005). Forces maintaining organellar genomes: is any as strong as genetic code disparity or hydrophobicity? *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 27(4), 436–446. <https://doi.org/10.1002/BIES.20209>
- De Silva, D., Tu, Y. T., Amunts, A., Fontanesi, F., & Barrientos, A. (2015). Mitochondrial ribosome assembly in health and disease. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(14), 2226–2250. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1053672>
- Dekker, P. J. T., Ryan, M. T., Brix, J., Müller, H., Hönlinger, A., & Pfanner, N. (1998). Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6515–6524. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6515>
- Delage, L., Giegé, P., Sakamoto, M., & Maréchal-Drouard, L. (2007). Four paralogues of RPL12 are differentially associated to ribosome in plant mitochondria. *Biochimie*, 89(5), 658–668. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2007.02.002>
- Derbikova, K. S., Levitsky, S. A., Chicherin, I. V., Vinogradova, E. N., & Kamenski, P. A. (2018). Activation of Yeast Mitochondrial Translation: Who Is in Charge? *Biochemistry*.

- Biokhimiia*, 83(2), 87–97. <https://doi.org/10.1134/S0006297918020013>
- Desai, N., Brown, A., Amunts, A., & Ramakrishnan, V. (2017). The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6324), 528–531. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL2415>
- Dong, Y., Palmer, S. R., Hasona, A., Nagamori, S., Kaback, H. R., Dalbey, R. E., & Brady, L. J. (2008). Functional overlap but lack of complete cross-complementation of *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli* YidC orthologs. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2458–2469. <https://doi.org/10.1128/JB.01366-07>
- Dorrell, R. G., & Howe, C. J. (2012). What makes a chloroplast? Reconstructing the establishment of photosynthetic symbioses. *Journal of Cell Science*, 125(8), 1865–1875. <https://doi.org/10.1242/JCS.102285/263103/AM/WHAT-MAKES-A-CHLOROPLAST-RECONSTRUCTING-THE>
- Du Plessis, D. J. F., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2006). Subunit a of cytochrome oxidase requires both YidC and SecYEG for membrane insertion. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12248–12252. <https://doi.org/10.1074/JBC.M600048200>
- Dünschede, B., Bals, T., Funke, S., & Schünemann, D. (2011). Interaction studies between the chloroplast signal recognition particle subunit cpSRP43 and the full-length translocase Alb3 reveal a membrane-embedded binding region in Alb3 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 35187–35195. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.250746>
- Dyson, M. R., Lee, C. P., Mandal, N., Seong, B. L., Varshney, U., & RajBhandary, U. L. (1993). Identity of a Prokaryotic Initiator tRNA. *The Translational Apparatus*, 23–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2407-6_3
- Edera, A. A., Gandini, C. L., & Sanchez-Puerta, M. V. (2018). Towards a comprehensive picture of C-to-U RNA editing sites in angiosperm mitochondria. *Plant Molecular Biology*, 97(3), 215–231. <https://doi.org/10.1007/S11103-018-0734-9>
- Elbaz-Alon, Y., Rosenfeld-Gur, E., Shinder, V., Futerman, A. H., Geiger, T., & Schuldiner, M. (2014). A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Developmental Cell*, 30(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2014.06.007>
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* 2007 2:4, 2(4), 953–971. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.131>
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W., & Ettema, T. J. G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(12), 711–723. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2017.133>
- Englmeier, R., Pfeffer, S., & Förster, F. (2017). Structure of the Human Mitochondrial Ribosome Studied in Situ by Cryoelectron Tomography. *Structure*, 25(10), 1574–1581.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.07.011>
- Facey, S. J., Neugebauer, S. A., Krauss, S., & Kuhn, A. (2007). The mechanosensitive channel protein MscL is targeted by the SRP to the novel YidC membrane insertion pathway of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 365(4), 995–1004. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.10.083>

- Falk, S., Ravaud, S., Koch, J., & Sinning, I. (2010). The C terminus of the Alb3 membrane insertase recruits cpSRP43 to the thylakoid membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(8), 5954–5962. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.084996>
- Feagin, J. E., Harrell, M. I., Lee, J. C., Coe, K. J., Sands, B. H., Cannone, J. J., Tami, G., Schnare, M. N., & Gutell, R. R. (2012). The Fragmented Mitochondrial Ribosomal RNAs of *Plasmodium falciparum*. *PLOS ONE*, 7(6), e38320. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0038320>
- Fey, J., Dietrich, A., Cosset, A., Desprez, T., & Maréchal-Drouard, L. (1997). Evolutionary aspects of “chloroplast-like” trnN and trnH expression in higher-plant mitochondria. *Current Genetics* 1997 32:5, 32(5), 358–360. <https://doi.org/10.1007/S002940050288>
- Fey, J., & Maréchal-Drouard, L. (1999). Compilation and analysis of plant mitochondrial promoter sequences: An illustration of a divergent evolution between monocot and dicot mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256(2), 409–414. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1999.0349>
- Fiumera, H. L., Broadley, S. A., & Fox, T. D. (2007). Translocation of mitochondrially synthesized Cox2 domains from the matrix to the intermembrane space. *Molecular and Cellular Biology*, 27(13), 4664–4673. <https://doi.org/10.1128/MCB.01955-06>
- Fiumera, H. L., Dunham, M. J., Saracco, S. A., Butler, C. A., Kelly, J. A., & Fox, T. D. (2009). Translocation and assembly of mitochondrially coded *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit Cox2 by Oxa1 and Yme1 in the absence of Cox18. *Genetics*, 182(2), 519–528. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.109.101196>
- Forner, J., Weber, B., Thus, S., Wildum, S., & Binder, S. (2007). Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: t-elements contribute to 5' and 3' end formation. *Nucleic Acids Research*, 35(11), 3676. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM270>
- Funes, S., Nargang, F. E., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2004). The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Molecular Biology of the Cell*, 15(4), 1853–1861. <https://doi.org/10.1091/MBC.E03-11-0789>
- Gagliardi, D., & Leaver, C. J. (1999). Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *The EMBO Journal*, 18(13), 3757–3766. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.13.3757>
- Gaur, R., Grasso, D., Datta, P. P., Krishna, P. D. V., Das, G., Spencer, A., Agrawal, R. K., Spremulli, L., & Varshney, U. (2008). A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Molecular Cell*, 29(2), 180–190. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.11.021>
- Gerdes, L., Bals, T., Klostermann, E., Karl, M., Philippar, K., Hünken, M., Soll, J., & Schünemann, D. (2006). A second thylakoid membrane-localized Alb3/Oxa1/YidC homologue is involved in proper chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16632–16642. <https://doi.org/10.1074/JBC.M513623200>
- Giege, P., & Brennicke, A. (1999). RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U

- changes in ORFs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15324–15329. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.26.15324>
- Giegé, P., Sweetlove, L. J., Cognat, V., & Leaver, C. J. (2005). Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(5), 1497–1512. <https://doi.org/10.1105/TPC.104.030254>
- Gobert, A., Gutmann, B., Taschner, A., Göringer, M., Holzmann, J., Hartmann, R. K., Rossmannith, W., & Giegé, P. (2010). A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(6), 740–744. <https://doi.org/10.1038/NSMB.1812>
- Gobert, A., Pinker, F., Fuchsbaauer, O., Gutmann, B., Boutin, R., Roblin, P., Sauter, C., & Giegé, P. (2013). Structural insights into protein-only RNase P complexed with tRNA. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS2358>
- Göhre, V., Ossenbühl, F., Crèvecoeur, M., Eichacker, L. A., & Rochaix, J. D. (2006). One of two alb3 proteins is essential for the assembly of the photosystems and for cell survival in Chlamydomonas. *The Plant Cell*, 18(6), 1454–1466. <https://doi.org/10.1105/TPC.105.038695>
- Gold, V. A., Chroscicki, P., Bragoszewski, P., & Chacinska, A. (2017). Visualization of cytosolic ribosomes on the surface of mitochondria by electron cryo-tomography. *EMBO Reports*, 18(10), 1786–1800. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201744261>
- Goldschmidt-Reisin, S., Kitakawa, M., Herfurth, E., Wittmann-Liebold, B., Grohmann, L., & Graack, H. R. (1998). Mammalian mitochondrial ribosomal proteins. N-terminal amino acid sequencing, characterization, and identification of corresponding gene sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 34828–34836. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.52.34828>
- Graves, P. V., Bégu, D., Velours, J., Neau, E., Belloc, F., Litvak, S., & Araya, A. (1990). Direct protein sequencing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9 confirms RNA editing in plants. *Journal of Molecular Biology*, 214(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90138-C](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90138-C)
- Gray, M. W. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A011403>
- Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5407), 1476–1481. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.283.5407.1476>
- Greber, B. J., & Ban, N. (2016). Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 103–132. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014343>
- Greber, B. J., Bieri, P., Leibundgut, M., Leitner, A., Aebersold, R., Boehringer, D., & Ban, N. (2015). Ribosome. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6232), 303–308. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA3872>
- Greber, B. J., Boehringer, D., Leitner, A., Bieri, P., Voigts-Hoffmann, F., Erzberger, J. P., Leibundgut, M., Aebersold, R., & Ban, N. (2014). Architecture of the large subunit of the

- mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*, 505(7484), 515–519.
<https://doi.org/10.1038/NATURE12890>
- Griparic, L., & Van Der Bliek, A. M. (2001). The Many Shapes of Mitochondrial Membranes. *Traffic*, 2(4), 235–244. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0854.2001.1R008.X>
- Grohmann, L., Thieck, O., Herz, U., Schröder, W., & Brennicke, A. (1994). Translation of nad9 mRNAs in mitochondria from *Solanum tuberosum* is restricted to completely edited transcripts. *Nucleic Acids Research*, 22(16), 3304–3311.
<https://doi.org/10.1093/NAR/22.16.3304>
- Gualberto, J. M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J. H., & Grienenberger, J. M. (1989). RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* 1989 341:6243, 341(6243), 660–662. <https://doi.org/10.1038/341660a0>
- Gualberto, J. M., & Newton, K. J. (2017). Plant Mitochondrial Genomes: Dynamics and Mechanisms of Mutation. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 225–252.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-043015-112232>
- Gualerzi, C. O., & Pon, C. L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry*, 29(25), 5881–5889. <https://doi.org/10.1021/BI00477A001>
- Güngör, B., Flohr, T., Garg, S. G., & Herrmann, J. M. (2022). The ER membrane complex (EMC) can functionally replace the Oxa1 insertase in mitochondria. *PLoS Biology*, 20(3).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3001380>
- Gully, B. S., Shah, K., Lee, M., Shearston, K. S., Smith, N., Sadowska, A., Blythe, A., Bernath-Levin, K., Stanley, W., Small, I. Bond, C., & Australia, W., Biological Crystallography The design and structural characterization of a synthetic pentatricopeptide repeat protein. (2357) <https://doi.org/10.1107/S1399004714024869>.
- Guo, H., & Rubinstein, J. L. (2018). Cryo-EM of ATP synthases. *Current Opinion in Structural Biology*, 52, 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2018.08.005>
- Hahn, A., Parey, K., Bublitz, M., Mills, D. J., Zickermann, V., Vonck, J., Kühlbrandt, W., & Meier, T. (2016). Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Molecular Cell*, 63(3), 445–456.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.05.037>
- Haïli, N., Arnal, N., Quadrado, M., Amiar, S., Tcherkez, G., Dahan, J., Briozzo, P., Colas Des Francs-Small, C., Vrielynck, N., & Mireau, H. (2013). The pentatricopeptide repeat MTSF1 protein stabilizes the nad4 mRNA in Arabidopsis mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 41(13), 6650–6663. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT337>
- Haïli, N., Planchar, N., Arnal, N., Quadrado, M., Vrielynck, N., Dahan, J., des Francs-Small, C., & Mireau, H. (2016). The MTL1 Pentatricopeptide Repeat Protein Is Required for Both Translation and Splicing of the Mitochondrial NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT7 mRNA in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 170(1), 354–366.
<https://doi.org/10.1104/PP.15.01591>
- Hamel, P., Sakamoto, W., Wintz, H., & Dujardin, G. (1997). Functional complementation of an oxa1- yeast mutation identifies an Arabidopsis thaliana cDNA involved in the assembly of respiratory complexes. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*,

- 12(6), 1319–1327. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1997.12061319.X>
- Hammani, K., & Giegé, P. (2014). RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends in Plant Science*, 19(6), 380–389. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2013.12.008>
- Hancock, K., & Hajduk, S. L. (1990). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* The Mitochondrial tRNAs of *Trypanosoma brucei* Are Nuclear Encoded*. 265(31), 19208–19215. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30645-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30645-2)
- Hao, W., Richardson, A. O., Zheng, Y., & Palmer, J. D. (2010). Gorgeous mosaic of mitochondrial genes created by horizontal transfer and gene conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21576–21581. https://doi.org/10.1073/PNAS.1016295107/SUPPL_FILE/SAPP.PDF
- Hasona, A., Crowley, P. J., Levesque, C. M., Mair, R. W., Cvitkovitch, D. G., Bleiweis, A. S., & Brady, L. J. (2005). Streptococcal viability and diminished stress tolerance in mutants lacking the signal recognition particle pathway or YidC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48), 17466–17471. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0508778102>
- Hauler, A., Jonietz, C., Stoll, B., Stoll, K., Braun, H. P., & Binder, S. (2013). RNA Processing Factor 5 is required for efficient 5' cleavage at a processing site conserved in RNAs of three different mitochondrial genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 74(4), 593–604. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12143>
- He, S., & Fox, T. D. (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Molecular Biology of the Cell*, 8(8), 1449–1460. <https://doi.org/10.1091/MBC.8.8.1449>
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Letters*, 418(3), 367–370. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01412-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01412-9)
- Hell, K., Neupert, W., & Stuart, R. A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *The EMBO Journal*, 20(6), 1281–1288. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.6.1281>
- Hennon, S. W., & Dalbey, R. E. (2014). Cross-linking-based flexibility and proximity relationships between the TM segments of the *Escherichia coli* YidC. *Biochemistry*, 53(20), 3278–3286. <https://doi.org/10.1021/BI500257U>
- Herbert, C. J., Golik, P., & Bonnefoy, N. (2013). Yeast PPR proteins, watchdogs of mitochondrial gene expression. *RNA Biology*, 10(9), 1477. <https://doi.org/10.4161/RNA.25392>
- Herrmann, J. M., & Bonnefoy, N. (2004). Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(4), 2507–2512. <https://doi.org/10.1074/JBC.M310468200>
- Hoch, F. L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochimica et Biophysica Acta*,

- 1113(1), 71–133. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(92\)90035-9](https://doi.org/10.1016/0304-4157(92)90035-9)
- Hodge, T., & Colombini, M. (1997). Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *The Journal of Membrane Biology*, 157(3), 271–279. <https://doi.org/10.1007/S002329900235>
- Holec, S., Lange, H., Kühn, K., Alioua, M., Börner, T., & Gagliardi, D. (2006). Relaxed Transcription in Arabidopsis Mitochondria Is Counterbalanced by RNA Stability Control Mediated by Polyadenylation and Polynucleotide Phosphorylase. *Molecular and Cellular Biology*, 26(7), 2869. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.7.2869-2876.2006>
- Horn, R., Gupta, K. J., & Colombo, N. (2014). Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility. *Mitochondrion*, 19 Pt B(PB), 198–205. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2014.04.004>
- Huchon, D., Szitenberg, A., Shefer, S., Ilan, M., & Feldstein, T. (2015). Mitochondrial group I and group II introns in the sponge orders Agelasida and Axinellida. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12862-015-0556-1>
- Itoh, Y., Andréll, J., Choi, A., Richter, U., Maiti, P., Best, R. B., Barrientos, A., Battersby, B. J., & Amunts, A. (2021). Mechanism of membrane-tethered mitochondrial protein synthesis. *Science*, 371(6531), 846–849. <https://doi.org/10.1126/science.abe0763>
- Jia, L., Dienhart, M., Schrap, M., McCauley, M., Hell, K., & Stuart, R. A. (2003). Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *The EMBO Journal*, 22(24), 6438–6447. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG624>
- Jia, L., Kaur, J., & Stuart, R. A. (2009). Mapping of the *Saccharomyces cerevisiae* Oxa1-mitochondrial ribosome interface and identification of MrpL40, a ribosomal protein in close proximity to Oxa1 and critical for oxidative phosphorylation complex assembly. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1792–1802. <https://doi.org/10.1128/EC.00219-09>
- Jiang, F., Chen, M., Yi, L., De Gier, J. W., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2003). Defining the regions of *Escherichia coli* YidC that contribute to activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48965–48972. <https://doi.org/10.1074/JBC.M307362200>
- Jiang, F., Yi, L., Moore, M., Chen, M., Rohl, T., Van Wijk, K. J., De Gier, J. W. L., Henry, R., & Dalbey, R. E. (2002). Chloroplast YidC homolog Albino3 can functionally complement the bacterial YidC depletion strain and promote membrane insertion of both bacterial and chloroplast thylakoid proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19281–19288. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110857200>
- Jouhet, J., Gros, V., & Michaud, M. (2019). Measurement of Lipid Transport in Mitochondria by the MTL Complex. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1949, 69–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9136-5_7
- Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J., & Block, M. A. (2004). Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 167(5), 863–874. <https://doi.org/10.1083/JCB.200407022>
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S. C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L. D., Herman, E. K., Soukal, P., Hroudová, M., Doležal, P., Stairs, C. W., Roger, A. J., Eliáš, M., Dacks, J. B., Vlček, Č., & Hampl, V. (2016). A Eukaryote

- without a Mitochondrial Organelle. *Current Biology : CB*, 26(10), 1274–1284.
<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2016.03.053>
- Kaur, J., & Stuart, R. A. (2011). Truncation of the Mrp20 protein reveals new ribosome-assembly subcomplex in mitochondria. *EMBO Reports*, 12(9), 950–955.
<https://doi.org/10.1038/EMBOR.2011.133>
- Kedrov, A., Sustarsic, M., De Keyzer, J., Caumanns, J. J., Wu, Z. C., & Driessen, A. J. M. (2013). Elucidating the native architecture of the YidC: ribosome complex. *Journal of Molecular Biology*, 425(22), 4112–4124. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2013.07.042>
- Keil, M., Bareth, B., Woellhaf, M. W., Peleh, V., Prestele, M., Rehling, P., & Herrmann, J. M. (2012). Oxa1-ribosome complexes coordinate the assembly of cytochrome C oxidase in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34484–34493.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M112.382630>
- Kirby, L. E., & Koslowsky, D. (2017). Mitochondrial dual-coding genes in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005989>
- Kitakawa, M., Graack, H. R., Grohmann, L., Goldschmidt-Reisin, S., Herfurth, E., Wittmann-Liebold, B., Nishimura, T., & Isono, K. (1997). Identification and characterization of the genes for mitochondrial ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 245(2), 449–456. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1997.T01-2-00449.X>
- Klostermann, E., Gen Helling, I. D., Carde, J. P., & Schünemann, D. (2002). The thylakoid membrane protein ALB3 associates with the cpSecY-translocase in *Arabidopsis thaliana*. *The Biochemical Journal*, 368(Pt 3), 777–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20021291>
- Koc, E. C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moseley, A., Koc, H., & Spremulli, L. L. (2000). A proteomics approach to the identification of mammalian mitochondrial small subunit ribosomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32585–32591.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M003596200>
- Koc, E. C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moyer, M. B., Schlatzer, D. M., Moseley, A., & Spremulli, L. L. (2001). The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43958–43969. <https://doi.org/10.1074/JBC.M106510200>
- Koehler, C. M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R. J., & Schatz, G. (1998). Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), 369–373.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.279.5349.369>
- Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C., & Ban, N. (2009). YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Molecular Cell*, 34(3), 344–353. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.04.019>
- Kol, S., Majczak, W., Heerlien, R., van der Berg, J. P., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2009). Subunit a of the F(1)F(0) ATP synthase requires YidC and SecYEG for membrane insertion. *Journal of Molecular Biology*, 390(5), 893–901.

- <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2009.05.074>
- Kolitz, S. E., & Lorsch, J. R. (2010). Eukaryotic initiator tRNA: finely tuned and ready for action. *FEBS Letters*, *584*(2), 396–404. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2009.11.047>
- Koppen, M., & Langer, T. (2007). Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *42*(3), 221–242. <https://doi.org/10.1080/10409230701380452>
- Kühlbrandt, W. (2014). Biochemistry. The resolution revolution. *Science (New York, N.Y.)*, *343*(6178), 1443–1444. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1251652>
- Kühn, K., Weihe, A., & Börner, T. (2005). Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, *33*(1), 337–346. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI179>
- Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K. I., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A. D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T., & Nureki, O. (2014). Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature*, *509*(7501), 516–519. <https://doi.org/10.1038/NATURE13167>
- Kumazaki, K., Kishimoto, T., Furukawa, A., Mori, H., Tanaka, Y., Dohmae, N., Ishitani, R., Tsukazaki, T., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Escherichia coli YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Scientific Reports*, *4*. <https://doi.org/10.1038/SREP07299>
- Kummer, E., Leibundgut, M., Rackham, O., Lee, R. G., Boehringer, D., Filipovska, A., & Ban, N. (2018). Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM. *Nature* *2018* *560*:7717, *560*(7717), 263–267. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0373-y>
- Kuzmenko, A., Atkinson, G. C., Levitskii, S., Zenkin, N., Tenson, T., Haurlyliuk, V., & Kamenski, P. (2014). Mitochondrial translation initiation machinery: conservation and diversification. *Biochimie*, *100*(100), 132–140. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2013.07.024>
- Kwasniak-Owczarek, M., Kazmierczak, U., Tomal, A., MacKiewicz, P., & Janska, H. (2019). Deficiency of mitoribosomal S10 protein affects translation and splicing in Arabidopsis mitochondria. *Nucleic Acids Research*, *47*(22), 11790–11806. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ1069>
- Lafontaine, D. L. J., & Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *2*(7), 514–520. <https://doi.org/10.1038/35080045>
- Lane, N. (2011). Energetics and genetics across the prokaryote-eukaryote divide. *Biology Direct*, *6*(1), 1–31. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-35/FIGURES/4>
- Lane, N. (2017). Serial endosymbiosis or singular event at the origin of eukaryotes? *Journal of Theoretical Biology*, *434*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2017.04.031>
- Lane, N., & Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, *467*(7318), 929–934. <https://doi.org/10.1038/NATURE09486>
- Lang, B. F., Burger, G., O’Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D.,

- Turmel, M., & Gray, M. W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, *387*(6632), 493–497. <https://doi.org/10.1038/387493A0>
- Lee, R. G., Gao, J., Siira, S. J., Shearwood, A. M., Ermer, J. A., Hofferek, V., Mathews, J. C., Zheng, M., Reid, G. E., Rackham, O., & Filipovska, A. (2020). Cardiolipin is required for membrane docking of mitochondrial ribosomes and protein synthesis. *Journal of Cell Science*, *133*(14). <https://doi.org/10.1242/JCS.240374>
- Lemaire, C., Guibet-Grandmougin, F., Angles, D., Dujardin, G., & Bonnefoy, N. (2004). A yeast mitochondrial membrane methyltransferase-like protein can compensate for oxa1 mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 47464–47472. <https://doi.org/10.1074/JBC.M404861200>
- Liere, K., Weihe, A., & Börner, T. (2011). The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *Journal of Plant Physiology*, *168*(12), 1345–1360. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2011.01.005>
- Lightowers, R. N., & Chrzanowska-Lightowers, Z. M. A. (2013). Human pentatricopeptide proteins: only a few and what do they do? *RNA Biology*, *10*(9), 1433–1438. <https://doi.org/10.4161/RNA.24770>
- Lu, B., & Hanson, M. R. (1994). A single homogeneous form of ATP6 protein accumulates in petunia mitochondria despite the presence of differentially edited atp6 transcripts. *The Plant Cell*, *6*(12), 1955–1968. <https://doi.org/10.1105/TPC.6.12.1955>
- Mai, N., Chrzanowska-Lightowers, Z. M. A., & Lightowers, R. N. (2017). The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell and Tissue Research*, *367*(1), 5–20. <https://doi.org/10.1007/S00441-016-2456-0>
- Maier, U. G., Bozarth, A., Funk, H. T., Zauner, S., Rensing, S. A., Schmitz-Linneweber, C., Börner, T., & Tillich, M. (2008). Complex chloroplast RNA metabolism: just debugging the genetic programme? *BMC Biology*, *6*. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-36>
- Malek, O., & Knoop, V. (1998). Trans-splicing group II introns in plant mitochondria: the complete set of cis-arranged homologs in ferns, fern allies, and a hornwort. *RNA (New York, N.Y.)*, *4*(12), 1599–1609. <https://doi.org/10.1017/S1355838298981262>
- Mariappan, M., Mateja, A., Dobosz, M., Bove, E., Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2011). The mechanism of membrane-associated steps in tail-anchored protein insertion. *Nature*, *477*(7362), 61–69. <https://doi.org/10.1038/NATURE10362>
- Marienfeld, J., Unseld, M., & Brennicke, A. (1999). The mitochondrial genome of Arabidopsis is composed of both native and immigrant information. *Trends in Plant Science*, *4*(12), 495–502. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01502-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01502-2)
- Martijn, J., Vosseberg, J., Guy, L., Offre, P., & Ettema, T. J. G. (2018). Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature* *2018* *557*:7703, *557*(7703), 101–105. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0059-5>
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., & Penny, D. (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial

- genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12246–12251.
https://doi.org/10.1073/PNAS.182432999/SUPPL_FILE/4329TABLE5.PDF
- McDowell, M. A., Heimes, M., Fiorentino, F., Mehmood, S., Farkas, Á., Coy-Vergara, J., Wu, D., Bolla, J. R., Schmid, V., Heinze, R., Wild, K., Flemming, D., Pfeffer, S., Schwappach, B., Robinson, C. V., & Sinning, I. (2020). Structural Basis of Tail-Anchored Membrane Protein Biogenesis by the GET Insertase Complex. *Molecular Cell*, 80(1), 72–86.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.08.012>
- McGilvray, P. T., Anghel, S. A., Sundaram, A., Zhong, F., Trnka, M. J., Fuller, J. R., Hu, H., Burlingame, A. L., & Keenan, R. J. (2020). An ER translocon for multi-pass membrane protein biogenesis. *ELife*, 9, 1–43. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56889>
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau De Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), 560–567. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2313>
- Merrick, W. C. (2004). Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene*, 332(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.02.051>
- Mihara, K., & Sato, R. (1985). Molecular cloning and sequencing of cDNA for yeast porin, an outer mitochondrial membrane protein: a search for targeting signal in the primary structure. *The EMBO Journal*, 4(3), 769. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1985.TB03695.X>
- Millar, H., Considine, M. J., Day, D. A., & Whelan, J. (2001). Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants. *IUBMB Life*, 51(4), 201–205.
<https://doi.org/10.1080/152165401753311735>
- Miller-Vedam, L. E., Bräuning, B., Popova, K. D., Oakdale, N. T. S., Bonnar, J. L., Prabu, J. R., Boydston, E. A., Sevillano, N., Shurtleff, M. J., Stroud, R. M., Craik, C. S., Schulman, B. A., Frost, A., & Weissman, J. S. (2020). Structural and mechanistic basis of the EMC-dependent biogenesis of distinct transmembrane clients. *ELife*, 9, 1–124.
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.62611>
- Miranda, R. G., McDermott, J. J., & Barkan, A. (2018). RNA-binding specificity landscapes of designer pentatricopeptide repeat proteins elucidate principles of PPR-RNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 46(5), 2613–2623.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1288>
- Moore, M., Goforth, R. L., Mori, H., & Henry, R. (2003). Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required. *The Journal of Cell Biology*, 162(7), 1245–1254. <https://doi.org/10.1083/JCB.200307067>
- Moore, M., Harrison, M. S., Peterson, E. C., & Henry, R. (2000). Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1529–1532. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.3.1529>
- Mori, H., Summer, E. J., Ma, X., & Cline, K. (1999). Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *The Journal of Cell Biology*,

- 146(1), 45–55. <https://doi.org/10.1083/JCB.146.1.45>
- Mueller, S. J., & Reski, R. (2015). Mitochondrial dynamics and the ER: The plant perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(DEC), 78. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2015.00078/BIBTEX>
- Mühleip, A. W., Joos, F., Wigge, C., Frangakis, A. S., Kühlbrandt, W., & Davies, K. M. (2016). Helical arrays of U-shaped ATP synthase dimers form tubular cristae in ciliate mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(30), 8442–8447. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1525430113>
- Myasnikov, A. G., Simonetti, A., Marzi, S., & Klaholz, B. P. (2009). Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(3), 300–309. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2009.04.010>
- Nosek, J., & Tomáška, L. (2003). Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Current Genetics*, 44(2), 73–84. <https://doi.org/10.1007/S00294-003-0426-Z>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.02.035>
- O’donnell, J. P., Phillips, B. P., Yagita, Y., Juszkiwicz, S., Wagner, A., Malinverni, D., Keenan, R. J., Miller, E. A., & Hegde, R. S. (2020). The architecture of EMC reveals a path for membrane protein insertion. *ELife*, 9, 1–56. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.57887>
- O’Toole, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M., & Small, I. (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 25(6), 1120–1128. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSN057>
- Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R., & Attardi, G. (1980). The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell*, 22(2 Pt 2), 393–403. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90350-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90350-5)
- Oldenkott, B., Burger, M., Hein, A. C., Jörg, A., Senkler, J., Braun, H. P., Knoop, V., Takenaka, M., & Schallenberg-Rüdinger, M. (2020). One C-to-U RNA Editing Site and Two Independently Evolved Editing Factors: Testing Reciprocal Complementation with DYW-Type PPR Proteins from the Moss Physcomitrium (Physcomitrella) patens and the Flowering Plants Macadamia integrifolia and Arabidopsis. *The Plant Cell*, 32(9), 2997–3018. <https://doi.org/10.1105/TPC.20.00311>
- Oliver, D. C., & Paetzel, M. (2008). Crystal structure of the major periplasmic domain of the bacterial membrane protein assembly facilitator YidC. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 5208–5216. <https://doi.org/10.1074/JBC.M708936200>
- Omura, T. (1998). Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. *Journal of Biochemistry*, 123(6), 1010–1016. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A022036>
- Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 77–101. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014334>

- Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N., & Herrmann, J. M. (2006). Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *The EMBO Journal*, *25*(8), 1603–1610. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601070>
- Palade, G. E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *1*(1), 59–68. <https://doi.org/10.1083/JCB.1.1.59>
- Park, J., Xi, H., & Kim, Y. (2021). The complete mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) isolated in Korea. *Korean Journal of Plant Taxonomy*, *51*(2), 176–180. <https://doi.org/10.11110/kjpt.2021.51.2.176>
- Pasch, J. C., Nickelsen, J., & Schünemann, D. (2005). The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *69*(4), 440–447. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0029-3>
- Pearce, S. F., Rebelo-Guimar, P., D'Souza, A. R., Powell, C. A., Van Haute, L., & Minczuk, M. (2017). Regulation of Mammalian Mitochondrial Gene Expression: Recent Advances. *Trends in Biochemical Sciences*, *42*(8), 625–639. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2017.02.003>
- Perrin, R., Lange, H., Grienemberger, J. M., & Gagliardi, D. (2004). AtmtPNPase is required for multiple aspects of the 18S rRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *Nucleic Acids Research*, *32*(17), 5174–5182. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH852>
- Pfeffer, S., Woellhaf, M. W., Herrmann, J. M., & Förster, F. (2015). Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS7019>
- Phreaner, C. G., Williams, M. A., & Mulligan, R. M. (1996). Incomplete editing of rps12 transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria. *The Plant Cell*, *8*(1), 107–117. <https://doi.org/10.1105/TPC.8.1.107>
- Pinker, F., Schelcher, C., Fernandez-Millan, P., Gobert, A., Birck, C., Thureau, A., Roblin, P., Giegé, P., & Sauter, X. C. (2017). Biophysical analysis of *Arabidopsis* protein-only RNase P alone and in complex with tRNA provides a refined model of tRNA binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(34), 13904–13913. <https://doi.org/10.1074/JBC.M117.782078>
- Planchar, N., Bertin, P., Quadrado, M., Dargel-Graffin, C., Hatin, I., Namy, O., & Mireau, H. (2018). The translational landscape of *Arabidopsis* mitochondria. *Nucleic Acids Research*, *46*(12), 6218–6228. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY489>
- Pleiner, T., Tomaleri, G. P., Januszyk, K., Inglis, A. J., Hazu, M., & Voorhees, R. M. (2020). Structural basis for membrane insertion by the human ER membrane protein complex. *Science (New York, N.Y.)*, *369*(6502), 433–436. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB5008>
- Preuss, M., Ott, M., Funes, S., Luirink, J., & Herrmann, J. M. (2005). Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC. Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(13), 13004–13011. <https://doi.org/10.1074/JBC.M414093200>
- Price, C. E., & Driessen, A. J. M. (2010). Conserved negative charges in the transmembrane

- segments of subunit K of the NADH:ubiquinone oxidoreductase determine its dependence on YidC for membrane insertion. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(6), 3575–3581. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.051128>
- Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G., & Barkan, A. (2011). Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(1), 415–420. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1012076108/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201012076SI.PDF>
- Pusnik, M., Small, I., Read, L. K., Fabbro, T., & Schneider, A. (2007). Pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei* function in mitochondrial ribosomes. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(19), 6876–6888. <https://doi.org/10.1128/MCB.00708-07>
- Ramrath, D. J. F., Niemann, M., Leibundgut, M., Bieri, P., Prange, C., Horn, E. K., Leitner, A., Boehringer, D., Schneider, A., & Ban, N. (2018). Evolutionary shift toward protein-based architecture in trypanosomal mitochondrial ribosomes. *Science (New York, N.Y.)*, *362*(6413). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU7735>
- Ravaud, S., Stjepanovic, G., Wild, K., & Sinning, I. (2008). The crystal structure of the periplasmic domain of the *Escherichia coli* membrane protein insertase YidC contains a substrate binding cleft. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(14), 9350–9358. <https://doi.org/10.1074/JBC.M710493200>
- Roll-Mecak, A., Shin, B. S., Dever, T. E., & Burley, S. K. (2001). Engaging the ribosome: universal IFs of translation. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*(12), 705–709. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)02024-2)
- Rugen, N., Straube, H., Franken, L. E., Braun, H.-P., & Eubel, H. (2019). Correction: Complexome Profiling Reveals Association of PPR Proteins with Ribosomes in the Mitochondria of Plants. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *18*(8), 1704. <https://doi.org/10.1074/mcp.AAC119.001674>
- Sääf, A., Monné, M., De Gier, J. W., & Von Heijne, G. (1998). Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(46), 30415–30418. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.46.30415>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, *14*(3). [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Sakamoto, W., Spielewoy, N., Bonnard, G., Murata, M., & Wintz, H. (2000). Mitochondrial localization of AtOXA1, an arabidopsis homologue of yeast Oxa1p involved in the insertion and assembly of protein complexes in mitochondrial inner membrane. *Plant & Cell Physiology*, *41*(10), 1157–1163. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCD045>
- Salinas-Giegé, T., Cavaiuolo, M., Cognat, V., Ubrig, E., Remacle, C., Duchêne, A. M., Vallon, O., & Maréchal-Drouard, L. (2017). Polycytidylation of mitochondrial mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Research*, *45*(22), 12963. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX903>
- Salinas-Giegé, T., Giegé, R., & Giegé, P. (2015). tRNA Biology in Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(3), 4518. <https://doi.org/10.3390/IJMS16034518>

- Salinas, T., Duchêne, A. M., & Maréchal-Drouard, L. (2008). Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(7), 320–329. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2008.04.010>
- Samuelson, J. C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., De Gier, J. W., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2001). Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in Escherichia coli: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34847–34852. <https://doi.org/10.1074/JBC.M105793200>
- Saracco, S. A., & Fox, T. D. (2002). Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded Saccharomyces cerevisiae Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1122–1131. <https://doi.org/10.1091/MBC.01-12-0580>
- Schaefer, B., Sun, W., Li, Y. S., Fang, L., & Chen, W. (2018). The evolution of posttranscriptional regulation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 9(5). <https://doi.org/10.1002/WRNA.1485>
- Schuenemann, D., Gupta, S., Persello-Cartieaux, F., Klimyuk, V. I., Jones, J. D. G., Nussaume, L., & Hoffman, N. E. (1998). A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 10312–10316. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.17.10312>
- Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., De Gier, J. W. L., Von Heijne, G., Van Der Does, C., Driessen, A. J. M., Oudega, B., & Lührink, J. (2000). YidC, the Escherichia coli homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *The EMBO Journal*, 19(4), 542–549. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.4.542>
- Seitl, I., Wickles, S., Beckmann, R., Kuhn, A., & Kiefer, D. (2014). The C-terminal regions of YidC from Rhodospirillum rubrum and Oceanicaulis alexandrii bind to ribosomes and partially substitute for SRP receptor function in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 91(2), 408–421. <https://doi.org/10.1111/MMI.12465>
- Sharma, M. R., Booth, T. M., Simpson, L., Maslov, D. A., & Agrawal, R. K. (2009). Structure of a mitochondrial ribosome with minimal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(24), 9637–9642. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0901631106>
- Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., & Agrawal, R. K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, 115(1), 97–108. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00762-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00762-1)
- Shen, C., Zhang, D., Guan, Z., Liu, Y., Yang, Z., Yang, Y., Wang, X., Wang, Q., Zhang, Q. X., Fan, S., Zou, T., & Yin, P. (2016). Structural basis for specific single-stranded RNA recognition by designer pentatricopeptide repeat proteins. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS11285>
- Shikanai, T., & Okuda, K. (2011). In vitro RNA-binding assay for studying trans-factors for RNA

- editing in chloroplasts. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 774, 199–208.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-234-2_13
- Shine, J., & Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), 1342–1346.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.71.4.1342>
- Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W., & Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 1996 384:6609, 384(6609), 582–585. <https://doi.org/10.1038/384582a0>
- Sloan, D. B., Alverson, A. J., Chuckalovcak, J. P., Wu, M., McCauley, D. E., Palmer, J. D., & Taylor, D. R. (2012). Rapid Evolution of Enormous, Multichromosomal Genomes in Flowering Plant Mitochondria with Exceptionally High Mutation Rates. *PLOS Biology*, 10(1), e1001241. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001241>
- Sloan, D. B., Wu, Z., & Sharbrough, J. (2018). Correction of Persistent Errors in Arabidopsis Reference Mitochondrial Genomes. *The Plant Cell*, 30(3), 525–527.
<https://doi.org/10.1105/TPC.18.00024>
- Small, I. D., & Peeters, N. (2000). The PPR motif - A TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2), 45–47.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01520-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01520-0)
- Small, I. D., Schallenberg-Rüdinger, M., Takenaka, M., Mireau, H., & Ostersetzer-Biran, O. (2020). Plant organellar RNA editing: what 30 years of research has revealed. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 101(5), 1040–1056.
<https://doi.org/10.1111/TPJ.14578>
- Smirnov, A., Entelis, N., Martin, R. P., & Tarassov, I. (2011). Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18. *Genes & Development*, 25(12), 1289–1305. <https://doi.org/10.1101/GAD.624711>
- Smith, D. R., Hua, J., & Lee, R. W. (2010). Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of *Polytomella*. *Current Genetics*, 56(5), 427–438.
<https://doi.org/10.1007/S00294-010-0311-5>
- Smits, P., Smeitink, J. A. M., van den Heuvel, L. P., Huynen, M. A., & Ettema, T. J. G. (2007). Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome. *Nucleic Acids Research*, 35(14), 4686–4703. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM441>
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Myers, R. S., Hamel, P., & Barrientos, A. (2012). A Heme-Sensing Mechanism in the Translational Regulation of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis. *Cell Metabolism*, 16(6), 801. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2012.10.018>
- Spence, E., Bailey, S., Nenninger, A., Møller, S. G., & Robinson, C. (2004). A homolog of Albino3/Oxal is essential for thylakoid biogenesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55792–55800.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M411041200>
- Stefer, S., Reitz, S., Wang, F., Wild, K., Pang, Y. Y., Schwarz, D., Bomke, J., Hein, C., Löhr, F., Bernhard, F., Denic, V., Dötsch, V., & Sinning, I. (2011). Structural basis for tail-anchored

- membrane protein biogenesis by the Get3-receptor complex. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6043), 758–762. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1207125>
- Stoll, B., & Binder, S. (2016). Two NYN domain containing putative nucleases are involved in transcript maturation in Arabidopsis mitochondria. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 85(2), 278–288. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13111>
- Stoll, B., Zendler, D., & Binder, S. (2014). RNA processing factor 7 and polynucleotide phosphorylase are necessary for processing and stability of nad2 mRNA in Arabidopsis mitochondria. *RNA Biology*, 11(7), 968–976. <https://doi.org/10.4161/RNA.29781>
- Suloway, C. J. M., Chartron, J. W., Zaslaver, M., & Clemons, W. M. (2009). Model for eukaryotic tail-anchored protein binding based on the structure of Get3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 14849–14854. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0907522106>
- Sun, T., Bentolila, S., & Hanson, M. R. (2016). The Unexpected Diversity of Plant Organelle RNA Editosomes. *Trends in Plant Science*, 21(11), 962–973. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2016.07.005>
- Sundberg, E., Slagter, J. G., Fridborg, I., Cleary, S. P., Robinson, C., & Coupland, G. (1997). ALBINO3, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *The Plant Cell*, 9(5), 717–730. <https://doi.org/10.1105/TPC.9.5.717>
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *The EMBO Journal*, 22(24), 6448. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG623>
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410(2), 103–123. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)
- Takenaka, M., Takenaka, S., Barthel, T., Frink, B., Haag, S., Verbitskiy, D., Oldenkott, B., Schallenberg-Rüdinger, M., Feiler, C. G., Weiss, M. S., Palm, G. J., & Weber, G. (2021). DYW domain structures imply an unusual regulation principle in plant organellar RNA editing catalysis. *Nature Catalysis* 2021 4:6, 4(6), 510–522. <https://doi.org/10.1038/s41929-021-00633-x>
- Tanaka, Y., Izumioka, A., Abdul Hamid, A., Fujii, A., Haruyama, T., Furukawa, A., & Tsukazaki, T. (2018). 2.8-Å crystal structure of Escherichia coli YidC revealing all core regions, including flexible C2 loop. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(1), 141–145. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.09.043>
- Tjalsma, H., Bron, S., & Van Dijl, J. M. (2003). Complementary impact of paralogous Oxa1-like proteins of Bacillus subtilis on post-translocational stages in protein secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15622–15632. <https://doi.org/10.1074/JBC.M301205200>
- Tobiasson, V., & Amunts, A. (2020). Ciliate mitoribosome illuminates evolutionary steps of mitochondrial translation. *ELife*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.59264>

- Tomal, A., Kwasniak-Owczarek, M., & Janska, H. (2019). An Update on Mitochondrial Ribosome Biology: The Plant Mitoribosome in the Spotlight. *Cells*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/CELLS8121562>
- Unsold, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P., & Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics*, *15*(1), 57–61. <https://doi.org/10.1038/NG0197-57>
- Van Aken, O., & Van Breusegem, F. (2015). Licensed to Kill: Mitochondria, Chloroplasts, and Cell Death. *Trends in Plant Science*, *20*(11), 754–766. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2015.08.002>
- Van Bloois, E., Haan, G. J., De Gier, J. W., Oudega, B., & Luirink, J. (2006). Distinct requirements for translocation of the N-tail and C-tail of the *Escherichia coli* inner membrane protein CyoA. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(15), 10002–10009. <https://doi.org/10.1074/JBC.M511357200>
- Van Bloois, E., Jan Haan, G., De Gier, J. W., Oudega, B., & Luirink, J. (2004). F1F0 ATP synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the *E. coli* inner membrane. *FEBS Letters*, *576*(1–2), 97–100. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.069>
- Van Bloois, E., Nagamori, S., Koningstein, G., Ullers, R. S., Preuss, M., Oudega, B., Harms, N., Kaback, H. R., Herrmann, J. M., & Luirink, J. (2005). The Sec-independent function of *Escherichia coli* YidC is evolutionary-conserved and essential. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(13), 12996–13003. <https://doi.org/10.1074/JBC.M414094200>
- Van Der Laan, M., Nouwen, N. P., & Driessen, A. J. M. (2005). YidC—an evolutionary conserved device for the assembly of energy-transducing membrane protein complexes. *Current Opinion in Microbiology*, *8*(2), 182–187. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2005.02.004>
- Van der Laan, M., Urbanus, M. L., Ten Hagen-Jongman, C. M., Nouwen, N., Oudega, B., Harms, N., Driessen, A. J. M., & Luirink, J. (2003). A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(10), 5801–5806. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0636761100>
- Van Der Sluis, E. O., Bauerschmitt, H., Becker, T., Mielke, T., Frauenfeld, J., Berninghausen, O., Neupert, W., Herrmann, J. M., & Beckmann, R. (2015). Parallel Structural Evolution of Mitochondrial Ribosomes and OXPHOS Complexes. *Genome Biology and Evolution*, *7*(5), 1235–1251. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVV061>
- Vance, J. E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1841*(4), 595–609. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2013.11.014>
- Volkmar, N., Thezenas, M. L., Louie, S. M., Juszkievicz, S., Nomura, D. K., Hegde, R. S., Kessler, B. M., & Christianson, J. C. (2019). The ER membrane protein complex promotes biogenesis of sterol-related enzymes maintaining cholesterol homeostasis. *Journal of Cell Science*, *132*(2). <https://doi.org/10.1242/JCS.223453>
- von Heijne, G. (1986). Why mitochondria need a genome. *FEBS Letters*, *198*(1), 1–4.

- [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81172-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81172-3)
- Waltz, F., Nguyen, T. T., Arrivé, M., Bochler, A., Chicher, J., Hammann, P., Kuhn, L., Quadrado, M., Mireau, H., Hashem, Y., & Giegé, P. (2019). Small is big in Arabidopsis mitochondrial ribosome. *Nature Plants*, 5(1), 106–117. <https://doi.org/10.1038/S41477-018-0339-Y>
- Waltz, F., Salinas-Giegé, T., Englmeier, R., Meichel, H., Soufari, H., Kuhn, L., Pfeffer, S., Förster, F., Engel, B. D., Giegé, P., Drouard, L., & Hashem, Y. (2021). The Chlamydomonas mitochondrial ribosome: how to build a ribosome from RNA fragments. *BioRxiv*, 2021.05.21.445086. <https://doi.org/10.1101/2021.05.21.445086>
- Waltz, F., Soufari, H., Bochler, A., Giegé, P., & Hashem, Y. (2020). Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome. *Nature Plants*, 6(4), 377–383. <https://doi.org/10.1038/S41477-020-0631-5>
- Waltz, F., Giegé, P. & Hashem, Y. Purification and cryo-electron microscopy analysis of plant mitochondrial ribosomes. *Bio-protocol* 11, (2021).
- Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual Review of Genetics*, 43, 95–118. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-102108-134850>
- Wang, F., Whynot, A., Tung, M., & Denic, V. (2011). The mechanism of tail-anchored protein insertion into the ER membrane. *Molecular Cell*, 43(5), 738–750. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.07.020>
- Westhof, E. (2012). Ribozymes, catalytically active RNA molecules. Introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 848, 1–4. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-545-9_1
- Wickles, S., Singharoy, A., Andreani, J., Seemayer, S., Bischoff, L., Berninghausen, O., Soeding, J., Schulten, K., van der Sluis, E. O., & Beckmann, R. (2014). A structural model of the active ribosome-bound membrane protein insertase YidC. *ELife*, 3(July2014), 1–17. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.03035>
- Wolters, J. F., Chiu, K., & Fiumera, H. L. (2015). Population structure of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1664-4>
- Xin, Y., Zhao, Y., Zheng, J., Zhou, H., Zhang, X. C., Tian, C., & Huang, Y. (2018). Structure of YidC from *Thermotoga maritima* and its implications for YidC-mediated membrane protein insertion. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(5), 2411–2421. <https://doi.org/10.1096/FJ.201700893RR>
- Yagi, Y., Hayashi, S., Kobayashi, K., Hirayama, T., & Nakamura, T. (2013). Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in plants. *PLoS One*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0057286>
- Yamamoto, Y., & Sakisaka, T. (2012). Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. *Molecular Cell*, 48(3), 387–397. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.08.028>
- Yan, J., Zhang, Q., & Yin, P. (2018). RNA editing machinery in plant organelles. *Science China. Life Sciences*, 61(2), 162–169. <https://doi.org/10.1007/S11427-017-9170-3>

- Yi, L., Celebi, N., Chen, M., & Dalbey, R. E. (2004). Sec/SRP requirements and energetics of membrane insertion of subunits a, b, and c of the Escherichia coli F₁F₀ ATP synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39260–39267. <https://doi.org/10.1074/JBC.M405490200>
- Yi, L., Jiang, F., Chen, M., Cain, B., Bolhuis, A., & Dalbey, R. E. (2003). YidC is strictly required for membrane insertion of subunits a and c of the F₁F₀ATP synthase and SecE of the SecYEG translocase. *Biochemistry*, 42(35), 10537–10544. <https://doi.org/10.1021/BI034309H>
- Yonath, A. (2009). Large facilities and the evolving ribosome, the cellular machine for genetic-code translation. *Journal of the Royal Society, Interface*, 6 Suppl 5(Suppl 5). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2009.0167.FOCUS>
- Yusupova, G., Jenner, L., Rees, B., Moras, D., & Yusupov, M. (2006). Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome. *Nature*, 444(7117), 391–394. <https://doi.org/10.1038/NATURE05281>
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, Di., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang, A., & Ettema, T. J. G. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 541(7637), 353–358. <https://doi.org/10.1038/NATURE21031>
- Zeng, R., Smith, E., & Barrientos, A. (2018). Yeast Mitoribosome Large Subunit Assembly Proceeds by Hierarchical Incorporation of Protein Clusters and Modules on the Inner Membrane. *Cell Metabolism*, 27(3), 645-656.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2018.01.012>

Annexes

Accession	Description	LogFC	adjp
GST	GST seule	11,65	2,11E-43
tr A0A3P6H7R7 A0A3P6H7R7_BRAOL	Transket_pyr domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BO	1,85	0,15
tr A0A3P6E7J2 A0A3P6E7J2_BRAOL	Transket_pyr domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BO	1,85	0,15
tr A0A3P6AKU1 A0A3P6AKU1_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T17828H PE=3	-2,56	0,20
tr G4XYD7 G4XYD7_BRAOL	ATP synthase subunit alpha OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=atp1 PE=3 SV=	-0,97	0,23
tr A0A3P6AWM7 A0A3P6AWM7_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T17607H PE=3	-1,42	0,23
tr A0A3P6DVV2 A0A3P6DVV2_BRAOL	Aconitate hydratase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC7T41403H PE=3	-2,45	0,23
tr A0A3P5ZZT5 A0A3P5ZZT5_BRAOL	ATP synthase subunit beta OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T12983H PE=3	-0,89	0,40
tr A0A3P6CL19 A0A3P6CL19_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4T26009H PE=3	-1,95	0,42
tr A0A3P6DGJ5 A0A3P6DGJ5_BRAOL	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase OS=Brassica oleracea OX=3712	-1,95	0,42
tr A0A3P6EML4 A0A3P6EML4_BRAOL	Formate dehydrogenase, mitochondrial OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BO	-1,95	0,42
tr A0A3P6CUB7 A0A3P6CUB7_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC2T06601H PE=3	-1,14	0,43
tr A0A3P6DHH2 A0A3P6DHH2_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC2T06978H PE=3	-1,17	0,43
tr A0A3P6CZJ5 A0A3P6CZJ5_BRAOL	NAB domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC2T074	-3,82	0,43
tr A0A3P6F364 A0A3P6F364_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5T29251H PE=3	-3,82	0,43
tr A0A3P6E9J5 A0A3P6E9J5_BRAOL	PORR domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9T5	-1,84	0,49
tr A0A3P6CHY0 A0A3P6CHY0_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4T26688H PE=3	-1,47	0,52
tr A0A3P6EUL9 A0A3P6EUL9_BRAOL	NB-ARC domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC1	3,57	0,53
tr A0A3P6AMN0 A0A3P6AMN0_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T14560H PE=3	-0,90	0,53
tr A0A3P6BV82 A0A3P6BV82_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4T23158H PE=3	-0,94	0,53
tr A0A3P6EFN1 A0A3P6EFN1_BRAOL	Prohibitin OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC7T44148H PE=3 SV=1	-1,08	0,53
tr A0A3P6D9U3 A0A3P6D9U3_BRAOL	Prohibitin OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9T53276H PE=3 SV=1	-1,08	0,53
tr A0A3P6E675 A0A3P6E675_BRAOL	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOL	-1,19	0,53
tr A0A3P6GJX7 A0A3P6GJX7_BRAOL	ATP synthase subunit d, mitochondrial (Fragment) OS=Brassica oleracea OX=37	-1,19	0,53
tr A0A3P6GN94 A0A3P6GN94_BRAOL	Cysteine synthase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC8T51214H PE=3 S	-1,46	0,53
tr A0A3P6FFT5 A0A3P6FFT5_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC8T49926H PE=3	-2,39	0,53
tr A0A3P6DDE6 A0A3P6DDE6_BRAOL	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Brassica ol	-3,51	0,53
tr A0A3P6DD52 A0A3P6DD52_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9T54366H PE=3	-3,52	0,53
tr A0A3P6F0A1 A0A3P6F0A1_BRAOL	Complex1_30kDa domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN	-3,52	0,53
tr A0A3P6A9I1 A0A3P6A9I1_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T13201H PE=3	-3,52	0,53
tr A0A3P6DJ29 A0A3P6DJ29_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC2T06557H PE=3	-3,52	0,53
tr A0A3P6BH5 A0A3P6BH5_BRAOL	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOL	-3,52	0,53
tr A0A3P6C230 A0A3P6C230_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4T23886H PE=3	-3,52	0,53
tr A0A3P6FDN6 A0A3P6FDN6_BRAOL	SWIB domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5T3	-3,52	0,53
tr A0A3P6C926 A0A3P6C926_BRAOL	Prohibitin OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4T26358H PE=3 SV=1	-1,00	0,53
tr A0A3P6EEE6 A0A3P6EEE6_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9T55052H PE=3	3,19	0,54
tr A0A3P6DQN5 A0A3P6DQN5_BRAOL	Ribosomal_L30 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=	2,68	0,54
tr A0A3P6CZG7 A0A3P6CZG7_BRAOL	NTP_transf_2 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BO	2,68	0,54
tr A0A3P6AV73 A0A3P6AV73_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T17007H PE=3	2,68	0,54
tr A0A3P6BG78 A0A3P6BG78_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T21070H PE=3	2,68	0,54
tr A0A3P6B6R8 A0A3P6B6R8_BRAOL	Transket_pyr domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BO	0,90	0,54
tr A0A3P6FXH4 A0A3P6FXH4_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC1T04150H PE=3	0,78	0,54
tr A0A3P6E4S1 A0A3P6E4S1_BRAOL	HpcH_Hpal domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOL	-0,57	0,54
tr A0A3P6DK53 A0A3P6DK53_BRAOL	S5 DRBM domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC	-0,74	0,54
tr A0A3P6GGF0 A0A3P6GGF0_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6T40053H PE=3	-0,75	0,54
tr A0A3P6GNP4 A0A3P6GNP4_BRAOL	Malate dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6T36644H PE=3	-0,83	0,54
tr A0A3P6D716 A0A3P6D716_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC2T06372H PE=3	-0,87	0,54
tr A0A3P6F1D6 A0A3P6F1D6_BRAOL	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5T3365	-0,92	0,54
tr A0A3P6GL14 A0A3P6GL14_BRAOL	Malate dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6T35979H PE=3	-0,93	0,54
tr A0A3P5ZYQ9 A0A3P5ZYQ9_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T13240H PE=3	-0,93	0,54
tr A0A3P6G2N7 A0A3P6G2N7_BRAOL	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6T3537	-1,03	0,54

Tableau Annexe 1 :

Liste des 50 protéines les plus significativement enrichies lors d'immunoprécipitations à l'aide de lysat de mitochondries de chou-fleur avec en protéine appât la GST seule en comparaison à des immunoprécipitations sans aucune protéine appât. La protéine appât est indiquée en jaune. Aucune autre protéine n'est significativement enrichie à part la protéine appât ajoutée.

