



**HAL**  
open science

# Caractérisation biochimique de deux protéines PPR mitochondriales de la sous famille Rf-like chez *Arabidopsis thaliana*

Noelya Planchard

► **To cite this version:**

Noelya Planchard. Caractérisation biochimique de deux protéines PPR mitochondriales de la sous famille Rf-like chez *Arabidopsis thaliana*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS289 . tel-01929102

**HAL Id: tel-01929102**

**<https://theses.hal.science/tel-01929102>**

Submitted on 21 Nov 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Caractérisation biochimique de deux protéines PPR mitochondriales de la sous-famille Rf-like chez *Arabidopsis thaliana*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°567 Sciences du Végétal : du gène à l'écosystème  
Spécialité de doctorat : Biologie

Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 28 septembre 2017, par

**Noelya Planchard**

## Composition du Jury :

Christopher Herbert Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Président
Géraldine Bonnard Directeur de recherche, Université de Strasbourg	Rapporteur
David Macherel Directeur de recherche, Université d'Angers	Rapporteur
Olivier Vallon Directeur de recherche, Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Hakim Mireau Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

## Remerciements

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont le fruit d'un travail d'équipe, j'aimerais remercier à cet endroit toutes les personnes qui y ont participé.

En premier lieu, merci Hakim de m'avoir accueillie dans ton équipe. Merci pour tous les conseils que tu m'as donnés, d'avoir été présent à toutes étapes de ma thèse et d'avoir minutieusement corrigé ce manuscrit.

Merci aux membres du jury, Mme Bonnard, M. Herbert, M. Macherel et M. Vallon d'avoir accepté de lire ce manuscrit et de passer du temps sur mon travail de thèse.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Philippe Giegé et Olivier Namy pour leur écoute et leurs conseils.

Au sujet du profilage de ribosome, merci Olivier pour tes connaissances et ta gentillesse, merci Isabelle de m'avoir montré comment faire une manip que j'avais tant de mal à mener à bien, et merci Pierre de m'avoir aidé à analyser les données et à les tourner dans tous les sens.

Merci également à tous les membres de l'équipe, qu'ils soient encore là où qu'ils n'aient été que de passage, tout comme moi : Céline, Noémie, Martine, Chuande, Trung, Matthieu et Françoise. Merci aussi aux anciens membres : Nawel, Fabien, Clément et Lydiane. Travailler à vos côtés a été un réel plaisir.

Merci Jennifer d'avoir commencé les projets RFL22 et RFL23, cela m'a permis de ne pas partir de rien et cela m'a été d'une aide infinie.

Merci Martine pour tous les sauvetages d'embryons, les semis, les récoltes, les génotypages et ta gentillesse.

Merci Fabien pour tes fichiers Excel et ton programme de prédictions.

Merci Noémie pour ta bonne humeur, ton écoute, tes conseils, ta gentillesse et ton sourire.

Merci Céline pour les innombrables manip qu'on a faites ensemble, merci pour ton acharnement à les faire marcher, mais encore plus merci d'être la personne que tu es. Merci de m'avoir fait rire chaque jour depuis ton arrivée dans notre équipe. Sans toi ma thèse aurait été nettement moins joyeuse. Pour ça je te suis éternellement reconnaissante.

Merci Marie-Lu pour ta gentillesse, ton sourire et tes conseils en biochimie.

Merci à Beate H., Magalie U., Carine G., Rajeev K., Ivan L., Corinne M., Gwendal C., Céline B., Vanessa P. et Amandine I. pour leur sympathie et/ou leur aide expérimentale.

Merci aux thésards, il a été très bénéfique dans des périodes où rien ne fonctionne correctement de pouvoir passer du temps ensemble et de voir que nous ne sommes pas seuls.

Merci à Bernard Darré, notre cher informaticien, d'avoir toujours été là lorsque j'ai eu besoin de lui (et j'ai souvent eu besoin de lui...).

Merci Jacqui pour ta gentillesse infinie, ta disponibilité, ton écoute et tes conseils.

Merci (de tout mon cœur) à la Fondation pour la Recherche Médicale, qui a financé ma 4<sup>ème</sup> année de thèse.

Merci à mes parents, mes beaux-parents, mes frères et aux membres de ma famille qui m'ont toujours soutenue dans ce que je faisais.

Merci à mon chéri qui est près de moi et me soutient depuis ma première année de fac (la première d'une longue série !). Merci à ma fille pour tous ses câlins et ses bisous qui m'ont aidés à ne jamais baisser les bras.

Merci à tous les membres de l'institut, qui ont contribués d'une façon ou d'une autre à faire avancer mon travail.

## Sommaire

<b>1. Introduction.....</b>	<b>25</b>
1.1. <i>Les mitochondries.....</i>	25
1.1.1. Evolution .....	25
1.1.2. Structure des mitochondries .....	29
1.2. <i>La respiration cellulaire aérobie.....</i>	33
1.2.1. De la glycolyse à la phosphorylation oxydative .....	33
1.2.2. La phosphorylation oxydative .....	35
1.3. <i>Le système OXPHOS.....</i>	37
1.3.1. Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase .....	37
1.3.1.1. Généralités .....	37
1.3.1.2. Structure du complexe I .....	37
1.3.1.2.1. Structure du complexe I de plantes .....	38
1.3.1.2.2. Structure du complexe I bactérien.....	39
1.3.1.2.3. Structure du complexe I de mammifères .....	40
1.3.1.3. Mécanisme de couplage du complexe I .....	41
1.3.1.4. Mutants du complexe I chez les plantes.....	42
1.3.2. Complexe II : Succinate-ubiquinone oxydoréductase.....	44
1.3.2.1. Généralités .....	44
1.3.2.2. Mutants du complexe II chez les plantes .....	44
1.3.3. Complexe III : coenzyme Q – cytochrome c réductase .....	45
1.3.3.1. Généralités .....	45
1.3.3.2. Mutants du complexe III chez les plantes.....	45
1.3.4. Complexe IV : cytochrome c oxydase.....	45
1.3.4.1. Généralités .....	45
1.3.4.2. Mutants du complexe IV chez les plantes .....	46
1.3.5. Complexe V : ATP synthase .....	46
1.3.5.1. Généralités .....	46
1.3.5.2. Mutants du complexe V chez les plantes.....	47
1.3.6. La respiration alternative .....	47
1.3.6.1. Les NAD(P)H déshydrogénases alternatives .....	47
1.3.6.2. Les oxydases alternatives ou AOX .....	48
1.3.6.3. Rôles des oxydoréductases alternatives .....	48
1.3.7. Les super-complexes respiratoires.....	50
1.4. <i>Les cytochromes de type c.....</i>	52
1.4.1. Présentation générale.....	52

1.4.2.	Import et maturation des cytochromes de type c .....	52
1.4.2.1.	Maturation en holocytochromes de types c.....	52
1.4.2.2.	Organisation modulaire de la machinerie de maturation des cytochrome de type c	53
1.4.2.3.	Le système I de maturation des cytochromes de type c.....	54
1.4.2.4.	Les spécificités du système I chez les mitochondries végétales .....	54
1.4.2.4.1.	Scission du gène <i>CcmF</i> .....	54
1.4.2.4.2.	Autres spécificités .....	55
1.4.2.5.	Import des apocytochromes c et c <sub>1</sub> .....	56
1.4.2.6.	Délivrance de l'hème .....	57
1.4.2.7.	Ligation de l'hème.....	57
1.5.	<i>Les protéines PPR</i> .....	58
1.5.1.	Découverte et généralités .....	58
1.5.2.	Structure des protéines PPR.....	61
1.5.3.	Organisation des motifs : les PPR classiques vs les PPR-PLS .....	63
1.5.3.1.	Les PPR-P vs les PPR-PLS .....	63
1.5.3.2.	Les séquences N et C-terminales des protéines PPR.....	64
1.5.3.2.1.	Les séquences N-terminales des protéines PPR .....	64
1.5.3.2.2.	Les séquences C-terminales des protéines PPR.....	64
1.5.3.3.	Les variants du motif PPR canonique.....	65
1.5.4.	Fonctions des protéines PPR.....	68
1.5.4.1.	La stérilité mâle cytoplasmique ou SMC .....	69
1.5.4.1.1.	Stérilité mâle cytoplasmique identifiée chez le pétunia .....	72
1.5.4.1.2.	Stérilités mâles cytoplasmiques identifiées chez le radis .....	72
1.5.4.1.3.	Stérilités mâles cytoplasmiques identifiées chez le riz.....	73
1.5.4.1.4.	Stérilité mâle cytoplasmique identifiée chez le sorgho.....	74
1.5.4.1.5.	Stérilité mâle cytoplasmique chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	74
1.5.4.1.1.	Stérilité mâle cytoplasmique chez l'orge.....	75
1.5.4.2.	Les protéines PPR Rf-like (ou RFL).....	75
1.5.4.2.1.	Présentation générale.....	75
1.5.4.2.2.	Les protéines RFL caractérisées chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	78
1.5.4.2.3.	Ce que l'on peut conclure au sujet des protéines RFL chez <i>Arabidopsis</i> .....	81
1.5.5.	Le code PPR.....	82
1.6.	<i>L'expression du génome mitochondrial chez les plantes</i> .....	85
1.6.1.	Import de protéines d'origine nucléaire dans la mitochondrie .....	85
1.6.2.	Le génome mitochondrial d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	85
1.6.3.	Transcription mitochondriale.....	86
1.6.4.	Modifications post-transcriptionnelle des ARNm .....	87

1.6.4.1.	Stabilisation des ARNm .....	87
1.6.4.2.	Epissage des introns .....	88
1.6.4.3.	Edition des ARNm mitochondriaux.....	90
1.6.4.3.1.	Considérations générales.....	90
1.6.4.3.2.	Implication des motifs C-terminaux dans l'édition des ARNm .....	91
1.6.4.3.3.	Intervention de protéines non-PPR dans l'éditosome.....	91
1.6.4.3.4.	Protéines PPR impliquées dans l'édition d'ARNm mitochondriaux chez les plantes	92
1.6.4.4.	Maturation des extrémités 5' et 3' des ARNm mitochondriaux.....	95
1.6.4.5.	La traduction mitochondriale .....	97
<b>2.</b>	<b>Traduction mitochondriale : Projet de revue.....</b>	<b>101</b>
2.1.	Introduction.....	101
2.2.	<i>The Mitochondrial translational apparatus</i> .....	104
2.2.1.	Mitoribosome composition .....	104
2.2.2.	Evolution of mitoribosome protein compositions .....	105
2.2.3.	RNA:protein ratios in mitoribosomes .....	106
2.2.4.	Roles of mitoribosome-specific MRPs .....	107
2.2.5.	Structure of mammalian mitoribosomes .....	108
2.2.5.1.	The 28S small subunit.....	109
2.2.5.2.	The 39S large subunit.....	110
2.2.5.3.	A, P and E sites of mitoribosomes .....	111
2.2.5.4.	Mitoribosome assembly .....	112
2.2.6.	Association of mitoribosomes to the inner membrane.....	112
2.3.	<i>Functioning and regulation of the mitochondrial translation machinery</i> .....	114
2.3.1.	The different steps of the mitochondrial translation and codon assignments in mitochondria .....	114
2.3.2.	The notion of translational activators .....	115
2.3.3.	Regulation of mitochondrial translation .....	118
2.3.4.	Potential roles of micro-RNAs in mitochondrial translation regulation ....	119
2.4.	<i>The case of PPR proteins that can promote or dowregulate translation of specific     mitochondrial mRNAs</i> .....	119
2.4.1.	PPR proteins promoting translation .....	120
2.4.1.1.	In mammals mitochondria.....	120
2.4.1.2.	In yeast mitochondria .....	120
2.4.1.3.	In plants mitochondria .....	121
2.4.2.	PPR proteins preventing mitochondrial translation.....	122
2.5.	Conclusion .....	124

<b>3. Problématique .....</b>	<b>127</b>
<b>4. Résultats.....</b>	<b>133</b>
4.1. <i>Caractérisation fonctionnelle de la protéine RFL22.....</i>	133
4.1.1. Le mutant <i>rfl22</i> meurt à l'état embryonnaire mais peut être sauvé par culture <i>in vitro</i>	133
4.1.2. Les complexes respiratoires III et IV et le complexe hème lyase sont sous-accumulés chez le mutant <i>rfl22</i> .....	135
4.1.3. Les ARNm mitochondriaux sont sur-accumulés chez le mutant <i>rfl22</i> .....	137
4.1.4. La protéine RFL22 est nécessaire à l'épissage de l'intron 1 de l'ARNm <i>nad2</i>	140
4.1.5. La forme courte de l'ARNm <i>ccmF<sub>C</sub></i> disparaît chez le mutant <i>rfl22</i> .....	141
4.1.6. L'ARNm <i>ccmF<sub>N2</sub></i> n'est pas traduit chez le mutant <i>rfl22</i> .....	143
4.1.7. La protéine RFL22 lie l'ARNm <i>ccmF<sub>N2</sub></i> <i>in vivo</i> .....	145
4.1.8. La protéine RFL22 lie l'ARNm <i>ccmF<sub>N2</sub></i> <i>in vitro</i> .....	146
4.1.9. Complémentation fonctionnelle du mutant <i>rfl22</i> d' <i>Arabidopsis</i> avec les orthologues putatifs du gène <i>RFL22</i> identifiés chez <i>Arabidopsis lyrata</i> et <i>Brassica rapa</i> .	148
4.2. <i>Caractérisation fonctionnelle de la protéine RFL23.....</i>	155
4.2.1. Le mutant <i>rfl23</i> présente un retard de croissance.....	155
4.2.2. Le mutant <i>rfl23</i> n'accumule plus de complexe I mais un intermédiaire d'assemblage de 200 kDa .....	156
4.2.3. Les ARNm mitochondriaux sont sur-accumulés chez le mutant <i>rfl23</i> .....	158
4.2.4. Les extrémités des transcrits mitochondriaux du complexe I sont maturées de façon équivalente chez le mutant <i>rfl23</i> et le sauvage .....	161
4.2.5. La protéine RFL23 est requise pour l'épissage de l'intron 1 de <i>nad2</i> .....	162
4.2.6. L'ARNm mitochondrial <i>nad4L</i> n'est pas traduit correctement chez <i>rfl23</i> .	163
4.3. <i>Projet d'article : Analyse du transcriptome mitochondrial chez Arabidopsis thaliana</i>	169
4.3.1. Introduction .....	170
4.3.2. Materials and methods.....	172
4.3.2.1. Plant material .....	172
4.3.2.2. Ribosome footprints preparation .....	173
4.3.2.3. Total RNA quantification .....	174
4.3.2.4. Bioinformatic Analysis : From raw data to alignment files.....	174
4.3.2.5. Bioinformatic Analysis : Differential Expression .....	174
4.3.3. Results .....	175



4.3.3.1. The majority of mitochondrial ribosome footprints in Arabidopsis measure 27 and 28 nucleotides .....	175
4.3.3.2. Analysis of ribosome footprint distributions along mitochondrial genes sequences	178
4.3.3.3. Arabidopsis mitochondrial mRNA show different ribosome association levels and ribosome entry mechanisms.....	183
4.3.3.4. Mitochondrial translation is reorchestrated in respiratory complex I mutants	186
4.3.4. Discussion .....	191
4.3.4.1. Arabidopsis mitochondrial ribosomes footprints do not show a bimodal distribution as in human mitochondria .....	191
4.3.4.2. Arabidopsis mitochondrial mRNAs exhibit large differences in polysome association	192
4.3.4.3. Mitochondrial translation is reorganized in Arabidopsis complex I mutants.	194
4.3.5. Concluding remarks .....	196
<b>5. Discussion et conclusion.....</b>	<b>199</b>
5.1. <i>Physiologie des mutants</i> .....	199
5.1.1. L'absence de la protéine CcmF <sub>N2</sub> chez le mutant <i>rfl22</i> impacte la chaîne respiratoire mitochondriale à plusieurs niveaux .....	199
5.1.2. L'expression des oxydoréductases alternatives permet aux mutants de complexes respiratoire de survivre.....	199
5.1.3. Les ARNm mitochondriaux sont surexprimés chez les mutants de complexes respiratoires .....	200
5.1.1. L'épissage de l'ARNm <i>nad2</i> est affecté chez les mutants de complexes respiratoire	202
5.2. <i>Fonctions des protéines RFL22 et RFL23</i> .....	203
5.2.1. La protéine RFL22 est à la fois impliquée dans la stabilisation et/ou la production de la forme courte de l'ARNm <i>ccmF<sub>C</sub></i> ainsi que dans la traduction de <i>ccmF<sub>N2</sub></i> ..	203
5.2.2. La protéine RFL23 est requise pour permettre au ribosome d'initier la traduction de l'ARNm <i>nad4L</i> au bon codon AUG .....	204
5.3. <i>Mode d'action des protéines RFL22 et RFL23</i> .....	205
5.3.1. Détermination du site de fixation de la protéine RFL22 sur l'ARNm <i>ccmF<sub>N2</sub></i> : deux hypothèses s'opposent.....	205
5.3.2. Détermination du site de fixation de la protéine RFL23 sur l'ARNm <i>nad4L</i>	208
5.4. <i>Ce que l'on peut conclure sur les protéines PPR Rf-like chez Arabidopsis thaliana</i>	210