accession	description	Log2FC	adjp
tr AOA3P6FFB7 AOA3P6FFB7_BRAOL	PPR2	8,00	4,79E-26
tr G4XYD5 G4XYD5_BRAOL	RPL2	7,88	5,52E-26
tr AOA3P6CRF7 AOA3P6CRF7_BRAOL	DNA gyrase subunit B OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC2T06	7,87	7,34E-26
tr AOA3P6E6M7 AOA3P6E6M7_BRAOL	AAA domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=	7,85	4,72E-26
tr AOA3P6DGB8 AOA3P6DGB8_BRAOL	AAA domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=	7,81	4,79E-26
tr AOA3P6FK33 AOA3P6FK33_BRAOL	Lon protease homolog, mitochondrial OS=Brassica oleracea OX=37	7,77	5,17E-24
tr AOA3P6ATJ4 AOA3P6ATJ4_BRAOL	DUF295 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712	7,62	8,94E-24
tr AOA3P6BN55 AOA3P6BN55_BRAOL	PPR7	7,62	8,94E-24
tr AOA3P6FIT9 AOA3P6FIT9_BRAOL	RPL3	7,60	8,17E-24
tr AOA3P6DIN8 AOA3P6DIN8_BRAOL	Lon protease homolog, mitochondrial OS=Brassica oleracea OX=37	7,58	1,25E-22
tr AOA3P6ENH4 AOA3P6ENH4_BRAOL	Lon protease homolog, mitochondrial OS=Brassica oleracea OX=37	7,46	1,45E-21
tr AOA3P6CMZ3 AOA3P6CMZ3_BRAOL	Tr-type G domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=371	7,39	1,16E-21
tr AOA3P6AZ75 AOA3P6AZ75_BRAOL	PPR5	7,29	1,14E-33
tr AOA3P6FN91 AOA3P6FN91_BRAOL	6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase OS=Brassi	7,23	1,23E-20
tr AOA3P6FBS1 AOA3P6FBS1_BRAOL	DNA gyrase subunit B OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5T34	7,20	2,04E-20
tr AOA3P6EHY4 AOA3P6EHY4_BRAOL	RPL4	7,06	1,65E-19
tr AOA3P6FW88 AOA3P6FW88_BRAOL	PPR4	7,00	1,25E-18
tr AOA3P6FQH1 AOA3P6FQH1_BRAOL	PH domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=E	6,98	1,30E-17
tr AOA3P6B0S6 AOA3P6B0S6_BRAOL	DYW_deaminase domain-containing protein OS=Brassica oleracea	6,98	2,08E-18
tr AOA3P6AM35 AOA3P6AM35_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3	6,92	3,53E-18
tr AOA3P6BHH5 AOA3P6BHH5_BRAOL	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=37	6,91	3,86E-18
tr AOA3P6GSW4 AOA3P6GSW4_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC8	6,90	1,68E-17
tr AOA3P6GAZ3 AOA3P6GAZ3_BRAOL	AAA domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=	6,86	5,09E-30
tr AOA3P6E3Q9 AOA3P6E3Q9_BRAOL	RPL22	6,79	3,84E-17
tr AOA3P6EIC7 AOA3P6EIC7_BRAOL	RPS11	6,77	5,66E-17
tr AOA3P6FAW6 AOA3P6FAW6_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5	6,77	5,04E-17
tr AOA3P6B8P6 AOA3P6B8P6_BRAOL	RPS21	6,72	2,03E-16
tr AOA3P6GGT5 AOA3P6GGT5_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC8	6,72	1,58E-16
tr AOA3P6ERC8 AOA3P6ERC8_BRAOL	AAA domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=	6,72	1,74E-28
tr AOA3P6BEL5 AOA3P6BEL5_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3	6,70	4,25E-16
tr AOA3P6FF49 AOA3P6FF49_BRAOL	SF4 helicase domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3	6,70	3,24E-16
tr AOA3P6EST0 AOA3P6EST0_BRAOL	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=37	6,68	2,34E-16
tr AOA3P6EWP2 AOA3P6EWP2_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC1	6,64	4,99E-16
tr AOA3P6EZS9 AOA3P6EZS9_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5	6,61	9,10E-16
tr AOA3P6DBK6 AOA3P6DBK6_BRAOL	RPL17	6,59	1,39E-15
tr AOA3P6F2D5 AOA3P6F2D5_BRAOL	RPL3	6,59	1,48E-15
tr AOA3P6AR35 AOA3P6AR35_BRAOL	RPL18	6,54	3,35E-15
tr AOA3P6B5K5 AOA3P6B5K5_BRAOL	50S ribosomal protein L22, chloroplastic OS=Brassica oleracea OX=3	6,53	3,50E-15
tr AOA3P6DPB0 AOA3P6DPB0_BRAOL	RPL24	6,52	4,25E-15
tr AOA3P6C4J7 AOA3P6C4J7_BRAOL	RPL1	6,51	4,72E-26
tr AOA3P6F7U6 AOA3P6F7U6_BRAOL	RPL24	6,50	6,38E-15
tr AOA3P6DH67 AOA3P6DH67_BRAOL	Isoleucyl-tRNA synthetase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC	6,49	1,28E-14
tr AOA3P6DXK7 AOA3P6DXK7_BRAOL	RPL18	6,47	9,24E-15
tr AOA3P6FL36 AOA3P6FL36_BRAOL	RPL23	6,47	1,35E-14
tr AOA3P6FCR1 AOA3P6FCR1_BRAOL	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=37	6,47	9,24E-15
tr AOA3P6BHK5 AOA3P6BHK5_BRAOL	Elongation factor G, mitochondrial OS=Brassica oleracea OX=3712 G	6,46	1,46E-30
tr AOA3P6GUZ5 AOA3P6GUZ5_BRAOL	Methionyl-tRNA synthetase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BO	6,45	2,61E-14
tr AOA3P6AGB6 AOA3P6AGB6_BRAOL	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Brassica oleracea OX=3712	6,44	2,59E-14
tr AOA3P6F6A1 AOA3P6F6A1_BRAOL	Isoleucyl-tRNA synthetase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC	6,44	2,96E-14
tr AOA3P6FPF4 AOA3P6FPF4_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC1	6,43	1,85E-14
tr AOA3P6ES58 AOA3P6ES58_BRAOL	RPS15	6,42	3,31E-14
tr AOA3P6GTT0 AOA3P6GTT0_BRAOL	RPL29	6,38	4,03E-14
tr AOA3P6FIH7 AOA3P6FIH7_BRAOL	PPR10	6,37	4,74E-14
tr AOA3P6DC92 AOA3P6DC92_BRAOL	RPS15	6,37	7,10E-14
tr AOA3P6BS36 AOA3P6BS36_BRAOL	AMP deaminase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4T22551H	6,37	1,19E-13
tr G4XYH3 G4XYH3_BRAOL	RPS4	6,36	8,71E-14
tr AOA3P6EWC5 AOA3P6EWC5_BRAOL	Cation_ATPase_N domain-containing protein OS=Brassica oleracea	6,36	5,80E-14
tr G4XYG5 G4XYG5_BRAOL	RPS3	6,34	1,09E-13
tr AOA3P6H2E9 AOA3P6H2E9_BRAOL	Smr domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=	6,32	1,94E-13
tr AOA3P6EFD8 AOA3P6EFD8_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	6,31	1,18E-13

tr AOA3P6F513 AOA3P6F513_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC1	6,31	1,08E-13
tr AOA3P6ETK4 AOA3P6ETK4_BRAOL	RPL21	6,31	1,16E-13
tr AOA3P6FE97 AOA3P6FE97_BRAOL	RPS24/35	6,25	3,33E-13
tr AOA3P6FV65 AOA3P6FV65_BRAOL	RPL21	6,25	2,66E-13
tr AOA3P6EDD9 AOA3P6EDD9_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	6,25	5,04E-13
tr AOA3P6BTU9 AOA3P6BTU9_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3	6,18	6,70E-13
tr AOA3P6FJF3 AOA3P6FJF3_BRAOL	Glutaredoxin domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=	6,15	1,13E-12
tr AOA3P6DEK8 AOA3P6DEK8_BRAOL	RPL9	6,14	1,30E-12
tr AOA3P6FVW5 AOA3P6FVW5_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6	6,12	1,92E-12
tr AOA3P6G252 AOA3P6G252_BRAOL	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Brassica oleracea OX=3712	6,11	1,84E-12
tr AOA3P6E6P2 AOA3P6E6P2_BRAOL	RPL9	6,11	1,84E-12
tr AOA3P6G254 AOA3P6G254_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC8	6,09	3,11E-12
tr AOA3P6FP57 AOA3P6FP57_BRAOL	RPS2	6,09	3,79E-12
tr AOA3P6GHR0 AOA3P6GHR0_BRAOL	PPR6	6,06	1,41E-20
tr AOA3P6G1F8 AOA3P6G1F8_BRAOL	AA_TRNA_LIGASE_II domain-containing protein OS=Brassica olerac	6,05	4,96E-12
tr AOA3P6DIE2 AOA3P6DIE2_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	6,03	5,04E-12
tr AOA3P6FWG1 AOA3P6FWG1_BRAOL	Sulfurtransferase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6T38160I	6,03	5,19E-12
tr AOA3P6CRY0 AOA3P6CRY0_BRAOL	AMP deaminase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4T28156H	6,02	9,61E-12
tr AOA3P6D313 AOA3P6D313_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4	5,99	1,14E-11
tr AOA3P6BU26 AOA3P6BU26_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4	5,99	8,90E-12
tr AOA3P6A1H9 AOA3P6A1H9_BRAOL	RPL19	5,98	9,18E-12
tr AOA3P6DRV3 AOA3P6DRV3_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	5,98	1,16E-11
tr AOA3P6F0Y6 AOA3P6F0Y6_BRAOL	Intron_maturas2 domain-containing protein OS=Brassica oleracea	5,97	1,60E-11
tr AOA3P6EG37 AOA3P6EG37_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	5,96	1,60E-11
tr AOA3P6GY10 AOA3P6GY10_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6	5,96	1,41E-11
tr AOA3P6ETL5 AOA3P6ETL5_BRAOL	RPL28	5,93	2,09E-11
tr AOA3P6FDC1 AOA3P6FDC1_BRAOL	RPS1	5,91	3,18E-11
tr AOA3P6DXX0 AOA3P6DXX0_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	5,90	3,19E-11
tr AOA3P6DDY0 AOA3P6DDY0_BRAOL	MRPS22	5,90	3,81E-11
tr AOA3P6EAF4 AOA3P6EAF4_BRAOL	FAD_binding_3 domain-containing protein OS=Brassica oleracea O	5,89	3,80E-11
tr AOA3P6E9K1 AOA3P6E9K1_BRAOL	RPL11	5,88	3,20E-11
tr AOA3P6EUS0 AOA3P6EUS0_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC7	5,88	4,27E-11
tr AOA3P6FXH4 AOA3P6FXH4_BRAOL	RH53	5,84	1,86E-37
tr AOA3P6FXJ5 AOA3P6FXJ5_BRAOL	RPL12	5,84	5,16E-11
tr AOA3P6F6M3 AOA3P6F6M3_BRAOL	RPL25	5,83	7,50E-11
tr AOA3P6EEE6 AOA3P6EEE6_BRAOL	PPR4	5,83	9,83E-25
tr AOA3P6FWC8 AOA3P6FWC8_BRAOL	PPR_long domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=371	5,83	7,71E-11
tr AOA3P6CFF5 AOA3P6CFF5_BRAOL	Aspartate aminotransferase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BO	5,83	1,14E-19
tr AOA3P6F3S4 AOA3P6F3S4_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC1	5,81	7,36E-11
tr AOA3P6BAE1 AOA3P6BAE1_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3	5,81	9,96E-11
tr AOA3P6HGZ6 AOA3P6HGZ6_BRAOL	RPS7	5,81	7,97E-11
tr AOA3P6ADM4 AOA3P6ADM4_BRAOL	DUF295 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712	5,80	8,99E-11
tr AOA3P6BNQ4 AOA3P6BNQ4_BRAOL	RPL28	5,79	9,76E-11
tr AOA3P6FJX4 AOA3P6FJX4_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5	5,79	9,66E-11
tr AOA3P6AFV3 AOA3P6AFV3_BRAOL	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Brassica oleracea O	5,78	4,05E-19
tr AOA3P6B2J4 AOA3P6B2J4_BRAOL	RPL13	5,75	1,52E-10
tr AOA3P6AVH9 AOA3P6AVH9_BRAOL	RECA_2 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712	5,75	1,45E-10
tr AOA3P6BP13 AOA3P6BP13_BRAOL	G domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BO	5,73	1,85E-10
tr AOA3P6DKY6 AOA3P6DKY6_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	5,72	2,04E-10
tr AOA3P6CB51 AOA3P6CB51_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4	5,71	2,18E-10
tr AOA3P6ECA5 AOA3P6ECA5_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	5,71	2,69E-10
tr AOA3P6FEH2 AOA3P6FEH2_BRAOL	DUF295 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712	5,70	2,55E-10
tr AOA3P6EJT9 AOA3P6EJT9_BRAOL	Mitochondrial pyruvate carrier OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=I	5,68	3,41E-10
tr AOA3P6FZF2 AOA3P6FZF2_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC8	5,65	1,08E-17
tr AOA3P6G696 AOA3P6G696_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6	5,65	4,49E-10
tr AOA3P6C717 AOA3P6C717_BRAOL	TPR_REGION domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=	5,65	4,42E-10
tr AOA3P6AMQ9 AOA3P6AMQ9_BRAOL	RPL2	5,65	4,60E-10
tr AOA3P6DGI5 AOA3P6DGI5_BRAOL	RPL14	5,64	5,05E-10
tr AOA3P6DRQ7 AOA3P6DRQ7_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	5,64	5,81E-10
tr AOA3P6BD90 AOA3P6BD90_BRAOL	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Brassica oleracea OX=3712	5,64	5,12E-10

tr AOA3P6ANG7 AOA3P6ANG7_BRAOL	PKS_ER domain-containing protein (Fragment) OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,63	2,36E-30
tr AOA3P6FF06 AOA3P6FF06_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,62	6,53E-10
tr AOA3P6DJ66 AOA3P6DJ66_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC27	5,62	6,35E-10
tr AOA3P6FUI4 AOA3P6FUI4_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC11	5,61	1,02E-17
tr AOA3P6FF37 AOA3P6FF37_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,61	6,95E-10
tr AOA3P6DH40 AOA3P6DH40_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC27	5,60	7,10E-10
tr AOA3P6E904 AOA3P6E904_BRAOL	RPS19	5,58	1,11E-09
tr AOA3P6BHC9 AOA3P6BHC9_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC33	5,58	9,58E-10
tr AOA3P6GF46 AOA3P6GF46_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC67	5,58	9,63E-10
tr AOA3P6ERN5 AOA3P6ERN5_BRAOL	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,57	2,24E-17
tr AOA3P6ATG7 AOA3P6ATG7_BRAOL	PPR6	5,56	1,13E-09
tr AOA3P6F3F6 AOA3P6F3F6_BRAOL	Ornithine aminotransferase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,55	1,27E-09
tr AOA3P6DQ01 AOA3P6DQ01_BRAOL	DUF3523 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,54	1,31E-09
tr AOA3P6EBM9 AOA3P6EBM9_BRAOL	RPS18	5,53	1,49E-09
tr AOA3P6E8B3 AOA3P6E8B3_BRAOL	ABC1 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,53	1,48E-09
tr AOA3P6DDD6 AOA3P6DDD6_BRAOL	ArsA_ATPase domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,50	2,00E-09
tr AOA3P6GA21 AOA3P6GA21_BRAOL	RPS23	5,50	2,07E-09
tr AOA3P6ANH2 AOA3P6ANH2_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC33	5,49	2,37E-09
tr AOA3P6CX76 AOA3P6CX76_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC47	5,47	5,66E-09
tr AOA3P6F2X6 AOA3P6F2X6_BRAOL	AAA domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,47	2,73E-09
tr AOA3P6FUQ5 AOA3P6FUQ5_BRAOL	RPL2	5,47	3,15E-09
tr AOA3P6ES67 AOA3P6ES67_BRAOL	50S ribosomal protein L20 OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,47	3,15E-09
tr AOA3P6DM50 AOA3P6DM50_BRAOL	Nucleoside diphosphate kinase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,47	1,92E-16
tr AOA3P6CHQ3 AOA3P6CHQ3_BRAOL	AAA domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,45	3,21E-09
tr AOA3P6EPV4 AOA3P6EPV4_BRAOL	RNA helicase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9T59935H PE=4	5,42	4,47E-09
tr AOA3P6BQ30 AOA3P6BQ30_BRAOL	Elongation factor Tu OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3T205	5,40	2,34E-16
tr AOA3P6G075 AOA3P6G075_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC67	5,40	5,33E-09
tr AOA3P6GF34 AOA3P6GF34_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC67	5,40	5,33E-09
tr AOA3P6C6A2 AOA3P6C6A2_BRAOL	3-isopropylmalate dehydratase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,40	5,09E-09
tr AOA3P6BWT3 AOA3P6BWT3_BRAOL	FCP1 homology domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,40	5,28E-09
tr AOA3P6BRF1 AOA3P6BRF1_BRAOL	E1_dh domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,39	5,92E-09
tr AOA3P6EM99 AOA3P6EM99_BRAOL	RPS6	5,37	6,82E-09
tr AOA3P6FHR8 AOA3P6FHR8_BRAOL	RPS8	5,37	6,83E-09
tr AOA3P6CF82 AOA3P6CF82_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC47	5,36	5,19E-16
tr AOA3P6EPQ6 AOA3P6EPQ6_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC97	5,35	8,53E-09
tr AOA3P6DX24 AOA3P6DX24_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC97	5,35	8,45E-09
tr AOA3P6CYL7 AOA3P6CYL7_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC27	5,35	8,53E-09
tr AOA3P6B208 AOA3P6B208_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC33	5,33	9,53E-09
tr AOA3P6GE95 AOA3P6GE95_BRAOL	tRNA 4-demethylwyosine synthase (AdoMet-dependent) OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,32	1,09E-08
tr AOA3P6FWE0 AOA3P6FWE0_BRAOL	RPS5	5,32	1,87E-15
tr AOA3P6EZL6 AOA3P6EZL6_BRAOL	DYW_deaminase domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,32	1,13E-08
tr AOA3P6ERA3 AOA3P6ERA3_BRAOL	PPR8	5,30	5,47E-19
tr AOA3P6EP84 AOA3P6EP84_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,29	1,34E-08
tr AOA3P6CQT3 AOA3P6CQT3_BRAOL	RPS16	5,28	1,57E-08
tr B2D211 B2D211_BRAOL	Sulfurtransferase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=B77C13.7 PE=4	5,28	1,83E-08
tr AOA3P6F9N0 AOA3P6F9N0_BRAOL	3-isopropylmalate dehydratase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,27	2,09E-08
tr AOA3P6EMJ2 AOA3P6EMJ2_BRAOL	RPS17	5,26	1,74E-08
tr AOA3P6F9M0 AOA3P6F9M0_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,26	1,83E-08
tr AOA3P6EPE9 AOA3P6EPE9_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC97	5,24	2,09E-08
tr AOA3P6E7M8 AOA3P6E7M8_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC77	5,24	2,12E-08
tr AOA3P6FS74 AOA3P6FS74_BRAOL	DYW_deaminase domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,24	2,12E-08
tr AOA3P6AXW0 AOA3P6AXW0_BRAOL	Protein-serine/threonine kinase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,22	2,42E-08
tr AOA3P6AFA2 AOA3P6AFA2_BRAOL	PHB domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,22	2,45E-08
tr AOA3P6DJT5 AOA3P6DJT5_BRAOL	DUF150 domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,22	2,45E-08
tr AOA3P6DYN5 AOA3P6DYN5_BRAOL	RPL3	5,20	4,89E-08
tr AOA3P6EHC8 AOA3P6EHC8_BRAOL	DYW_deaminase domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,20	2,86E-08
tr AOA3P6BZ88 AOA3P6BZ88_BRAOL	Transket_pyr domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC35	5,20	4,79E-08
tr AOA3P6BSY3 AOA3P6BSY3_BRAOL	Cysteine synthase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4T24678	5,19	4,33E-19
tr AOA3P6G0J4 AOA3P6G0J4_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC87	5,19	1,35E-14
tr AOA3P6DHN5 AOA3P6DHN5_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC27	5,19	3,24E-08

tr A0A3P6BE59 A0A3P6BE59_BRAOL	S5 DRBM domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712	5,18	4,00E-08
tr A0A3P6FUQ9 A0A3P6FUQ9_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC1	5,17	8,70E-08
tr A0A3P6F813 A0A3P6F813_BRAOL	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC2	5,16	2,55E-07
tr A0A3P6BF54 A0A3P6BF54_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC4	5,16	4,04E-08
tr A0A3P6DEA2 A0A3P6DEA2_BRAOL	PHB domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5	5,14	6,51E-08
tr A0A3P6BGT8 A0A3P6BGT8_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3	5,14	4,59E-14
tr A0A3P6DHL0 A0A3P6DHL0_BRAOL	Mitochondrial Rho GTPase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6	5,13	5,29E-14
tr A0A3P6CA80 A0A3P6CA80_BRAOL	Ribosomal_L2_C domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC7	5,12	1,30E-07
tr A0A3P6ENJ2 A0A3P6ENJ2_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC7	5,12	7,18E-08
tr A0A3P6F310 A0A3P6F310_BRAOL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC8	5,12	7,18E-08
tr A0A3P6CVS3 A0A3P6CVS3_BRAOL	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM23 OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	5,11	2,01E-07
tr A0A3P6FKR5 A0A3P6FKR5_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC5	5,10	7,97E-08
tr A0A3P6GKX0 A0A3P6GKX0_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC6	5,10	6,90E-08
tr A0A3P6A3D3 A0A3P6A3D3_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3	5,10	7,83E-08
tr A0A3P6B0U2 A0A3P6B0U2_BRAOL	RPL2 (GCD1)	5,10	1,75E-17
tr A0A3P6B8A1 A0A3P6B8A1_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC3	5,10	8,84E-08
tr A0A3P6E241 A0A3P6E241_BRAOL	Uncharacterized protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC9	5,10	8,84E-08
tr A0A3P6DK63 A0A3P6DK63_BRAOL	NAD(P)-bd_dom domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC10	5,06	1,00E-13
tr A0A3P6CSE3 A0A3P6CSE3_BRAOL	DYW_deaminase domain-containing protein OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC11	5,06	1,29E-07
tr A0A3P6A220 A0A3P6A220_BRAOL	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial OS=Brassica oleracea OX=3712 GN=BOLC12	5,06	1,27E-07

Tableau Annexe 2 :

Liste des 200 protéines les plus enrichies lors des immunoprécipitations à l'aide de lysat de mitochondries de chou-fleur et de la protéine appât 6His-GST-Oxa1aRBD. Les protéines de la SSU sont indiquées en bleu, et les protéines de la LSU sont indiqués en orange.

accession	description	Log2FC	adjp
tr A0A3P6EYJ5 A0A3P6EYJ5_BRAOL	Dihydropolipoyl dehydrogenase	6,21	4,09E-04
tr A0A3P6AGA9 A0A3P6AGA9_BRAOL	Dihydropolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	6,00	1,19E-03
tr A0A3P6BZM6 A0A3P6BZM6_BRAOL	RPS14	5,92	1,46E-03
tr A0A3P6G6Z6 A0A3P6G6Z6_BRAOL	Dihydropolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	5,79	2,01E-03
tr A0A3P6GJX3 A0A3P6GJX3_BRAOL	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	5,71	2,53E-03
tr A0A3P6BCM4 A0A3P6BCM4_BRAOL	Dihydropolipoyl dehydrogenase	5,62	3,34E-03
tr A0A3P6AQD0 A0A3P6AQD0_BRAOL	RPL27	5,51	4,87E-03
tr A0A3P6FN09 A0A3P6FN09_BRAOL	Prohibitin	5,46	5,78E-03
tr A0A3P6FB71 A0A3P6FB71_BRAOL	Pre-mRNA-splicing factor SLU7 (Fragment)	5,40	6,57E-03
tr A0A3P6EA05 A0A3P6EA05_BRAOL	RPL28	5,40	6,57E-03
tr A0A3P6F400 A0A3P6F400_BRAOL	RPL18	5,35	7,64E-03
tr A0A3P6DGH9 A0A3P6DGH9_BRAOL	RPL28	5,35	7,64E-03
tr A0A3P6FNM4 A0A3P6FNM4_BRAOL	Prohibitin	5,22	1,13E-02
tr A0A3P6G267 A0A3P6G267_BRAOL	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	5,22	1,13E-02
tr A0A3P6E309 A0A3P6E309_BRAOL	RPL27	5,16	1,37E-02
tr A0A3P6A9S1 A0A3P6A9S1_BRAOL	Uncharacterized protein	5,16	1,37E-02
tr A0A3P6DAH7 A0A3P6DAH7_BRAOL	IGR domain-containing protein	5,09	1,57E-02
tr A0A3P6DJX5 A0A3P6DJX5_BRAOL	RPS34	4,69	3,67E-02
tr A0A3P6F5Z3 A0A3P6F5Z3_BRAOL	Uncharacterized protein	4,69	3,67E-02
tr A0A3P6EAC4 A0A3P6EAC4_BRAOL	RPL31	4,59	4,43E-02
tr A0A3P6AWM7 A0A3P6AWM7_BRAOL	Uncharacterized protein	4,49	4,97E-02
tr A0A3P6EXW7 A0A3P6EXW7_BRAOL	RPL32	4,49	4,97E-02
tr A0A3P6GY10 A0A3P6GY10_BRAOL	Uncharacterized protein	4,49	4,97E-02
tr A0A3P6FH84 A0A3P6FH84_BRAOL	RPL32	4,49	4,97E-02
tr A0A3P6DDY0 A0A3P6DDY0_BRAOL	MRPS22	4,19	4,27E-06
tr A0A3P6DGI5 A0A3P6DGI5_BRAOL	RPL14	4,00	3,27E-05
tr A0A3P6DTL2 A0A3P6DTL2_BRAOL	Uncharacterized protein	3,36	2,01E-03
tr A0A3P6FLY0 A0A3P6FLY0_BRAOL	PHB domain-containing protein	3,07	6,57E-03
tr A0A3P6CQT3 A0A3P6CQT3_BRAOL	Uncharacterized protein	2,97	5,40E-05
tr A0A3P6FDC1 A0A3P6FDC1_BRAOL	Ribosomal_S10 domain-containing protein	2,90	3,41E-06
tr A0A3P6F3L7 A0A3P6F3L7_BRAOL	Uncharacterized protein (Fragment)	2,83	1,58E-02
tr A0A3P6G3R9 A0A3P6G3R9_BRAOL	CX9C domain-containing protein (Fragment)	2,83	1,58E-02
tr A0A3P6DICO A0A3P6DICO_BRAOL	RPS21	2,72	2,06E-03
tr A0A3P6DWI6 A0A3P6DWI6_BRAOL	RPS13	2,67	2,53E-03
tr A0A3P6E9K1 A0A3P6E9K1_BRAOL	RPL11	2,55	3,96E-02
tr A0A3P5ZZW8 A0A3P5ZZW8_BRAOL	RPL17	2,44	4,97E-02
tr A0A3P6E1X9 A0A3P6E1X9_BRAOL	RPL33	2,43	4,97E-02
tr A0A3P6FL36 A0A3P6FL36_BRAOL	RPL23	2,29	3,27E-03
tr A0A3P6FUQ5 A0A3P6FUQ5_BRAOL	RPL20	2,27	1,19E-03
tr A0A3P6DC92 A0A3P6DC92_BRAOL	RPS15	1,91	2,83E-04
tr A0A3P6ARC4 A0A3P6ARC4_BRAOL	RPS6	1,82	3,12E-02
tr A0A3P6ERU1 A0A3P6ERU1_BRAOL	MOSC domain-containing protein (Fragment)	1,77	3,34E-03
tr A0A3P6F6M3 A0A3P6F6M3_BRAOL	RPL25	1,72	4,55E-02
tr A0A3P6GSE6 A0A3P6GSE6_BRAOL	RPS18	1,68	6,28E-03
tr A0A3P6BCI1 A0A3P6BCI1_BRAOL	RPS10	1,68	4,97E-02
tr A0A3P6ES58 A0A3P6ES58_BRAOL	RPS15	1,68	9,03E-04
tr A0A3P6B2J4 A0A3P6B2J4_BRAOL	RPL13	1,67	2,16E-02
tr A0A3P6EIC7 A0A3P6EIC7_BRAOL	RPS11	1,65	4,09E-04
tr G4XYG5 G4XYG5_BRAOL	RPS3	1,65	2,12E-03
tr A0A3P6EM99 A0A3P6EM99_BRAOL	RPS6	1,58	2,06E-02
tr A0A3P6D2N5 A0A3P6D2N5_BRAOL	RPS14	1,53	4,55E-02
tr A0A3P6EBM9 A0A3P6EBM9_BRAOL	RPS18	1,51	3,27E-03
tr A0A3P6FIH7 A0A3P6FIH7_BRAOL	PPR10	1,50	2,01E-03
tr A0A3P6GA21 A0A3P6GA21_BRAOL	RPS23	1,49	1,79E-02
tr A0A3P6HAK6 A0A3P6HAK6_BRAOL	RPS15	1,46	2,01E-03
tr A0A3P6DBK6 A0A3P6DBK6_BRAOL	RPL17	1,45	1,58E-02
tr A0A3P6ETK4 A0A3P6ETK4_BRAOL	RPL21	1,43	1,06E-02
tr A0A3P6E904 A0A3P6E904_BRAOL	RPS19	1,41	2,76E-03
tr A0A3P6FE97 A0A3P6FE97_BRAOL	RPS24/35	1,31	4,87E-03
tr A0A3P6GTT0 A0A3P6GTT0_BRAOL	RPL29	1,31	1,47E-02

tr A0A3P6DK53 A0A3P6DK53_BRAOL	RPS5	1,30	2,01E-03
tr A0A3P6FV65 A0A3P6FV65_BRAOL	RPL21	1,29	2,18E-02
tr A0A3P6EEE6 A0A3P6EEE6_BRAOL	PPR4	1,27	5,37E-03
tr A0A3P6EWC5 A0A3P6EWC5_BRAOL	Cation_ATPase_N domain-containing protein	1,24	2,09E-02
tr A0A3P6DPB0 A0A3P6DPB0_BRAOL	KOW domain-containing protein	1,14	2,80E-02
tr G4XYH3 G4XYH3_BRAOL	RPS4	1,07	1,62E-02
tr A0A3P6F2D5 A0A3P6F2D5_BRAOL	RPL3	1,07	2,50E-02
tr A0A3P6EEC7 A0A3P6EEC7_BRAOL	RPS23	1,05	2,11E-02
tr A0A3P6EMJ2 A0A3P6EMJ2_BRAOL	RPS17	1,04	3,04E-02
tr A0A3P6FP57 A0A3P6FP57_BRAOL	RPS2	1,04	3,04E-02
tr A0A3P6G696 A0A3P6G696_BRAOL	Uncharacterized protein	1,04	2,26E-02
tr A0A3P6HGZ6 A0A3P6HGZ6_BRAOL	RPS7	1,03	2,38E-02
tr G4XYD5 G4XYD5_BRAOL	RPL2	1,03	1,99E-02
tr A0A3P6B0U2 A0A3P6B0U2_BRAOL	RPL20 (GCD1)	1,01	1,54E-02
tr A0A3P6FW88 A0A3P6FW88_BRAOL	PPR	1,13	5,05E-02
tr A0A3P6ETL5 A0A3P6ETL5_BRAOL	RPL28	1,47	5,48E-02
tr A0A3P6DU39 A0A3P6DU39_BRAOL	RPS8	1,11	5,55E-02
tr A0A3P6BN70 A0A3P6BN70_BRAOL	RPL31	4,38	5,99E-02
tr A0A3P6CQJ8 A0A3P6CQJ8_BRAOL	RPS31	1,62	6,29E-02
tr A0A3P6AI52 A0A3P6AI52_BRAOL	RPL27	4,27	7,76E-02

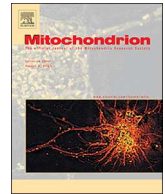
Tableau Annexe 3 :

Liste des 80 protéines les plus enrichies lors des immunoprécipitations à l'aide de mitoribosomes de chou-fleur purifiés et de la protéine appât 6His-GST-Oxa1aC-ter. Les protéines de la SSU sont indiquées en bleu, et les protéines de la LSU sont indiqués en orange.



Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mito

Specificities of the plant mitochondrial translation apparatus

Florent Waltz^b, Nicolas Corre^a, Yaser Hashem^{b,*}, Philippe Giegé^{a,*}^a Institut de biologie de moléculaire des plantes, CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue du général Zimmer, F 67084 Strasbourg, France^b Institut Européen de Chimie et Biologie, U1212 Inserm, Université de Bordeaux, 2 rue R. Escarpit, F 33600 Pessac, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Mitoribosome
 Ribosome evolution
 Pentatricopeptide repeat proteins
 rRNA expansion segments
 Archaeplastida

ABSTRACT

Mitochondria are endosymbiotic organelles responsible for energy production in most eukaryotic cells. They host a genome and a fully functional gene expression machinery. In plants this machinery involves hundreds of pentatricopeptide repeat (PPR) proteins. Translation, the final step of mitochondrial gene expression is performed by mitochondrial ribosomes (mitoribosomes). The nature of these molecular machines remained elusive for a very long time. Because of their bacterial origin, it was expected that mitoribosomes would closely resemble bacterial ribosomes. However, recent advances in cryo-electron microscopy have revealed the extraordinary diversity of mitoribosome structure and composition. The plant mitoribosome was characterized for *Arabidopsis*. In plants, in contrast to other species such as mammals and kinetoplastids where rRNA has been largely reduced, the mitoribosome could be described as a protein/RNA-augmented bacterial ribosome. It has an oversized small subunit formed by expanded ribosomal RNAs and additional protein components when compared to bacterial ribosomes. The same holds true for the large subunit. The small subunit is characterized by a new elongated domain on the head. Among its additional proteins, several PPR proteins are core mitoribosome proteins. They mainly act at the structural level to stabilize and maintain the plant-specific ribosomal RNA expansions but could also be involved in translation initiation. Recent advances in plant mitoribosome composition and structure, its specialization for membrane protein synthesis, translation initiation, the regulation and dynamics of mitochondrial translation are reviewed here and put in perspective with the diversity of mitochondrial translation processes in the green lineage and in the wider context of eukaryote evolution.

1. Plant mitochondrial gene expression combines bacterial traits with eukaryote-specific processes

Mitochondria can be viewed as the powerhouses of the eukaryotic cell that supply energy required for cellular processes. These organelles evolved from a free-living aerobic bacterium that was engulfed as an endosymbiont by what appears now to be an archeon (Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). This ancestral endosymbiont was recently proposed to belong to a sister group of α -proteobacteria (Martijn et al., 2018). Subsequent evolution resulted in the loss or the massive transfer of the ancestral bacterium genetic material to the nucleus of the host cell. This led to a drastic reduction of the number of mitochondrial genes as compared to the prokaryote ancestor (Eme et al., 2017; Yang et al., 1985), for instance with only 14 protein-coding genes in mammalian mitochondria and up to 69 mRNAs in the jakobid *Reclinomonas americana* (Burger et al., 2013). Land plant mitochondrial genomes are comparatively larger compared to other eukaryotic species, with most of them ranging from 300 to 500 kbp, and typically containing about 30 protein coding genes. In *Arabidopsis thaliana*, the mitochondrial genome

encodes 33 mRNAs, 26S, 18S and 5S rRNAs and a set of 22 tRNAs (Unseld et al., 1997; Sloan et al., 2018). Still genome sizes and gene contents are also very variable in the green lineage, with very compact mitochondrial genomes encoding only 8 mRNAs in green algae such as *Chlamydomonas reinhardtii* (Michaelis et al., 1990). In all cases, in order to sustain mitochondrial activity, thousands of nuclear-encoded proteins have to be imported into mitochondria (Gray, 2015). Thus, the coevolution between mitochondrial and nuclear genomes led to a progressive loss of autonomy of the organelle. For their biogenesis and function, mitochondria now completely rely on the coordinated expression of both the mitochondrial and the nuclear genomes. This coordination is essential because major complexes required for mitochondrial function, i.e. respiratory chain complexes, the ATP synthase as well as mitochondrial ribosomes (called “mitoribosomes” hereafter) are composed of both nuclear-encoded and mitochondrial-encoded subunits (Giegé et al., 2005).

Despite their dependence on nuclear gene expression, mitochondria have retained fully functional gene expression processes. To perform them, mitochondria use machineries that associate traits inherited from

* Corresponding authors.

E-mail address: philippe.giege@ibmp-cnrs.unistra.fr (P. Giegé).<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.04.008>

Received 28 January 2020; Received in revised form 14 April 2020; Accepted 21 April 2020

Available online 22 April 2020

1567-7249/ © 2020 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

the bacterial ancestor of mitochondria with eukaryote-specific processes that have evolved independently in the respective eukaryote groups during mitochondrial evolution (Hammani and Giegé, 2014). Consequently, although mitochondrial gene expression systems all derive from a same bacterial scaffold, they have diverged remarkably in the various eukaryotic lineages (Adl et al., 2012). In land plants, mitochondrial RNA metabolism involves RNA transcription, RNA editing, the splicing of group I and group II introns, the maturation of 5' and 3' transcript extremities, RNA stability and degradation processes and translation (Hammani and Giegé, 2014; Schmitz-Linneweber et al., 2015; Small et al., 2019; Tomal et al., 2019). In this system, it was recognized that post-transcriptional and/or post-translational processes play the major role in determining gene product abundances (Giegé et al., 2000; Giegé et al., 2005). Similar to human mitochondria, where dysfunctions lead to severe disorders such as neurodegenerative diseases (Boczonadi et al., 2018), plant mitochondrial gene expression defects often result in severe outcomes for plant development and fertility (Gualberto and Newton, 2017). In the past two decades, considerable progress has been made to identify the protein factors performing and regulating the different steps of plant mitochondrial gene expression. Remarkably, a fast growing number of articles have revealed the prominent roles of factors belonging to the wide family of helical repeat modular proteins (Hammani et al., 2014). Most of these factors are eukaryote-specific and evolved, or were recruited to address plant-specific mitochondrial gene expression processes. Among them, pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are particularly prominent in land plants, with a massive involvement in all steps of gene expression (Schmitz-Linneweber and Small, 2008). Until now, it was commonly accepted that PPR protein mode of action would always imply the specific recognition of RNA moieties by a stretch of PPR motifs in a sequence-specific manner (Barkan et al., 2012).

Among plant mitochondria gene expression processes, translation has remained the most elusive step until recently. Here we review recent advances in the characterization of the plant mitochondrial translation apparatus, i.e. its main effector the mitoribosome and its control and regulation.

2. Defining features of plant mitoribosome

The main molecular machines performing translation, the final step of gene expression, are the ribosomes. These essential complexes are composed of two subunits. The “small subunit” (SSU) binds mRNA and reads the genetic information while the “large subunit” (LSU) contains tRNA aminoacyl (A), peptidyl (P) and exit (E) sites and performs the actual protein synthesis. Determining the structure of ribosomes and understanding how translation actually works has been a major challenge of molecular biology since its debut. First high-resolution structures could be resolved by X-ray crystallography, in 1999 for a bacterial ribosome (Clemons et al., 1999) and not until 2011 for a eukaryotic ribosome (Ben-Shem et al., 2011). Determining the structure of low-abundance, membrane-bound ribosomes, such as mitochondrial ribosomes, was regarded as an unattainable dream until the advent of contemporary cryo-electron microscopy (cryo-EM) techniques (Danev et al., 2019).

2.1. Specificities of plant mitoribosome composition and structure

With the increased availability of cryo-EM, a number of mitochondrial ribosomes structures was derived, i.e. for mammals, yeast and trypanosomes (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015; Desai et al., 2017; Ramrath et al., 2018). Likewise, the plant mitoribosome, (from *Arabidopsis* and cauliflower) was recently characterized biochemically (Waltz et al., 2019) and its structure determined at high resolution by cryo-EM (Waltz et al., 2020). The plant mitoribosome core is composed of the SSU 18S rRNA and the LSU 26S rRNA. As compared to bacterial ribosomes, the plant mitoribosome rRNAs have large expansion

segments in both the SSU and the LSU. On the SSU, a characteristic large (370 nt) expansion forms a novel rRNA domain unique to plant mitoribosomes. It is mostly shaped by a four-way rRNA junction extended by two parallel double-stranded rRNA helices, contacted by two PPR proteins, one being parallel and the other perpendicular to the two rRNA helices (Waltz et al., 2020). This remarkable structure is highly flexible as it can make high amplitude (30°) movements relative to the SSU body. The function of this novel head domain remains nevertheless completely unknown. Similar to rRNAs, the proteome of the plant mitoribosome is expanded with 82 ribosomal proteins, compared to the 54 proteins of *E. coli* ribosome. Among those mitoribosomal proteins, 19 are entirely specific to plants, half of them being PPR proteins (see Section 4 below) and the others are mostly helical proteins of unknown functions. The identification of PPR proteins as part of this ribosome is in accordance with the prevalence of PPR proteins for all gene expression processes in plant mitochondria. The composition of plant mitoribosomes might also be heterogeneous as several gene families have been observed for both canonical ribosomal proteins and novel plant-specific subunits while single copies of the respective proteins are observed in the ribosome structure. This is for instance the case for bL12m that has four paralogs (Delage et al., 2007) but also for uS8m, uS15m, uL22m or for the novel rPPR mS83. Still, at this stage, no evidence has been provided to suggest the existence of different functionally specialized plant mitoribosomes (Tomal et al., 2019).

Beyond the expansions, the SSU also contains a characteristic body protuberance. The high-resolution structure revealed that this protuberance of unknown function is composed of mS47, mS45 and an extension of uS4m. The foot of the SSU, essentially h44 and h6, is also elongated and stabilized by PPR proteins (Fig. 1).

The plant mitoribosome is also characterized by a distinctive central protuberance. This LSU domain that mediates inter-subunit contacts with the SSU head contains a 5S rRNA similar to bacterial central protuberances. Nevertheless, it also contains the mitochondrially specific proteins mL40, mL46, mL59/64 and mL60, thus increasing and reshaping the overall volume of the plant mitochondrial central protuberance (Waltz et al., 2020). Moreover, domain III of the LSU is completely reorganized and elongated, drastically reshaping the back of the LSU.

Thus, with these additional RNA domains and proteins, the plant mitoribosome represents an augmented bacterial ribosome. The SSU is particularly expanded with its large expansions and numerous additional proteins (Fig. 1).

2.2. Specialization for the translation of membrane proteins

Mitochondrial ribosomes are specialized for the translation of the small set of proteins that remain encoded in mitochondrial genomes. Most of these proteins are hydrophobic core components of respiratory complexes. Studies in mammals and yeast have revealed that mitoribosomes indeed evolved to cope with the translation of this particular set of proteins. Both mammals and yeast mitoribosomes are, at least partially, attached to the mitochondrial inner membrane and make contact with the insertase Oxa1, through the interaction with mL45 in mammals and Mba1 as well as an RNA expansion segment of H96 in yeast (Pfeffer et al., 2015; Englmeier et al., 2017). Similarly, in plants the biochemical characterization of the mitoribosome suggested that it is membrane-bound because, based on the observation that treatments with non-ionic detergents were required to solubilize it from mitochondrial membrane fractions (Waltz et al., 2019). The determination of its structure at high resolution revealed that the peptide exit tunnel going from the peptidyl-transferase center to the channel exit is rather similar to what is found in bacteria, in contrast to what has been described in opisthokonta species. Nevertheless, it is likely that the channel exit makes contact with Oxa1 through a linker protein. Such a protein would be specific to plants as orthologues of Mba1 and mL45 do not occur in plant mitochondria. The plant mitoribosome structure also

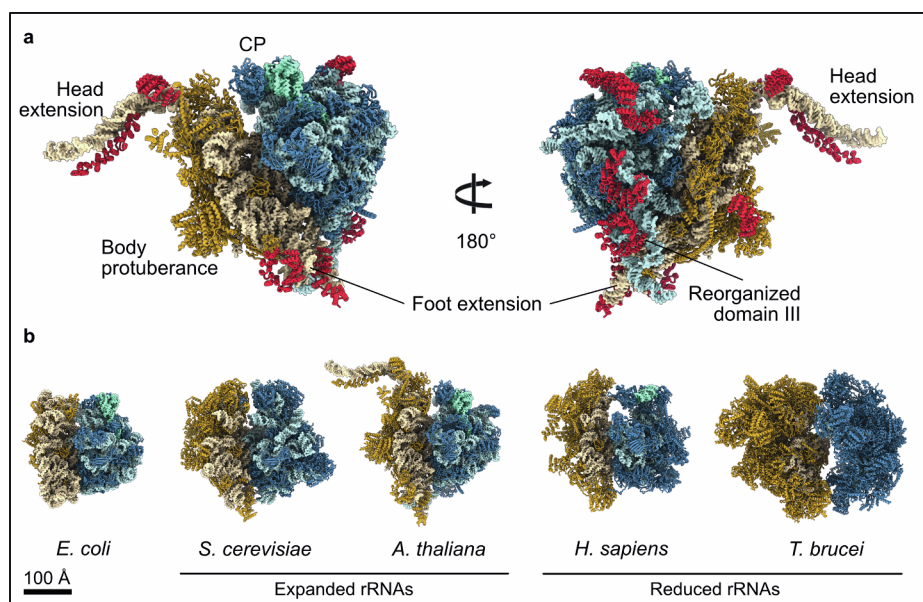


Fig. 1. Structural comparison between the plant and other mitoribosomes. (a) High resolution structure of cauliflower mitoribosome determined by Cryo-EM, shown in two orientations. SSU components are shown in beige colors and LSU components in blue. Lighter shades represent rRNAs while darker shades show proteins. Plant-specific PPR proteins associated with the mitoribosome are shown in red. (b) High resolution structures of mitoribosomes from yeast, plants, mammals and Trypanosomes are compared with *E. coli* ribosome structure, highlighting the divergence of mitoribosomes as compared to bacteria and their diversity in terms of size and shape across eukaryotes. Scale bar represents 100 Å.

reveals an extensive surface mainly formed by the remodeled Domain III of the LSU. This surface might also be involved in the interaction with the mitochondrial inner membrane (Waltz et al., 2020).

3. Structural divergence between mitoribosomes from plants and from other eukaryotes

While all mitoribosomes from the different eukaryotic groups seemingly share very similar functions, i.e. to translate a small set of mRNAs mostly encoding respiratory chain proteins, it is striking to see how mitoribosome composition and structure diverged throughout evolution (Waltz and Giegé, 2019). In comparison, even if exceptions exist (Barandun et al., 2019), cytosolic ribosomes from the different eukaryotic groups are much more conserved, both in terms of structure and composition (Yusupova and Yusupov, 2017). Briefly, mitoribosomes are all protein-rich as compared to bacterial ribosomes and are all larger than bacterial ribosomes (1.2–1.5 times larger depending on the species) (Waltz and Giegé, 2019). However, their overall structures are very different, with specific rearrangements and expansions in the different eukaryotic groups. These structural modifications usually correlate with functional adaptations, the SSUs for example, are heavily reshaped and expanded, most likely to accommodate unique and alternative translation initiation processes by delimitating a cleft that could be involved in mRNA recruitment (Fig. 1). Initial assumptions, mostly based on the analysis of mammalian mitoribosomes, proposed that the increase in mitoribosome protein numbers had compensated for the decrease in rRNA sizes (Greber and Ban, 2016). This paradigm can be pushed to an extreme with the trypanosome mitoribosome that contains extremely reduced rRNAs and a huge set of 127 proteins (Ramrath et al., 2018). This model of reduced-RNA evolution cannot be extrapolated to all mitoribosomes, as mitoribosomal rRNAs are not always reduced in size during eukaryotic evolution. Plants, and to a lesser extent yeast, illustrate how mitoribosomes could be expanded both in terms of rRNAs and protein content.

Another major divergence resides in the composition of the central protuberance among the different eukaryotic mitoribosomes. While it contains a 5S rRNA in plants similar to bacteria, it diverged significantly in other eukaryotes, with the 5S rRNA being replaced by a tRNA in mammals, by an LSU rRNA expansion in yeast and replaced entirely by proteins in trypanosomes (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015; Ramrath et al., 2018; Waltz et al., 2020). Altogether, the extreme differences observed between mitochondrial ribosomes suggest that

they have evolved to adapt to particular eukaryotic niches. Evolutionary cues to these adaptations might have been the differences in mitochondrial genome content in the different eukaryotic groups (e.g. encoding exclusively hydrophobic proteins or encoding both hydrophobic and hydrophilic proteins) or different physiological or biochemical environments in mitochondria from the different eukaryotic groups (e.g. different pH or temperature conditions). In all cases, given the wide diversity of mitoribosome structures and compositions, it appears that they are more permissive to evolutionary drifts than cytosolic ribosomes or chlororibosomes (which strongly resemble bacterial ribosome) (Boerema et al., 2018). This might be explained by the fast generation time of mitochondria, as compared to the whole cell, directly affecting the mitoribosome scaffolds, mitochondrial rRNAs. This might also indicate that mitoribosome functions are less crucial than the other ribosome functions for eukaryotic cells viability.

4. Occurrence and functions of pentatricopeptide repeat proteins as ribosomal components

Early biochemical analyses revealed that plant mitochondrial PPR proteins, i.e. PPR336 and PNM1, occur in high-molecular-weight fractions containing mitoribosomes (Uyttewaal et al., 2008; Hammani et al., 2011). These proteins were lost from mitoribosomal fractions upon ribosome destabilizing treatments using puromycin or EDTA similar to canonical ribosomal proteins or rRNAs (Uyttewaal et al., 2008; Hammani et al., 2011). It was therefore proposed that these PPR proteins might be components of plant mitoribosomes. Still, their occurrence as core ribosomal proteins or their precise molecular functions could not be established.

Recently, the detailed characterization of plant mitoribosomes at the biochemical and structural levels confirmed that PPR proteins indeed occur as core ribosomal proteins. These proteins were coined “ribosomal PPR” or rPPR and PPR336 and PNM1 were renamed rPPR1 and rPPR9 (Waltz et al., 2019). While the biochemical analysis showed that 11 PPR proteins can be found in the plant mitoribosome (Waltz et al., 2019), only 8 were observed in the mitoribosome high resolution structure (Waltz et al., 2020). This suggests that some rPPR proteins are functionally redundant, e.g. rPPR3a and rPPR3b and/or that specific subpopulations of mitoribosomes with different subunit compositions co-exist in mitochondria. Alternatively, it cannot be excluded that some rPPR proteins are mobile/flexible, thus hindering their visualization in the cryoEM structure, especially when bound to highly-flexible rRNA

expansion segments. With the exception of rPPR10/mS83 localized in the SSU mRNA exit channel (discussed below), it is striking to see that all the rPPR proteins interact and stabilize plant-specific rRNA expansions. For instance, rPPR4 and rPPR9 bind rRNA expansions of the LSU. Ribosomal PPR5 contributes to the overall stability of the LSU by long-distance interactions with the expansion segment of H16 and H31, while rPPR6 and another rPPR bind and shape the large head expansion of the mitoribosome SSU (Waltz et al., 2020). It thus appears that in most instances the recruitment of PPR proteins to the plant mitoribosome and the expansions of both LSU and SSU rRNAs occurred as a co-evolutionary process. Nonetheless, the functional relevance of the plant-specific expansions and their rPPR binders remains unknown. It is for instance surprising to note that the knockout mutation of rPPR9 results in lethality while that of rPPR4 only results in plant growth delay, although the two proteins share seemingly similar functions through the interaction with neighboring expansions in the mitoribosome LSU.

The identification and characterization of rPPR proteins also sheds a new light on the diversity of PPR proteins mode of action. PPR proteins can be divided into two major subfamilies, the P (pure PPR) and PLS (pure, long, short) PPR proteins (Barkan and Small, 2014). While PLS-types are nearly exclusively involved in RNA editing, P-type proteins are involved in transcription, RNA editing, splicing, RNA end maturation and stability as well as translation (Cheng et al., 2016). Until now, the mode of action of all characterized PPR proteins involved the specific recognition of RNA targets, with individual PPR motifs recognizing individual bases according to a combinatorial recognition code where the nature of residues 5 and 35 of each motif is instrumental for base recognition (Barkan et al., 2012). This process takes place most of the time with the recognition of contiguous bases in an RNA sequence or in a folded RNA such as tRNA, with the recognition of specific unpaired bases, as found for RNase P enzyme PRORP (Gobert et al., 2013; Pinker et al., 2017). Still in all cases, RNA recognition by PPR involves interactions between the concave side of a PPR superhelix and unpaired RNA bases. The novel rPPR proteins seem to use a completely different mode of action. The determination of the near atomic resolution structures of rPPRs in the context of the mitoribosome showed that rPPR proteins mostly bind the convex side, i.e. the phosphate backbone, of paired RNA helices (Waltz et al., 2020). In particular, positively charged residues of the rPPRs seem to contact the phosphate backbone of RNA, thus making a positive/negative charges interaction (Fig. 2). This observation is in accordance with the fact that residues at positions 5 and 35 of rPPR proteins do not appear to follow the canonical PPR code and do not allow us to predict RNA targets. The way rPPR proteins achieve specificity for particular rRNA helices remains to be determined. It will also be interesting to investigate to what degree this alternative mode of action is widespread or not among other non-ribosomal PPR proteins.

5. Clues for plant mitochondrial translation initiation processes

At this stage, the processes underlying mitochondrial translation initiation are largely unexplored and remain speculative in plant mitochondria. Translation initiation involves the recruitment and correct positioning of mRNAs at a specific site on the mitoribosome SSU. While of bacterial origin, and contrary to chloroplasts where Shine-Dalgarno-like sequences have been found for some genes, plant mitochondria have entirely lost Shine-Dalgarno sequences from their mRNA sequences and also lost anti-Shine-Dalgarno sequences from the SSU 18S rRNA (Hammani and Giegé, 2014). A similar situation is found in all mitochondrial systems investigated so far (animals, yeast and trypanosoma) (Waltz and Giegé, 2019). However, in contrast to other systems such as mammals where mitochondrial mRNAs start with AUG initiation codons, plant mRNAs possess long 5' untranslated regions (UTRs) that might contain cis elements that could be involved in translation initiation (Hammani and Giegé, 2014). The analysis of

numerous plant mitochondrial genomic sequences has shown that translation is mostly, but not always, initiated with an AUG codon in land plant mitochondria. For instance, in Arabidopsis, GGG, AAU and GUG are putative additional translation initiator codons (Unsel et al., 1997). In other species such as Oenothera or radish, GUG and ACG make additional putative translation initiation sites (Bock et al., 1994; Dong et al., 1998). In all cases, specific ribosome entry sites on mRNAs have not yet been experimentally characterized in plant mitochondria.

Nevertheless, it was recently established that nearly half of the plant mitochondrial mRNA 5'UTRs contain a sequence motif rich in adenine and purines, here called the AxAAA motif, positioned 19 nt upstream of the predicted initiation codons (Waltz et al., 2020). Furthermore, the recent determination of the structure of plant mitochondrial ribosome has identified a novel PPR protein, rPPR10/mS83, positioned in the extended mRNA exit channel specific to the plant mitoribosome SSU (Waltz et al., 2020). rPPR10 is located at a distance from the decoding center that corresponds to a *circa* 19 nt sequence. One might thus speculate that rPPR10 functions as a plant mitochondria-specific recruitment platform that binds incoming mRNAs (canonically, unlike the rest of rPPRs) and thus specifies the translation start site. This putative translation initiation process would resemble a Shine-Dalgarno/anti Shine-Dalgarno interaction with a PPR/AxAAA interaction. However, the PPR code does not allow us to predict an RNA target for rPPR10 and its involvement in translation initiation must be assessed experimentally. It is also possible that another factor specifically recognizes the consensus sequence and that rPPR10 only acts as a general mRNA stabilizing factor. Nonetheless, a somewhat similar situation has been found in mammalian mitochondria, where the ribosomal PPR protein mS39 binds a conserved U-rich sequence downstream of initiation codons (Kummer et al., 2018).

The AxAAA motif is only found in 17 mRNAs (Waltz et al., 2020), indicating that at least another alternative translation initiation process must exist in plant mitochondria. This would be somewhat similar to translation initiation in chloroplasts where some mRNAs exploit a Shine-Dalgarno-like translation initiation mechanism and others use an alternative translation initiation pathway (Zoschke and Bock, 2018). For instance, the PPR protein MTL1 was recognized to be essential for the translation of Nad7 (Haili et al., 2016). Through the binding to Nad7 5'UTR, it might be specifically recognized and recruited by the mitoribosome SSU. Likewise, a number of PPR proteins that do not occur as core ribosomal proteins were identified in fractions containing mitoribosomes, either by immuno-precipitations or by a Blue-Native PAGE approach (Waltz et al., 2019; Rugen et al., 2019). Some of these proteins might serve as mRNA-specific translation initiation factors, similar to MTL1 and thus specify an alternative translation initiation pathway in plant mitochondria.

6. Dynamics and regulation of mitochondrial gene expression at the protein level

Beyond the recent advances in the characterization of plant mitochondrial translation apparatus, progress has also been made recently in characterizing the actual transcriptome expressed in plant mitochondria. For this, ribosome profiling technology was used to obtain a genome-wide snapshot view of mitochondrial translation in Arabidopsis (Planchard et al., 2018). This revealed that mitoribosome footprints are 27 or 28 nt long in land plants, in contrast to animal mitochondria where mitoribosome footprints are 24 to 37 nt long (Mai et al., 2017). It also revealed that ribosome occupancy of specific mRNAs, and thus translation rates are somewhat correlated with the abundance of the respective proteins in mitochondria. For instance, respiratory chain complex subunits and the ATP synthase are translated at higher rates than ribosomal proteins or cytochrome c maturation proteins. Mitoribosome occupancy also appear to follow the stoichiometry of subunits in the respective complexes, particularly for complex V where, for example, ATP1 present in the complex as a trimer is more

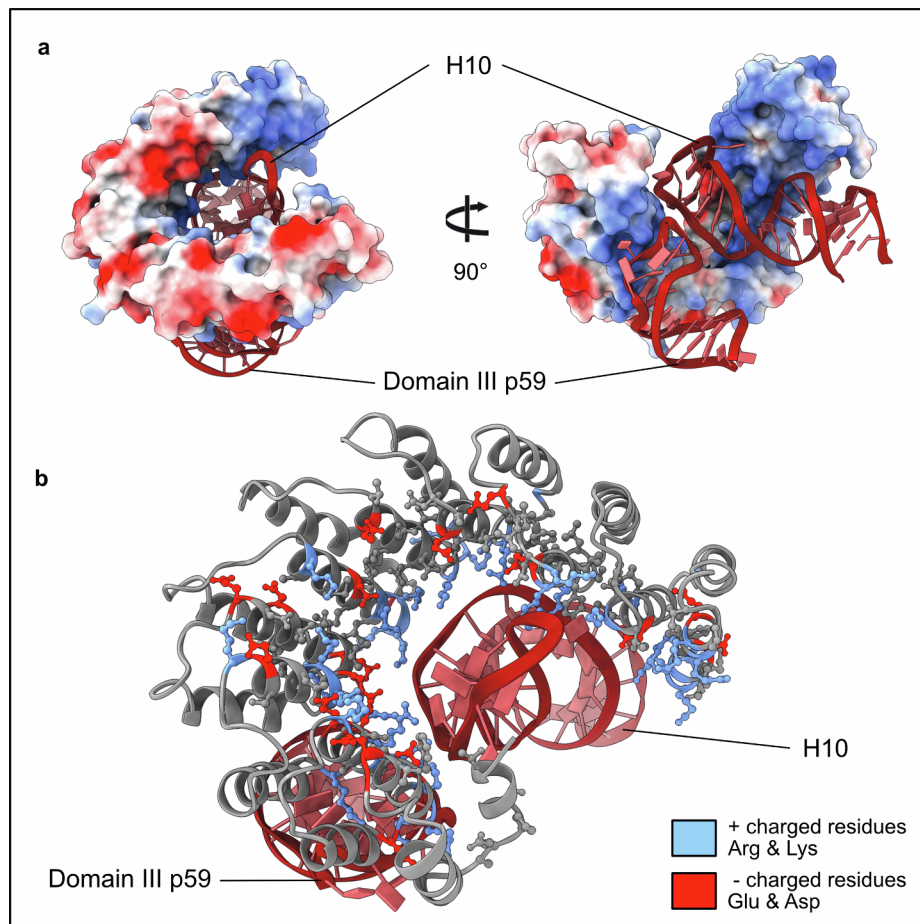


Fig. 2. Novel mode of action of ribosomal PPR proteins. rPPR9 interaction with the 26S rRNA H10 and Domain III plant-specific helix p59 is illustrated, with rRNA shown in dark red. On (a) the electrostatic potential of rPPR9 is shown with blue surfaces showing positive charges and red surfaces showing negative charges, revealing the mostly positively charged interior part of rPPR9 interacting with the RNA. (b) shows the spatial distribution of positively and negatively charged residues of rPPR9 colored in blue and red respectively. Positively charged Arg and Lys point towards the H10 rRNA helix phosphate backbone.

translated than ATP6 present as a single copy (Guo and Rubinstein, 2018).

The mitochondrial translome was also analyzed in different genetic mutant backgrounds; for instance to analyze the function of a novel ribosomal protein, as described above (Waltz et al., 2019). It was also used with complex I mutants (Planchard et al., 2018) as well as with rps10 mutants (Kwasniak-Owczarek et al., 2019). This revealed that the ribosome association profiles were modified as compared to wild-type, with e.g. a reduction of ribosome occupancy for some ATP synthase mRNAs in the complex I mutants (Planchard et al., 2018) and higher translation rates of ribosomal proteins in rps10 mutants (Kwasniak-Owczarek et al., 2019). These observations directly demonstrate that plant mitochondrial translation is indeed a dynamic process that can adapt to a changing mitochondrial environment.

While it is becoming an accepted concept that plant mitochondrial translation can be tuned and finely regulated, it is still unclear whether the translation apparatus operates a quality control assessment of mRNAs in plant mitochondria. An important feature of mRNA maturation in plant mitochondria is RNA editing. It alters hundreds of codons in the mitochondrial transcriptome (Giegé and Brennicke, 1999; Small et al., 2019). Protein sequence comparisons have shown that only proteins translated from fully edited mRNAs should result in evolutionarily conserved and functional proteins (Gualberto et al., 1989). Nevertheless, the translation of a collection of partially edited mRNAs would lead to a great diversity of protein isoforms that might be used for alternative or regulatory functions. An early analysis performed in maize mitochondria using antibodies generated against non-edited, partially edited and fully edited fragments of rps12 suggested that partially edited mRNAs can be translated and that the mitoribosome does not discriminate the editing status of its mRNA substrates (Phreaner et al., 1996). This was corroborated with the recent ribosome

profiling analysis that confirmed that the actual translation of mRNAs is not dependent on the editing status of mRNAs (Planchard et al., 2018). Likewise, it also appears that mitoribosomes can take unspliced mRNAs as substrates (Kwasniak-Owczarek et al., 2019). Still, direct sequencing of different proteins, e.g. wheat ATP9, potato NAD9 and petunia ATP6 (Graves et al., 1990; Grohmann et al., 1994; Lu and Hanson, 1994) and the plant mitochondria proteomes (Millar et al., 2001) showed that only proteins corresponding to fully edited and spliced mRNAs are present in the respective functional complexes found in plant mitochondria. As previously proposed (Giegé et al., 2005), this suggests that the steady-state accumulation of translation products is regulated at the post-translational level, i.e. during the assembly of functional complexes. Messenger RNAs appear to be translated indiscriminately and only functional proteins can be assembled in respiratory complexes or the ribosome while aberrant proteins are not incorporated into functional complexes and are most probably quickly degraded. In support of this hypothesis, a number of factors involved in protein maturation and/or protein degradation were identified in fractions containing mitoribosomes (Waltz et al., 2019; Rugen et al., 2019).

7. Diversity of mitochondrial translation systems in the green lineage

While recent studies have revealed the translation landscape of Arabidopsis mitochondria as well as the composition and structure of its ribosome, very little is known on the diversity of mitochondrial translation machineries in the green lineage. Among eukaryotes, the “green lineage” corresponds to the supergroup of Archaeplastida (or Plantae). It includes Glaucophytes, Rhodophytes (red algae) and Viridiplantae. The latter includes uni- and multicellular green algae as well as Embryophytes. This branch includes bryophytes, ferns, gymnosperms

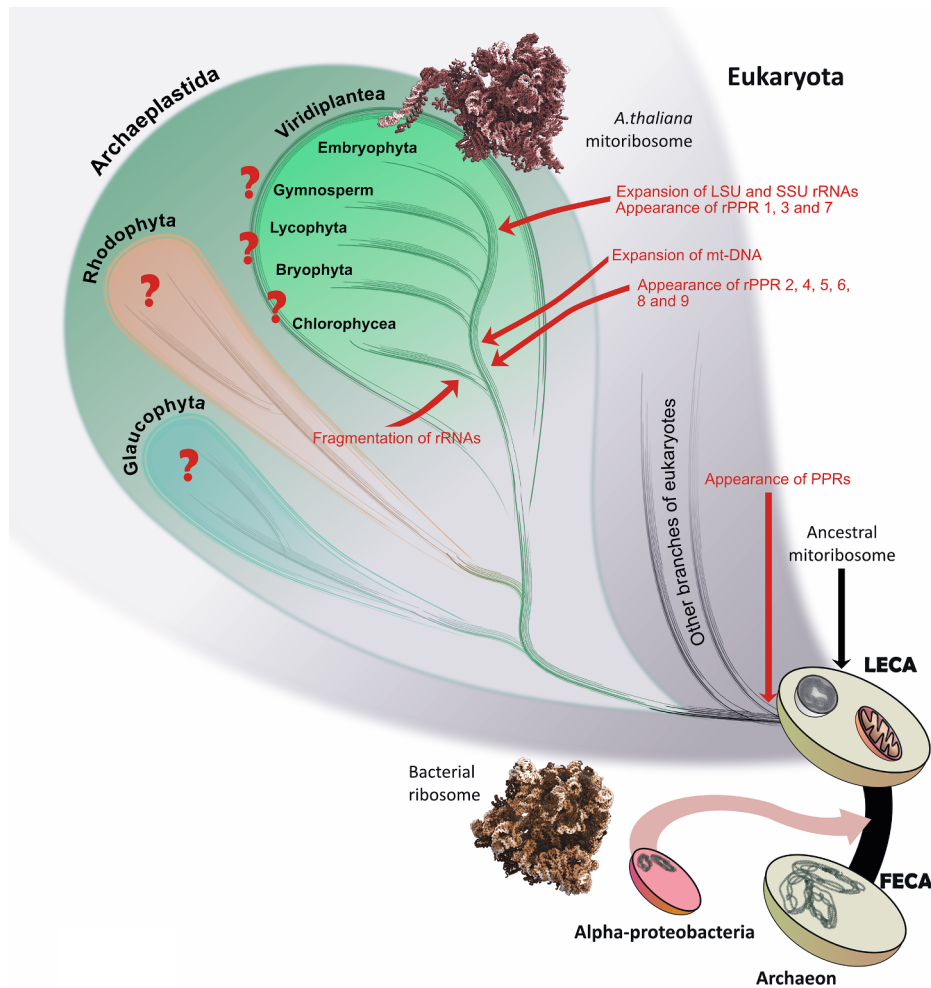


Fig. 3. Phylogenetic history of the appearance of specific features of the mitochondrial translation apparatus in Archaeplastida. FECA stands for the “first eukaryotic common ancestor” and LECA, the “last eukaryotic common ancestor”. Red arrows indicate evolutionary events that influenced mitoribosome composition and structure. Cartoons represent the structures of *E. coli* ribosome and the architecture and structure of Arabidopsis/cauliflower mitoribosome. Question marks are shown for clades of the plantae lineage where no information is available on the composition and structure of mitoribosomes.

and angiosperms (Fig. 3). This Plantae super-group is also defined as the group of organisms with a plastid resulting directly from the endosymbiosis of cyanobacteria (Burki, 2014). The so-called primary endosymbiosis of cyanobacteria is believed to have occurred 1.2 to 1.5×10^5 years ago (Dyall et al., 2004). The plastids of Plantae therefore have a common origin, all of them coming from this primary endosymbiosis. However, Plantae are not the only eukaryotes with plastids or to be photosynthetic. Indeed, many eukaryotes have undergone so-called secondary or even tertiary endosymbiosis events (Archibald, 2009). These evolutionary processes correspond to the endosymbiosis of a eukaryote with another eukaryote carrying a primary endosymbiont, such as green algae. Once acquired, the secondary endosymbiont can be reduced until only its plastid remains (as observed with *Euglena* in the eukaryote supergroup of Excavata). Many secondary endosymbioses are observed in the eukaryote supergroup of Stramenopiles, Alveolates and Rhizaria (SAR). In particular, in the branch of Alveolates, secondary plastids can be photosynthetic as observed in *Chromera* (Oborník et al., 2011) or can have lost their photosynthetic function, e.g. to become apicoplasts, as observed in Apicomplexa such as the malaria parasite *Plasmodium* (Dyall et al., 2004; Archibald, 2009). Mitochondrial translation is completely unexplored in these secondary symbiotic organisms as well as in most major groups of plantae.

Still, the analysis of ribosomal RNA sequences in genomic databases already reveals the huge diversity of mitochondrial ribosomes in the

green lineage. For instance, among embryophytes (land plants), the large expansion of the small subunit 18S rRNA helix 39 (h39), that corresponds to a novel head domain in Arabidopsis is very variable. It is altogether conserved in angiosperms but can be longer in some species, e.g. in *Vitis* or can be shorter as seen in rice, although in most monocots (e.g. maize, wheat) a long expansion is present similar to dicotyledons. Then, h39 expansions are shorter in gymnosperms and mosses and extremely reduced in ferns (Waltz et al., 2019). Likewise the large subunit 26S rRNA is also very divergent among Viridiplantae, with domain III expansions of variable sizes, here as well longer in angiosperms and shorter in gymnosperms, ferns and mosses. In addition, specific expansions are observed, e.g. in the 3' part of 26S rRNA in some mosses (Waltz et al., 2019). Beyond embryophytes, rRNAs are even more diverse in other groups of Viridiplantae. In particular, in green algae such as the chlorophyte *Chlamydomonas*, rRNAs are fragmented into several small RNAs encoded by gene fragments (Boer and Gray, 1988). A similar situation is found in apicomplexans such as *Plasmodium* (Feagin et al., 1991). The way these rRNA fragments are assembled to reconstitute the rRNA core of mitoribosomes is completely unknown. In all cases, it suggests that mitoribosome assembly processes are very different between clades of the green lineage.

Beyond the nature of rRNAs and of mitoribosome composition, other features of mitochondrial translation are very divergent in the green lineage. For instance, the nature of mature mRNAs that enter translation varies. In embryophytes, such as Arabidopsis, they contain

long 5' UTRs (Hammani and Giegé, 2014), while in Chlorophyta such as *Chlamydomonas*, no 5' UTR is present and the mature mRNAs start with the translation initiation codon, similar to mammalian mitochondria (Salinas-Giegé et al., 2017). Moreover, in *Chlamydomonas*, mRNAs 3' ends are defined by poly-cytidine tails added post-transcriptionally. These poly C tails that are specific to Chlorophyta mitochondrial mRNAs (Salinas-Giegé et al., 2017) might define mature mRNAs that are competent to be recruited by the translation initiation machinery. While all the mitochondrial mRNAs from the green lineage seemingly lack Shine-Dalgarno sequences (Waltz and Giegé, 2019), they appear to have very diverse translation initiation and regulation processes among the green lineage.

8. Concluding remarks

In summary, while it has already been documented experimentally that mitochondrial translation and its main apparatus, the mitoribosomes are extremely diverse between eukaryotic supergroups (i.e. between, Opisthokonta, Excavata and Viridiplantae) (Waltz and Giegé, 2019), it also appears that translation processes and mitoribosomes are extremely divergent within eukaryotic supergroups. Similar to fungal and mammalian mitoribosomes (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015; Desai et al., 2017) that significantly differ among opisthokonts, mitochondrial translation processes are expected to be very divergent both in terms of translation initiation processes, ribosome composition and structures in the different groups composing the green lineage. The experimental characterization of translation regulation processes as well as the characterization of a variety of mitoribosomes from species representative of the diversity of the green lineage will be required to fully apprehend the evolution and specialization of translation processes across eukaryotes.

Acknowledgements

This work was supported by the “Centre National de la Recherche Scientifique”, the University of Strasbourg, by Agence Nationale de la Recherche (ANR) grants [MITRA, ANR-16-CE11-0024-02] to PG and YH and by the LabEx consortium “MitoCross” in the frame of the French National Program “Investissement d’Avenir” [ANR-11-LABX-0057_MITOCROSS to PG, as well as by a European Research Council Starting Grant (TransTryp ID:759120) to YH.

References

- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R.S., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493.
- Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S.H.W., Ramakrishnan, V., 2015. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science* 348, 95–98.
- Archibald, J.M., 2009. The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol.* 19, 81–88.
- Barandun, J., Hunziker, M., Vossbrinck, C.R., Klinge, S., 2019. Evolutionary compaction and adaptation visualized by the structure of the dormant microsporidian ribosome. *Nat. Microbiol.* 4, 1798–1804.
- Barkan, A., Rojas, M., Fujii, S., Yap, A., Chong, Y.S., Bond, C.S., Small, I., 2012. A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genet.* 8, e1002910.
- Barkan, A., Small, I., 2014. Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 415–442.
- Ben-Shem, A., De Loubresse, N.G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M., 2011. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 1524–1529.
- Bock, H., Brennicke, A., Schuster, W., 1994. Rps3 and rpl16 genes do not overlap in oenothera mitochondria: GTG as a potential translation initiation codon in plant mitochondria? *Plant Mol. Biol.* 24, 811–818.
- Boczonadi, V., Ricci, G., Horvath, R., 2018. Mitochondrial DNA transcription and translation: clinical syndromes. *Essays Biochem.* 62, 321–340.
- Boer, P.H., Gray, M.W., 1988. Scrambled ribosomal RNA gene pieces in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. *Cell* 55, 399–411.
- Boerema, A.P., Aibara, S., Paul, B., Tobiasson, V., Kimanius, D., Forsberg, B.O., Wallden, K., Lindahl, E., Amunts, A., 2018. Structure of the chloroplast ribosome with chl-RRF and hibernation-promoting factor. *Nat. Plants* 4, 212–217.
- Burger, G., Gray, M.W., Forget, L., Lang, B.F., 2013. Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biol. Evol.* 5, 418–438.
- Burki, F., 2014. The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Cheng, S., Gutmann, B., Zhong, X., Ye, Y., Fisher, M.F., Bai, F., Castleden, I., Song, Y., Song, B., Huang, J., Liu, X., Xu, X., Lim, B.L., Bond, C.S., Yiu, S.M., Small, I., 2016. Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *Plant J.* 85, 532–547.
- Clemons, W.M., May, J.L.C., Wimberly, B.T., McCutcheon, J.P., Capel, M.S., Ramakrishnan, V., 1999. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* 400, 833–840.
- Danev, R., Yanagisawa, H., Kikkawa, M., 2019. Cryo-electron microscopy methodology: current aspects and future directions. *Trends Biochem. Sci.* 44, 837–848.
- Delage, L., Giegé, P., Sakamoto, M., Maréchal-Drouard, L., 2007. Four paralogues of RPL12 are differentially associated to ribosome in plant mitochondria. *Biochimie* 89, 658–668.
- Desai, N., Brown, A., Amunts, A., Ramakrishnan, V., 2017. The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science* 355, 528–531.
- Dong, F.G., Wilson, K.G., Makaroff, C.A., 1998. The radish (*Raphanus sativus* L.) mitochondrial *cox2* gene contains an ACG at the predicted translation initiation site. *Curr. Genet.* 34, 79–87.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., Johnson, P.J., 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304, 253–257.
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C.W., Ettema, T.J.G., 2017. Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 120.
- Englmeier, R., Pfeffer, S., Förster, F., 2017. Structure of the human mitochondrial ribosome studied in situ by cryoelectron tomography. *Structure* 25, 1574–1581.e2.
- Feagin, J.E., Gardner, M.J., Williamson, D.H., Wilson, R.J.M., 1991. The putative mitochondrial genome of *Plasmodium falciparum*. *J. Protozool.* 38, 243–245.
- Giegé, P., Brennicke, A., 1999. RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 15324–15329.
- Giegé, P., Hoffmann, M., Binder, S., Brennicke, A., 2000. RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria. *EMBO Rep* 1, 164–170.
- Giegé, P., Sweetlove, L.J., Cognat, V., Leaver, C.J., 2005. Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 1497–1512.
- Gobert, A., Pinker, F., Fuchsbaue, O., Gutmann, B., Boutin, R., Roblin, P., Sauter, C., Giegé, P., 2013. Structural insights into protein-only RNase P complexed with tRNA. *Nat. Commun.* 4, 1353.
- Graves, P.V., Bégu, D., Velours, J., Neau, E., Belloc, F., Litvak, S., Araya, A., 1990. Direct protein sequencing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9 confirms RNA editing in plants. *J. Mol. Biol.* 214, 1–6.
- Gray, M.W., 2015. Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 10133–10138.
- Greber, B.J., Ban, N., 2016. Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annu. Rev. Biochem.* 85, annurev-biochem-060815-014343.
- Greber, B.J., Bieri, P., Leibundgut, M., Leitner, A., Aebersold, R., Boehringer, D., Ban, N., 2015. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science* 348, 303–308.
- Grohmann, L., Thieck, O., Herz, U., Schroder, W., Brennicke, A., 1994. Translation of nad9 mRNAs in mitochondria from *Solanum tuberosum* is restricted to completely edited transcripts. *Nucleic Acids Res.* 22, 3304–3311.
- Gualberto, J.M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J.H., Grienenberger, J.M., 1989. RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* 341, 660–662.
- Gualberto, J.M., Newton, K.J., 2017. Plant mitochondrial genomes: dynamics and mechanisms of mutation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 225–252.
- Guo, H., Rubinstein, J.L., 2018. Cryo-EM of ATP synthases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 52, 71–79.
- Haili, N., Planchard, N., Arnal, N., Quadrado, M., Vrielynck, N., Dahan, J., des Francs-Small, C.C., Mireau, H., 2016. The MTL1 Pentatricopeptide repeat protein is required for both translation and splicing of the mitochondrial NADH dehydrogenase Subunit7 mRNA in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 170, 354–366.
- Hammani, K., Bonnard, G., Bouchoucha, A., Gobert, A., Pinker, F., Salinas, T., Giegé, P., 2014. Helical repeats modular proteins are major players for organelle gene expression. *Biochimie* 100, 141–150.
- Hammani, K., Giegé, P., 2014. RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends Plant Sci.* 19, 380–389.
- Hammani, K., Gobert, A., Hleibieh, K., Choulier, L., Small, I., Giegé, P., 2011. An Arabidopsis dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation. *Plant Cell* 23, 730–740.
- Kummer, E., Leibundgut, M., Rackham, O., Lee, R.G., Boehringer, D., Filipovska, A., Ban, N., 2018. Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM. *Nature* 560, 263–267.
- Kwasniak-Owczarek, M., Kazmierczak, U., Tomal, A., Mackiewicz, P., Janska, H., 2019. Deficiency of mitoribosomal S10 protein affects translation and splicing in Arabidopsis mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 47, 11790–11806.
- Lu, B.W., Hanson, M.R., 1994. A single homogeneous form of ATP6 protein accumulates in petunia mitochondria despite the presence of differentially edited atp6 transcripts. *Plant Cell* 6, 1955–1968.
- Mai, N., Chrzanowska-lightowlers, Z.M.A., Lightowlers, R.N., 2017. The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell Tissue Res.* 367, 5–20.
- Martijn, J., Vosseberg, J., Guy, L., Offre, P., Ettema, T.J.G., 2018. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature* 557, 101–105.
- Michaelis, G., Vahrenholt, C., Pratje, E., 1990. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas*

- reinhardtii*: the gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Mol. Gen. Genet.* 223, 211–216.
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giegé, P., Leaver, C.J., 2001. Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 127, 1711–1727.
- Oborník, M., Vancová, M., Lai, D.H., Janoušková, J., Keeling, P.J., Lukeš, J., 2011. Morphology and ultrastructure of multiple life cycle stages of the photosynthetic relative of apicomplexa, *Chromera velia*. *Protist* 162, 115–130.
- Pfeffer, S., Woellhaf, M.W., Herrmann, J.M., Förster, F., 2015. Organization of the mitochondrial translation machinery studied *in situ* by cryoelectron tomography. *Nat. Commun.* 6, 6019.
- Phreaner, C.G., Williams, M.A., Mulligan, R.M., 1996. Incomplete editing of rps12 transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria. *Plant Cell* 8, 107–117.
- Pinker, F., Schelcher, C., Fernandez-Millan, P., Gobert, A., Birck, C., Thureau, A., Roblin, P., Giegé, P., Sauter, X.C., 2017. Biophysical analysis of Arabidopsis protein-only RNase P alone and in complex with tRNA provides a refined model of tRNA binding. *J. Biol. Chem.* 292, 13904–13913.
- Planchard, N., Bertin, P., Quadrado, M., Dargel-Graffin, C., Hatin, I., Namy, O., Mireau, H., 2018. The translational landscape of Arabidopsis mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 1–11.
- Ramrath, D., Niemann, M., Leibundgut, M., Bieri, P., Prange, C., Horn, E.K., Leitner, A., Boehringer, D., Schneider, A., Ban, N., 2018. Evolutionary shift toward protein-based architecture in trypanosomal mitochondrial ribosomes. *Science* 362, 7735.
- Rugen, N., Straube, H., Franken, L.E., Braun, H.P., Eubel, H., 2019. Complexome profiling reveals association of PPR proteins with ribosomes in the mitochondria of plants. *Mol. Cell. Proteomics* 18, 1345–1362.
- Salinas-Giegé, T., Cavaiuolo, M., Ubrig, E., Remacle, C., Duchêne, A., Vallon, O., Maréchal Drouard, L., 2017. Polycytidylation of mitochondrial mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nuc. Acids. Res.* 45, 12963–12973.
- Schmitz-Linneweber, C., Small, I., 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* 13, 663–670.
- Schmitz-Linneweber, C., Lampe, M.K., Sultan, L.D., Ostersetzer-Biran, O., 2015. Organellar maturases: a window into the evolution of the spliceosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 798–808.
- Sloan, D.B., Wu, Z., Sharbrough, J., 2018. Correction of persistent errors in Arabidopsis reference mitochondrial genomes. *Plant Cell* 30, 525–527.
- Small, I.D., Schallenberg-Rüdinger, M., Takenaka, M., Mireau, H., Ostersetzer-Biran, O., 2019. Plant organellar RNA editing: what 30 years of research has revealed. *Plant J.* in press.
- Tomal, A., Kwasniak-Owczarek, M., Janska, H., 2019. An update on mitochondrial ribosome biology: the plant mitoribosome in the spotlight. *Cells* 8, E1562.
- Unsel, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., Brennicke, A., 1997. The mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* 15, 57–61.
- Uyttewaal, M., Mireau, H., Rurek, M., Hammani, K., Arnal, N., Quadrado, M., Giegé, P., 2008. PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J. Mol. Biol.* 375, 626–636.
- Waltz, F., Giegé, P., 2019. Striking diversity of mitochondria-specific translation processes across eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 45, 149–162.
- Waltz, F., Nguyen, T.-T., Arrivé, M., Bochler, A., Chicher, J., Hammann, P., Kuhn, L., Quadrado, M., Mireau, H., Hashem, Y., Giegé, P., 2019. Small is big in Arabidopsis mitochondrial ribosome. *Nat. Plants* 5, 106–117.
- Waltz, F., Soufari, H., Bochler, A., Giegé, P., Hashem, Y., 2020. Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome. *Nat. Plants.* in press.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., Woese, C.R., 1985. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4443–4447.
- Yusupova, G., Yusupov, M., 2017. Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160184.
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E.F., Saw, J.H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K.W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K.U., Stott, M.B., Nunoura, T., Banfield, J.F., Schramm, A., Baker, B.J., Spang, A., Ettema, T.J.G., 2017. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* 541, 353–358.
- Zoschke, R., Bock, R., 2018. Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control, and regulation. *Plant Cell.* 30, 745–770.



Review

Types and Functions of Mitochondria-Specific Ribosomal Proteins across Eukaryotes

Vassilis Scaltsoyiannes ^{1,†} , Nicolas Corre ^{1,†} , Florent Waltz ^{1,2,*} and Philippe Giegé ^{1,*}

¹ CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France; vassileios.skaltsogiannis@etu.unistra.fr (V.S.); nicolas.corre@etu.unistra.fr (N.C.)

² Helmholtz Pioneer Campus, Helmholtz Zentrum München, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Munich, Germany

* Correspondence: waltz.florent@gmail.com (F.W.); philippe.giege@ibmp-cnrs.unistra.fr (P.G.); Tel.: +33-3-6715-5363 (P.G.); Fax: +33-3-8861-4442 (P.G.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Mitochondria are key organelles that combine features inherited from their bacterial endosymbiotic ancestor with traits that arose during eukaryote evolution. These energy producing organelles have retained a genome and fully functional gene expression machineries including specific ribosomes. Recent advances in cryo-electron microscopy have enabled the characterization of a fast-growing number of the low abundant membrane-bound mitochondrial ribosomes. Surprisingly, mitochondria were found to be extremely diverse both in terms of structure and composition. Still, all of them drastically increased their number of ribosomal proteins. Interestingly, among the more than 130 novel ribosomal proteins identified to date in mitochondria, most of them are composed of α -helices. Many of them belong to the nuclear encoded super family of helical repeat proteins. Here we review the diversity of functions and the mode of action held by the novel mitochondria-specific ribosomal proteins and discuss why these proteins that share similar helical folds were independently recruited by mitochondria during evolution in independent eukaryote clades.

Keywords: mitochondrial gene expression; ribosomes; translation; helical repeat proteins; pentapeptide repeat proteins; single particle cryo-EM



Citation: Scaltsoyiannes, V.; Corre, N.; Waltz, F.; Giegé, P. Types and Functions of Mitochondria-Specific Ribosomal Proteins across Eukaryotes. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3474. <https://doi.org/10.3390/ijms23073474>

Academic Editor: Sarath Chandra Janga

Received: 22 February 2022

Accepted: 21 March 2022

Published: 23 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ribosomes are key molecular machines, fundamental to all life on Earth. They decode information carried by messenger RNAs (mRNAs) and translate it into proteins [1]. Ribosomes are universally composed of two subunits, the small one (SSU) binds mRNA and reads the genetic information, while the large subunit (LSU) catalyses the actual formation of peptidyl bonds between amino-acids that allows protein synthesis. Likewise, all ribosomes are ribonucleoprotein (RNP) complexes composed of numerous proteins and ribosomal RNAs (rRNAs), the LSU rRNA being a catalytic RNA, i.e., a ribozyme. Despite these common features, ribosomes diverged significantly during evolution. In bacteria and archaea, ribosomes both make 70S particles with about 54 proteins as well as 16S, 23S and 5S rRNAs [2]. However, archaeal ribosomes often evolved to adapt to harsh environmental conditions e.g., with the recruitment of specific r-proteins to respond to high temperature or halophilic conditions. Thus archaeal ribosomes often have a more rigid structure than their bacterial counterparts [3]. In contrast, ribosomes that occur in eukaryote cytosol are larger, forming 80S RNP complexes. They evolved from an ancestral archaeal ribosome but have more proteins and larger rRNAs, e.g., with 80 proteins and 18S, 28S, 5S and 5.8S rRNAs in humans [4]. Beyond these cytosolic ribosomes, which are often referred to as “eukaryote ribosomes”, other types of ribosomes occur in eukaryote cells. These additional ribosomes are found in genome-containing organelles: mitochondria, as well as chloroplasts for the

Archaeplastida kingdom. Until the last decade, very little was known of these organellar ribosomes [5,6].

Mitochondria and chloroplasts are essential energy producing organelles of bacterial origin that have arisen through distinct endosymbiotic events. Mitochondria derive from a bacteria belonging to a sister group of α -proteobacteria that was engulfed by the archaeal-type ancestor of eukaryote cells about 1.5–2 billion years ago [7–10]. The second endosymbiotic event took place 500 million years later with the engulfment of a cyanobacteria by a fully ledged eukaryote that gave rise to the tripartite phylum (red, blue and green algae) Archaeplastida [11,12]. Both mitochondria and chloroplasts are considered as semi-autonomous organelles because they have retained a genome and fully functional gene expression machineries [5]. While the vast majority of bacterial genes coming from the ancestral endosymbionts were either lost or transferred to the host nuclei, some genes—most of them encoding essential proteins of the respiratory chain or the photosynthetic machinery—remain to this date in organellar genomes. It is notable that many of these genes encode hydrophobic core proteins of the respective energy producing systems. The difficulty to synthesize in the cytosol and import to the organelles such membrane proteins might have been an evolutionary indicator for the retention of their genes in organellar genomes [13]. Another hypothesis proposes that a colocation of genes and of their products is required for the redox regulation of gene expression [14]. Nonetheless, the retention of mRNA coding genes in organelles implied that comprehensive gene expression machineries, including in particular functional ribosomes, should be present in organelles. For their biogenesis, mitochondrial ribosomes thus rely on the coordinated synthesis of ribosomal proteins, most of whose mRNAs are coded in the nucleus, translated in the cytosol, and imported into mitochondria, together with the synthesis of moieties encoded by the mitochondrial genome, i.e., mitochondrial rRNAs and ribosomal proteins, in some eukaryotes. Few studies have investigated the mitoribosomes assembly, although the evidence suggests that, in human and yeast, this process resembles bacterial ribosome assembly [5]. Because of their bacterial origin, it was assumed for a long time that organellar ribosomes would be very similar to bacterial ones. This assumption turned out to be true for chloroplasts, where the chlororibosomes composition and three-dimensional structure strongly resemble those of bacterial ribosomes, as revealed by recent studies [15–18].

In marked contrast with chloroplasts, the recent characterization of mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) in a diversity of species representing the major eukaryote groups has revealed how mitoribosomes strikingly diverged from prokaryotes and eukaryotes ribosomes. Even more stunning is their diversity between the different eukaryote clades [5,6]. While the 3D structures of bacterial and cytosolic ribosomes could be obtained by X-ray crystallography in 1999 and 2011, respectively [19,20], the characterisation and determination of 3D structures from very low abundant ribosomes such as mitoribosomes was only possible thanks to the cryo-electron microscopy (cryo-EM) revolution that started a decade ago. Since 2015, the compositions and structures of ribosomes from animals, fungi, kinetoplasts, land plants, a ciliate and a photosynthetic algae could be determined (Figure 1) [21–28], thus providing examples of mitoribosomes from Opisthokonta, Excavata, Archaeplastida and Stramenopiles, Alveolata, and Rhizaria (SAR), four out of the five major super-groups of eukaryotes. The overall architecture of all these mitoribosomes is extremely diverse, in particular that of the SSUs with numerous specific rRNA expansion segments and additional domains [5,29]. Mitochondrial ribosomal RNAs are extremely diverse. They can be larger than in bacteria, as seen in yeast and particularly in land plants, or highly reduced, as observed in animals and particularly in kinetoplasts. The most extreme example of rRNA divergence was observed in the algae *Chlamydomonas*, where rRNAs are fragmented into 13 pieces that are non-contiguously encoded as gene pieces in the *Chlamydomonas* mitochondrial genome, expressed as separate small RNAs and brought together to reconstitute a functional ribosome [27]. Beyond these divergences, a common feature of all mitoribosomes is the marked increase in the number of ribosomal proteins. To date, over 130 novel ribosomal proteins, specific to mitoribosomes, have been identified,

although only about 30 novel proteins are common to at least two mitoribosomes [30]. This implies that beyond a set of common proteins that might have been present in the common ancestor of all mitoribosomes, the different eukaryote groups independently recruited specific sets of proteins to make specialised ribosomes, potentially adapted to different environmental niches. Still, despite this diversity, it is remarkable that most of the novel mitochondrial ribosomal proteins belong to the group of α -helical repeat proteins, including proteins such as pentatricopeptide repeat (PPR) proteins, octatricopeptide repeat (OPR) proteins or mitochondrial transcription termination factor (mTERF) proteins that share a similar type of tridimensional fold. The diversity of structures and functions of the novel mitochondrial ribosomal proteins, for rRNA stabilisation, for the recruitment of mRNA, to bind other ribosomal proteins, to anchor the ribosomes to the mitochondrial membrane and for the assembly of mitoribosomes will be discussed here, and insights will be provided to understand the diversity of their mode of action. This ensemble of functions is summarized in Figure 2.