<b>6. Annexes : participation à d'autres projets.....</b>	<b>215</b>
6.1. Caractérisation de la protéine PPR MTL1.....	215
6.2. Caractérisation de la protéine PPR MTSF2 .....	229
<b>7. Matériel et méthodes .....</b>	<b>249</b>
7.1. Matériel .....	249
7.1.1. Matériel végétal.....	249
7.1.2. Souches bactériennes .....	249
7.1.3. Plasmides .....	250
7.1.4. Oligonucléotides.....	251
7.1.5. Outils informatiques.....	260
7.2. Méthodes.....	261
7.2.1. Protocoles de biologie végétale.....	261
7.2.1.1. Stérilisation de graines.....	261
7.2.1.2. Sauvetage de mutants embryon-létaux d'Arabidopsis.....	261
7.2.1.3. Complémentation fonctionnelle de mutants.....	263
7.2.2. Protocoles de biologie moléculaire.....	265
7.2.2.1. Extraction d'ADN génomique en plaque 96 puits.....	265
7.2.2.2. Extraction d'ADN génomique en tubes individuels.....	266
7.2.2.1. Extraction d'ARN total .....	266
7.2.2.2. Migration d'ADN ou ARN sur gel d'agarose .....	266
7.2.2.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne : PCR .....	267
7.2.2.4. PCR sur de l'ADN complémentaire issu d'ARN circularisé : C-RT-PCR.....	268
7.2.2.5. RT-PCR quantitative : q-RT-PCR.....	269
7.2.2.6. Clonage Gateway® .....	270
7.2.2.7. Amplification de plasmides dans <i>E. coli</i> (souches DH10B ou DH5α).....	271
7.2.2.1. Northern-blot.....	271
7.2.3. Protocoles de biochimie .....	273
7.2.3.1. Western-blot .....	273
7.2.3.2. Profilage de ribosomes.....	274
7.2.3.3. Production de protéines recombinantes .....	278
7.2.3.4. Purification de protéines recombinantes ayant une étiquette histidine .....	279
7.2.3.5. Purification de protéines recombinantes ayant une étiquette MBP.....	280
7.2.3.6. Gels-retard .....	281
7.2.3.7. Co-immunoprécipitation de complexes PPR/ARN.....	282
7.2.4. Autres protocoles .....	283
7.2.4.1. Purification de mitochondries.....	283
<b>8. Références bibliographiques .....</b>	<b>287</b>





## Liste des Figures

Figure 1 – Les deux scénarios alternatifs de l'eucaryogenèse (Koonin, 2010).....	29
Figure 2 - Modèle de Palade représentant la structure interne d'une mitochondrie (Frey & Mannella, 2000).....	30
Figure 3 – Modèle structural de mitochondries de foie de rat obtenu par cryo-tomographie électronique (Mannella, 2006).....	31
Figure 4 - Modèle de la structure interne d'une mitochondrie de cervelet de poulet, réalisé par tomographie par microscopie électronique <i>in situ</i> (Frey & Mannella, 2000).....	32
Figure 5 – Schéma réactionnel de la glycolyse.....	33
Figure 6 – Schéma réactionnel du cycle de Krebs.....	34
Figure 7 - Schéma du système OXPHOS (Bellance et al., 2009; Dudkina et al., 2010).....	36
Figure 8 - Modèle de la structure interne du complexe I de plantes (Braun et al., 2014).....	39
Figure 9 - Structure du bras membranaire du complexe I chez <i>E. coli</i> (Efremov & Sazanov, 2011).....	39
Figure 10 - Structure du complexe I de bœuf (Zhu et al., 2016).....	41
Figure 11 - Mécanisme de couplage du complexe I (Fiedorczuk et al., 2016).....	42
Figure 12 – Structures par cryo-microscopie électronique du respirasome I <sub>1</sub> +III <sub>2</sub> +IV <sub>1</sub> et du super-complexe I <sub>1</sub> +III <sub>2</sub> à partir de mitochondries purifiées de cœur de mouton (Letts et al., 2016).....	51
Figure 13 - Organisation fonctionnelle générale de la machinerie de maturation des cytochromes de type c (Verissimo & Daldal, 2014).....	53
Figure 14 - Schéma du système I de maturation des cytochromes de type c (Hamel et al., 2009).....	56
Figure 15 - Adressage subcellulaire des protéines PPR chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Colcombet et al., 2013).....	61
Figure 16 – Structure des protéines PPR (Fujii et al., 2011; Yin et al., 2013).....	62
Figure 17 - Représentation graphique de la proportion de gènes PPR présentant des introns (Lurin et al., 2004).....	63
Figure 18 – Alignement des séquences consensus des différents types de motifs PPR (Cheng et al., 2016).....	66
Figure 19 – Architecture des protéines PPR chez les plantes (Cheng et al., 2016).....	67

Figure 20 - Arbres phylogénétiques résultant d'alignements multiples et montrant le niveau d'apparentement entre les protéines PPR de type P codées chez diverses espèces de plantes terrestres (Fujii et al., 2011). .....	77
Figure 21 - Bases structurales de la reconnaissance des nucléotides par les répétitions PPR (Shen et al., 2016).....	83
Figure 22 - Définition des motifs PPR par différentes équipes de recherche (Cheng et al., 2016) .....	84
Figure 23 - Organisation du génome mitochondrial d' <i>Arabidopsis thaliana</i> (Unsold et al., 1997) .....	86
Figure 24 - Siliques disséquées à partir de plantes hétérozygotes RFL22/ <i>rfl22</i> montrant les graines décolorées (flèches rouges) porteuses d'embryons <i>rfl22</i> homozygotes mutants (Travaux de J. Dahan).....	134
Figure 25 - Croissance <i>in vitro</i> du mutant <i>rfl22</i> en comparaison au sauvage Col-0 (Travaux de J. Dahan).....	134
Figure 26 - Mesure du niveau d'accumulation de complexes respiratoires, de complexes impliqués dans la maturation des cytochromes de type c et des cytochromes c et c <sub>1</sub> , par western-blot. Les anticorps utilisés sont mentionnés à côté de chaque image (Travaux de J. Dahan).....	135
Figure 27 - Le mutant <i>rfl22</i> n'accumule plus à un niveau détectable les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Travaux de J. Dahan).....	136
Figure 28 - Mesure du niveau d'accumulation des ARNm codant des différentes isoformes de l'alternative oxydase et des NADH déshydrogénases alternatives chez le mutant <i>rfl22</i> et le mutant complémenté <i>rfl22</i> -HA en comparaison au sauvage. ....	137
Figure 29 - Mesure du niveau d'accumulation des ARNm mitochondriaux chez le mutant <i>rfl22</i> et le mutant complémenté <i>rfl22</i> -HA, en comparaison au sauvage Col-0. ....	138
Figure 30 - Analyse par northern-blot des ARNm impliqués dans la maturation des cytochromes de type c.....	139
Figure 31 - Efficacité d'épissage des ARNm mitochondriaux chez le mutant <i>rfl22</i> et les plantes complémentées <i>rfl22</i> -HA en comparaison au sauvage Col-0.....	140
Figure 32 - Cartographie des extrémités des ARNm <i>ccmF<sub>C</sub></i> , <i>ccmF<sub>N1</sub></i> et <i>ccmF<sub>N2</sub></i> chez le mutant <i>rfl22</i> en comparaison au sauvage.....	142
Figure 33 - Traductomes mitochondriaux de Col-0 et du mutant <i>rfl22</i> .....	143
Figure 34 - Analyse différentielle des changements transcriptionnels et traductionnels des ARNm mitochondriaux chez le mutant <i>rfl22</i> .....	144

Figure 35 - Représentation de la densité en ribosomes le long de l'ARNm <i>ccmF<sub>N2</sub></i> chez Col-0 et le mutant <i>rfl22</i> .....	145
Figure 36 - Co-immunoprécipitation de l'ARNm <i>ccmF<sub>N2</sub></i> avec la protéine RFL22-HA (Travaux de J. Dahan).....	146
Figure 37 - La protéine PPR RFL22 reconnaît spécifiquement une courte région de la 5' UTR de l'ARNm <i>ccmF<sub>N2</sub></i> <i>in vitro</i> .....	147
Figure 38 - Détermination de la région cartographiée comportant le site de fixation de la protéine RFL22-HA sur la 5'UTR de l'ARNm <i>ccmF<sub>N2</sub></i> .....	147
Figure 39 - Alignement des séquences protéiques de la protéine RFL22 chez <i>A. thaliana</i> et de ses orthologues putatifs chez <i>A. lyrata</i> et <i>B. rapa</i> .....	149
Figure 40 - Alignement des 5'UTR de <i>ccmF<sub>N2</sub></i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et de <i>Brassica Rapa</i> ...	150
Figure 41 - La protéine RFL22-L complémente fonctionnellement le mutant <i>rfl22</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	151
Figure 42 - Alignement de la 5'UTR de <i>ccmF<sub>N2</sub></i> de <i>Brassica rapa</i> avec la région de liaison de la protéine RFL22 sur la 5' UTR de <i>ccmF<sub>N2</sub></i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> identifiée par gel retard. ....	152
Figure 43 - Le mutant <i>rfl23</i> présente un retard de croissance important par rapport au témoin sauvage (Col-0). ....	155
Figure 44 - Le mutant <i>rfl23</i> n'accumule plus le complexe I de la chaîne respiratoire (Travaux de J. Dahan).....	156
Figure 45 - Détection du complexe I et de ses intermédiaires d'assemblage chez Col-0 et le mutant <i>rfl23</i> (Travaux d'E. Meyer) .....	157
Figure 46 - Mesure du niveau d'accumulation des ARNm codant des différentes isoformes de l'alternative oxydase et des NADH déshydrogénases alternatives chez le mutant <i>rfl23</i> et le mutant complémenté <i>rfl23</i> -FLAG en comparaison au sauvage. ....	158
Figure 47 - Mesure du niveau d'accumulation des ARNm mitochondriaux chez le mutant <i>rfl23</i> et le mutant complémenté <i>rfl23</i> -FLAG, en comparaison au sauvage Col-0. ....	159
Figure 48 - Les ARNm codant les sous unités du complexe I sont surexprimés chez le mutant <i>rfl23</i> .....	160
Figure 49 - Cartographie des extrémités des ARNm mitochondriaux du complexe I chez le mutant <i>rfl23</i> en comparaison au sauvage Col-0.....	161
Figure 50 - Mesure de l'efficacité d'épissage des ARNm mitochondriaux chez le mutant <i>rfl23</i> et le mutant complémenté <i>rfl23</i> -FLAG en comparaison au sauvage Col-0 .....	162
Figure 51 - Traductomes mitochondriaux de Col-0 et du mutant <i>rfl23</i> .....	163

Figure 52 - Analyse différentielle des changements transcriptionnels et traductionnels des ARNm mitochondriaux chez le mutant <i>rfl23</i> .....	164
Figure 53 - Couverture ribosomale de l'ARNm <i>nad4L</i> chez Col-0 et le mutant <i>rfl23</i> .....	165
Figure 54 - K-mers distribution in the 27 and 33-mers short RNA populations .....	176
Figure 55 - The 27-mers population ribosome protected fragments show a stronger repartition bias relative to mitochondrial start codon compared to the 33-mers population.....	177
Figure 56 - Most 27-mers population maps to the mitochondrial coding sequences. ....	178
Figure 57 - Ribosome footprint distributions along Arabidopsis mitochondrial mRNAs in which start or stop codons are removed by post-transcriptional processing. ....	180
Figure 58 - Analysis of RPF distributions around the start codon of a selected panel of Arabidopsis mitochondrial mRNAs. ....	181
Figure 59 - Analysis of RPF distributions around the stop codon of a selected panel of Arabidopsis mitochondrial mRNAs. ....	182
Figure 60 - A single region outside of known mitochondrial genes seem to associate with ribosome in Arabidopsis.....	183
Figure 61 - Protein coding mitochondrial transcripts show differential ribosome association in Arabidopsis .....	184
Figure 62 - Comparative RPF densities on <i>atp6-1</i> and <i>atp6-2</i> transcripts .....	185
Figure 63 - Differential transcriptional and translational profiles of mitochondrial mRNAs between the <i>mtsf1</i> mutant and Col-0. ....	186
Figure 64 - Differential transcriptional and translational profiles of mitochondrial mRNAs between the <i>mtl1</i> mutant and Col-0. ....	187
Figure 65 - RPF coverage of mitochondrial mRNAs in the Arabidopsis <i>mtsf1</i> mutant.....	188
Figure 66 - RPF coverage of mitochondrial mRNAs in the Arabidopsis <i>mtl1</i> mutant.....	188
Figure 67 - Quantitative RT-PCR measuring the steady state levels of mitochondrial mRNA exon by exon in the indicated genotypes (Col-0, <i>mtl1</i> , <i>mtsf1</i> ). ....	189
Figure 68 - RPF coverage along the <i>nad7</i> mRNA in Col-0 and <i>mtl1</i> plants.....	190
Figure 69 - Structure secondaire prédite en amont de l'AUG de l'ARNm <i>nad4L</i> (dG=-2,2 kcal/mol). ....	209
Figure 70 - Schéma représentant les différentes étapes de la création de gènes chimères comportant le promoteur du gène <i>RFL22</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et la séquence codante des orthologues les plus proches chez <i>Arabidopsis lyrata</i> et <i>Brassica rapa</i> . ....	264
Figure 71 - Schéma représentant le transfert d'ARN d'un gel d'agarose sur une membrane de nylon.....	272



Figure 72 - Schéma simplifié du protocole de profilage de ribosomes à partir de fleurs  
d'Arabidopsis .....277



## Liste des Tableaux

Tableau 1 – Nombre de protéines PPR identifiées chez diverses espèces modèles. ....	59
Tableau 2 - Nombre de protéines RFL identifiées chez diverses espèces de plantes terrestres (Fujii et al., 2011). ....	76
Tableau 3 - Protéines PPR mitochondriales impliquées dans la stabilisation de transcrits mitochondriaux chez les plantes.....	88
Tableau 4 - Protéines PPR mitochondriales impliquées dans l'épissage d'introns de groupe II chez les plantes .....	90
Tableau 5 - Protéines PPR mitochondriales impliquées dans l'édition des cytosines en uracile, chez les plantes .....	94
Tableau 6 - Protéines PPR mitochondriales impliquées dans la maturation d'extrémités 5' de leur cible ou dans des clivages au sein de leur séquence codante chez les plantes.....	96
Tableau 7 - Overview of bacterial and mitochondrial ribosomes composition. ....	105
Tableau 8 - Translational activators identified in <i>S. cerevisiae</i> .....	116
Tableau 9 - PPR proteins promoting translation of specific mitochondrial mRNAs .....	122
Tableau 10 - Restorer of fertility PPR proteins preventing translation of specific mRNA or ORF .....	123
Tableau 11 – Liste des fonctions des gènes <i>RFL</i> identifiés chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Fujii et al., 2011).....	129
Tableau 12 - Prédiction des sites de liaison possibles de la protéine RFL22 sur le transcriptome mitochondrial d' <i>Arabidopsis</i> . ....	206
Tableau 13 – Prédiction des sites de liaison possibles de la protéine RFL23 sur le transcriptome mitochondrial d' <i>Arabidopsis</i> . ....	208
Tableau 14 – Souches bactériennes utilisées .....	250
Tableau 15 - Oligonucléotides utilisés pour construire les plasmides ayant permis de faire la complémentation fonctionnelle du mutant <i>rfl22</i> par les homologues les plus proches identifiés chez <i>A. lyrata</i> et <i>B. rapa</i> . ....	251
Tableau 16 - Oligonucléotides utilisés pour réaliser les q-RT-PCR "exon" .....	253
Tableau 17 - Oligonucléotides utilisés pour l'analyse du transcriptome mitochondrial par q-RT-PCR .....	256
Tableau 18 - Oligonucléotides utilisés pour cartographier les extrémités 5' et 3' des ARNm mitochondriaux par c-RT-PCR .....	257

Tableau 19 - Oligonucléotides utilisés pour l'amplification par PCR de sondes à rétro-transcrire pour les expériences de gels-retard .....	259
Tableau 20 - Oligonucléotides utilisés pour l'amplification par PCR de sondes ADN pour les expériences de northern-blot.....	259
Tableau 21 - Oligonucléotides utilisés pour déterminer le taux d'édition de quelques ARNm mitochondriaux .....	260
Tableau 22 - Composition des milieux de cultures MRP et MRPlant .....	262
Tableau 23 - Composition de la solution Macroéléments de Monnier .....	262
Tableau 24 - Composition de la solution Microéléments de Monnier.....	262
Tableau 25 - Programme d'amplification utilisé avec l'ADN polymérase Taq.....	267
Tableau 26 - Programme d'amplification utilisée avec l'ADN polymérase Phusion.....	268
Tableau 27 - Programme utilisé pour les q-RT-PCR.....	269

## Abréviations

A	Adénine
<i>A. lyrata</i>	<i>Arabidopsis lyrata</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine Diphosphate
AOX	Alternative Oxydase
APS	Ammonium Persulfate
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine Triphosphate
b, kb, Mb	bases, kilobases, Mégabases
<i>B. rapa</i>	<i>Brassica rapa</i>
BEt	Bromure d'Ethidium
BN-PAGE	Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosine
C-RT-PCR	Circular-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CA	Carbonic anhydrase
CCB (voie)	Cytochrome C Biogenesis
CCM (système)	Cytochrome C Maturation
CMS	Cytoplasmic Male Sterility
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
Col-0	Columbia
cyro-EM	cryo-electron microscopy
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da, kDa, Mda	Dalton, kiloDalto, MégaDalton
dG	Energie libre
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNAse	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribonucleotides
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique

FAD	Flavine Adénine Dinucleotide
FADH2	forme réduite du FAD
FRM	Fondation pour la Recherche Médicale
g	constante de gravitation
G	Guanine
g, mg, $\mu$ g, ng	gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
GTP	Guanosine Triphosphate
h	heure
His	Histidine
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IPTG	Isopropyl bêta-D-thiogalactopyranoside
kcal	kilo calories
L, mL, $\mu$ L	litre, millilitre, microlitre
LB	Luria Bertani
Ler	Landsberg erecta
M, mM, $\mu$ M, nM, pM	molaire, millimolaire, micromolaire, nanomolaire, picomolaire
MBP	Maltose Binding Protein
min	minute
miRNA	microRNA
MITRAC	Mitochondrial Translation Regulation Assembly intermediate of Cytochrome c oxidase
mol	Moles
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid, 4-Morpholinepropanesulfonic acid
MORF	multiple organellar RNA editing factor
MPP	Mitochondrial Processing Peptidase
Mr-O	Monte-Rosso
mRNA	ARN messenger
MRP	Mitochondrial Ribosomal Protein
mt-LSU	mitochondrial Large Subunit
mt-SSU	mitochondrial Small Subunit
mtPAP	mitochondrial polyA polymerase
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NAD+	forme oxydée du NAD
NADH	forme réduite du NAD
NARS	Non Anotated Region with Signal
nm	nanomètre
ORF	Open Reading Frame
OXPPOS	Oxidative phosphorylation

PCR	Polymerase Chain Reaction
PES	polypeptide exit site
PMF	Proton Motive Force
PPR	Pentatricopeptide Repeat
q-RT-PCR	quantitative-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
Rf	Restaurateur de fertilité
Rf-like, RFL	Restaurateur de fertilité - life
RIP	RNA editing factor Interacting Proteins
RNA	Ribonucleic Acid
RNAse	Ribonucléase
ROS	Reactive Oxygen Species
RPF	Ribosome Protected Fragment
rpm	Rotations Par Minute
RRF	Ribosomal Recycling Factor
rRNA	ARN ribosomique
S	Svedberg
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Shine-Dalgarno
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
sec, s	seconde
Sha	Shahdara
SMC	Stérilité Mâle Cytoplasmique
SSC	Saline Sodium Citrate
T	Thymine
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	TBS + 0,1 % Tween 20
TCA (cycle)	Koc, E. 45-59.
Temed	N,N,N',N'- tetraméthylethylene diamine
THE	Tris-Hepes-EDTA
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TOM	Translocase of the Outer Membrane
TPR	Tetratricopeptide Repeat
tRNA	transfert RNA
U	Uracile
UTR	Untranslated Region
V	Volt





# Introduction



# 1. Introduction

## 1.1. Les mitochondries

### 1.1.1. Evolution

De nombreuses données soutiennent fortement le fait que les mitochondries ont une origine exogène et monophylétique, elles ont été acquises par les cellules eucaryotes suite à un événement d'endosymbiose (Margulis, 1976; Gray et al., 1999).