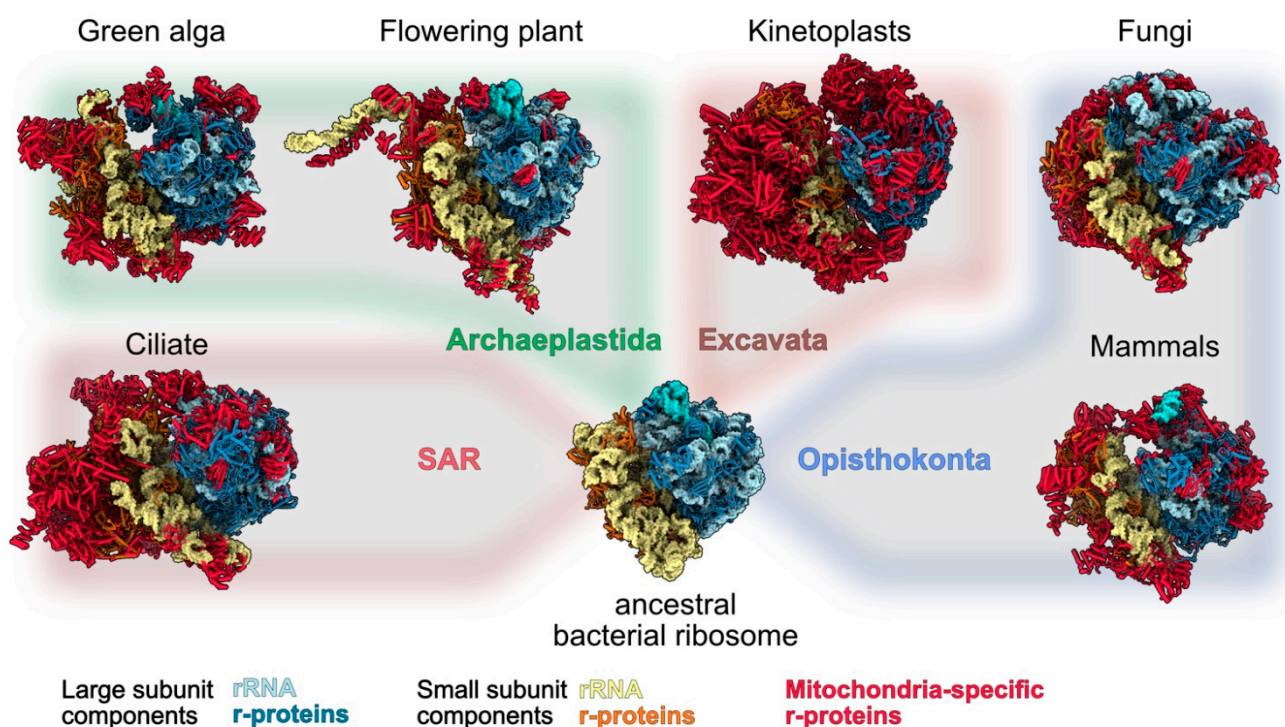


Figure 1. Structural comparison between available mitoribosome structures. To highlight the divergence of mitoribosomes as compared to bacteria and their diversity in terms of size and shape across eukaryotes, high resolution structures of mitoribosomes are presented and overlaid on a schematic evolutionary tree of eukaryotes. From left to right, mitoribosomes structures are from: ciliate (*T. thermophilus*), green alga (*C. reinhardtii*), flowering plant (*A. thaliana*), kinetoplasts (*T. brucei*), fungi (*N. crassa*) and mammals (*H. sapiens*). They are compared with *E. coli* ribosome structure, representing the ancestral form of mitoribosomes. Large subunits components are shown in blue shades and small subunit components in yellow shades. Mitochondria-specific ribosomal proteins (which includes shared and species-specific proteins) are highlighted in red. No structures have been solved yet for the supergroup Amoebozoa (hence not shown on the figure). SAR corresponds to the supergroup which includes the Stramenopiles, Alveolates, and Rhizaria subgroups.

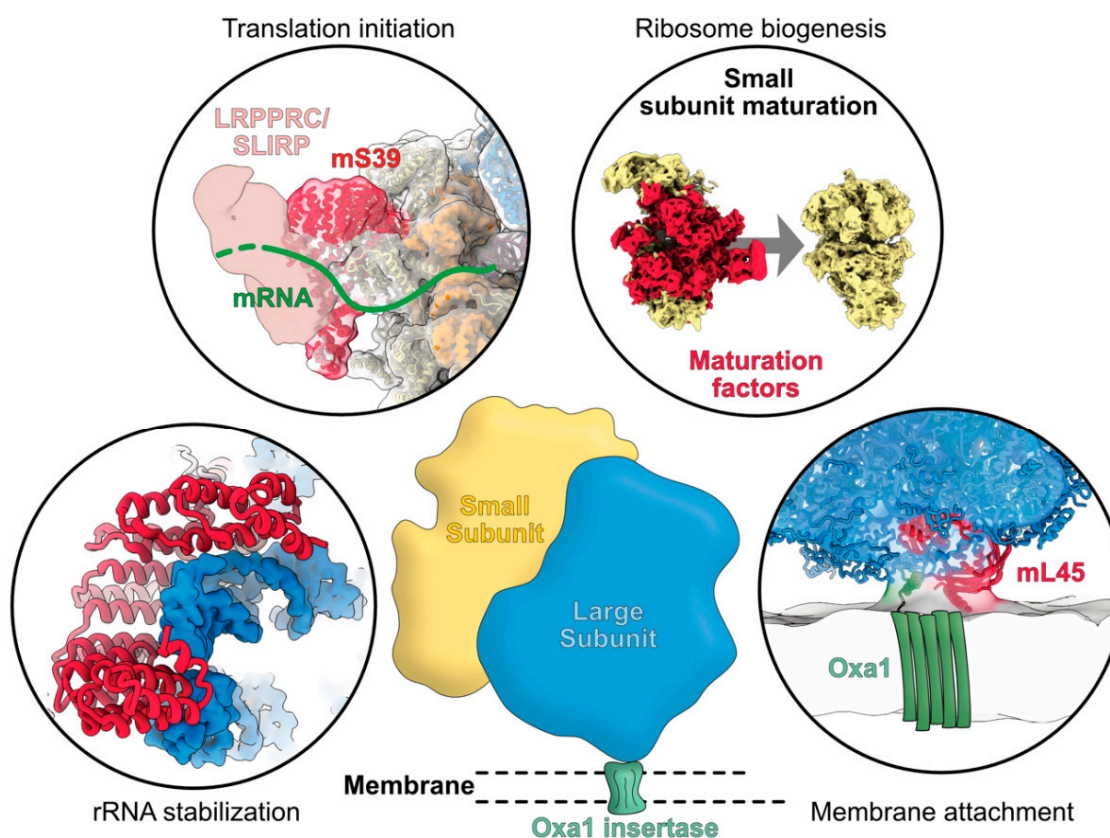


Figure 2. Graphical summary of the functions of mitoribosome-specific ribosomal proteins. The recently identified proteins specifically occurring in mitochondrial ribosomes are shown in red. They can be involved in rRNA stabilization, in the recruitment of mRNA for translation initiation, in the assembly and maturation of mitoribosomes, and in its attachment to the mitochondrial inner membrane through the binding with the insertase Oxa1. The exemplary shown mS39 and mL45 specifically occur in mammalian mitoribosomes.

2. Technologies That Allowed to Identify Mitoribosome-Specific Proteins

As early as the late 1950s, it was speculated that complexes capable of protein synthesis would be present in mitochondria [31,32], only five years after the first description of ribosomes [33]. In the following 10 years, biochemical characterisation of mitoribosomes was achieved for fungal and animal species [34]. These early reports described the sedimentation coefficient and the probable rRNA content of these mitoribosomes, already linking them to bacteria. However, the clarification of their protein composition would also only come more than 10 years later, with the two-dimensional poly acrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis of purified bovine mitoribosomes, revealing that these mitoribosomes would be composed of more than 80 proteins, hence more than found in bacteria, yet without knowing exactly their nature [35]. The development of protein sequencing and mass-spectrometry in the 1990s allowed, in the early 2000s, for the first characterisation of the putative protein composition of the small and large subunit of the mammalian mitoribosome [36,37]. These studies already revealed the conservation and absence of bacterial homologs, as well as putative proteins shared with yeast mitoribosomes, and some being specific to animals. However, their role in the ribosome was unknown. In 2003, the first cryo-EM characterization of a mitoribosome was published [38]. This study reported the architecture of the bovine mitoribosome at about 10Å resolution, not enough for a clear assignation of the mitoribosome specific r-proteins. It confirmed, however, the largely proteic nature of this mitoribosome, looking significantly different from bacterial and cytosolic ribosomes.

The release of complete organisms genomes combined with basic local alignment search tool (BLAST) and mass-spectrometry analyses allowed to investigate the composition of mitoribosomes in new organisms, revealing conserved and specific proteins [39–42]. Still, small proteins can escape detection by mass-spectrometry, and really pure samples are required to draw a clear picture of the protein composition, otherwise leading to an overestimation of the protein content, and the mis-assignment of proteins as r-proteins. The combination of different purification techniques and analyses, such as immunoprecipitation and classical sucrose density gradient separation, or large pore Blue Native PAGE and complexome profiling, or grad-seq, provides more accurate protein composition determination [26,43–45] but is still not 100% reliable and does not provide functional and spatial localization of the proteins in the complex of interest. These experiments can be complemented by crosslinking mass-spectrometry which allows for the determination of what proteins or domains are close to each other in the complex [46].

More than 50 years have been necessary to achieve a clear idea of the complete composition of a mitoribosome. Structural biology elucidates both the composition and function of the studied complex. Thanks to the rapid technical advancement of cryo-EM in the 2010s, notably with the development of new direct electron detectors [47], larger and more challenging to purify complexes could be resolved, such as mitoribosomes [21–23,48,49], to resolutions that allowed unambiguous assignment of protein densities, thus allowing for the direct determination of the complexes' composition.

Today, thanks to the technical progress in proteomics, metagenomic and structural biology, the combination of these techniques allows for the investigation of the composition of mitoribosomes and their evolution in ways that were unimaginable before.

3. Prominence of Helical Repeat Proteins in Mitochondrial Gene Expression

As mentioned above, recent technological advances, in particular cutting edge single particle cryo-EM [47], has enabled the identification of a large number of ribosomal proteins that specifically occur in mitochondria. Many of these factors belong to the protein super-family of helical repeat proteins that are composed of repeated modules of helices. The occurrence of helical repeat proteins as ribosomal proteins might not be surprising because, for two decades, a fast growing number of genomic and functional investigations have identified that many organelle specific post-transcriptional processes are performed by helical repeat proteins belonging to recently recognized gene families such as pentatricopeptide repeat (PPR), octotricopeptide repeat (OPR), mTERF, half-a-tetratricopeptide repeat (HAT) and heptatricopeptide repeat (HPR) proteins [50].

For instance, PPR proteins that occur in all eukaryotes and are particularly prevalent in plants with hundreds of PPR genes were found to be involved in the maturation of RNA ends, RNA editing, splicing, RNA stabilization and translation [51]. Interestingly a mode of action has been described for PPR proteins where specific amino-acids at given positions in individual PPR motifs give specificity for a particular ribonucleotide. Thus, a succession of PPR motifs recognizes single stranded RNA in a sequence specific manner. This connection between amino-acids of PPR motifs and nucleotides is referred to as the "PPR code" [52]. This code was validated experimentally for many proteins, i.e., for RNA editing factors [51]. However, this mode of action is not applicable to all PPR proteins, as, for example, recently recognized PPR-NYN proteins holding RNase P activity, that recognize folded pre-tRNAs in a non-canonical way [53–55].

HAT proteins make a smaller family of proteins, conserved in eukaryotes, where they were found to be involved in a variety of organellar but also nucleo-cytoplasmic processes [56]. For instance, the HAT protein HCF107 was found to bind and most probably stabilize the 5' ends of chloroplast mRNAs [57].

Likewise, the mTERF protein family that occurs in plants and animals appears to be specific to organelles [58]. mTERF proteins were found to bind DNA but also RNA with, for example, MTERF4 that was found to bind rRNA to regulate ribosome biogenesis

in humans [59], and mTERF9 that interacts with the 16S rRNA to promote chloroplast ribosome biogenesis in Arabidopsis [60].

In contrast, OPR proteins appear to be restricted to the plant lineage as well as to Alveolata, and are particularly prevalent in Chlorophyta such as *Chlamydomonas*. OPR proteins are related to a variety of RNA related processes in the chloroplast, for example, [61,62], and the OPR protein RAP was found to be required for chloroplast 16S rRNA maturation [63].

Finally, HPR proteins were recently recognized to be a family of putative organellar proteins which are mostly found in Alveolata. They were experimentally shown to occur in mitochondria of the malaria parasite *Plasmodium*, where they were proposed to be involved in RNA processing and/or stabilization [64], possibly for the assembly of the fragmented rRNAs that occur in apicomplexa mitoribosomes, similar to *Chlamydomonas*.

Beyond OPR and HPR that appear to be related [64], all these gene families do not seem to have a common evolutionary origin [50]. In particular, consensus motifs derived from the respective protein families do not appear to hold conserved sequence features [50]. Nonetheless, all these proteins have a similar modular organization, with tandem arrays of individual repeats that all contain a similar secondary structure relying on antiparallel α -helices. In all these different protein families, the succession of repeats folds into a solenoid structure. It is this conserved fold that assigns these organelle proteins to the super-group of helical repeat proteins that also includes PUF and TALE proteins [65,66]. Interestingly, the comparison of structure models for representative factors from the different families had suggested that many helical repeat proteins contain nucleic acid binding platforms composed of positively charged residues in the concave surface of the super-helices [50]. This feature that was proposed for PPR and mTERF proteins [59,67] has been shown experimentally for PUF proteins [68] and also observed recently for many of the ribosomal helical repeat proteins by the recent cryo-EM studies of mitoribosomes. In this light, it is tempting to speculate that helical repeat proteins might share at least some features used for RNA recognition.

To date, among helical repeat proteins, the PPR family has clearly attracted the most attention, for instance with the description of a PPR code. Interestingly, as described in details below, none of the PPR proteins identified as ribosomal proteins seem to recognize RNAs according to the PPR code. At this stage, it is unclear whether the occurrence of PPR proteins as ribosomal proteins constituted an ancestral function for these proteins and the PPR code was acquired later for specific processes or whether the mode of action using the PPR code was ancestral and subsequently lost for some functions, such as the association to ribosomes in different eukaryote groups. Future investigations will contribute to decipher the diversity of the helical repeat proteins mode of action to try to understand why this type of structure was independently selected for nucleic acid binding several times in evolution, in particular in the context of mitoribosomes.

4. Functions and Modes of Action of Mitoribosome-Specific Proteins

4.1. rRNA Stabilization Mediated by Mitoribosome-Specific Proteins

Ribosomes are complex ribonucleoprotein particles composed of rRNAs and r-proteins. Most of the r-proteins are located at the periphery of the ribosomes. These proteins are usually composed of a globular domain facing the solvent, and long domains extending into the ribosome, between rRNA helices, to anchor the protein and/or stabilize the rRNA. Even though prokaryotic and cytosolic ribosomes have now been characterized in detail, it is unclear what actual function these r-proteins possess. Given that the majority of them are largely positively charged, it is suggested that the general function of r-proteins is to stabilize and counteract the negatively charged rRNAs which perform the catalytic activity [69]. Hence, their main role is to stabilize rRNAs to promote efficient protein synthesis.

In mitoribosomes, most of the additional r-proteins that were acquired during eukaryote evolution also appear to serve this function (additional functions are described in the following sections). However, due to the diversity of rRNA composition across mitoribo-

somes, many of these proteins have been recruited to fit a certain need, e.g., stabilization of an rRNA extension, or compensation of rRNA loss.

Some of these proteins are conserved between mitoribosomes and were surely acquired early in their evolution. This is, for example, the case of mS29, a GTPase located on the head of the small subunit, first described in humans [21,22]. Resolution was sufficient in human, yeast and kinetoplastids to show that the GTPase do contain GDP and might be active, however its role in the mitoribosome is unclear [23,24,29]. In all cases, it binds to rRNA of the small subunit, and might be involved in subunit association and translocation by making specific bridges between the SSU and the LSU.

One interesting case is the systematic acquisition of PPR proteins at the foot of the small subunit (Figure 3D). In bacteria, the foot of the SSU is formed by the tip of the rRNA helix h44 and the helix h6—the only protein present in that area is bS20, which probably contributes to h44 stabilization. However, bS20 was universally lost in the mitochondria [5]. The presence of a PPR protein in that area was first described in humans, where the protein mS27 compensates for the strong reduction and unwinding of h44 and the loss of h6 [21,22]. It was later discovered that mS27 is also present in yeast, however the protein here carries an additional function, as the rRNA is more conserved with bacteria in yeast compared to humans and is even expanded [70]. There, it stabilizes h44, h6 and the fungi expansion segment h44-ES1. In land plants, a PPR protein is positioned similar to the yeast mS27, and helps stabilize the extended h44 tip [25]. In the ciliate *Tetrahymena*, the rRNA in this area is significantly expanded, and two proteins were recruited to stabilize it [28]. mS93 is an mTERF protein involved in the stabilization of the expanded h44, and mS90, which resembles a PPR protein, is positioned similar to the yeast mS27 and the PPR protein found in land plants. Finally, in the green algae *Chlamydomonas*, where the rRNAs are reduced—h6 is noticeably absent—a PPR protein, mS106, is found, and is positioned similar to mS27 in humans [27]. Interestingly, in kinetoplastids, two PPR proteins, mS51 and mS63, are located in that area, which no longer contains RNA due to the drastic rRNA reduction in these organisms [24]. mS51 and mS63 are positioned similar to mS90 and mS93, respectively, in *Tetrahymena*. It is remarkable to systematically find these very similar proteins at that position in all mitoribosomes investigated to date. One explanation could be that similar proteins would have been independently recruited to perform a similar function in the different eukaryote groups. Alternatively, a PPR protein might have been recruited very early during mitoribosome evolution to compensate for bS20 loss, and have drifted significantly during evolution. This remains to be properly investigated.

rPPR proteins seem to have a totally distinct RNA binding process than the canonical PPRs, where a “PPR code” was described. In particular, in plants, no RNA targets could be predicted using the PPR code when looking at positions 5 and 35 of each rPPR protein motif, suggesting that RNA interactions are performed differently. This was confirmed by the cryo-EM structure of a plant mitoribosome. It revealed the contact sites between rPPR proteins and rRNAs [25]. It appears that most rPPRs contact double stranded RNA helices of the rRNA instead of single stranded RNA (Figure 3B). This interaction is mediated by positively charged residues of the rPPRs and the negatively charged phosphate backbone of the rRNAs. How this process achieves the specific binding of individual rPPR proteins to their interaction site on the mitoribosome is still undetermined.

In the case of specific proteins being recruited, in *Chlamydomonas*, where rRNAs are reduced and fragmented, several OPR proteins were recruited to the ribosome, and help stabilize the extremities of the rRNA fragments [27]. They mainly interact with single stranded rRNAs by enlacing the rRNA ends, but can also interact with rRNA helices via their solvent exposed side. This is the case for mL115, which stabilizes the L1 rRNA 3' end, and also interacts with H4 and H19 of the same rRNA fragment (Figure 3A). A similar case is found in the ciliate *Tetrahymena*, where the mL106 protein is also involved in stabilizing the 3' end of one of the two rRNAs of the large subunit [28].

These RNA/protein interactions are reminiscent of the canonical ssRNA/PPR interactions, although no recognition code between OPR proteins and single stranded RNA could

be recognized at this stage. In contrast, mS107, an OPR from the SSU of *Chlamydomonas*, binds the double stranded RNA of the S2 rRNA, similar to the land plant mitoribosome rPPRs. mL113, an OPR protein, binds the tip of a helix from L3b thanks to a domain inserted between OPR repeats; in that case OPR repeats are not at all involved in RNA binding.

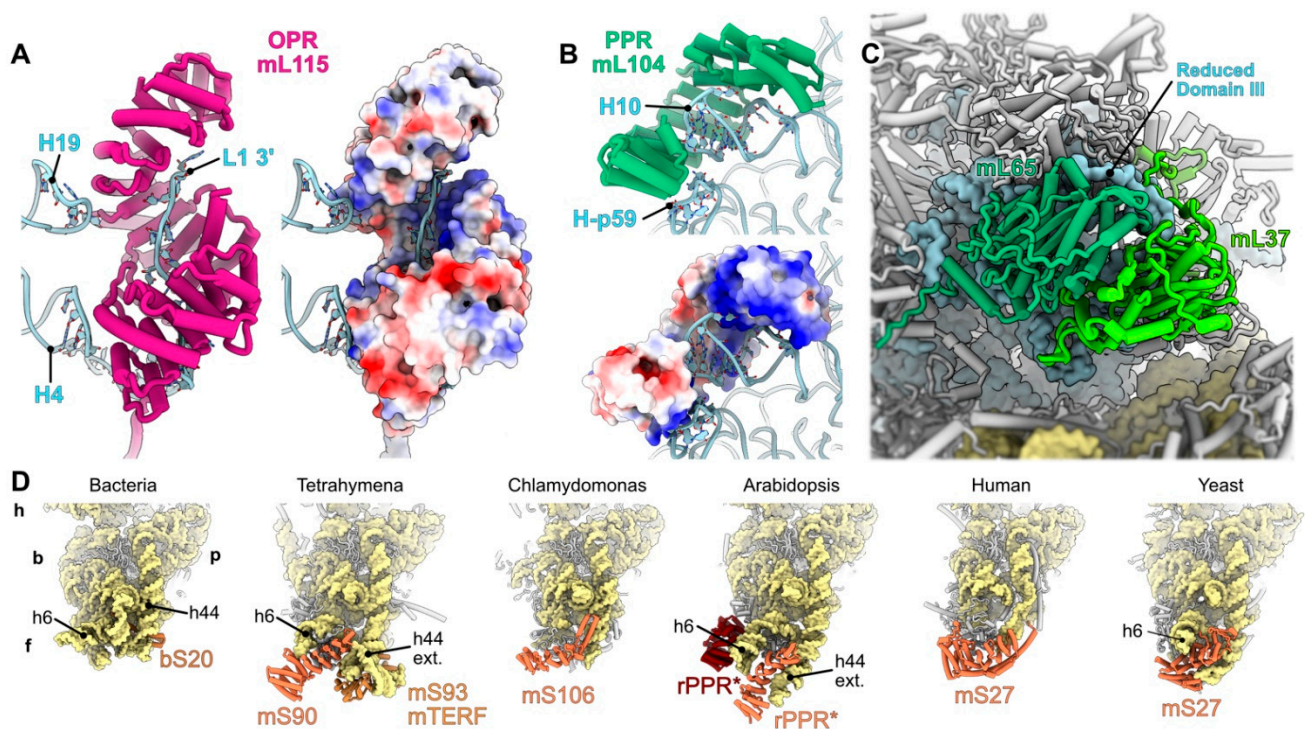


Figure 3. Examples of RNA-binding proteins recruited to mitoribosomes. (A,B) present close-up views of large alpha-helical proteins which were largely recruited to mitoribosomes. (A) The OPR mL115 involved in the stabilization of fragment L1 of the fragmented rRNAs of *C. reinhardtii* is shown. The OPR enclases the 3' single-stranded extremity of the L1 fragment which is stabilized via charge interaction. It also interacts with H19 and H4. The electrostatic potential of mL115 is shown with blue surfaces showing positive charges and red surfaces showing negative charges. (B) The PPR mL104 of the flowering plant mitoribosome is shown. It englobes helix H10, interacting with the rRNA backbone which is a different mode of action compared to non-ribosomal PPR proteins. It also interacts with H-p59, a plant specific RNA helix. As in (A), the electrostatic potential of mL115 is shown, revealing that the rRNA interaction is mostly mediated by positively charged residues. (C) The pseudo-dimer composed of mL65 and mL37, probably repurposed endonucleases, are shown as an example of non-alpha-helical mitoribosome-specific r-proteins. The r-proteins interact with the reduced domain III of the large subunit of the mammalian mitoribosome. (D) Structural comparison of the foot of the small subunit. This comparison highlights the conserved helical proteins involved in the stabilization of the foot of the small subunit—where the tip of h44 and h6 are either extended, reduced, or deleted—most likely due to the loss of the bacterial r-protein bS20 in mitoribosomes. All mitoribosomes share a PPR protein at this position (mS27, mS90, rPPR* and mS106), which may be the product of a single ancestral PPR protein. In trypanosoma, PPR protein mS63 is also present at this position but no longer interacts via RNA. The different parts of the small subunit are indicated on the bacterial model; h: head, b: body, f: foot, p: platform.

In animals, specific proteins, a pseudo-dimer made by mL65 and mL37, repurposed endonucleases, interacts with the reduced domain III of the large subunit. There, it probably stabilizes the rRNA and compensates for its loss (Figure 3C) [21,22]. In *Chlamydomonas*, the strong reduction of domain III is compensated for by the acquisition of the OPR mL113 and the mTERF mL114 [27]. As opposed to these cases, rRNAs are expanded in flowering plants. In the large subunit, the rPPR proteins mL101 and mL104 are involved in the

stabilisation of the refolded and extended domain III and domain I. mL104, for example, englobes the tip of H10 from domain I and interacts with H-p59, a helix from the refolded domain III (Figure 3B) [25].

Altogether, mitoribosomes have recruited a wide variety of binders that bind their RNA targets through very diverse processes.

4.2. Mitochondrial Specific mRNA Recruitment Processes

During translation initiation, the mRNA is recruited to the SSU, where its start codon is aligned with the ribosomal P site and recognized by the initiator tRNA. This first step of the translation cycle exhibits a great variation across lineages and has attracted a lot of interest in the last decades. In bacteria, the mRNA binding to the ribosome is often directed by an interaction between a conserved sequence motif, the Shine-Dalgarno (SD), and a complementary sequence, the anti Shine-Dalgarno, located at the 16S rRNA [71–73]. The SD motif is positioned upstream of the start codon and aids in aligning the ribosome to select and decode the open reading frame (Figure 4A). This Shine-Dalgarno dependent mechanism is the most widely used for prokaryotic mRNAs, but other mechanisms involve, for example, the S1 protein [74] and some mRNAs that are completely devoid of SD sequence, or even 5'UTR [75]. For the later, it remains elusive how they are recruited to the ribosome [71]. Thus, mRNAs with discrete characteristics require distinct mechanisms for their recruitment.

In mitochondria, despite the plethora of proteins that partake in their proteome, only a few are encoded by the mitochondrial expression machinery, i.e., 13 in human, eight in yeast [6], and around 30 in land plants [76,77], where the majority are components of the oxidative phosphorylation complexes. In most eukaryotes, mitochondria-encoded mRNAs lack the SD sequence and the 5' m7G cap, features that aid their translation in bacteria and cytosol, respectively, the exception being some Jakobid species such as *Reclinomonas*, which retained SD-like sequences [78]. Moreover, the 5' untranslated region (5'UTR), which contains cis-elements essential for expression, varies in length across lineages and in some cases is missing. The heterogeneity that mitochondrial mRNAs present, coupled with the profound divergence of mitoribosomes structure and composition across various phyla, have resulted in specialized recruitment mechanisms. For instance in mammals, most mitochondrial mRNAs do not possess a 5' UTR and when they do, it is up to 3 nt in length [79–81], leaving little, if any space for a 5' UTR-dependent regulation. In compliance with this notion, a specific ribosomal protein has been proposed to direct mRNA binding in humans. The PPR protein mS39 is located at the entry site of the mRNA channel on the ribosomal small subunit [21,22]. Allegedly, mS39 PPR motifs interact with a U-rich region placed downstream of the start codon in the vicinity of the mRNA's 7th codon, facilitating the recruitment of the mRNA to the ribosome [82]. Moreover, a recent study revealed an additional moiety, the leucine-rich PPR motif-containing protein (LRPPRC), forming a complex with the Stem-Loop Interacting RNA binding Protein (SLIRP), that interacts with mS39 in translationally active mitoribosomes, i.e., bound mRNA and tRNA present in A or P site [83]. The LRPPRC-SLIRP complex shows a strong affinity for RNAs via several PPR motifs [84], promotes mRNA polyadenylation in mitochondria [85], and acts as a chaperon to mediate the relaxation of mRNA secondary structures [86]. Also, SLIRP has been linked with the presence of mRNAs in active mitoribosomes [87]. Collectively, mS39 may serve as a platform for the docking of the LRPPRC-SLIRP complex which delivers mitochondrial mRNAs to the ribosome [83]. Then, mS39 facilitates the threading of mRNA through the SSU, and the start codon is selected for the initiation of translation (Figure 4).

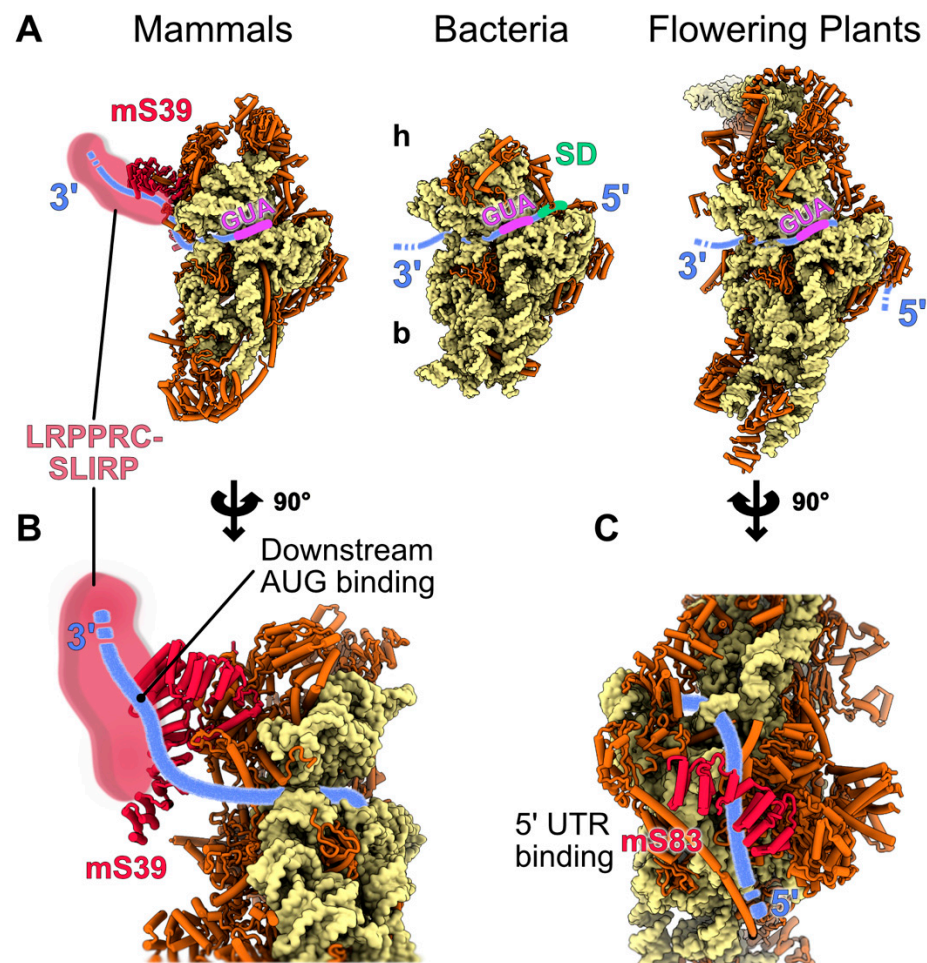


Figure 4. Specific proteins involved in the translation initiation process in mitochondria. Proposed mechanisms of mitochondria-specific translation initiation events involving mitochondria-specific r-proteins are shown. (A) The proposed positions and orientations of the mRNA on the small subunits of mammalian, plant and bacteria during translation initiation are indicated on the figure. The mRNA is shown in blue, the initiation codon (AUG) is in purple and the Shine-Dalgarno (SD) consensus, only present in bacteria, is in green. (B,C) present close-up views of mammalian and plant mRNA binders. (B) The mammalian mRNA stabilization by the PPR protein mS39 and probably the LRPPRC-SLIRP complex is shown. mS39 and LRPPRC-SLIRP interact with the ORF, downstream of the AUG. (C) In flowering plants, a proposed mechanism of mRNA stabilization would involve the PPR protein mS83, which would bind a consensus sequence located in the 5' UTR of the mitochondrial mRNAs. A similar process was also proposed in yeast, involving specific proteins for each yeast mRNA.

LRPPRC-SLIRP complex constitutes a linking bond between transcription and translation and seems to act as a universal activator of translation in mammals. To date, only one translational activator has been found in mammals, that being TACO1, which is involved in the translation of COX1 [88]. In contrast, other eukaryotes are heavily dependent on translational activators for mitochondrial translation. These are regulatory proteins that promote the protein synthesis of specific mitochondrial mRNAs. In yeast, the limited number of protein-encoding mRNAs has allowed the evolution of a specialized mRNA recruitment mechanism where particular protein factors promote the translation of distinct mRNAs according to cellular needs. These translational activators utilize the 5' UTR to bind and deliver the transcripts to the ribosome [89,90]. Interestingly, yeast's mRNA exit channel has been remodeled, possibly following the alteration of the SSU rRNA 3' end which no longer facilitates the start codon selection via the Shine-Dalgarno sequence. Instead, the alignment of the yeast mRNAs might be coordinated by the action of translation activators. The

species-specific mS42 and mS43 form a heterodimer located at the edge of the remodeled mRNA exit channel, and along with a series of specific protein elements placed on this site, could act as a platform for translation activators [23].

In plants, the mRNA recruitment mechanism is yet to be determined. However, recent findings point to another ribosomal-specific PPR protein, mS83, which may have a role similar to the protein mammalian mS39. mS83 is positioned at the SSU near the mRNA exit channel and could possibly bind to an AxAAA motif, present in nearly half of the plant's mitochondrial mRNAs via its PPR moieties [25]. Thus, mS83 could potentially aid the mRNA binding to the mitoribosome, align the mRNA with the SSU and assist in the selection of the start codon from the initiation complex (Figure 4). Nonetheless, although mS83 may constitute a potential recruitment mechanism for a number of the plant's mRNAs, it is unlikely to be unique, since not all mRNAs contain the AxAAA motif [25]. Rather, it is more likely that a combination of distinct mechanisms is involved in mRNA recruitment in plant mitoribosomes [25]. In compliance with this notion, the existence of translational activators in plant mitochondria is expected, especially if we take into consideration the long 5' UTRs of plant mitochondrial mRNAs, which can act as a binding site similar to yeast. For instance, proteins such as the recently described RFL8 likely act similar to yeast translation activators in plant mitochondria [91]. In the green algae *Chlamydomonas*, the initiation mechanism is unknown; however, like in humans, the mRNAs lack 5' UTRs. Additionally, they are post-transcriptionally polycytidylated at their 3' UTRs [92]. It is possible that the polycytidylation is important to have translatable mRNA, either by creating a binding platform for trans-acting factors—RNA binding proteins could recognize this cytidine stretch and act as translation activators—or may contribute to mRNA circulation to also promote translation [93].

Altogether, the vast divergence of mitoribosomes across eukaryotes, the presence of novel ribosomal specific proteins, the specialized nature of mitoribosome to decode membrane proteins coupled with the distinct characteristics of mitochondrial mRNAs, had an immense influence in mRNA recruitment, resulting in elegant and highly adapted mechanisms.

4.3. Involvement of Mitoribosome Specific Proteins for Protein Binding

Mitoribosomes have followed separate evolutionary routes regarding their RNA contents from being expanded in plants [27] and fungi [23,70], reduced in metazoa [21,22], and kinetoplastids [24], or even fragmented in the green algae *Chlamydomonas* and in members of the Apicomplexa clade [27,94], to being mostly unchanged in jakobids [30] compared to their bacterial counterparts. In contrast, their protein composition has universally increased across the eukaryotic lineages as a result of various expansions in bacterial proteins as well as the presence of novel species-specific ribosomal proteins, shifting the RNA-protein ratio from the bacterial 2:1 to 1:2 in mammals and 1:6 in kinetoplastids [6].

The novel ribosomal proteins hold a central role in ribosome architecture, assembly, and translation through interactions either with rRNAs (discussed above) or with other proteins. In mammals, for instance, two novel ribosomal proteins mS29 and mS27 form mitochondria-specific bridges between the two subunits. As discussed in 4.1, mS29 is a guanosine 5'-triphosphate (GTP) binding protein located at the head of the small subunit. It interacts with the central protuberance in the LSU creating two bridges with mL46 and mL48 [22]. Another inter-subunit bridge is formed by the novel RP mS27 and the N-terminal extension of bL19m, connecting the bottom of the SSU with the LSU.

Inter-subunit bridges coordinate the relative movements of the subunits, crucial for the active translation. In yeast, the specific connection of mS44 and bL19m contributes to the multiple contact sites between the small and the large subunit of the species. The increased number of inter-subunit bridges present in yeast mitoribosomes compared to humans allows for a more stiff ribosome with the movement of the subunits to be more firm [23].

The presence of novel ribosomal proteins is even more profound in kinetoplastids. Trypanosomal mitoribosomes render an extreme case of divergence, with severely reduced

rRNAs and the enrolment of over 120 proteins, half of them being species-specific [24,95]. Notably, the two largest ribosomal proteins mS48 and mS49 (1788 and 1181 aa, respectively) are specific to kinetoplastids. mS48 expands from the lower body of the SSU up to the head interacting with a series of ribosomal proteins (mS51, mS22, mS47, mS60, uS5m, mS59, and mS49), displaying an intrinsic role in the assembly of the SSU and its protein network. mS49 exhibits a similar role through interactions with most of the proteins located at the head of the SSU (uS10m, mS53, mS35, mS55, mS52, and mS50) [24]. A repercussion of the rRNA contraction is the presence of functionally important regions, like the L1 stalk and the central protuberance (CP), which is totally depleted of rRNA. The L1 stalk, through conformational changes, regulates the tRNA positioning and release from the E-site [96,97]. The novel ribosomal proteins mL70, mL74, m91 and the bacterial bL9m that form the L1 stalk compensate for the missing rRNA. Similarly, the CP is solely formed by proteins including the specific mL73, mL82 and mL96, and probably assembles as a module which docks to the LSU at a late intermediate state [95,98,99]. The kinetoplastid's mitoribosomal exit tunnel is also highly remodeled. The unique r-proteins mL72 and mL109 interact with the conserved uL4m, uL22m, uL23m and uL29m to shape the mature peptide exit channel [95,99].

Another notable example, where novel ribosomal proteins have reshaped the mitoribosome's architecture, is the evolutionarily distant *Tetrahymena thermophila*, a ciliate protist from the phylum Alveolata. The SSU is characterized by its two protein rich regions, the body extension and the back protuberance [28]. Both regions have a limited rRNA presence, and subsequently they are shaped by multiple protein-protein interactions, many of them attributed to mitoribosomes or proteins only found in ciliate. The body extension is formed by eight proteins (four unique) uS11, mS23, mS26, mS37, mS76, mS77, mS78-NTD and mS79, whereas the back protuberance consists of eleven proteins mS45, mS47, mS78-CTD, mS83–88, mS91 and mS92 (one mitoribosome specific, 10 unique). The two moieties are connected with mS78, the largest ribosomal protein present in ciliate mitoribosomes. In addition, both regions are interconnected with the SSU head, with the body extension to interact with the head through mS23, mS26, mS29, and mS37 and the back protuberance through mS31, mS45, mS47, mS85, mS87, mS88, mS89, mS92, and uS9m [28]. This extensive protein network formed between the head and the body could affect and may limit the movement of the head upon the conformational changes of the SSU during translation elongation [96,100]. Interestingly, half of the proteins synthesized in ciliate mitoribosomes are soluble [28]; however, how mitoribosomes can adapt their mode of synthesis from membrane to matrix proteins is yet to be determined. A notable unique ribosomal protein, mL105, is located near the exit channel and interacts with the uL22m and the uL24m at the solvent side, whereas the mL105-CTD enters the exit tunnel, interacting with bL23m and possibly with the nascent chain. In addition, mL105 possesses a 'signal peptide-binding domain' which may constitute some early evidence regarding a putative protein targeting the system in ciliate mitochondria [28]. Finally, an interesting feature of the mRNA entry channel is the reconstitution of uS3 ribosomal proteins out of three separate proteins: mS31m, mS92, and uS3m. The two first, which are nucleus-encoded, interact with the mitochondria-encoded uS3m to form the complete uS3 ribosomal protein, showcasing the significance of the crosstalk between the two genomes as a repercussion of the genetic drift throughout mitochondrial evolution [28].

Collectively, unique mitoribosomal proteins have been recruited, following several evolutionary pressures, to vastly reshape the architecture of eukaryote's mitoribosomes and take over many elegant mechanisms of the mitoribosomes by establishing a wide protein network.

4.4. Specific Processes for Mitoribosome Attachment to Membranes

The majority of proteins still encoded in the mitochondrial genome are hydrophobic membrane proteins, components of the respiratory chain complexes. Due to their hydrophobic nature, these proteins would be challenging to import from the cytosol. This

specificity seems to have caused a specialization of the mitochondrial protein translation machinery for the synthesis of hydrophobic membrane proteins [101]. As a consequence of this specialization, it appears that protein synthesis occurs in the mitochondrial matrix at or near the inner membrane. This localization allows for simultaneous membrane insertion of the neo-synthesized peptide during translation [83]. In order to bring the mitochondrial ribosome close to the inner membrane and close to the protein insertion machinery, specific proteins allow the tethering of ribosomes directly to the main component of the Oxidative Assembly (OXA) translocase, the complex responsible for most of the membrane protein insertion of both nuclear and mitochondrially encoded proteins in the mitochondrial inner membrane [102].

The main component of the OXA complex is the Oxa1 protein insertase. It is part of the Oxa1/YidC/Alb3 conserved protein family, which is an evolutionarily conserved protein machinery for the insertion of hydrophobic proteins into bacterial and organellar membranes [103–105]. All proteins from this family have five transmembrane domains; YidC proteins can be found in prokaryotes, whereas Alb3 proteins are present in chloroplasts [106,107]. Oxa1 is found in mitochondria, in an orientation with its N-terminal part in the membrane and its C-terminal part located in the mitochondrial matrix. This C-terminal region plays the role of a “Ribosome Binding Domain” (RBD) [108,109]. The RBD is positively charged, but the precise mechanism of interaction between this RBD and mitochondrial ribosome is still unclear. In yeast, it has been shown that cells expressing C-terminal truncated versions of Oxa1 have impaired respiration functions and difficulties to use non-fermentable carbon sources [109]. In addition, yeasts lacking the C-terminal region accumulate improperly inserted mitochondrial proteins in the matrix which should have been inserted in the inner membrane [110]. Oxa1 knock-out mutation leads to a critical deficiency in respiratory complexes III, IV and V, especially for the two subunits of complex IV (cytochrome oxidase c), Cox1 and Cox2 proteins, both mitochondrially encoded. Insertion of critical membrane proteins in the inner membrane, such as the cytochrome b protein, part of the complex III (cytochrome bc1), is also severely reduced.

Mechanisms and proteins involved in mitochondrial ribosome binding with Oxa1 seem to strongly vary between eukaryotes. Nevertheless, these mechanisms are well described for some organisms [111,112].

The link between Oxa1 and the mitochondrial ribosome in yeast is mediated by a non-ribosomal linker protein named Mba1. This protein is able to bind mitochondrial ribosomes near the peptide exit channel, and can then bind the C-terminal domain of Oxa1 [113]. Structural studies using Cryo-EM and Cryo-ET techniques showed that this interaction is stabilized with the help of the rRNA expansion segment 96-ES1 of the large subunit, making a second contact site directly with the inner membrane of mitochondria [114]. This rRNA stabilizing expansion is not found in any other organism for which the mitochondrial ribosome structure has already been resolved.

Unlike in yeast, the structural homolog of Mba1 in mammals, mL45, was identified as an integral part of the large subunit of the mitochondrial ribosome. This protein directly binds on the Oxa1 homolog, the Oxa1L insertase, and positions the peptide exit channel just above it [115]. Recent structural studies show that the mL45 protein is not the only ribosomal protein making contact with Oxa1L. It seems that the C-terminal region of Oxa1L containing the ribosome binding domain makes two additional contact sites, one with uL24m protein, and another with bL28m, uL29m and the large subunit rRNA [112]. These proteins are located near the peptide channel exit and contact the C-terminal extension of Oxa1. The last contact site with rRNA is mediated by a small extension of the C-terminal region of Oxa1L only found in mammals.

In the green algae *Chlamydomonas*, in situ imaging using cryo-electron tomography suggests that mitoribosomes are all bound to the mitochondrial inner membrane. Moreover, the determination of the *Chlamydomonas* mitoribosome's high resolution structure combined with tomography suggests that a specific protein, mL119, located at the peptide channel exit appears to be involved in the interaction between the mitoribosome and Oxa1

to mediate membrane attachment. This protein is not related to the mammals mL45 or the yeast Mba1 [27]. In contrast with green algae, little is known about membrane-tethered mitochondrial ribosome in land plants, but high concentrations of non-ionic detergents are necessary to solubilise ribosomes from Arabidopsis mitochondrial extracts, suggesting that at least part of these ribosomes are tightly bound to the mitochondrial membranes [26]. Still, no homolog proteins of the mammals mL45, the yeast Mba1 or Chlamydomonas mL119 was found encoded in the Arabidopsis genome, implying that land plants might use yet another specific process for membrane attachment [25]. Nonetheless, non-dissociative immunoprecipitation of plant mitochondrial ribosomes co-precipitate Oxa1a [26], and expression of Oxa1a in Oxa1 knock-out yeast cells leads to a partial complementation of the respiratory defects normally present in the mutant [116]. These clues tend to suggest that plant Oxa1a performs similar functions and might have the possibility to bind the ribosome despite the low amino acid identity between the two homolog proteins.

4.5. Functions of Mitoribosome Specific Proteins for Ribosome Assembly

Ribosome biogenesis is the crucial process where all the ribosomes components, r-proteins, and rRNAs come together to form the functional translation machinery. This process involves a large number of proteins (maturation factors) and RNAs (such as snoRNAs in cytosolic ribosome maturation) factors that will aid to properly fold, assemble and modify the different elements of the ribosome [117]. Even if some of these maturation factors are conserved from prokaryotes to eukaryotes—these are usually factors involved in the maturation of conserved catalytic areas—the process of ribosome maturation in eukaryotes involves many additional factors, and is much more complex. In eukaryotes, the maturation process is restricted in the nucleus [118], and recent cryo-EM structures have highlighted the intricacy of this process [119–123]. In prokaryotes, biogenesis appears to be quicker and is thus more challenging to capture by structural means, even if some studies do exist [124,125].

In mitochondria, the biogenesis of mitoribosomes is even more complex, as it has to be coordinated between two gene expression compartments [126]. Indeed, the rRNAs, and part of the r-proteins, depending of the organisms, are encoded by the mitochondrial genome and are thus transcribed and processed inside the mitochondria. The rest of the r-proteins are encoded by the nuclear genome and have to be imported into the mitochondria. This is also the case for all the maturation factors involved in mitoribosome biogenesis. Recently, several studies managed to capture mitoribosome assembly intermediates from humans [127–131] and kinetoplastids [95,98,99,132,133], describing different steps and factors involved in the maturation of the large and small mitoribosomal subunits. A portion of these factors were previously described by non-structural means [59,134–136], but most of them were described for the first time with these studies, and most importantly, directly observed in action.

Collectively, the studies on the human LSU maturation structurally describe the mode of action of 13 maturation factors mainly involved in the maturation of the PTC. A large portion of these factors are GTPases and helicases involved in the correct folding of the rRNA, or methylases involved in its modification. Most are conserved and have bacterial or eukaryotic homologs; this is the case for GTPB5 and GTBP10 (homologs to OgbE) or are conserved in the same process with other eukaryotes. Thus, DDX28 is mt-LAF2 in kinetoplastids, and most likely Mss116 in yeast [136] and MRM3 corresponds to mt-LAF5-6. One complex that might be conserved across eukaryotes is the ACP block, composed of MALSU1–L0R8F8–mt-ACP in human and mt-Rsfs–L0R8F8–mt-SAF32 in kinetoplastids. It is always present on the large subunit during its maturation and prevents LSU-SSU association, it however does not bind RNA. The complex is composed of MALSU1/mt-Rsfs, a conserved bacterial factor, involved in ribosome hibernation and not in maturation, complemented by the two factors L0R8F8 and mt-ACP, which are specific to mitochondria. Moreover, the redundancy of assembly factors between LSU and SSU, notably mt-ACP and LYR motif proteins, with components of complex I in kinetoplastids, might point

towards potential crosstalks between the assembly of ribosomal subunits and respiratory complexes [95,132,137]. On the contrary, the mTERF4 protein involved rRNA stabilization during the PTC maturation appears to be specific to humans.

In kinetoplastids, the detailed structures of maturation complexes of the large subunit present over 30 different maturation factors [95,98,99]. Given that kinetoplastid mitoribosomes are probably among the most divergent mitoribosomes described to date, it is not surprising that so many additional maturation factors were recruited in kinetoplastids (which is also the case for the SSU maturation described later) [24]. Many of the specific maturation factors are RNA binders, but also repurposed mitochondrial proteins, similar to the additional mitochondria-specific r-proteins that were recruited to mitoribosomes [5]. The strong complexity of this mitoribosome, and the extensive number of maturation factors involved, probably makes the biogenesis of this mitoribosome much slower compared to classical ribosomes, which may well have played an important role in the capture of these maturation states. A tryptic of GTPases, mt-EngA, mt-EngB, and mt-Rgb1 (also found in the human LSU intermediates, named MTG1), notably plays an important role in the maturation of the PTC by interacting with the rRNA and locking it in a specific conformation.

Finally, several maturation states were also resolved for the small subunit of *Trypanosoma brucei*, involving in total 39 maturation factors [132,133]. During that process, the SSU goes through drastic remodelling, and many of the assembly factors complement the huge protein shell formed by the already in place r-proteins. Similar to the LSU, a large portion of these factors are involved in the correct folding of the rRNA, notably for the decoding centre. A portion of these maturation factors are KRIPP proteins, kinetoplastid-specific proteins PPR proteins that were previously identified as potential r-proteins [138] that directly interact with single stranded rRNA. For example, KRIPP2 interacts with the 5' end of the immature rRNA, very similar to OPR mL115 in *Chlamydomonas* or mL106 in *Tetrahymena* interactions with mature rRNA.

In summary, mitoribosome assembly involves protein factors conserved with bacteria but also new factors that are similar to mitoribosome r-proteins, either shared between eukaryotes, or specific to certain clades. Many of those factors interact with RNA, notably to promote its correct folding.

5. Concluding Remarks

The extraordinary and unexpected diversity of mitochondrial ribosomes began to be recognised less than a decade ago, in particular due to the development of revolutionary cryo-electron microscopy techniques that allowed for the obtaining of high resolution structures of mitoribosomes from a number of distantly related eukaryotes. Initial biochemical analyses suggested that mitoribosomes are protein-rich [36,39,78]. This was corroborated by the first cryo-EM structures obtained with animal models and led to the initial assumption that the recruitment of many novel proteins to mitoribosomes had been driven by the necessity to spatially replace rRNA segments or sub-domains that were lost during evolution. This “structural patching” hypothesis was however contradicted by the observation that yeast and particularly plant mitoribosomes do not have reduced rRNAs, contrary to animals or kinetoplastids, but still have a widely expanded set of ribosomal proteins. Likewise, the bioinformatic and biochemical analysis of mitoribosomes in jakobids, a group of protists with the most bacterial-like mitochondrial genomes and rRNAs, also found that jakobid mitoribosomes are protein rich as compared to their bacterial ancestors [30]. This led to the hypothesis that the last eukaryote common ancestor (LECA) mitoribosome might have already been protein-rich. Indeed, while tens of specific r-proteins were acquired in independent eukaryote clades, phylogeny analyses suggest that LECA might have contained as many as 33 SSU and 46 LSU proteins, thus with a 50% increase of protein numbers as compared to bacterial ribosomes [30]. This raises the question of the nature of the evolutionary forces that might have driven the very early recruitment of many novel proteins to mitoribosomes. One possible explanation might reside in the biochemical environment

constituted by the mitochondrial matrix. This compartment is much more basic, with a pH close to 8, than the mitochondrial inter membrane space and the cytosol that has a pH close to 7 [139]. This pH gradient generated by the oxidative phosphorylation (OXPHOS) machinery and required for energy production through the ATP synthase might be deleterious to rRNA stability. Thus, the recruitment of many proteins to the mitoribosome might have been favoured to decrease contacts between rRNAs and a high pH solvent that could result in rRNA hydrolysis. In turn, the occurrence of many additional proteins might have been the evolutionary hint to allow the drift of mitochondrial rRNA genes through either losses or expansions.

Beyond the evolutionary history of mitoribosomes composition, many open questions remain with regard to the diversity of mitoribosomes within the same species, on the regulation of their function, and on their interaction with other gene expression complexes, as well as the assembly machineries of OXPHOS complexes. For instance, it is still unclear if different subpopulations of mitoribosomes, with different protein contents, occur within the same mitochondria. In some eukaryotes, i.e., in plants, hydrophilic proteins are encoded in the mitochondrial genome in addition to the common set of hydrophobic OXPHOS proteins. Does this imply that a subpopulation of mitoribosomes is attached to the inner membrane to synthesize hydrophobic proteins, while another subset of mitoribosomes would be soluble in the matrix for the synthesis of hydrophilic proteins? Answers to such questions are likely to be brought by in situ approaches such as cryo-electron tomography. These analyses are also expected to reveal if some of the additional ribosomal proteins described here play novel or additional functions, e.g., for the interaction of ribosomes with other complexes or for other yet unassigned regulatory processes related or not to mitochondrial translation. Likewise, since mitoribosome protein functions were already related to diseases in humans, e.g., tumorigenesis [140], future studies will also reveal whether dysfunctions of the novel mitochondrial-specific ribosomal proteins described here may result in disorders ranging from decreased agriculture yield to human diseases.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, V.S., N.C., F.W. and P.G.; Figures preparation, F.W.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by ANR grants “MITRA, ANR 16 CE11-0024” and “DAMIA, ANR 20 CE11-0021” to P.G.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors apologize to those whose contributions were not cited because of length restrictions. This work was supported by the French “Centre National de la Recherche Scientifique”, by the University of Strasbourg, by the LabEx consortium “MitoCross” and by an Alexander von Humboldt postdoctoral grant to FW.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Melnikov, S.; Ben-Shem, A.; de Loubresse, N.G.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M. One core, two shells: Bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 560–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Schmeing, T.M.; Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **2009**, *461*, 1234–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Londei, P.; Ferreira-Cerca, S. Ribosome Biogenesis in Archaea. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 686977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Khatter, H.; Myasnikov, A.G.; Natchiar, S.K.; Klaholz, B.P. Structure of the human 80S ribosome. *Nature* **2015**, *520*, 640–645. [[CrossRef](#)]
5. Waltz, F.; Giegé, P. Striking Diversity of Mitochondria-Specific Translation Processes across Eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **2020**, *45*, 149–162. [[CrossRef](#)]
6. Kummer, E.; Ban, N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 307–325. [[CrossRef](#)]