Les ancêtres des mitochondries étaient des monères (organismes unicellulaires primitifs dont les gènes ne sont pas dans un noyau) et sont devenus des organites par le biais de la sélection naturelle (Margulis, 1976; Theissen & Martin, 2006). Des comparaisons phylogénétiques entre les gènes mitochondriaux et ceux de différentes bactéries ont montré que la bactérie *Rickettsia prowazekii* ( $\alpha$ -protéobactérie) comprend des gènes phylogénétiquement plus proches de la mitochondrie que des autres bactéries. En conséquence, la séquence génomique de *Rickettsia* supporte vivement l'idée qu'elle partage un ancêtre commun avec la mitochondrie (Andersson & Kurland, 1998b, 1998a; Gray et al., 1999; Gray, 2012).

La signature métabolique des mitochondries se trouve dans la façon dont elles génèrent l'ATP : elles utilisent le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), aussi appelé cycle de Krebs, pour générer de l'ATP ; c'est également le cas de *Rickettsia prowazekii*. Dans les deux cas, le pyruvate est converti en acétyl-CoA pour amorcer le cycle TCA (Andersson & Kurland, 1998b). Puisque *Rickettsia* et les mitochondries partagent un ancêtre commun, il a été possible de calculer pendant combien de temps elles ont divergé l'une de l'autre. Le temps de divergence des plantes terrestres et des hépatiques a été utilisé pour calculer celui pour les gènes *COX* et *COB* de *Rickettsia* et des mitochondries, qui est estimé entre 1,5 et 2 milliards d'années (Sicheritz-Pontén et al., 1998; Andersson & Kurland, 1998b; Dolezal et al., 2006).

Au cours de sa domestication, la mitochondrie a perdu un grand nombre des gènes qu'elle codait (Margulis, 1976; Andersson & Kurland, 1998b; Gray et al., 1999), et plus de 99 % des protéines mitochondriales sont aujourd'hui codées par des gènes nucléaires

(Andersson & Kurland, 1998b; Adams & Palmer, 2003). En effet, durant l'évolution mitochondriale, de nombreux gènes mitochondriaux ont été transférés fonctionnellement au noyau ou remplacés par des gènes nucléaires préexistants portant les mêmes fonctions (Adams & Palmer, 2003). La bactérie *Rickettsia* ne comporte que 834 gènes codant des protéines, mais puisqu'il s'agit d'un parasite intracellulaire cette valeur est difficilement comparable à celle de la bactérie libre ayant subi l'endosymbiose il y a 2 milliards d'années. En revanche, la bactérie *Caulobacter*, une  $\alpha$ -protéobactérie libre, plus comparable à cette bactérie libre originelle, comporte plus de 3 600 gènes codant des protéines dans un génome de 4 000 Mb (Andersson & Kurland, 1998a; Nierman et al., 2001).

Un certain nombre de gènes mitochondriaux essentiels ne sont pas retrouvés dans les mitochondries, par exemple la plupart des protéines ribosomales, la plupart des protéines du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire et la plupart des protéines requises pour la synthèse d'acides nucléiques. De plus, le nombre de gènes mitochondriaux varie d'une espèce à l'autre (Andersson & Kurland, 1998a).

Les génomes des parasites, des endosymbiontes et des organites évoluent dans des conditions radicalement différentes de celles dans lesquelles évoluent les génomes des organismes libres, notamment parce qu'ils résident dans un environnement conditionné par le génome de leur hôte (Andersson & Kurland, 1998a). Pour ce qui est de la mitochondrie, la cellule hôte est dépendante de « produits » fournis par cette dernière. Dans ce cas, les destins de la cellule et des mitochondries qu'elle porte sont liés par une dépendance symbiotique progressivement renforcée par la perte de gènes mitochondriaux (Andersson & Kurland, 1998a).

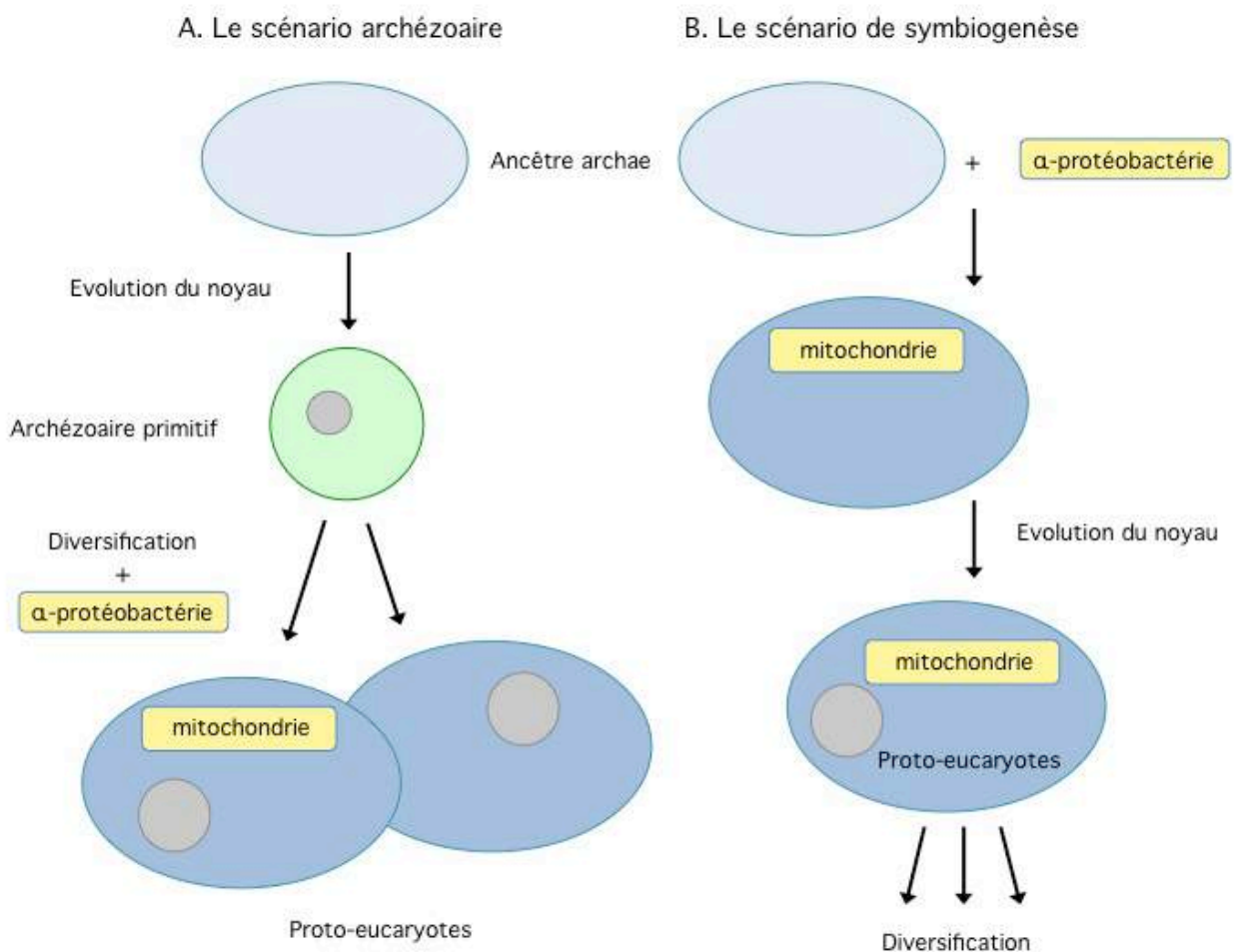
Ici, la symbiose initiée entre la cellule eucaryote primitive et une bactérie aérobie a permis à l'eucaryote d'évoluer vers une vie aérobie. En outre, les mitochondries de levure et de mammifères ont tellement divergé de leur ancêtre bactérien qu'elles ont créé un code génétique en partie différent et un ensemble d'ARNs de transfert (ARNt) spécialisés. Ce n'est pas le cas pour les mitochondries de plantes, qui suivent le code génétique universel (Andersson & Kurland, 1998a).

En ce qui concerne le noyau de la cellule hôte, il est proposé qu'il ait été acquis également par endosymbiose, peu de temps avant la mitochondrie. Ce modèle, dit « d'endosymbioses en séries » suppose que l'organisme hôte avait un métabolisme

## *Introduction*

anaérobie et hétérotrophe. Cependant, on ne sait pas si l'hôte était un eucaryote ou une archaebactérie. S'il existe aujourd'hui des eucaryotes sans mitochondries (les archézoaires), il semblerait qu'ils en aient possédé à une période puis les aient perdues lors de l'évolution. Si la divergence entre les lignées eucaryotes majeures (incluant celle sans mitochondries) a eu lieu plus ou moins simultanément et s'il n'y a pas d'eucaryotes primitifs dépourvus de mitochondries (et s'il n'y en a jamais eu), alors l'origine de la mitochondrie est placée extrêmement proche de celle de la cellule eucaryote (Gray et al., 1999).

Deux modèles sont proposés concernant l'origine endosymbiotique des mitochondries : le « scénario archézoaire » et le « scénario de la symbiogenèse » (Figure 1). Dans le scénario archézoaire, l'hôte de l'endosymbionte proto-mitochondrial est un hypothétique eucaryote primitif sans mitochondrie, appelé archézoaire. Dans le second scénario, un seul événement endosymbiotique impliquant l'endosymbiose d'une  $\alpha$ -protéobactérie par une cellule archae a conduit à l'apparition des mitochondries, et a été suivi par l'évolution du noyau et la compartimentation de la cellule eucaryote (Koonin, 2010). La différence fondamentale entre ces deux scénarios est de savoir si l'endosymbiose qui a donné naissance à la proto-mitochondrie s'est produite en même temps que la formation de la cellule eucaryote (scénario de symbiogenèse) ou après la formation d'une cellule primitive sans mitochondrie qui a servi d'hôte et qui était déjà essentiellement eucaryote (scénario archézoaire) (Gray, 2012).



**Figure 1 – Les deux scénarios alternatifs de l'eucaryogenèse (Koonin, 2010)**

(a) Le scénario archézoaire. L'endosymbiose ayant donné naissance à la proto-mitochondrie s'est produite après la formation d'une cellule primitive sans mitochondries qui a servi d'hôte et qui était déjà essentiellement eucaryote.

(b) Le scénario de symbiogenèse. L'endosymbiose ayant donné naissance à la proto-mitochondrie s'est produite en même temps que la formation de la cellule eucaryote.

L'ancêtre archae est représenté en bleu pâle, l'archézoaire primitif en vert, les proto-eucaryotes en bleu foncé, les noyaux en gris et la mitochondrie et l' $\alpha$ -protéobactérie sous la forme d'un rectangle jaune.

### 1.1.2. Structure des mitochondries

La mitochondrie est constituée de deux membranes : une membrane interne et une membrane externe. La membrane externe comprend un grand nombre de protéines formant des pores, appelées porines mitochondriales ou VDAC (Voltage-Dependant Anion selective Chanel). Ces protéines rendent la membrane externe semi-perméable aux petites molécules et aux ions. La membrane interne entoure la matrice mitochondriale en formant une barrière imperméable aux molécules hydrophiles et aux ions n'ayant pas de transporteur protéique. La membrane interne, transductrice d'énergie, constitue un système membranaire ayant une surface bien plus importante que celle de la membrane externe, ce qui rend compte de son rôle crucial dans la synthèse d'ATP (Perkins et al., 1997; Mannella, 2006).

A l'intérieur de la matrice se trouvent de multiples copies du génome mitochondrial, codant quelques protéines et les ARNs nécessaires à la traduction des ARNm correspondants. De fait, les centaines de protéines présentes dans la mitochondrie sont pour la plupart codées par l'ADN nucléaire et importées post-traductionnellement à partir du cytosol (Frey & Mannella, 2000; Chacinska et al., 2009).

De nombreux modèles de structures mitochondriales ont été proposés. Le modèle de Sjöstrand, datant de 1953, comprend une double membrane limitante avec une membrane interne formant des cloisons (septa) qui divisent la matrice en plusieurs compartiments. Palade, en 1952, a également observé des compartiments internes séparés par des membranes, qu'il a nommé cristae. Dans son modèle il n'y a pas de septa mais des déflecteurs (baffles) se projetant dans la matrice. Le modèle de Palade est celui présenté dans les manuels scolaires avec la membrane interne correspondant à une surface fermée et continue ayant une morphologie complexe et les cristae correspondant à des plis semblables au soufflet d'un accordéon (Figure 2) (Palade, 1952; Frey & Mannella, 2000).

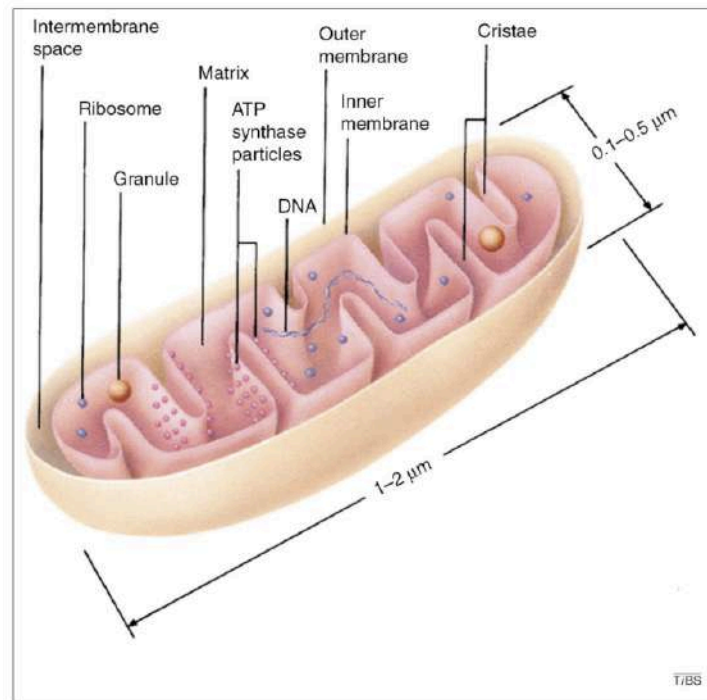


Figure 2 - Modèle de Palade représentant la structure interne d'une mitochondrie (Frey & Mannella, 2000).

La membrane interne est représentée en rose, la membrane externe en beige.

En 1966, Hackenbrock a montré que des changements conformationnels de la membrane interne des mitochondries isolées existent. Par exemple, la matrice se contracte pendant des changements d'état osmotique ou métabolique, ce qui donne une conformation condensée dans laquelle la membrane interne est éloignée de la membrane externe, sauf à des endroits appelés « sites de contact », répartis aléatoirement (Hackenbrock, 1966; Perkins et al., 1997; Frey & Mannella, 2000).

La même année, Daems et Wisse ont noté que la fréquence à laquelle les cristae sont connectés à l'espace inter-membranaire est moins importante que prévue si le modèle de Palade était correct. Suite à l'étude minutieuse de fines sections de mitochondrie, ils ont conclu que les cristae sont connectés à l'espace inter-membranaire par le biais de structures tubulaires d'un diamètre de 30 nm environ, qu'ils ont appelés « pediculi cristae » (Frey & Mannella, 2000; Mannella, 2006).



Mannella et son équipe ont réalisé la première tomographie par microscopie électronique sur des mitochondries (Frey & Mannella, 2000). Les résultats de cette expérience ont montré que le modèle standard de la structure des mitochondries était incorrect, au moins pour les mitochondries isolées de foie de rat. Les images montrent que les cristae ne correspondent pas à des déflexions avec de grandes ouvertures sur l'espace inter-membranaire mais sont plutôt pléomorphiques (peuvent revêtir des formes différentes dans certaines conditions ou sous des influences déterminées) et ont une nature tubulaire (Figure 3) (Frey & Mannella, 2000; Mannella, 2006).

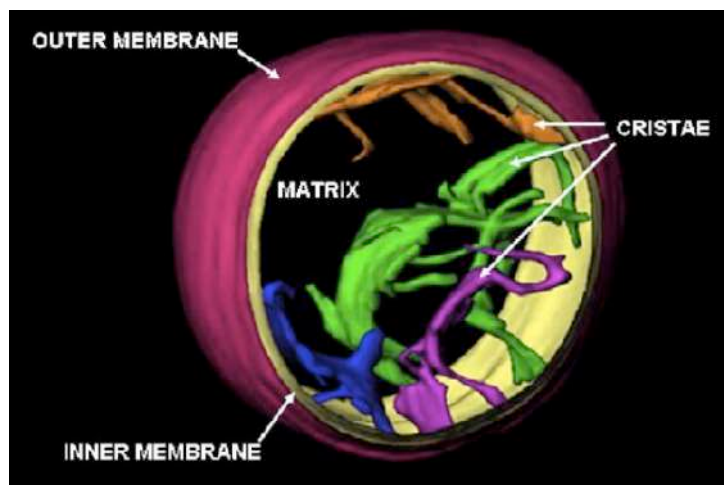
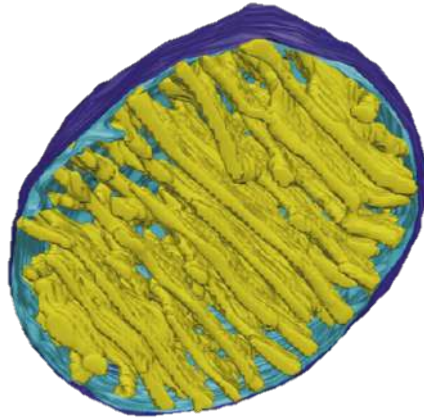


Figure 3 – Modèle structural de mitochondries de foie de rat obtenu par cryo-tomographie électronique (Mannella, 2006).

La membrane des cristae et la membrane interne sont contiguës mais sont représentées différemment par Frey et Mannella en Figure 4 pour mettre en avant les différences de morphologie du cristae (Frey & Mannella, 2000).



**Figure 4 - Modèle de la structure interne d'une mitochondrie de cervelet de poulet, réalisé par tomographie par microscopie électronique *in situ* (Frey & Mannella, 2000).**

Le cristae est représenté en jaune, le reste de la membrane interne en bleu clair et la membrane externe en bleu foncé.

#### Implications fonctionnelles

Puisque la phosphorylation oxydative dépend de la diffusion rapide des ions et des substrats, le nombre et la forme (diamètre et longueur) des jonctions des cristae pourraient réguler le taux de phosphorylation de l'ATP sous certaines conditions. De plus, la forme et le volume des cristae pourraient affecter la diffusion du cytochrome c entre les compartiments intra-cristaux et inter-membranaires. En plus de créer un gradient latéral de soluté, les jonctions de cristae peuvent aussi restreindre la diffusion de protéines membranaires (Frey & Mannella, 2000; Mannella, 2006).

Il est suggéré que la topologie de la membrane interne représente une balance entre les processus de fusion et de fission des membranes (Mannella, 2006). De plus, elle impacte la diffusion interne des métabolites et des protéines solubles, ce qui peut influencer des processus mitochondriaux tels que la production d'ATP ou encore la libération de protéines pendant l'apoptose. L'hypothèse émergente est que la topologie de la membrane interne mitochondriale est un paramètre régulé par la cellule pour optimiser les performances mitochondriales et la réponse aux stimuli (Mannella, 2008).

## 1.2. La respiration cellulaire aérobie

### 1.2.1. De la glycolyse à la phosphorylation oxydative

L'oxydation aérobie du glucose commence par la glycolyse (Figure 5), prenant place dans le cytoplasme, et donnant lieu à la production de deux molécules de NADH, deux ATP et deux pyruvates. Les molécules de pyruvate sont transportées dans la matrice mitochondriale où leur groupements acétyl seront transférés au coenzyme A par la pyruvate déshydrogénase, avec la formation de deux molécules de NADH. Les groupes acétyl de deux acétyl-CoA sont transférés à l'oxaloacétate, qui entre dans le cycle de Krebs (Rich & Maréchal, 2010).

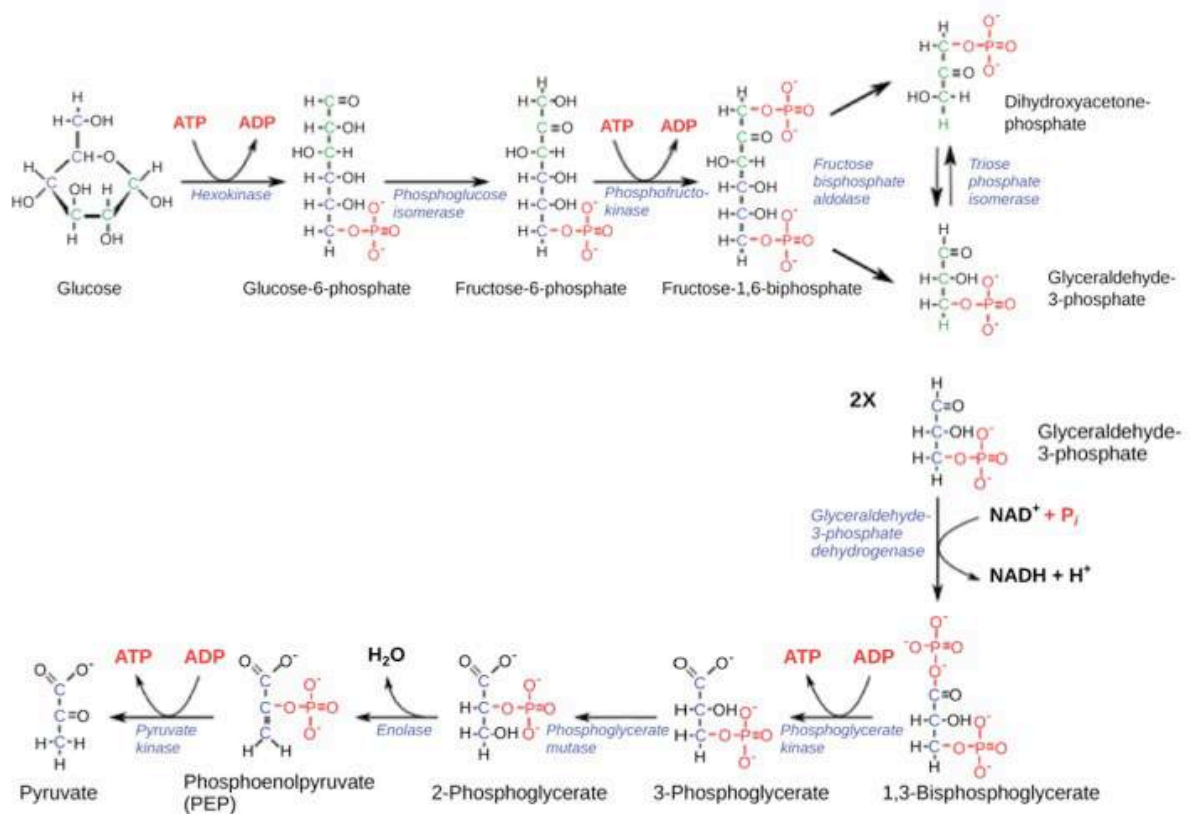


Figure 5 – Schéma réactionnel de la glycolyse

Le cycle de Krebs (ou cycle TCA), prenant place dans la matrice mitochondriale, constitue la voie métabolique terminale commune de l'oxydation des glucides, des acides gras et des acides aminés, produisant les substrats énergétiques assurant l'essentiel des besoins en énergie de la cellule (Figure 6). En effet, il est constitué d'une suite de réactions d'oxydo-réductions où une partie des substrats est oxydée en  $\text{CO}_2$  avec transfert d'électrons au  $\text{NAD}^+$  ou au  $\text{FAD}$  qui sont alors réduits en  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ou  $\text{FADH}_2$ . Ces composés étant ensuite oxydés par la chaîne respiratoire (Rich & Maréchal, 2010).

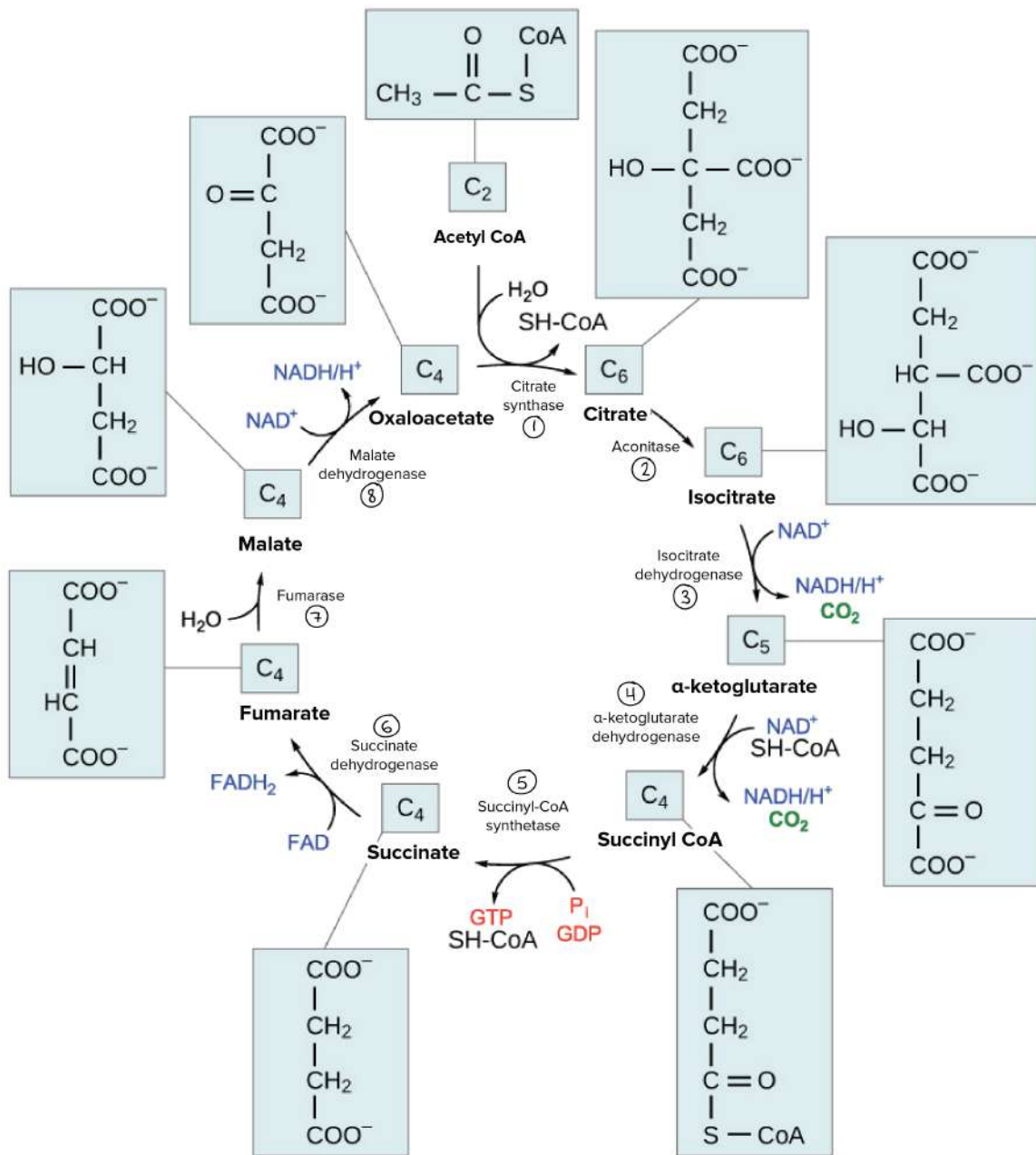


Figure 6 - Schéma réactionnel du cycle de Krebs

Le NADH produit par la glycolyse et le cycle de Krebs, ainsi que le succinate (un intermédiaire du cycle de Krebs), constituent des substrats riches en électrons qui sont oxydés par les complexes I et II de la chaîne respiratoire, respectivement ; ceux-ci transférant à leur tour les électrons à l'ubiquinone, une petite molécule organique liposoluble qui peut être réduite ou oxydée. L'ubiquinone réduite diffuse jusqu'au complexe III où elle est ré-oxydée. Le complexe III réduit le cytochrome c se trouvant dans la membrane interne, qui à son tour réduit le complexe IV où l'oxygène est réduit en eau (Rich & Maréchal, 2010).

La chaîne de transfert d'électrons, aussi appelée chaîne respiratoire ou système OXPHOS, fournit l'énergie pour générer la PMF (Proton Motive Force), et donc la formation au sein de la matrice, d'ATP à partir d'ADP et d'un phosphate  $P_i$ . L'ADP et le phosphate sont conduits à l'intérieur de la matrice, et l'ATP en dehors de l'espace inter-membranaire (soit dans le cytoplasme) par une partie de l'énergie de la PMF (Rich & Maréchal, 2010).

### **1.2.2. La phosphorylation oxydative**

Comme il l'a été mentionné ci-avant, la phosphorylation oxydative permet aux cellules eucaryotes de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de  $P_i$ . Il s'agit d'un processus qui couple la phosphorylation de l'ADP par une ATP synthase et l'oxydation de substrats, le NADH, le  $FADH_2$  et le succinate, réalisée au niveau de la chaîne respiratoire. Le système OXPHOS est constitué de 5 complexes intégrés dans la membrane interne mitochondriale, schématisés en Figure 7 :

- Complexe I : NADH Ubiquinone oxydoréductase
- Complexe II : Succinate Ubiquinone oxydoréductase
- Complexe III : Coenzyme Q – Cytochrome c réductase
- Complexe IV : Cytochrome c oxydase
- Complexe V : ATP synthase

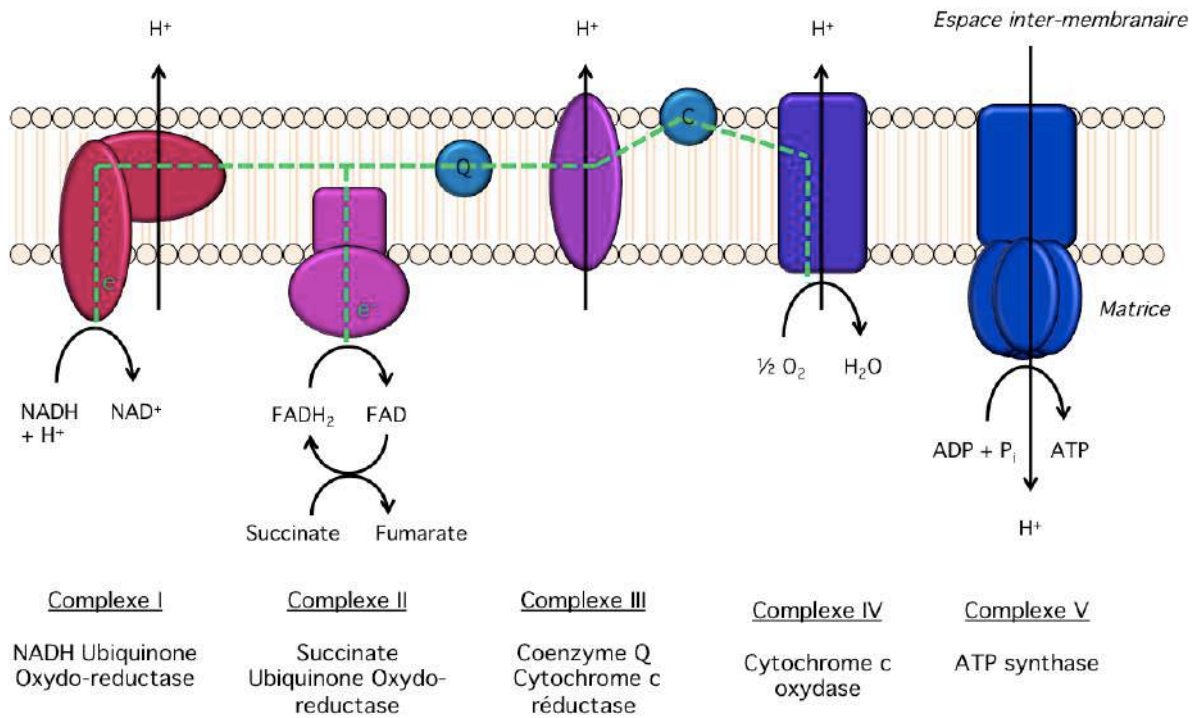


Figure 7 - Schéma du système OXPHOS (Bellance et al., 2009; Dudkina et al., 2010).

L'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (complexe V) est fournie par le gradient électrochimique de protons alimenté par les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire associés à deux transporteurs mobiles : l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et le cytochrome c. Le complexe II de la chaîne respiratoire permet de transporter vers l'ubiquinone les électrons du FADH<sub>2</sub>. Lorsque les électrons provenant de l'oxydation du NADH et du FADH<sub>2</sub> circulent dans la chaîne respiratoire, des protons sont pompés à travers la membrane interne de la matrice vers l'espace inter-membranaire. L'ATP est synthétisé lorsque les protons s'écoulent à travers l'ATP synthase et retournent dans la matrice mitochondriale (Dudkina et al., 2006, 2010).