7. Eme, L.; Spang, A.; Lombard, J.; Stairs, C.W.; Ettema, T.J.G. Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 711–723. [[CrossRef](#)]
8. Martijn, J.; Vosseberg, J.; Guy, L.; Offre, P.; Ettema, T.J.G. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature* **2018**, *557*, 101–105. [[CrossRef](#)]
9. Muñoz-Gómez, S.A.; Susko, E.; Williamson, K.; Eme, L.; Slamovits, C.H.; Moreira, D.; López-García, P.; Roger, A.J. Site-and-branch-heterogeneous analyses of an expanded dataset favour mitochondria as sister to known Alphaproteobacteria. *Nat. Ecol. Evol.* **2022**, *6*, 253–262. [[CrossRef](#)]
10. Roger, A.J.; Muñoz-Gómez, S.A.; Kamikawa, R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, R1177–R1192. [[CrossRef](#)]
11. Dorrell, R.G.; Howe, C.J. What makes a chloroplast? Reconstructing the establishment of photosynthetic symbioses. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 1865–1875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Adl, S.M.; Bass, D.; Lane, C.E.; Lukeš, J.; Schoch, C.L.; Smirnov, A.; Agatha, S.; Berney, C.; Brown, M.W.; Burki, F.; et al. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2019**, *66*, 4–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Björkholm, P.; Harish, A.; Hagström, E.; Ernst, A.M.; Andersson, S.G.E. Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 10154–10161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Allen, J.F. Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: Colocation for redox regulation of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 10231–10238. [[CrossRef](#)]
15. Zoschke, R.; Bock, R. Chloroplast Translation: Structural and Functional Organization, Operational Control, and Regulation. *Plant Cell* **2018**, *30*, 745–770. [[CrossRef](#)]
16. Bieri, P.; Leibundgut, M.; Saurer, M.; Boehringer, D.; Ban, N. The complete structure of the chloroplast 70S ribosome in complex with translation factor pY. *EMBO J.* **2017**, *36*, 475–486. [[CrossRef](#)]
17. Boerema, A.P.; Aibara, S.; Paul, B.; Tobiasson, V.; Kimanius, D.; Forsberg, B.O.; Wallden, K.; Lindahl, E.; Amunts, A. Structure of the chloroplast ribosome with chl-RRF and hibernation-promoting factor. *Nat. Plants* **2018**, *4*, 212–217. [[CrossRef](#)]
18. Graf, M.; Arenz, S.; Huter, P.; Dönhöfer, A.; Nováček, J.; Wilson, D.N. Cryo-EM structure of the spinach chloroplast ribosome reveals the location of plastid-specific ribosomal proteins and extensions. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *45*, gkw1272. [[CrossRef](#)]
19. Clemons, W.M.; May, J.L.C.; Wimberly, B.T.; McCutcheon, J.P.; Capel, M.S.; Ramakrishnan, V. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* **1999**, *400*, 833–840. [[CrossRef](#)]
20. Ben-Shem, A.; de Loubresse, N.G.; Melnikov, S.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science* **2011**, *334*, 1524–1529. [[CrossRef](#)]
21. Greber, B.J.; Bieri, P.; Leibundgut, M.; Leitner, A.; Aebersold, R.; Boehringer, D.; Ban, N. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science* **2015**, *348*, 303–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Amunts, A.; Brown, A.; Toots, J.; Scheres, S.H.W.; Ramakrishnan, V. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science* **2015**, *348*, 95–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Desai, N.; Brown, A.; Amunts, A.; Ramakrishnan, V. The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science* **2017**, *355*, 528–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ramrath, D.J.F.; Niemann, M.; Leibundgut, M.; Bieri, P.; Prange, C.; Horn, E.K.; Leitner, A.; Boehringer, D.; Schneider, A.; Ban, N. Evolutionary shift toward protein-based architecture in trypanosomal mitochondrial ribosomes. *Science* **2018**, *362*, eaau7735. [[CrossRef](#)]
25. Waltz, F.; Soufari, H.; Bochler, A.; Giegé, P.; Hashem, Y. Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome. *Nat. Plants* **2020**, *6*, 377–383. [[CrossRef](#)]
26. Waltz, F.; Nguyen, T.; Arrivé, M.; Bochler, A.; Chicher, J.; Hammann, P.; Kuhn, L.; Quadrado, M.; Mireau, H.; Hashem, Y.; et al. Small is big in Arabidopsis mitochondrial ribosome. *Nat. Plants* **2019**, *5*, 106–117. [[CrossRef](#)]
27. Waltz, F.; Salinas-Giegé, T.; Englmeier, R.; Meichel, H.; Soufari, H.; Kuhn, L.; Pfeffer, S.; Förster, F.; Engel, B.D.; Giegé, P.; et al. How to build a ribosome from RNA fragments in Chlamydomonas mitochondria. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 7176. [[CrossRef](#)]
28. Tobiasson, V.; Amunts, A. Ciliate mitoribosome illuminates evolutionary steps of mitochondrial translation. *eLife* **2020**, *9*, e59264. [[CrossRef](#)]
29. Bieri, P.; Greber, B.J.; Ban, N. High-resolution structures of mitochondrial ribosomes and their functional implications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2018**, *49*, 44–53. [[CrossRef](#)]
30. Valach, M.; Alcazar, J.A.G.; Sarrasin, M.; Lang, B.F.; Gray, M.W.; Burger, G. An Unexpectedly Complex Mitoribosome in Andalusia godoyi, a Protist with the Most Bacteria-like Mitochondrial Genome. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 788–804. [[CrossRef](#)]
31. Mager, J. Chloramphenicol and chlortetracycline inhibition of amino acid incorporation into proteins in a cell-free system from Tetrahymena pyriformis. *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *38*, 150–152. [[CrossRef](#)]
32. Rendi, R. On the occurrence of intramitochondrial ribonucleoprotein particles. *Exp. Cell Res.* **1959**, *17*, 585–587. [[CrossRef](#)]
33. Palade, G.E. A small particulate component of the cytoplasm. *J. Cell Biol.* **1955**, *1*, 59–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Borst, P.; Grivell, L.A. Mitochondrial ribosomes. *FEBS Lett.* **1971**, *13*, 73–88. [[CrossRef](#)]
35. Matthews, D.E.; Hessler, R.A.; Denslow, N.D.; Edwards, J.S.; O'Brien, T.W. Protein composition of the bovine mitochondrial ribosome. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 8788–8794. [[CrossRef](#)]
36. Koc, E.C.; Burkhardt, W.; Blackburn, K.; Moyer, M.B.; Schlatzer, D.M.; Moseley, A.; Spremulli, L.L. The Large Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43958–43969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Koc, E.C.; Burkhart, W.; Blackburn, K.; Moseley, A.; Koc, H.; Spremulli, L.L. A Proteomics Approach to the Identification of Mammalian Mitochondrial Small Subunit Ribosomal Proteins. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 32585–32591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sharma, M.R.; Koc, E.C.; Datta, P.P.; Booth, T.M.; Spremulli, L.L.; Agrawal, R.K. Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* **2003**, *115*, 97–108. [[CrossRef](#)]
39. Bonen, L.; Calixte, S. Comparative Analysis of Bacterial-Origin Genes for Plant Mitochondrial Ribosomal Proteins. *Mol. Biol. Evol.* **2006**, *23*, 701–712. [[CrossRef](#)]
40. Gan, X.; Arita, K.; Isono, S.; Kitakawa, M.; Yoshino, K.; Yonezawa, K.; Kato, A.; Inoue, H.; Isono, K. Identification and comparative analysis of the large subunit mitochondrial ribosomal proteins of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *254*, 157–164. [[CrossRef](#)]
41. Sharma, M.R.; Booth, T.M.; Simpson, L.; Maslov, D.A.; Agrawal, R.K. Structure of a mitochondrial ribosome with minimal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9637–9642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Maslov, D.A.; Sharma, M.R.; Butler, E.; Falick, A.M.; Gingery, M.; Agrawal, R.K.; Spremulli, L.L.; Simpson, L. Isolation and characterization of mitochondrial ribosomes and ribosomal subunits from *Leishmania tarentolae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, *148*, 69–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rugen, N.; Straube, H.; Franken, L.E.; Braun, H.-P.; Eubel, H. Complexome profiling reveals association of PPR proteins with ribosomes in the mitochondria of plants. *Mol. Cell. Proteom.* **2019**, *18*, 1345–1362. [[CrossRef](#)]
44. Smirnov, A.; Förstner, K.U.; Holmqvist, E.; Otto, A.; Günster, R.; Becher, D.; Reinhardt, R.; Vogel, J. Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 11591–11596. [[CrossRef](#)]
45. Gerovac, M.; Vogel, J.; Smirnov, A. The World of Stable Ribonucleoproteins and Its Mapping with Grad-Seq and Related Approaches. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 186. [[CrossRef](#)]
46. O'Reilly, F.J.; Rappsilber, J. Cross-linking mass spectrometry: Methods and applications in structural, molecular and systems biology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 1000–1008. [[CrossRef](#)]
47. Kühlbrandt, W. The Resolution Revolution. *Science* **2014**, *343*, 1443–1444. [[CrossRef](#)]
48. Amunts, A.; Brown, A.; Bai, X.C.; Llacer, J.L.; Hussain, T.; Emsley, P.; Long, F.; Murshudov, G.; Scheres, S.H.W.; Ramakrishnan, V. Structure of the Yeast Mitochondrial Large Ribosomal Subunit. *Science* **2014**, *343*, 1485–1489. [[CrossRef](#)]
49. Greber, B.J.; Boehringer, D.; Leitner, A.; Bieri, P.; Voigts-Hoffmann, F.; Erzberger, J.P.; Leibundgut, M.; Aebersold, R.; Ban, N. Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature* **2013**, *505*, 515–519. [[CrossRef](#)]
50. Hammani, K.; Bonnard, G.; Bouchoucha, A.; Gobert, A.; Pinker, F.; Salinas, T.; Giegé, P. Helical repeats modular proteins are major players for organelle gene expression. *Biochimie* **2014**, *100*, 141–150. [[CrossRef](#)]
51. Barkan, A.; Small, I. Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, *65*, 415–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Barkan, A.; Rojas, M.; Fujii, S.; Yap, A.; Chong, Y.S.; Bond, C.S.; Small, I. A Combinatorial Amino Acid Code for RNA Recognition by Pentatricopeptide Repeat Proteins. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, 4–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gobert, A.; Pinker, F.; Fuchsbauer, O.; Gutmann, B.; Boutin, R.; Roblin, P.; Sauter, C.; Giegé, P. Structural insights into protein-only RNase P complexed with tRNA. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Pinker, F.; Schelcher, C.; Fernandez-Millan, P.; Gobert, A.; Birck, C.; Thureau, A.; Roblin, P.; Giegé, P.; Sauter, C. Biophysical analysis of Arabidopsis protein-only RNase P alone and in complex with tRNA provides a refined model of tRNA binding. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 13904–13913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Teramoto, T.; Kaitany, K.J.; Kakuta, Y.; Kimura, M.; Fierke, C.A.; Hall, T.M.T. Pentatricopeptide repeats of protein-only RNase P use a distinct mode to recognize conserved bases and structural elements of pre-tRNA. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 11815–11826. [[CrossRef](#)]
56. Preker, P.J.; Keller, W. The HAT helix, a repetitive motif implicated in RNA processing. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 15–16. [[CrossRef](#)]
57. Hammani, K.; Cook, W.B.; Barkan, A. RNA binding and RNA remodeling activities of the half-a-tetratricopeptide (HAT) protein HCF107 underlie its effects on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5651–5656. [[CrossRef](#)]
58. Roberti, M.; Polosa, P.L.; Bruni, F.; Manzari, C.; Deceglie, S.; Gadaleta, M.N.; Cantatore, P. The MTERF family proteins: Mitochondrial transcription regulators and beyond. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2009**, *1787*, 303–311. [[CrossRef](#)]
59. Spähr, H.; Habermann, B.; Gustafsson, C.M.; Larsson, N.G.; Hallberg, B.M. Structure of the human MTERF4-NSUN4 protein complex that regulates mitochondrial ribosome biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15253–15258. [[CrossRef](#)]
60. Méteignier, L.-V.; Ghandour, R.; Zimmerman, A.; Kuhn, L.; Meurer, J.; Zoschke, R.; Hammani, K. Arabidopsis mTERF9 protein promotes chloroplast ribosomal assembly and translation by establishing ribonucleoprotein interactions in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 1114–1132. [[CrossRef](#)]
61. Ozawa, S.-I.; Cavaiuolo, M.; Jarrige, D.; Kuras, R.; Rutgers, M.; Eberhard, S.; Drapier, D.; Wollman, F.-A.; Choquet, Y. The OPR Protein MTH1 Controls the Expression of Two Different Subunits of ATP Synthase Cfo in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **2020**, *32*, 1179–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Viola, S.; Cavaiuolo, M.; Drapier, D.; Eberhard, S.; Vallon, O.; Wollman, F.; Choquet, Y. MDA 1, a nucleus-encoded factor involved in the stabilization and processing of the *atpA* transcript in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Plant J.* **2019**, *98*, tpj.14300. [[CrossRef](#)]
63. Kleinknecht, L.; Wang, F.; Stübe, R.; Philippar, K.; Nickelsen, J.; Bohne, A.-V. RAP, the Sole Octotricopeptide Repeat Protein in Arabidopsis, Is Required for Chloroplast 16S rRNA Maturation. *Plant Cell* **2014**, *26*, 777–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Hillebrand, A.; Matz, J.M.; Almendinger, M.; Müller, K.; Matuschewski, K.; Schmitz-Linneweber, C. Identification of clustered organellar short (cos) RNAs and of a conserved family of organellar RNA-binding proteins, the heptatricopeptide repeat proteins, in the malaria parasite. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 10417–10431. [[CrossRef](#)]
65. Filipovska, A.; Rackham, O. Modular recognition of nucleic acids by PUF, TALE and PPR proteins. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 699–708. [[CrossRef](#)]
66. Rubinson, E.H.; Eichman, B.F. Nucleic acid recognition by tandem helical repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 101–109. [[CrossRef](#)]
67. Delannoy, E.; Stanley, W.A.; Bond, C.S.; Small, I.D. Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1643–1647. [[CrossRef](#)]
68. Edwards, T.A.; Pyle, S.E.; Wharton, R.P.; Aggarwal, A.K. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* **2001**, *105*, 281–289. [[CrossRef](#)]
69. Nikolay, R.; van den Bruck, D.; Achenbach, J.; Nierhaus, K.H. Ribosomal Proteins: Role in Ribosomal Functions. In *eLS*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2015; pp. 1–12.
70. Itoh, Y.; Naschberger, A.; Mortezaei, N.; Herrmann, J.M.; Amunts, A. Analysis of translating mitochondria reveals functional characteristics of translation in mitochondria of fungi. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5187. [[CrossRef](#)]
71. Rodnina, M.V. Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a032664. [[CrossRef](#)]
72. Shine, J.; Dalgarno, L. The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 1342–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Geissmann, T.; Marzi, S.; Romby, P. The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA Biol.* **2009**, *6*, 153–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Duval, M.; Korepanov, A.; Fuchsbauer, O.; Fechter, P.; Haller, A.; Fabbretti, A.; Choulier, L.; Micura, R.; Klähholz, B.P.; Romby, P.; et al. Escherichia coli ribosomal protein S1 unfolds structured mRNAs onto the ribosome for active translation initiation. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Saito, K.; Green, R.; Buskirk, A.R. Translational initiation in E. Coli occurs at the correct sites genome-wide in the absence of mrna-rRNA base-pairing. *eLife* **2020**, *9*, e55002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Unseld, M.; Marienfeld, J.R.; Brandt, P.; Brennicke, A. The mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* **1997**, *15*, 57–61. [[CrossRef](#)]
77. Waltz, F.; Corre, N.; Hashem, Y.; Giegé, P. Specificities of the plant mitochondrial translation apparatus. *Mitochondrion* **2020**, *53*, 30–37. [[CrossRef](#)]
78. Burger, G.; Gray, M.W.; Forget, L.; Lang, B.F. Strikingly Bacteria-Like and Gene-Rich Mitochondrial Genomes throughout Jakobid Protists. *Genome Biol. Evol.* **2013**, *5*, 418–438. [[CrossRef](#)]
79. Temperley, R.J.; Wydro, M.; Lightowers, R.N.; Chrzanowska-Lightowers, Z.M. Human mitochondrial mRNAs—Like members of all families, similar but different. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1081–1085. [[CrossRef](#)]
80. Ojala, D.; Montoya, J.; Attardi, G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **1981**, *290*, 470–474. [[CrossRef](#)]
81. Montoya, J.; Ojala, D.; Attardi, G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* **1981**, *290*, 465–470. [[CrossRef](#)]
82. Kummer, E.; Leibundgut, M.; Rackham, O.; Lee, R.G.; Boehringer, D.; Filipovska, A.; Ban, N. Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM. *Nature* **2018**, *560*, 263–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Aibara, S.; Singh, V.; Modelska, A.; Amunts, A. Structural basis of mitochondrial translation. *eLife* **2020**, *9*, e58362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Baggio, F.; Bratic, A.; Mourier, A.; Kauppila, T.E.S.; Tain, L.S.; Kukat, C.; Habermann, B.; Partridge, L.; Larsson, N.-G. Drosophila melanogaster LRPPRC2 is involved in coordination of mitochondrial translation. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 13920–13938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Ruzzenente, B.; Metodiev, M.D.; Wredenberg, A.; Bratic, A.; Park, C.B.; Cámara, Y.; Milenkovic, D.; Zickermann, V.; Wibom, R.; Hultenby, K.; et al. LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J.* **2012**, *31*, 443–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Siira, S.J.; Spähr, H.; Shearwood, A.-M.J.; Ruzzenente, B.; Larsson, N.-G.; Rackham, O.; Filipovska, A. LRPPRC-mediated folding of the mitochondrial transcriptome. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1532. [[CrossRef](#)]
87. Lagouge, M.; Mourier, A.; Lee, H.J.; Spähr, H.; Wai, T.; Kukat, C.; Ramos, E.S.; Motori, E.; Busch, J.D.; Siira, S.; et al. SLIRP Regulates the Rate of Mitochondrial Protein Synthesis and Protects LRPPRC from Degradation. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005423. [[CrossRef](#)]
88. Weraarpachai, W.; Antonicka, H.; Sasarman, F.; Seeger, J.; Schrank, B.; Kolesar, J.E.; Lochmüller, H.; Chevrette, M.; Kaufman, B.A.; Horvath, R.; et al. Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 833–837. [[CrossRef](#)]
89. Herrmann, J.M.; Woellhaf, M.W.; Bonnefoy, N. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 286–294. [[CrossRef](#)]
90. Derbikova, K.S.; Levitsky, S.A.; Chicherin, I.V.; Vinogradova, E.N.; Kamenski, P.A. Activation of Yeast Mitochondrial Translation: Who Is in Charge? *Biochemistry* **2018**, *83*, 87–97. [[CrossRef](#)]

91. Nguyen, T.-T.; Planchard, N.; Dahan, J.; Arnal, N.; Balzergue, S.; Benamar, A.; Bertin, P.; Brunaud, V.; Dargel-Graffin, C.; Macherel, D.; et al. A Case of Gene Fragmentation in Plant Mitochondria Fixed by the Selection of a Compensatory Restorer of Fertility-Like PPR Gene. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3445–3458. [[CrossRef](#)]
92. Salinas-Giegé, T.; Cavaiuolo, M.; Cognat, V.; Ubrig, E.; Remacle, C.; Duchêne, A.-M.; Vallon, O.; Maréchal-Drouard, L. Polycytidylation of mitochondrial mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 12963–12973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Cahoon, A.B.; Qureshi, A.A. Leaderless mRNAs are circularized in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria. *Curr. Genet.* **2018**, *64*, 1321–1333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Feagin, J.E.; Harrell, M.I.; Lee, J.C.; Coe, K.J.; Sands, B.H.; Cannone, J.J.; Tami, G.; Schnare, M.N.; Gutell, R.R. The Fragmented Mitochondrial Ribosomal RNAs of *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38320. [[CrossRef](#)]
95. Soufari, H.; Waltz, F.; Parrot, C.; Durrieu-Gaillard, S.; Bochler, A.; Kuhn, L.; Sissler, M.; Hashem, Y. Structure of the mature kinetoplast mitoribosome and insights into its large subunit biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 29851–29861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Noller, H.F.; Lancaster, L.; Zhou, J.; Mohan, S. The ribosome moves: RNA mechanics and translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 1021–1027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Trabuco, L.G.; Schreiner, E.; Eargle, J.; Cornish, P.; Ha, T.; Luthey-Schulten, Z.; Schulten, K. The Role of L1 Stalk-tRNA Interaction in the Ribosome Elongation Cycle. *J. Mol. Biol.* **2010**, *402*, 741–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Jaskolowski, M.; Ramrath, D.J.F.; Bieri, P.; Niemann, M.; Mattei, S.; Calderaro, S.; Leibundgut, M.; Horn, E.K.; Boehringer, D.; Schneider, A.; et al. Structural Insights into the Mechanism of Mitoribosomal Large Subunit Biogenesis. *Mol. Cell* **2020**, *79*, 629–644. [[CrossRef](#)]
99. Tobiasson, V.; Rej Gahura, O.; Aibara, S.; Baradaran, R.; Ikov, A.; Amunts, A. Interconnected assembly factors regulate the biogenesis of mitoribosomal large subunit. *EMBO J.* **2021**, *40*, e106292. [[CrossRef](#)]
100. Ratje, A.H.; Loerke, J.; Mikolajka, A.; Brünner, M.; Hildebrand, P.W.; Starosta, A.L.; Dönhöfer, A.; Connell, S.R.; Fucini, P.; Mielke, T.; et al. Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature* **2010**, *468*, 713–716. [[CrossRef](#)]
101. Ott, M.; Amunts, A.; Brown, A. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **2016**, *85*, 77–101. [[CrossRef](#)]
102. Keil, M.; Bareth, B.; Woellhaf, M.W.; Peleh, V.; Prestele, M.; Rehling, P.; Herrmann, J.M. Oxa1-Ribosome Complexes Coordinate the Assembly of Cytochrome c Oxidase in Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 34484–34493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Stuart, R.A. Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: The role of the Oxa1 complex. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Res.* **2002**, *1592*, 79–87. [[CrossRef](#)]
104. Krüger, V.; Deckers, M.; Hildenbeutel, M.; van der Laan, M.; Hellmers, M.; Dreker, C.; Preuss, M.; Herrmann, J.M.; Rehling, P.; Wagner, R.; et al. The Mitochondrial Oxidase Assembly Protein1 (Oxa1) Insertase Forms a Membrane Pore in Lipid Bilayers. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33314–33326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Stiller, S.B.; Höpker, J.; Oeljeklaus, S.; Schütze, C.; Schrempp, S.G.; Vent-Schmidt, J.; Horvath, S.E.; Frazier, A.E.; Gebert, N.; van der Laan, M.; et al. Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 901–908. [[CrossRef](#)]
106. Wang, P.; Dalbey, R.E. Inserting membrane proteins: The YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta—Biomembr.* **2011**, *1808*, 866–875. [[CrossRef](#)]
107. Hennon, S.W.; Soman, R.; Zhu, L.; Dalbey, R.E. YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 14866–14874. [[CrossRef](#)]
108. Haque, M.E.; Elmore, K.B.; Tripathy, A.; Koc, H.; Koc, E.C.; Spremulli, L.L. Properties of the C-terminal Tail of Human Mitochondrial Inner Membrane Protein Oxa1L and Its Interactions with Mammalian Mitochondrial Ribosomes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 28353–28362. [[CrossRef](#)]
109. Jia, L. Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: The importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J.* **2003**, *22*, 6438–6447. [[CrossRef](#)]
110. Szyrach, G.; Ott, M.; Bonnefoy, N.; Neupert, W.; Herrmann, J.M. Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* **2003**, *22*, 6448–6457. [[CrossRef](#)]
111. Hildenbeutel, M.; Theis, M.; Geier, M.; Haferkamp, I.; Neuhaus, H.E.; Herrmann, J.M.; Ott, M. The Membrane Insertase Oxa1 Is Required for Efficient Import of Carrier Proteins into Mitochondria. *J. Mol. Biol.* **2012**, *423*, 590–599. [[CrossRef](#)]
112. Itoh, Y.; Andréll, J.; Choi, A.; Richter, U.; Maiti, P.; Best, R.B.; Barrientos, A.; Battersby, B.J.; Amunts, A. Mechanism of membrane-tethered mitochondrial protein synthesis. *Science* **2021**, *371*, 846–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Ott, M.; Prestele, M.; Bauerschmitt, H.; Funes, S.; Bonnefoy, N.; Herrmann, J.M. Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1603–1610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Pfeffer, S.; Woellhaf, M.W.; Herrmann, J.M.; Förster, F. Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Englmeier, R.; Pfeffer, S.; Förster, F. Structure of the Human Mitochondrial Ribosome Studied In Situ by Cryoelectron Tomography. *Structure* **2017**, *25*, 1574–1581.e2. [[CrossRef](#)]

116. Benz, M.; Soll, J.; Ankele, E. Arabidopsis thaliana Oxa proteins locate to mitochondria and fulfill essential roles during embryo development. *Planta* **2013**, *237*, 573–588. [[CrossRef](#)]
117. Kressler, D.; Hurt, E.; Baßler, J. A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 640–654. [[CrossRef](#)]
118. Erdmann, P.S.; Hou, Z.; Klumpe, S.; Khavnekar, S.; Beck, F.; Wilfling, F.; Plitzko, J.M.; Baumeister, W. In situ cryo-electron tomography reveals gradient organization of ribosome biogenesis in intact nucleoli. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5364. [[CrossRef](#)]
119. Klinge, S.; Woolford, J.L. Ribosome assembly coming into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 116–131. [[CrossRef](#)]
120. Kargas, V.; Castro-Hartmann, P.; Escudero-Urquijo, N.; Dent, K.; Hilcenko, C.; Sailer, C.; Zisser, G.; Marques-Carvalho, M.J.; Pellegrino, S.; Wawiórka, L.; et al. Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. *eLife* **2019**, *8*, e44904. [[CrossRef](#)]
121. Ameisemeier, M.; Zemp, I.; van den Heuvel, J.; Thoms, M.; Berninghausen, O.; Kutay, U.; Beckmann, R. Structural basis for the final steps of human 40S ribosome maturation. *Nature* **2020**, *587*, 683–687. [[CrossRef](#)]
122. Cheng, J.; Lau, B.; La Venuta, G.; Ameisemeier, M.; Berninghausen, O.; Hurt, E.; Beckmann, R. 90S pre-ribosome transformation into the primordial 40S subunit. *Science* **2020**, *369*, 1470–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Lau, B.; Cheng, J.; Flemming, D.; La Venuta, G.; Berninghausen, O.; Beckmann, R.; Hurt, E. Structure of the Maturing 90S Pre-ribosome in Association with the RNA Exosome. *Mol. Cell* **2021**, *81*, 293–303.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Nikolay, R.; Hilal, T.; Qin, B.; Mielke, T.; Bürger, J.; Loerke, J.; Textoris-Taube, K.; Nierhaus, K.H.; Spahn, C.M.T. Structural Visualization of the Formation and Activation of the 50S Ribosomal Subunit during In Vitro Reconstitution. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 881–893.e3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Nikolay, R.; Hilal, T.; Schmidt, S.; Qin, B.; Schwefel, D.; Vieira-Vieira, C.H.; Mielke, T.; Bürger, J.; Loerke, J.; Amikura, K.; et al. Snapshots of native pre-50S ribosomes reveal a biogenesis factor network and evolutionary specialization. *Mol. Cell* **2021**, *81*, 1200–1215.e9. [[CrossRef](#)]
126. Sissler, M.; Hashem, Y. Mitoribosome assembly comes into view. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2021**, *28*, 631–633. [[CrossRef](#)]
127. Cipullo, M.; Gesé, G.V.; Khawaja, A.; Hällberg, B.M.; Rorbach, J. Structural basis for late maturation steps of the human mitoribosomal large subunit. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3673. [[CrossRef](#)]
128. Hillen, H.S.; Lavdovskaia, E.; Nadler, F.; Hanitsch, E.; Linden, A.; Bohnsack, K.E.; Urlaub, H.; Richter-Dennerlein, R. Structural basis of GTPase-mediated mitochondrial ribosome biogenesis and recycling. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3672. [[CrossRef](#)]
129. Cheng, J.; Berninghausen, O.; Beckmann, R. A distinct assembly pathway of the human 39S late pre-mitoribosome. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4544. [[CrossRef](#)]
130. Lenarčič, T.; Jaskolowski, M.; Leibundgut, M.; Scaiola, A.; Schönhut, T.; Saurer, M.; Lee, R.G.; Rackham, O.; Filipovska, A.; Ban, N. Stepwise maturation of the peptidyl transferase region of human mitoribosomes. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3671. [[CrossRef](#)]
131. Chandrasekaran, V.; Desai, N.; Burton, N.O.; Yang, H.; Price, J.; Miska, E.A.; Ramakrishnan, V. Visualizing formation of the active site in the mitochondrial ribosome. *eLife* **2021**, *10*, e68806. [[CrossRef](#)]
132. Saurer, M.; Ramrath, D.J.F.; Niemann, M.; Calderaro, S.; Prange, C.; Mattei, S.; Scaiola, A.; Leitner, A.; Bieri, P.; Horn, E.K.; et al. Mitoribosomal small subunit biogenesis in trypanosomes involves an extensive assembly machinery. *Science* **2019**, *365*, 1144–1149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Lenarčič, T.; Niemann, M.; Ramrath, D.J.F.; Calderaro, S.; Flügel, T.; Saurer, M.; Leibundgut, M.; Boehringer, D.; Prange, C.; Horn, E.K.; et al. Mitoribosomal small subunit maturation involves formation of initiation-like complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2114710118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Rorbach, J.; Boesch, P.; Gammage, P.A.; Nicholls, T.J.J.; Pearce, S.F.; Patel, D.; Hauser, A.; Perocchi, F.; Minczuk, M. MRM2 and MRM3 are involved in biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 2542–2555. [[CrossRef](#)]
135. De Silva, D.; Tu, Y.-T.; Amunts, A.; Fontanesi, F.; Barrientos, A. Mitochondrial ribosome assembly in health and disease. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 2226–2250. [[CrossRef](#)]
136. Zeng, R.; Smith, E.; Barrientos, A. Yeast Mitoribosome Large Subunit Assembly Proceeds by Hierarchical Incorporation of Protein Clusters and Modules on the Inner Membrane. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 645–656.e7. [[CrossRef](#)]
137. Van Vranken, J.G.; Nowinski, S.M.; Clowers, K.J.; Jeong, M.-Y.; Ouyang, Y.; Berg, J.A.; Gygi, J.P.; Gygi, S.P.; Winge, D.R.; Rutter, J. ACP Acylation Is an Acetyl-CoA-Dependent Modification Required for Electron Transport Chain Assembly. *Mol. Cell* **2018**, *71*, 567–580.e4. [[CrossRef](#)]
138. Aphasizheva, I.; Maslov, D.; Wang, X.; Huang, L.; Aphasizhev, R. Pentatricopeptide Repeat Proteins Stimulate mRNA Adenylation/Uridylation to Activate Mitochondrial Translation in Trypanosomes. *Mol. Cell* **2011**, *42*, 106–117. [[CrossRef](#)]
139. Porcelli, A.M.; Ghelli, A.; Zanna, C.; Pinton, P.; Rizzuto, R.; Rugolo, M. pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 799–804. [[CrossRef](#)]
140. Pecoraro, A.; Pagano, M.; Russo, G.; Russo, A. Ribosome Biogenesis and Cancer: Overview on Ribosomal Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5496. [[CrossRef](#)]

Caractérisation de l'attachement du mitoribosome à la membrane interne des mitochondries chez les plantes terrestres

Résumé

Les ribosomes sont des complexes moléculaires responsables de la traduction de l'information génétique véhiculée par l'ARNm en protéines. La traduction cytosolique est bien caractérisée, contrairement à la traduction mitochondriale chez les eucaryotes. Chez l'Homme et la levure, la traduction mitochondriale se déroule à la surface de la membrane interne de la mitochondrie de manière concomitante avec l'insertion des protéines néosynthétisées dans la membrane. Les mitoribosomes sont attachés directement à l'insertase Oxa1 par des mécanismes différents selon les groupes d'organismes. Chez les plantes terrestres, cette interaction n'a pas encore été observée et le mécanisme de l'interaction reste inconnu. Mes travaux se concentrent sur la caractérisation de l'interaction entre le mitoribosome de plante et l'insertase Oxa1a dans la membrane interne mitochondriale. Mes expériences de co-immunoprécipitation ont permis de montrer qu'il existe une interaction entre le domaine C-terminal d'Oxa1a et le mitoribosome. Cette interaction semble directe entre ce domaine et une protéine constitutive du mitoribosome. Des expériences complémentaires de cryo-EM et de cryo-ET permettront de connaître le site de contact exact et la ou les protéine(s) du mitoribosome responsable(s) de l'interaction avec Oxa1a.

Mots clés : Oxa1a, mitochondrie, traduction, mitoribosome, *Arabidopsis thaliana*

Abstract

Ribosomes are molecular complexes responsible for the translation of genetic information carried by mRNA into proteins. Cytosolic translation is well characterized, unlike mitochondrial translation in eukaryotes. In humans and yeast, mitochondrial translation takes place on the surface of the mitochondrial inner membrane concomitantly with the insertion of neosynthesized proteins into the membrane. Mitoribosomes are attached directly to the Oxa1 insertase by different mechanisms in each group of organisms. In land plants, this interaction has not yet been observed and the mechanism of the interaction remains unknown. My work focuses on characterizing the interaction between the plant mitoribosome and the Oxa1a insertase in the mitochondrial inner membrane. My co-immunoprecipitation experiments have shown that there is an interaction between the C-terminal domain of Oxa1a and the mitoribosome. This interaction seems to be direct between this domain and a constitutive protein of the mitoribosome. Further cryo-EM and cryo-ET experiments will allow to know the exact contact site and the mitoribosome protein(s) responsible for the interaction with Oxa1a.

Key words: Oxa1a, mitochondria, translation, mitoribosome, *Arabidopsis thaliana*