## 1.3. Le système OXPHOS

### 1.3.1. Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase

#### 1.3.1.1. Généralités

Le complexe I constitue le point d'entrée principal des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Il s'agit du plus gros et du plus complexe des complexes de la chaîne respiratoire (environ 1 000 kDa) : en effet, chez les eucaryotes dits « supérieurs », il est composé de plus de 40 sous-unités (49 chez *Arabidopsis*). Cinq à neuf d'entre elles sont codées par le génome mitochondrial (9 chez *Arabidopsis* ; les protéines Nad1, Nad2, Nad3, Nad4, Nad4L, Nad5, Nad6, Nad7 et Nad9), les autres étant codées par le génome nucléaire (Klodmann et al., 2011; Meyer et al., 2011; Braun et al., 2014).

Le NADH est ré-oxydé en NAD<sup>+</sup>, ceci étant couplé à la réduction de l'ubiquinone. Des complexes I présentant des caractéristiques différentes sont retrouvés chez les champignons, les algues, les plantes, les animaux et les bactéries. Le transfert d'électrons au sein du complexe I est couplé à la translocation de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie, ce qui augmente considérablement l'efficacité de l'oxydation du NADH et donc le rendement final en ATP (Rich & Maréchal, 2010).

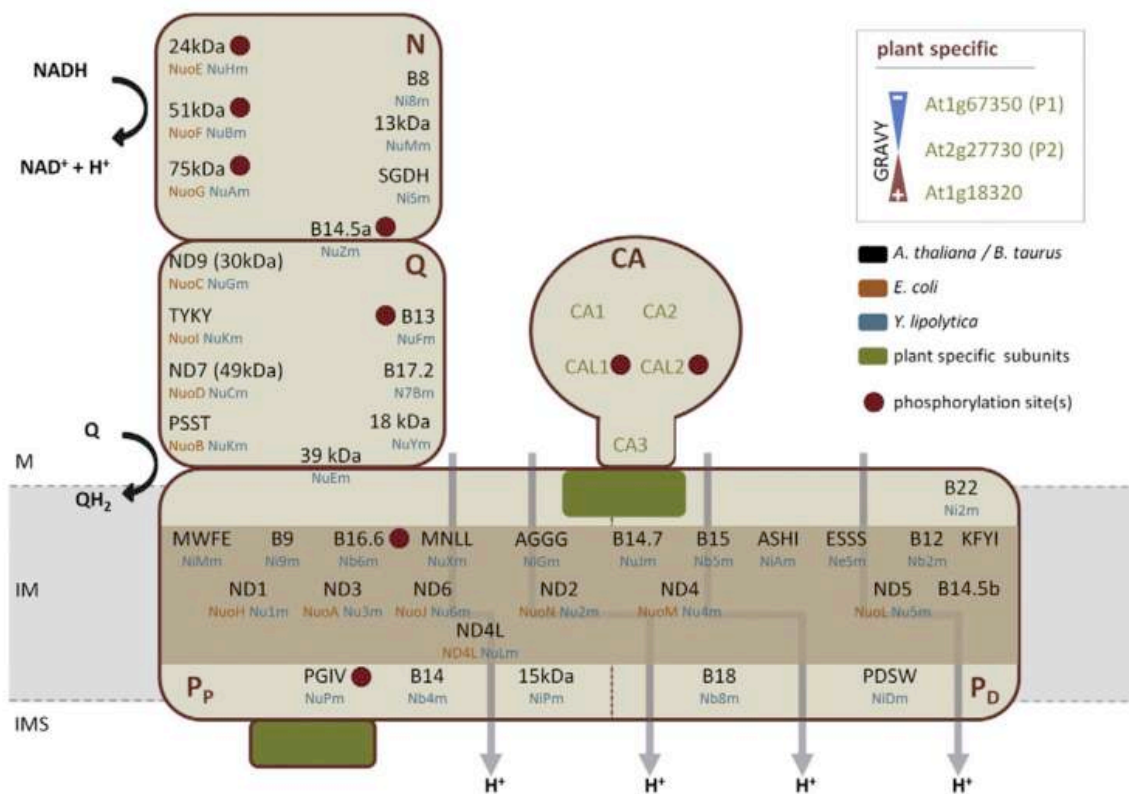
#### 1.3.1.2. Structure du complexe I

Le complexe I est composé de deux parties, ou deux « bras » formant une structure en L (Figure 8). Le « bras membranaire » forme la base du L et est intégré dans la membrane interne, tandis que le « bras matriciel » forme la barre verticale du L et est lié au bras membranaire tout en dépassant perpendiculairement dans la matrice. Le bras matriciel comprend tous les clusters Fer-Soufre et l'activité d'oxydation du NADH, tandis que le bras membranaire comprend le site de liaison à l'ubiquinone et les canaux responsables du transport des protons (Guénebaut et al., 1997, 1998; Grigorieff, 1998; Morgan & Sazanov, 2008; Meyer et al., 2011).

### 1.3.1.2.1. Structure du complexe I de plantes

Le complexe I de plantes diffère de celui des autres eucaryotes, en partie à cause du grand nombre de sous-unités spécifiques des plantes, toutes associées au bras membranaire (Heazlewood et al., 2003a; Millar et al., 2003; Cardol et al., 2004; Sunderhaus et al., 2006; Meyer et al., 2008, 2011).

En effet, 30 % des sous-unités du complexe I de plantes n'ont d'homologues ni chez les mammifères, ni chez les champignons, ni chez les bactéries. Certaines de ces sous-unités permettent au complexe I d'avoir des activités parallèles, comme par exemple les anhydrases carboniques (CA sur la Figure 8) ou la GLDH (L-galactone-1,4-lactone déshydrogénase) (Klodmann et al., 2010; Heazlewood et al., 2003a; Sunderhaus et al., 2006; Millar et al., 2003). Ceci suggère que le complexe I de plantes a évolué spécifiquement vers des fonctions liées aux rôles spécifiques des mitochondries végétales (Meyer et al., 2011). Il a également été montré qu'il permet de maintenir la balance redox pendant la photosynthèse (Raghavendra et al., 1998; Dutilleul et al., 2003).





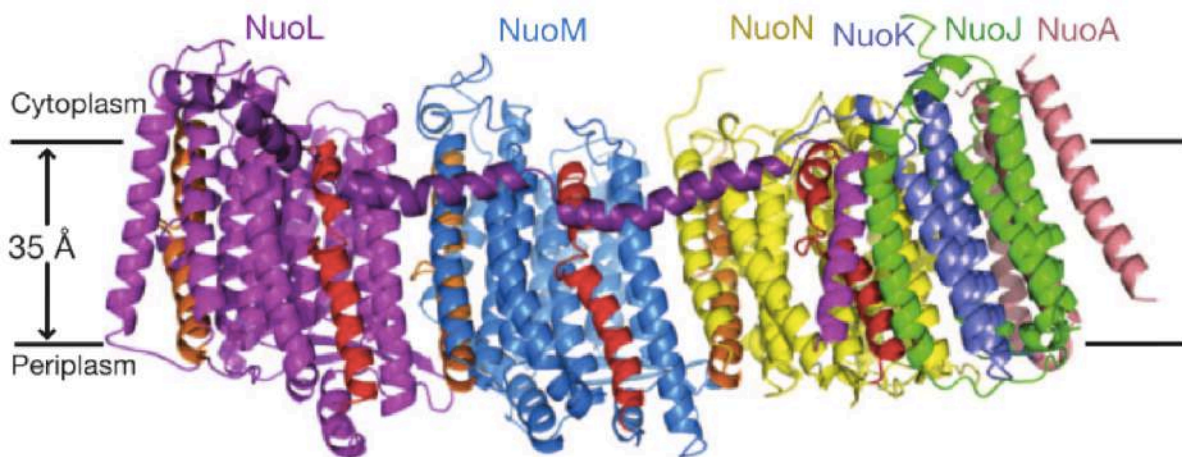
**Figure 8 - Modèle de la structure interne du complexe I de plantes (Braun et al., 2014).**

Les sous-unités sont nommées d'après la nomenclature bovine (en noir). Les noms des protéines homologues chez *E. coli* sont indiqués en orange, ceux chez *Y. lipolytica* en bleu. Mis à part les anhydrases carboniques (domaine CA), la localisation des sous-unités spécifiques des plantes n'est pas définie. Leur nom est indiqué en haut à droite de la figure et leur localisation putative est indiquée par des rectangles verts. Les sous-unités phosphorylées sont indiquées par des points rouges.

M : matrice, IM : membrane interne, IMS : espace inter-membranaire.

### 1.3.1.2.2. Structure du complexe I bactérien

Le bras du membranaire du complexe I chez *E. coli* a été cristallisé (Efremov & Sazanov, 2011). Il comprend six sous-unités ; NuoL, NuoM, NuoN, NuoA, NuoJ et NuoK, et 55 hélices transmembranaires (Figure 9). La conformation des sous-unités homologues aux anti-porteurs-like L, M et N a été résolue à cette occasion, avec deux structures répétées inversées de cinq hélices transmembranaires disposées de manière inhabituelle, « face à dos ». Chaque répétition comprend une hélice transmembranaire discontinue et forme la moitié d'un canal à travers la membrane. Un réseau de résidus polaires conservés relie les deux demi-canaux, parachevant la voie de translocation des protons. Le quatrième canal putatif de translocation de protons se situe à l'interface des sous-unités N, K, J et A. Cette structure indique que la translocation de protons à travers le complexe I implique des changements conformationnels coordonnés des éléments de structure (Efremov & Sazanov, 2011).



**Figure 9 - Structure du bras membranaire du complexe I chez *E. coli* (Efremov & Sazanov, 2011)**

### 1.3.1.2.3. Structure du complexe I de mammifères

Deux structures du complexe I de mammifères ont été résolues récemment. L'une réalisée chez le mouton (*Ovis aries*) faite par cryo-microscopie électronique associée à la spectrométrie de masse (Fiedorczuk et al., 2016) et l'autre chez le bœuf (*Bos taurus*) par cryo-microscopie électronique également (Zhu et al., 2016).

Les structures des 14 sous-unités conservées et des 31 sous-unités surnuméraires spécifiques des mitochondries sont résolues au sein de la forme en L. Il a été montré que le bras matriciel hydrophile comprend une flavine mononucléotide (FMN) et 8 clusters fer-soufre impliqués dans le transfert d'électrons, tandis que le bras membranaire comprend 78 hélices transmembranaires, principalement apportées par des sous-unités antiporteurs-like impliquées dans la translocation de protons. Les deux études sont également en accord sur le fait que les sous-unités surnuméraires mitochondriales forment une coque interconnectée et stabilisatrice autour des sous-unités centrales du complexe I (Figure 10) (Fiedorczuk et al., 2016; Zhu et al., 2016).

Des lipides étroitement liés stabilisent davantage les interactions entre les sous-unités hydrophobes. Les sous-unités possédant des rôles régulateurs putatifs contiennent des cofacteurs supplémentaires, du NADPH et deux molécules de phosphopantéthéine (un groupe prosthétique dérivé de la pantéthéine entrant dans la constitution de la coenzyme A et de la protéine porteuse d'acyl), qui se révèlent impliquées dans des interactions entre les sous-unités. Les auteurs ont mis en évidence l'existence de deux conformations différentes du complexe I, qui peuvent être liées au mécanisme de couplage conformationnel et à la transition activation-désactivation du complexe (Fiedorczuk et al., 2016).

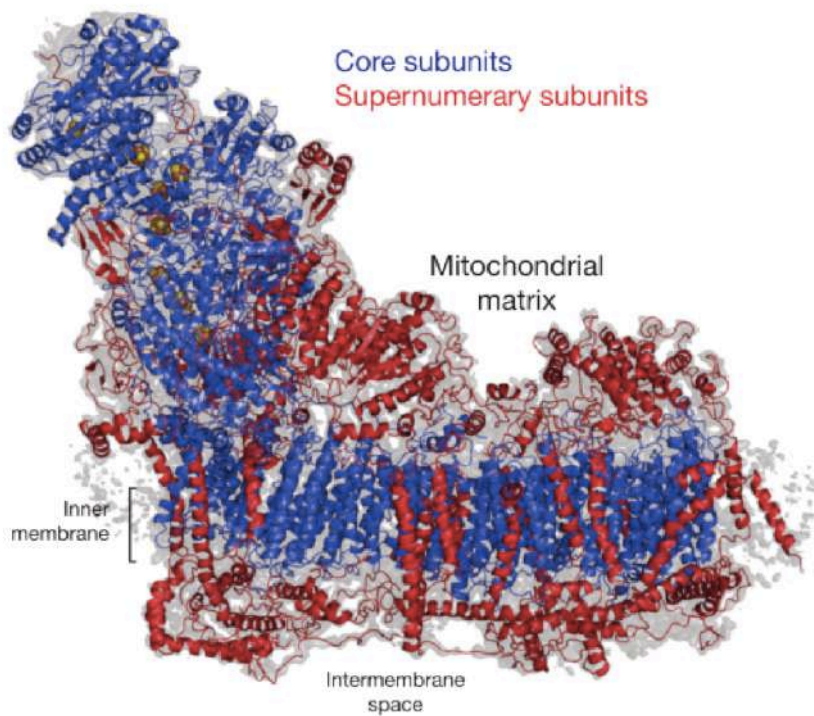


Figure 10 - Structure du complexe I de bœuf (Zhu et al., 2016)

Structure réalisée par cryo-microscopie électronique à partir de mitochondries de bœuf. Les sous-unités centrales et conservées sont représentées en bleu (les clusters fer-souffre en orange), les sous-unités surnuméraires sont représentées en rouge.

### 1.3.1.3. Mécanisme de couplage du complexe I

Le mécanisme de couplage entre le transfert d'électrons et la translocation de protons est encore énigmatique. La conservation de caractéristiques clés des bactéries jusqu'aux mammifères suggère que le mécanisme de base est probablement le même, avec des « stabilisateurs » et des « régulateurs » additionnels, l'axe central des résidus polaires membranaires ayant probablement un rôle clé (Fiedorczuk et al., 2016). Dans chaque cycle catalytique, la charge négative des résidus qui entourent le site Q (Figure 11) peut entraîner des changements conformationnels de Nad1 et du canal par lequel passent les protons qui se propageront par l'axe central jusqu'aux canaux des sous-unités anti-porteurs-like Nad2, Nad4 et Nad5. L'hélice transversale HL de Nad5 semblant avoir un rôle stabilisateur plutôt que d'être un élément mobile Le résultat net serait le pompage de quatre protons par cycle, à savoir un par canal (Fiedorczuk et al., 2016).

Cette structure montre que les sous-unités surnuméraires du complexe I le stabilisent. Certaines d'entre elles, en particulier celles comprenant des cofacteurs (39-kDa, SDAP, B14, B22 et 13-kDa) ou des résidus phosphorylés (42-kDa, ESSS, MWFE, B14.5a, B14.5b et B16.6), peuvent contribuer à la régulation de l'état redox de la cellule, de la biosynthèse de lipides et de l'homéostasie mitochondriale (Fiedorczuk et al., 2016; Zhu et al., 2016).

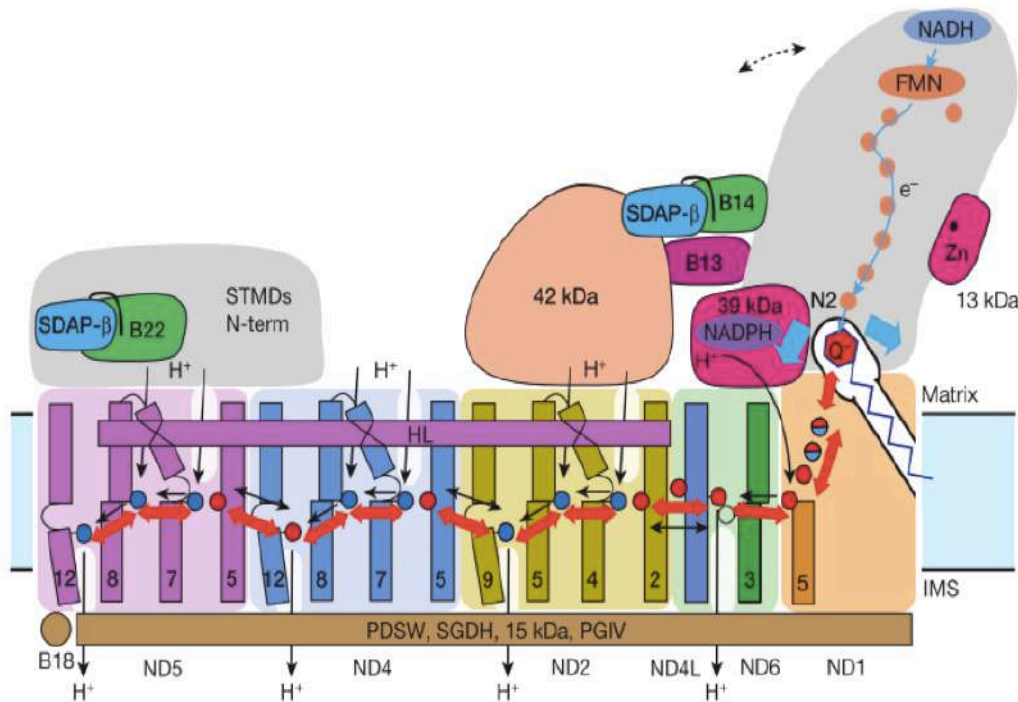


Figure 11 - Mécanisme de couplage du complexe I (Fiedorczuk et al., 2016)

Les sous-unités conservées et certaines sous-unités surnuméraires putativement régulatrices sont représentées. Les changements de conformation, indiqués par des flèches rouges, se propagent à partir du site Q site (canal E) vers les sous-unités anti-porteurs-like via l'axe hydrophile central. Les déplacements des hélices près du cluster N2 (flèches bleues) peuvent aider à lancer le processus. L'hélice traversante de ND5 (Nad5) et les hélices transversales de quatre sous-unités surnuméraires du côté de l'espace inter-membranaire peuvent servir de stators. La ligne pointillée indique le décalage du bras périphérique dans la conformation fermée. La sous-unité 39-kDa contenant le NADPH et la sous-unité 13-kDa contenant le Zn sont essentielles à l'activité du complexe et peuvent servir de senseurs redox. Le résultat net d'un cycle conformationnel est la translocation de quatre protons à travers la membrane interne (les lignes noires indiquent les voies possibles).

#### 1.3.1.4. Mutants du complexe I chez les plantes

Certains mutants auquel il manque une sous-unité du complexe I ne peuvent plus assembler le complexe complet mais peuvent parfois, en fonction de la sous-unité manquante, accumuler de façon stable des intermédiaires d'assemblage. L'assemblage du complexe I suit une séquence conservée dans l'évolution. Le bras matriciel est assemblé

indépendamment dans la matrice, tandis que l'assemblage du bras membranaire est initié au sein de la membrane interne. Le bras matriciel assemblé est greffé sur ce pré-complexe, et enfin le bras membranaire est étendu pour terminer le processus (Meyer et al., 2011). De nombreux mutants du complexe I (PPR ou non) ont été décrits dans la littérature, certains d'entre eux sont présentés ci-après.

L'étude de gènes impliqués dans l'expression du génome mitochondrial a permis l'identification de nombreux mutants du complexe I. Par exemple, la protéine PPR OTP43 est indispensable pour le trans-épissage de l'intron 1 de l'ARNm *nad1* chez Arabidopsis. Les mutants *otp43* n'ont plus de complexe I détectable et présentent un retard de germination, une déformation foliaire et un léger retard de croissance (de Longevialle et al., 2007).

Également, la protéine PPR MTSF1 (Mitochondrial Stabilization Factor 1) se fixe sur la région 3'UTR de l'ARNm *nad4* et est indispensable à sa stabilisation (Haïli et al., 2013). La protéine PPR MTSF2 (Mitochondrial Stabilization Factor 2), également appelée PPR19, se fixe dans la région 3'UTR du précurseur central (portant les exons 2 et 3) de l'ARNm *nad1* et permet également sa stabilisation (Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017). Les mutants *mtsf1* et *mtsf2* n'accumulent plus de complexe I fonctionnel et présentent un retard de croissance (Haïli et al., 2013; Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017).

La protéine PPR MTL1 (Mitochondrial Translation Factor 1), est notamment indispensable à l'épissage de l'intron 2 de l'ARNm *nad7* et à sa traduction. Le mutant présente, comme les mutants cités ci-avant, un retard de croissance causé par l'absence du complexe I (Haïli et al., 2016). Enfin, la protéine PPR BIR6 (BSO-Insensitive Roots 6) permet l'épissage de l'intron 1 de *nad7*. En l'absence de BIR6, l'assemblage du complexe I est affecté et le mutant présente un retard de croissance modéré (Koprivova et al., 2010).

*La caractérisation des protéines MTL1 et MTSF2, auxquelles j'ai participé durant ma thèse, sont présentées en annexe.*

## **1.3.2. Complexe II : Succinate-ubiquinone oxydoréductase**

### **1.3.2.1. Généralités**

Le complexe II constitue le second point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Il fait 160 kDa et est le plus petit complexe du système OXPHOS. Chez les mammifères, ce complexe consiste en deux sous-unités solubles exposées à la matrice, attachées à deux protéines membranaires hydrophobes. Chez les plantes, il est composé de 7 sous-unités dont 3 sont homologues au complexe II des mammifères, et dont aucune n'est codée par la mitochondrie (Eubel et al., 2003; Millar et al., 2004; Dudkina et al., 2006).

Il diffère des autres complexes de la chaîne respiratoire en plusieurs points (Rich & Maréchal, 2010) :

- Il s'agit du seul complexe respiratoire codé uniquement par le génome nucléaire.
- Il est un composant enzymatique du cycle de Krebs, catalysant l'oxydation du succinate en fumarate, ce qui résulte en la réduction du FAD. Le FAD réduit est ensuite ré-oxydé par l'ubiquinone de la membrane interne.
- Son activité ne donne pas lieu à la translocation de protons.

### **1.3.2.2. Mutants du complexe II chez les plantes**

La déplétion de la protéine SDH1-1 du complexe II conduit à une létalité des gamétophytes. L'allèle *sdh1-1* n'est pas transmis par le gamétophyte mâle et n'est transmis que partiellement par le gamétophyte femelle. Les microspores mutantes se développent normalement jusqu'à la phase des microspores vacuolées, mais ne subissent pas la mitose I (León et al., 2007). Aucun autre mutant du complexe II n'a été identifié chez les plantes.

### **1.3.3. Complexe III : coenzyme Q – cytochrome c réductase**

#### **1.3.3.1. Généralités**

Le complexe III (500 kDa) est au centre du système OXPHOS et comprend 10 sous-unités chez les plantes, dont une codée par le génome mitochondrial : la protéine Cob (Braun & Schmitz, 1995; Meyer et al., 2008). Environ un quart du complexe est enchâssé dans la membrane interne, une petite partie faisant saillie dans l'espace inter-membranaire et la plus grande partie faisant saillie dans la matrice (Dudkina et al., 2006). L'ubiquinol produit par les complexes I et II est capable de diffuser dans la membrane interne pour être oxydé en ubiquinone par le complexe III. Les deux protons et les électrons libérés sont transférés au cytochrome c soluble. Le complexe III permet de catalyser l'oxydation de l'ubiquinol et la réduction concomitante du cytochrome c (Rich & Maréchal, 2010). De plus, chez les plantes le complexe III est bi-fonctionnel dans la mesure où il comprend les deux sous-unités de la « Mitochondrial Processing Peptidase » ou MPP, une protéase permettant le clivage des pré-séquences des pré-protéines mitochondriales importées à partir du cytosol (Braun et al., 1992).

#### **1.3.3.2. Mutants du complexe III chez les plantes**

Le mutant ppr2263 chez le maïs est le seul mutant ne présentant plus de complexe III décrit à ce jour. La protéine PPR2263 est nécessaire pour l'épissage des ARNm *nad5* du complexe I et *cob* du complexe III. Alors que cette mutation n'a pas d'impact sur le complexe I, elle cause l'absence du complexe III chez le mutant (Sosso et al., 2012).

### **1.3.4. Complexe IV : cytochrome c oxydase**

#### **1.3.4.1. Généralités**

Deux formes du complexe IV coexistent ; l'une de 230 kDa et l'autre plus petite, de 200 kDa. Il manque à la plus petite forme la protéine COX VIb et probablement d'autres sous-unités (Eubel et al., 2003). Le complexe IV comprend 12 à 13 sous-unités chez *Arabidopsis*, dont 3 codées par la mitochondries : les protéines Cox1, Cox2 et Cox3 peuvent exister dans

la membrane sous forme de monomère ou de dimère (Dudkina et al., 2006; Millar et al., 2004). Il catalyse le transfert d'électrons à partir du cytochrome c réduit jusqu'à l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) (Rich & Maréchal, 2010).

#### 1.3.4.2. Mutants du complexe IV chez les plantes

Un mutant du complexe IV chez *Arabidopsis* a été caractérisé par notre équipe. Il s'agit du mutant *cod1* (cytochrome c oxydase déficient1), affecté dans un gène codant une protéine PPR adressée aux mitochondries. Ce mutant présente un défaut d'édition de l'ARNm *cox2* en deux sites, ce qui a pour conséquence de déstabiliser le complexe IV qui n'est plus détectable chez ces plantes. Ce mutant, initialement embryon-létal, a pu être sauvé par culture *in vitro* et survit certainement grâce à l'action de l'oxydase alternative et des NADH déshydrogénases alternatives (Dahan et al., 2014).

#### 1.3.5. Complexe V : ATP synthase

##### 1.3.5.1. Généralités

Chez *Arabidopsis*, l'ATP synthase comporte 14 à 15 sous-unités et fait 500 à 600 kDa. Certaines sous-unités sont codées par la mitochondrie : les protéines Atp1, Atp4, Atp6-1, Atp6-2, Atp8 et Atp9 (Dudkina et al., 2006; Heazlewood et al., 2003b; Meyer et al., 2008). Ce complexe a une structure bipartite : il est composé d'un « stator » appelé  $F_1$ , localisé dans la matrice mitochondriale, ancrée à la seconde partie du complexe, le « rotor » appelé  $F_0$ , hydrophobe et se trouvant dans la membrane interne. Les deux parties du complexe V sont reliées par une tige centrale qui tourne pendant la catalyse et par une tige périphérique qui empêche la rotation du stator. La rotation des sous-unités dans les deux sous-complexes  $F_0$  et  $F_1$  du complexe V est provoquée par le gradient de protons à travers la membrane interne et constitue la base de la phosphorylation de l'ADP. L'énergie mécanique ainsi générée est convertie en énergie chimique en permettant la synthèse d'ATP (Dudkina et al., 2006; Nakamoto et al., 2009).



### 1.3.5.2. Mutants du complexe V chez les plantes

Aucun mutant du complexe V n'a encore été identifié chez les plantes. Tout comme les mutants du complexe IV, ceux du complexe V y sont probablement embryon-létaux.

### 1.3.6. La respiration alternative

Tandis que chez les animaux la chaîne de transport des électrons est basée sur une succession linéaire de réactions d'oxydo-réductions, elle est ramifiée chez les plantes à plusieurs endroits. En plus des cinq complexes classiques évoqués ci-avant, les mitochondries de plantes possèdent en effet des oxydoréductases dites « alternatives » qui participent à la chaîne de transport des électrons (Eubel et al., 2004b).

#### 1.3.6.1. Les NAD(P)H déshydrogénases alternatives

Ces enzymes catalysent le transfert d'électrons du NAD(P)H à l'ubiquinone et sont aussi appelées « NADH déshydrogénases insensibles à la roténone » du fait que leur activité n'est pas affectée par la roténone, une molécule inhibitrice du complexe I (Rasmusson et al., 1999; Moore et al., 2003; Michalecka et al., 2004).

Les NAD(P)H déshydrogénases alternatives (ou dites de type II) sont au nombre de 7 chez *Arabidopsis* et sont codées par trois familles de gènes nucléaires, appelées *NDA* (2 gènes), *NDB* (4 gènes) et *NDC* (1 gène). Les protéines *NDA* sont exposées du côté de la matrice tandis que les *NDB* le sont du côté de l'espace inter-membranaire (Elhafez et al., 2006). Les protéines *NDA* et *NDB* pourraient former un complexe protéique ayant probablement une structure hétérotrimérique (Michalecka et al., 2003; Klodmann et al., 2011). Il a été montré que certaines NAD(P)H ont un double adressage. En effet, la protéine *NDC1* est adressée à la fois à la mitochondrie et au chloroplaste tandis que les protéines *NDA1*, *NDA2* et *NDB1* sont adressées à la mitochondrie et aux peroxysomes (Carrie et al., 2008).

### 1.3.6.2. Les oxydases alternatives ou AOX

En plus des NAD(P)H alternatives, les mitochondries végétales possèdent une oxydase terminale appelée « oxydase alternative » (ou *AOX*), catalysant le transfert direct d'électrons à partir de l'ubiquinol jusqu'à l'oxygène, tout en étant insensible au cyanure. Il existe 5 gènes *AOX* chez *Arabidopsis* (*AOX1a*, *b*, *c* et *d* et *AOX2*) (Saisho et al., 1997, 2001a; Clifton et al., 2006). Néanmoins, la présence d'une oxydase alternative n'est pas réservée qu'aux plantes puisqu'on la retrouve également chez les protéobactéries hétérotrophes et phototrophes marines, les cyanobactéries, les algues et certains champignons (McDonald & Vanlerberghe, 2006; McDonald, 2009). L'expression des gènes *AOX1* est induite par différents types de stress, alors que celle de *AOX2* l'est de manière constitutive ou régulée par le développement (Polidoros et al., 2009). L'*AOX*, tout comme les NAD(P)H alternatives, ne donne pas lieu à la translocation de protons vers l'espace intermembranaire et ne permet donc pas une conservation d'énergie (Affourtit et al., 2002).

### 1.3.6.3. Rôles des oxydoréductases alternatives

Ces oxydoréductases alternatives ne couplent pas le transfert d'électrons au transport de protons à travers la membrane interne. Par conséquent, elles semblent catalyser des réactions occasionnant un gâchis énergétique. On croit néanmoins que ces réactions sont importantes, possiblement parce qu'elles sont à la base des mécanismes de protection contre les débordements de la chaîne respiratoire dans les cellules végétales sous certaines conditions physiologiques (Eubel et al., 2004b). Dans de nombreux cas, ces enzymes alternatives permettent probablement un renouvellement métabolique plus rapide et plus contrôlé lorsque cela est nécessaire, sans dépendre du renouvellement de l'ATP (Rich & Maréchal, 2010).

La régulation des transferts d'électrons entre les oxydoréductases classiques et la régulation du partitionnement des électrons entre les voies classiques et alternatives ne sont pas encore bien comprises (Eubel et al., 2004b). De plus, l'expression des gènes *AOX* est régulée différemment en fonction des organes (Saisho et al., 1997). Néanmoins, les NAD(P)H déshydrogénases externes pourraient réguler l'état de réduction des pools cytoplasmiques de NADH et NADPH en réponse aux variations de la concentration calcique (Rasmusson et al., 2004).

En présence d'Antimycine A ou de myxothiazol (inhibiteurs du complexe III), la transcription de l'ARNm *AOX1A* augmente considérablement, alors que le niveau de transcription des autres ARNm *AOX* reste inchangé. Elle l'est également en présence de  $\text{NaN}_3$  (azoture de sodium) ou d'oligomycine (inhibiteurs respectifs des complexes IV et V). Ceci montre que l'expression du gène *AOX1A* est sensible non seulement à l'inhibition du complexe III, qu'elle court-circuite, mais aussi à l'inhibition d'autres complexes en aval dans la chaîne respiratoire (Saisho et al., 1997, 2001b). De plus, le fait que l'expression du gène *AOX1A* soit induite en présence d'Antimycine A suggère que lorsque la voie des cytochromes est altérée, elle signale des changements de coordination dans la capacité de respiration par l'AOX.

Un exemple naturel d'une telle régulation coordonnée se produit dans l'inflorescence thermogénique des Arums tels que *Sauromatum guttatum*. Dans ces organes floraux spécialisés, un taux extrêmement élevé de respiration génère de la chaleur pour volatiliser les produits chimiques attirant les insectes pour la pollinisation. Cette respiration se produit principalement via l'AOX en raison à la fois d'une forte baisse de la capacité de la voie du cytochrome et d'une forte augmentation de la capacité de l'AOX (Meeuse, 1975; Elthon et al., 1989; Vanlerberghe et al., 2002). Il a été montré que cette chaleur est générée par deux voies différentes, l'une résistante et l'autre sensible au cyanure (Skubatz, 2014).

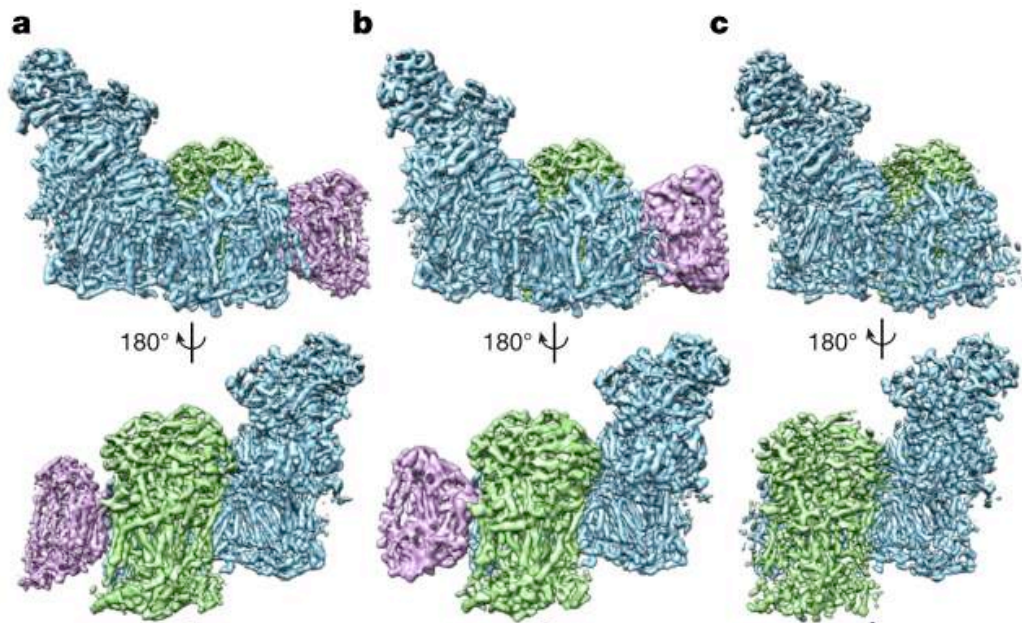
L'AOX est également induite par de hauts niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour Reactive Oxygen Species) et permet leur diminution, tout comme les NAD(P)H déshydrogénases (Millar et al., 2001b; Moller, 2001). Elle est capable de prévenir une réduction excessive de la chaîne de transfert des électrons, qui pourrait résulter en une perturbation de la glycolyse et du cycle de Krebs dans des conditions de haute disponibilité de substrat (Polidoros et al., 2009). Chez des mutants des complexes I et IV de la chaîne respiratoire, les oxydoréductases alternatives sont surexprimées, en particulier AOX1D et NDB4 (Haili et al., 2013; Haili et al., 2016; Dahan et al., 2014; Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017).

### 1.3.7. Les super-complexes respiratoires

Mis à part le complexe II, tous les complexes de la chaîne respiratoire sont impliqués dans des super-complexes (ou dans une oligomérisation de complexes). Le super-complexe le plus abondant est celui formé par les complexes I et III selon un ratio de 1 pour 2 (aussi appelé  $I_1+III_2$ ) dont la structure a été résolue récemment et est représentée en Figure 12 (Letts et al., 2016), mais d'autres super-complexes moins abondants ont également été décrits dans la littérature :  $I_2 + III_4$ ,  $V_2$ ,  $III_2 + IV_{1-2}$ , et  $I_1 + III_2 + IV_{1-4}$  (Eubel et al., 2004b).

Les super-complexes impliquant les complexes I,  $III_2$  et IV sont aussi appelés « respirasomes », dans la mesure où ils peuvent à eux seuls prendre en charge la respiration, en présence d'ubiquinone et de cytochrome c. Les respirasomes sont très abondants dans les mitochondries de mammifères, contrairement aux mitochondries végétales où 90 à 100 % du complexe IV se trouve sous forme monomérique (Schägger & Pfeiffer, 2000; Eubel et al., 2003, 2004a). L'AOX ne semble être associée à aucun super-complexe (Eubel et al., 2003, 2004b).

Récemment, deux équipes ont déterminé la structure du respirasome. L'une a travaillé avec mitochondries purifiées de à partir de cœur de mouton (Letts et al., 2016) et l'autre de cœur de porc (Gu et al., 2016). Le respirasome adopte deux structures distinctes, l'une dite « resserrée » et l'autre « relâchée », correspondant probablement à différentes étapes d'assemblage ou de désassemblage (Figure 12). Dans les deux conformations, les domaines membranaires sont alignés, ce qui forme une surface plane exposée à la membrane. De plus, la densité du complexe IV est plus faible que celle des complexes I et III, ce qui indique une grande flexibilité conformationnelle pour le complexe IV (Letts et al., 2016). Le complexe  $III_2$  et le complexe IV se lient au même côté de la forme en L du complexe I avec leurs domaines transmembranaires alignés, formant un disque transmembranaire (Gu et al., 2016).



**Figure 12 – Structures par cryo-microscopie électronique du respirasome I<sub>1</sub>+III<sub>2</sub>+IV<sub>1</sub> et du super-complexe I<sub>1</sub>+III<sub>2</sub> à partir de mitochondries purifiées de cœur de mouton (Letts et al., 2016).**

a- Respirasome en conformation resserrée

b- Respirasome en conformation relâchée

c- Super-complexe I<sub>1</sub>+III<sub>2</sub>.

Le complexe I est représenté en bleu, le complexe III en vert et le complexe IV en violet

Les complexes respiratoires monomériques et les super-complexes semblent coexister au sein de la membrane interne. De plus, la stœchiométrie des différents complexes diffère, ce qui exclut la possibilité que tous les complexes soient impliqués dans un super-complexe à un moment donné (Blanchi et al., 2004; Dudkina et al., 2006).

Les rôles physiologiques des super-complexes n'ont pas encore été déterminés, mais des mesures d'activité *in vitro* montrent qu'ils permettent un transfert d'électrons plus efficace entre les complexes de la chaîne respiratoire. Il se peut également qu'ils permettent la stabilisation réciproque des complexes (bien que ce ne soit pas le cas pour les complexes III et IV dont la stabilité de l'un ne dépend pas de l'autre), qu'ils régulent la chaîne respiratoire ou encore qu'ils permettent d'augmenter la quantité de protéines pouvant être insérée dans la membrane interne. On suppose que le super-complexe I<sub>1</sub>+III<sub>2</sub> pourrait également réguler la respiration alternative chez les plantes dans la mesure où il pourrait limiter l'accès de l'alternative oxydase à son substrat, l'ubiquinol (Schägger & Pfeiffer, 2000; Dudkina et al., 2006).

## 1.4. Les cytochromes de type c

### 1.4.1. Présentation générale

Les cytochromes de type c sont des métalloprotéines de l'espace inter-membranaire, comprenant un hème comme groupe prosthétique. Il s'agit donc d'hémoprotéines caractérisées par la fixation covalente d'un hème à une apoprotéine. Elles permettent, entre autre, la translocation d'électrons à partir du complexe III jusqu'au complexe IV (Hamel et al., 2009; Klodmann et al., 2011). Les cytochromes de type c sont généralement recrutés dans des réactions de transfert d'électrons et leur activité d'oxydo-réduction est déterminée par le changement de valence de l'atome de fer dans le cofacteur hème ( $Fe^{3+}$  à  $Fe^{2+}$ ). Ils constituent une famille de molécules structurellement diverses que l'on retrouve du côté positif de la membrane interne mitochondriale (Howe & Merchant, 1994; Allen et al., 2003; Hamel et al., 2009). Il existe deux types de cytochromes de type c ; l'un étant soluble (cytochrome c) et faisant la navette entre les complexes respiratoires III et IV et l'autre ancré dans la membrane interne (cytochrome  $c_1$ ) et faisant partie du complexe III (Howe & Merchant, 1994).

### 1.4.2. Import et maturation des cytochromes de type c

#### 1.4.2.1. Maturation en holocytochromes de types c

Les holocytochromes c (cytochromes c matures) se trouvent à un endroit différent de celui d'où proviennent les apoprotéines et le cofacteur hème. L'hème et les apocytochromes (cytochromes c immatures) sont transportés indépendamment jusqu'à la face positive de la membrane interne et maintenus sous forme réduite jusqu'à qu'ils soient associés, ce qui constitue l'étape terminale du processus de maturation (Hamel et al., 2009). Il existe cinq systèmes d'assemblage des cytochromes de type c. Le système I est présent chez *E. coli* et les mitochondries de plantes, le système II chez *B. pertussis* et le système III chez les mitochondries de *S. cerevisiae* (Kranz et al., 1998; Nakamoto et al., 2000; Thöny-Meyer, 2002; Stevens et al., 2005; Hamel et al., 2009). Deux autres systèmes, IV et V, ont également été décrits. Le système IV concerne les mitochondries du trypanosome et de *Leishmania* (Allen et al., 2004), tandis que le système V se réfère à la voie CCB (Cytochrome C Biogenesis), requise pour l'attachement covalent de l'hème  $c_1$  au cytochrome  $b_6$  dans le

complexe  $b_6f$  des cyanobactéries et des eucaryotes photosynthétiques (Kuras et al., 1997, 2007; Lyska et al., 2007).

### 1.4.2.2. Organisation modulaire de la machinerie de maturation des cytochrome de type c

La machinerie de maturation des cytochromes de type c a été décrite comme étant modulaire. Trois modules fonctionnels sont intégrés dans la membrane interne et prennent en charge leur maturation coordonnée (Figure 13). Le module 1 transporte l'hème à travers la membrane pendant que le module 2 transporte et chaperonne les apocytochromes c compétents pour la ligation. Le module 3 piège les substrats (l'hème et l'apocytochrome c, fournis respectivement par les modules 1 et 2) et catalyse la liaison thioéther entre l'hème et l'apocytochrome c (Verissimo & Daldal, 2014).

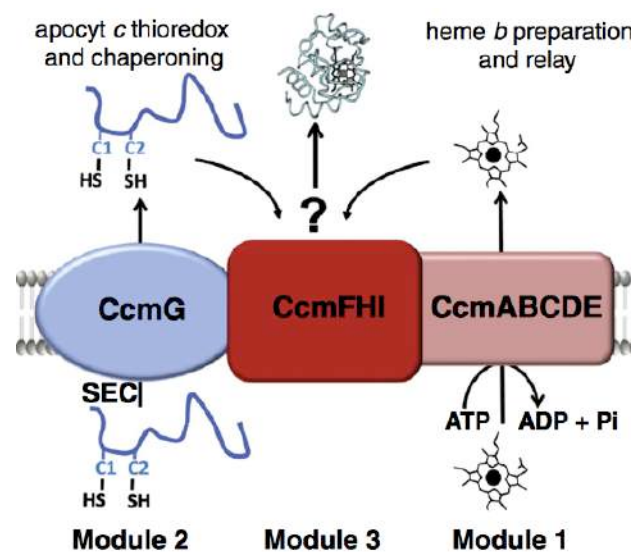


Figure 13 - Organisation fonctionnelle générale de la machinerie de maturation des cytochromes de type c (Verissimo & Daldal, 2014)

- Module 1 : Translocation de l'hème
- Module 2 : Translocation de l'apocytochrome c
- Module 3 : Ligation de l'hème à l'apocytochrome c

### 1.4.2.3. Le système I de maturation des cytochromes de type c

Le système I de maturation des cytochromes de type c (aussi appelé système Ccm pour Cytochrome c maturation) est celui utilisé par les mitochondries végétales (Figure 14), mais aussi par les  $\alpha$ - et  $\gamma$ -protéobactéries, les archae et les algues rouges. La fonction des protéines Ccm a été caractérisée principalement chez *E. coli*. Il existe huit à neuf protéines Ccm, de CcmA à CcmH ou CcmI (Stevens et al., 2005; Verissimo & Daldal, 2014).

Les protéines CcmA et CcmB constituent le transporteur ABC d'un substrat inconnu mais essentiel pour le processus de maturation, et sont également impliquées dans le relargage ATP-dépendant de la forme holo de la chaperonne CcmE (Stevens et al., 2005; Rayapuram et al., 2007; Sanders et al., 2010). CcmC est impliquée dans la délivrance de l'hème à la chaperonne CcmE (Spielewoy et al., 2001; Ren & Thöny-Meyer, 2001). CcmD est une petite protéine membranaire facilitant les interactions entre les autres protéines Ccm, en particulier entre CcmC et CcmE (Ahuja & Thöny-Meyer, 2005). CcmF forme un complexe avec CcmE et CcmH et facilite le transfert de l'hème à partir de CcmE jusqu'à l'apocytochrome c (Ren et al., 2002). Les protéines CcmG et CcmH sont impliquées dans le contrôle de la réduction des cystéines de l'apocytochrome c (Meyer et al., 2005; Fabianek et al., 2000). Et enfin, la protéine CcmI pourrait, avec CcmF et CcmH, lier l'apocytochrome c (Sanders et al., 2010).

### 1.4.2.4. Les spécificités du système I chez les mitochondries végétales

#### 1.4.2.4.1. Scission du gène *CcmF*

Chez la bactérie, la protéine CcmF est codée par un gène unique, *CCMF*, qui se présente sous forme scindée dans les génomes des mitochondries végétales. Dans la plupart des cas, le gène est scindé en deux gènes *CCMF<sub>N</sub>* et *CCMF<sub>C</sub>*. De manière exceptionnelle, le gène *CCMF<sub>C</sub>* est de nouveau divisé en deux gènes chez l'hépatique des fontaines *Marchantia polymorpha* (Oda et al., 1992). Le gène *CCMF<sub>N</sub>* est quant à lui scindé en deux gènes *CCMF<sub>N1</sub>* et *CCMF<sub>N2</sub>* chez les *Brassicaceae* (Unsel et al., 1997; Handa, 2003; Park et al., 2013). Le seul évènement de scission du gène *CCMF* en dehors des *Brassicaceae* est retrouvé chez l'oignon (une espèce monocotylédone), où il est également présent sous forme de deux gènes *CCMF<sub>N1</sub>* et *CCMF<sub>N2</sub>*. Bien que les positionnements des scissions soient proches, le point



de cassure exact est différent entre les *Brassicaceae* et l'oignon, ce qui indique que deux événements de coupure indépendants ont eu lieu au cours de l'évolution (Kim et al., 2016).

Chez l'oignon comme chez *Arabidopsis*, les ARNm  $ccmF_{N1}$  et  $ccmF_{N2}$  sont transcrits séparément et ne montrent pas de signe de trans-épissage (Forner et al., 2007; Kim et al., 2016). L'ARNm  $ccmF_{N1}$  ne possède pas de codon stop chez l'oignon, alors qu'il en a un chez *Arabidopsis* (Unselde et al., 1997; Kim et al., 2016). Chez *Arabidopsis*, les trois protéines issues du clivage du gène *CCMF* forment un complexe et cela doit certainement être aussi le cas pour les autres espèces chez lesquelles ce gène est clivé (Rayapuram et al., 2008; Kim et al., 2016). Ce complexe formé par les protéines CcmF interagit avec la protéine CcmH, comme chez la bactérie (Rayapuram et al., 2008).

#### 1.4.2.4.2. Autres spécificités

Toutes les protéines Ccm bactériennes sont codées par un seul locus correspondant à un opéron tandis que chez les mitochondries de plantes, ces protéines sont codées à la fois par le génome nucléaire (CcmA, CcmE et CcmH) et par le génome mitochondrial (CcmB, CcmC,  $CcmF_{N1}$ ,  $CcmF_{N2}$  et  $CcmF_C$ ). De plus, seules six des huit à neuf protéines Ccm bactériennes sont retrouvées chez les plantes ; les protéines CcmD, CcmG et CcmI sont manquantes (Giegé et al., 2008). Il est possible que les fonctions remplies par ces gènes soient redondantes avec des fonctions déjà remplies par des gènes de plantes, et qu'ils aient donc été perdus pendant l'évolution, sans préjudice pour la maturation des cytochromes de type c (Giegé et al., 2008).

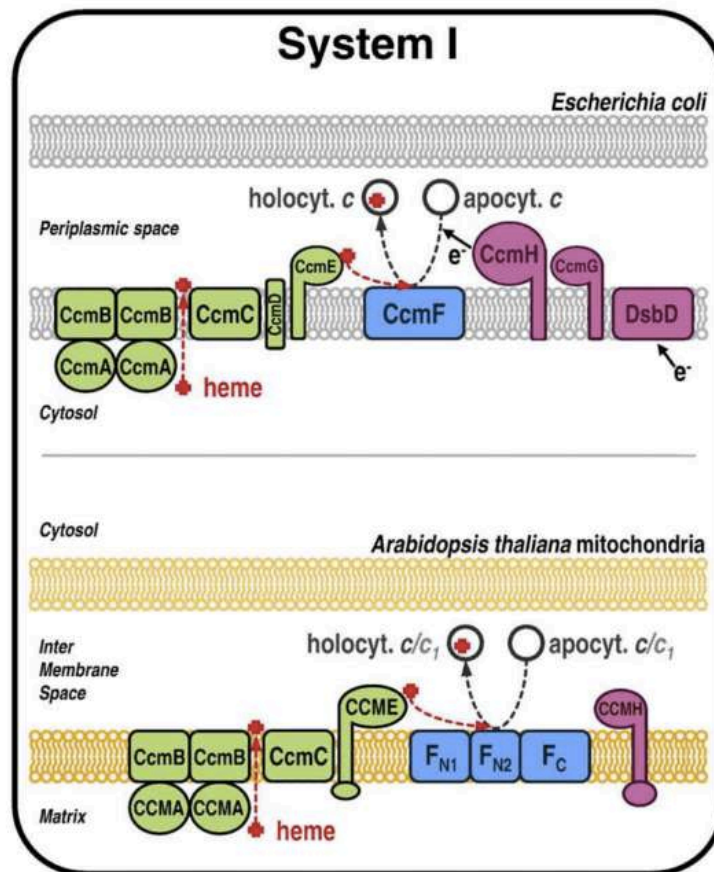


Figure 14 - Schéma du système I de maturation des cytochromes de type c (Hamel et al., 2009).

#### 1.4.2.5. Import des apocytochromes c et $c_1$

Les apocytochromes c et  $c_1$  sont codés par des gènes nucléaires et importés post-traductionnellement dans l'espace inter-membranaire mitochondrial par des mécanismes distincts (Hamel et al., 2009). L'import de l'apocytochrome c requiert l'intervention des composants de la machinerie TOM (Translocase of the Outer Membrane) de la membrane externe, ainsi que le complexe CCHL (Cytochrome C Heme Lyase) qui joue le rôle de récepteur sur la face interne de la membrane externe et permet à l'holocytochrome c d'adopter la bonne conformation (Hamel et al., 2009). L'apocytochrome  $c_1$  est aussi importé dans la mitochondrie *via* la machinerie de translocation TOM à laquelle s'ajoute la machinerie TIM (Translocase of the Inner Membrane) (Zollner et al., 1992; Arnold et al., 1998). Chez la levure et le champignon, la translocation de l'apocytochrome dans l'espace inter-membranaire se fait par le biais de protéoliposomes (Mayer et al., 1995; Diekert et al., 2001; Wiedemann et al., 2003).

#### 1.4.2.6. Délivrance de l'hème

La délivrance de l'hème chez les mitochondries végétales fait intervenir les protéines CcmA, CcmB, CcmC et CcmE ; cette dernière étant capable de lier l'hème covalamment (Schulz et al., 1998). Des expériences chez *E. coli* ont montré que l'hème est lié de manière transitoire à CcmE et transmis à l'apocytochrome c, d'où son appellation de protéine chaperonne (Hamel et al., 2009). Bien que la présence de CcmC soit nécessaire et suffisante pour charger l'hème sur CcmE, la présence des autres protéines Ccm est requise pour transférer l'hème de CcmE à l'apocytochrome c (Schulz et al., 1999; Ren & Thöny-Meyer, 2001). Le modèle actuel propose que CcmE fasse la navette entre CcmC et CcmF pour la délivrance de l'hème et que CcmF et CcmH promeuvent la ligation de l'hème à l'apocytochrome c (Ren et al., 2002; Hamel et al., 2009).

Dans la mesure où le substrat du transporteur ABC est inconnu, deux modèles de fonctionnement ont été proposés le concernant. Dans le premier, il est proposé qu'il agisse plutôt en libérant la chaperonne CcmE que comme un réel transporteur, l'hydrolyse de l'ATP par CcmA induisant un changement de conformation du transporteur. Ce changement de conformation serait capable de promouvoir en retour la libération de l'holo-CcmE, permettant la libération ultérieure de l'hème de l'apocytochrome (Hamel et al., 2009). Dans le second modèle, la libération de l'hème de l'holo-CcmE est dépendante du substrat transporté par le transporteur ABC et requise pour la liaison de l'hème à l'apocytochrome. Dans ce modèle, en l'absence du substrat, le processus de maturation avorte (Hamel et al., 2009).

#### 1.4.2.7. Ligation de l'hème

La CCHL est définie comme l'enzyme catalysant l'étape terminale de la voie de synthèse de l'holocytochrome. Cette étape consiste en la formation de deux liaisons thioéther entre l'hème et l'apocytochrome c (Hamel et al., 2009). Dans le système I de maturation des cytochromes de type c, les protéines CcmF<sub>N1</sub>, CcmF<sub>N2</sub>, CcmF<sub>C</sub> et CcmH interagissent sous forme de complexe pour permettre la ligation de l'hème à l'apocytochrome et constituent les composants de l'hème lyase (Rayapuram et al., 2008; Giegé et al., 2008; Hamel et al., 2009). Il a été proposé que le complexe CCHL ne catalyse pas l'attachement covalent de l'hème à l'apocytochrome c à proprement parler, mais qu'il soit plutôt impliqué dans la stabilisation des apocytochromes c et c<sub>1</sub> dans des conformations spécifiques, en

maintenant les cystéines et/ou l'hème sous forme réduite, et en permettant la présentation de l'hème aux apocytochromes c et c<sub>1</sub> (Hamel et al., 2009).

## 1.5. Les protéines PPR

### 1.5.1. Découverte et généralités

Les protéines PPR (Pentatricopeptide Repeat) ont été découvertes par Ian Small et Nemo Peeters en 2000 (Small & Peeters, 2000) en cherchant des protéines d'*Arabidopsis thaliana* prédites pour être adressées à la mitochondrie et au chloroplaste. Ils ont découvert à cette occasion une très grande famille de protéines chez *Arabidopsis thaliana*, qui comprend à ce jour 496 membres (Small & Peeters, 2000; Lurin et al., 2004; Cheng et al., 2016). Par la suite, des motifs PPR ont été trouvés chez tous les eucaryotes analysés, mais en nombre extrêmement variable entre les animaux et les végétaux (Lurin et al., 2004). Des protéines PPR sont également retrouvées chez les protistes, les champignons et les métazoaires mais en nombre bien moins important que chez les plantes, par exemple, 7 protéines PPR ont été décrites chez l'homme (Lightowers & Chrzanowska-Lightowers, 2013). Elles sont absentes chez la plupart des procaryotes, y compris chez les proches descendants des symbiontes ayant donné lieu à la mitochondrie et au chloroplaste (Lurin et al., 2004).

Le Tableau 1 liste le nombre de protéines PPR identifiées chez plusieurs espèces modèles.

Organisme	Nombre de protéines PPR	Références
<i>Arabidopsis thaliana</i>	496	(Cheng et al., 2016)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	2	(Lurin et al., 2004)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	14	(Tourasse et al., 2013)
<i>Cyanidoschyzon merolae</i>	10	(Lurin et al., 2004)
<i>Drosophila Melanogaster</i>	7	(Baggio et al., 2014)
<i>Glycine max</i>	629	(Fujii & Small, 2011)
<i>Homo sapiens</i>	7	(Lightowers & Chrzanowska-Lightowers, 2013)
<i>Leishmania major</i>	23	(Mingler et al., 2006)
<i>Medicago truncatula</i>	365	(Fujii & Small, 2011)
<i>Oryza sativa</i>	475	(Cheng et al., 2016)
<i>Physcomitrella patens</i>	133	(Cheng et al., 2016)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	1	(Lurin et al., 2004)
<i>Rickettsia prowazekii</i>	0	(Lurin et al., 2004)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15	(Herbert et al., 2013)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10	(Kühl et al., 2011; Herbert et al., 2013)
<i>Selaginella moellendorffii</i>	1568	(Cheng et al., 2016)
<i>Synechocystis sp</i>	0	(Lurin et al., 2004)
<i>Trypanosoma brucei</i>	39	(Aphasizhev & Aphasizheva, 2013)
<i>Vitis vinifera</i>	534	(Cheng et al., 2016)

**Tableau 1 – Nombre de protéines PPR identifiées chez diverses espèces modèles.**

Concernant l'expansion très importante des protéines PPR chez les plantes, plusieurs théories ont été proposées :

- L'une d'entre elles voudrait que les gènes PPR aient été amplifiés par plusieurs événements de transcription inverse / intégration plutôt que par une association fortuite avec des rétro-transposons (Lechary et al., 2003).
- Une autre des hypothèses, valable pour les systèmes de SMC, propose l'existence d'un conflit nucléo-cytoplasmique dans lequel le génome des organites aurait évolué pour avoir l'avantage sur son hôte tandis que le noyau de l'hôte aurait co-évolué pour

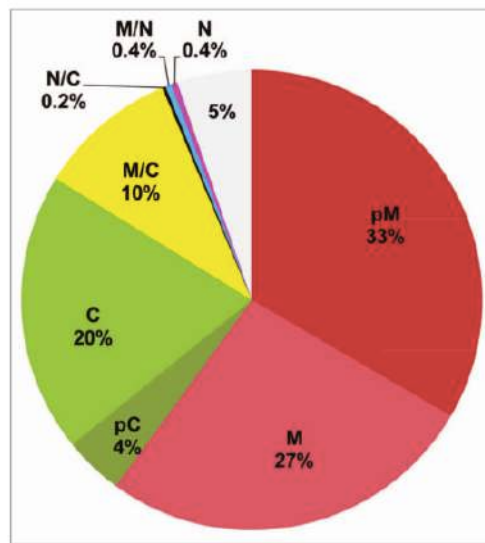
restaurer son avantage, dans la plupart des cas avec la mise en place de gènes codant des protéines PPR (Lightowers & Chrzanowska-Lightowers, 2013).

- Une troisième hypothèse concerne le « debugging » des ARNm et propose que le noyau ait développé un certain nombre de facteurs de liaison à l'ARN (ici, les protéines PPR) pour prendre en charge des mutations génomiques au niveau de l'ARN (Maier et al., 2008). Cette hypothèse a été proposée pour le chloroplaste mais est transposable aux mitochondries, dans la mesure du nombre important de sites d'édités qu'elle comprend (Bentolila et al., 2008).

De plus, les génomes des organites de plantes sont plus grands que ceux des animaux ; par exemple le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* fait 366 kb, tandis que celui de la mitochondrie humaine ne fait que 16,5 kb. Les génomes des organites de plantes sont malléables et peuvent recombinaison activement, accepter de l'ADN étranger par transfert horizontal ou encore former de multiples génomes circulaires, ce qui peut être à l'origine d'un large éventail de changements évolutifs (Lightowers & Chrzanowska-Lightowers, 2013).

Chez *Arabidopsis*, les gènes PPR sont répartis uniformément sur les cinq chromosomes nucléaires, avec peu de clusters. Le cluster le plus dense se trouve sur le bras long du chromosome 1 où 19 gènes PPR et quelques pseudogènes se trouvent dans une région d'environ 1 Mb. La famille PPR présente un important polymorphisme, lié à des délétions ou duplications de répétitions en tandem.

Les prédictions d'adressage des protéines PPR ont montré que très peu de protéines seraient localisées à l'extérieur des organites (Lurin et al., 2004; Colcombet et al., 2013). Chez *Arabidopsis*, parmi les protéines PPR ayant un adressage unique, 60 % sont adressées à la mitochondrie, 24 % au chloroplaste et 0,4 % au noyau (Figure 15) (Colcombet et al., 2013).



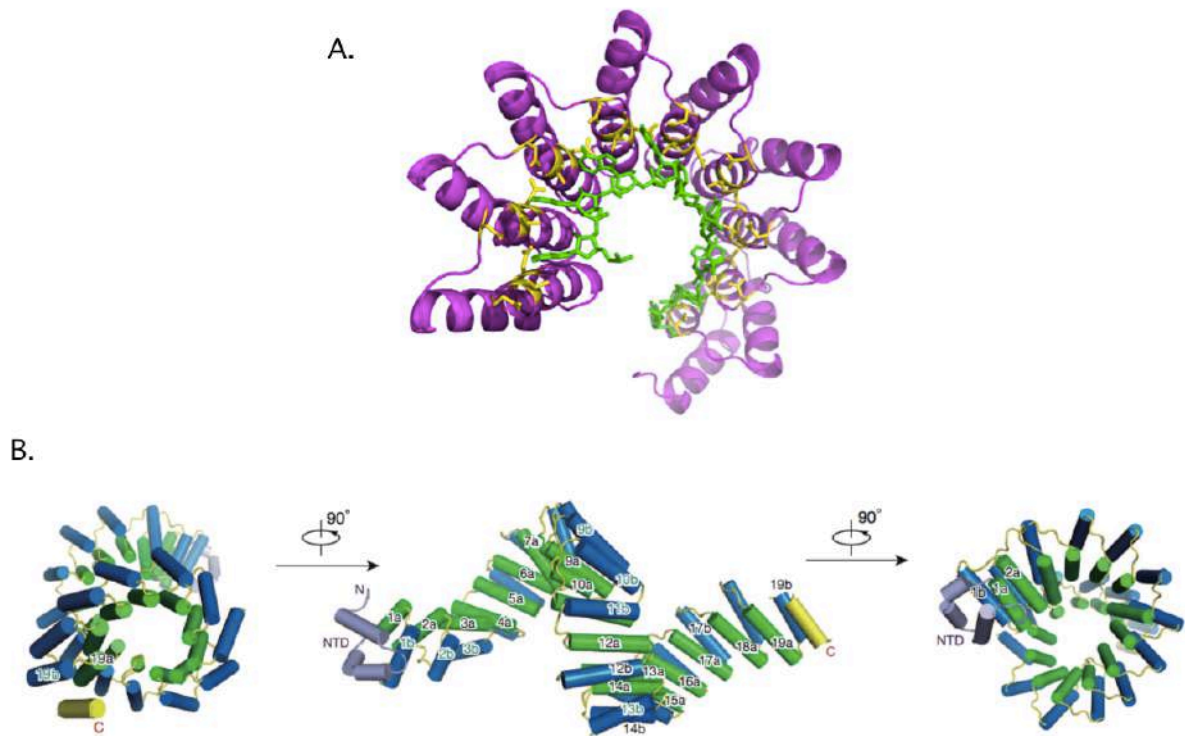
**Figure 15 - Adressage subcellulaire des protéines PPR chez *Arabidopsis thaliana* (Colcombet et al., 2013)**

- 33 % sont prédites être adressées à la mitochondrie (pM, en rouge)
- 27 % sont adressées à la mitochondrie (M, rouge pâle)
- 4 % sont prédites être adressées au chloroplaste (pC, vert foncé)
- 20 % sont adressées au chloroplaste (C, vert clair)
- 10 % sont doublement adressées à la mitochondrie et au chloroplaste (M/C, jaune)
- 0,2 % sont doublement adressées au noyau et au chloroplaste (N/C, noir)
- 0,4 % sont doublement adressées à la mitochondrie et au noyau (M/N, bleu clair)
- 0,4 % sont adressées au noyau (N, rose)
- 5 % n'ont pas d'adressage défini (gris clair)

### 1.5.2. Structure des protéines PPR

Les protéines à motif PPR appartiennent à la grande famille de protéines dites super-hélicoïdales. Ces protéines sont caractérisées par la présence de répétitions en tandem de motifs dégénérés d'environ 35 acides aminés. La structure répétée de ces protéines n'a pas attiré l'attention plus tôt car elles ont été confondues avec les protéines TPR (pour tétratricopeptide) présentant des répétitions dégénérées de 34 acides aminés (Fisk et al., 1999; Small & Peeters, 2000). La répétition des motifs PPR forme une super hélice (ou un solénoïde) entourant un tunnel central (Small & Peeters, 2000; Howard et al., 2012). En Figure 16A est représenté un modèle d'une protéine PPR liée à son ARN cible (Fujii et al., 2011) et en Figure 16B la structure cristallographique de la protéine PPR10 du maïs (Yin et al., 2013).

Des études de « prédiction de contact » ont été menées pour déterminer le positionnement spatial d'une répétition PPR par rapport à la répétition adjacente. Lorsque deux motifs P sont adjacents, les hélices  $\alpha$  sont positionnées de façon antiparallèle de telle sorte que les résidus 1 à 18 soient antiparallèles au résidus 20 à 31 du même motif mais parallèles aux résidus 1 à 18 du motif suivant (Cheng et al., 2016).



**Figure 16 – Structure des protéines PPR (Fujii et al., 2011; Yin et al., 2013)**

A. Modèle d'une protéine PPR liée à une cible ARN (Fujii et al., 2011). Les répétitions PPR sont indiquées en violet, l'ARN cible en vert et en jaune sont représentées les chaînes latérales des acides aminés potentiellement impliqués dans la spécificité de reconnaissance de l'ARN cible.

B. Structure cristallographique de la protéine PPR10 du maïs (Yin et al., 2013). Cette protéine comprend 19 répétitions PPR, 3 hélices alpha courtes en N-terminal (en violet) et une hélice alpha en C-terminal (en jaune). Les deux hélices au sein de chaque répétition sont appelées hélices a et b et sont représentées en vert et en bleu, respectivement.



### 1.5.3. Organisation des motifs : les PPR classiques vs les PPR-PLS

Les protéines PPR comportent en moyenne 12 motifs, mais cela peut varier de 2 à 30 en fonction des protéines (Small & Peeters, 2000; Lurin et al., 2004; Lightowlers & Chrzanowska-Lightowlers, 2013). Les répétitions PPR se présentent généralement sous la forme d'un *continuum* ininterrompu qui s'étale sur au moins sur les deux tiers de la protéine. Chez Arabidopsis, les motifs PPR sont adjacents les uns aux autres sans trous entre les motifs pour environ la moitié des protéines. Pour l'autre moitié, on observe des trous réguliers de 65 à 70 acides aminés (Lurin et al., 2004)

Les gènes codant les protéines PPR contiennent rarement des introns. Plus de 80 % des PPR ne contiennent qu'un exon, et seulement 7 % contiennent plus d'un intron (Figure 17). Ceci explique pourquoi les gènes PPR sont relativement courts (2 kb en moyenne entre l'ATG et le stop) en dépit du fait que les protéines PPR soient plutôt de grande taille (642 acides aminés en moyenne) (Lurin et al., 2004).

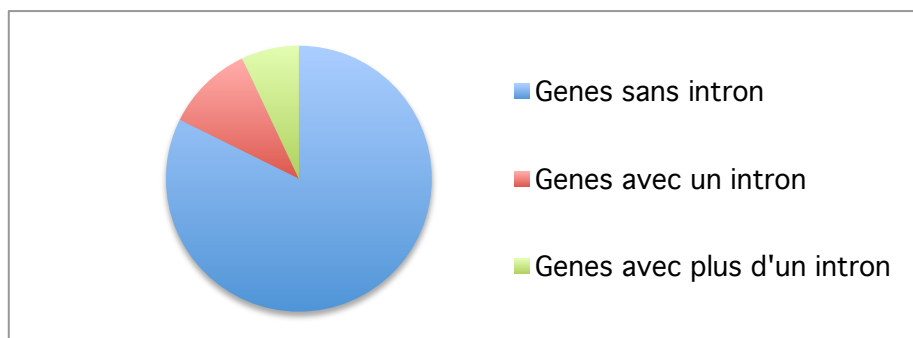


Figure 17 - Représentation graphique de la proportion de gènes PPR présentant des introns (Lurin et al., 2004).

#### 1.5.3.1. Les PPR-P vs les PPR-PLS

Il existe plusieurs types de protéines PPR, les PPR « classiques » correspondant à celles présentées ci-avant, et les PPR-PLS, qui seront présentées ensuite. Comme mentionné ci-avant, les PPR classiques (dites PPR-P pour Pures) ont été décrites comme des protéines présentant des répétitions en tandem de 35 acides aminés. Or, il a été défini en 2004 de nouveaux

motifs de 31 et 36 acides aminés. La comparaison de séquences a montré qu'il s'agit bien de motifs PPR, comme décrit dans Small & Peeters, 2000. Ces motifs ont été appelés PPR-like S (pour short) et PPR-like L (pour long). Les protéines PPR comportant les trois types de motifs P, L et S ont été appelées protéines PPR-PLS, et ne sont rencontrées que chez les plantes (Lurin et al., 2004). Il est fort probable que la sous-famille PPR-P soit apparue suite à l'expansion des PPR communes aux eucaryotes, tandis que les répétitions de la sous-famille PPR-PLS sont probablement apparues suite à des mutations des répétitions PPR classiques (Lurin et al., 2004).

Récemment, de nouvelles études bio-informatiques ont été menées et une nouvelle classification des protéines PPR a vu le jour. Dorénavant, les protéines PPR sont considérées comme Pures si elles comprennent une majorité de motifs P, et les protéines PPR-PLS sont caractérisées par le fait qu'elles comprennent soit des domaines C-terminaux additionnels (cf. ci-après) soit une majorité de motifs L et S. Ces dernières peuvent commencer indifféremment par un motif de type P, L ou S. Il semblerait que les protéines PPR-PLS aient une conformation similaire aux PPR-P, chaque motif P, L et S formant une paire d'hélices  $\alpha$  antiparallèles (Cheng et al., 2016).

### **1.5.3.2. Les séquences N et C-terminales des protéines PPR**

#### **1.5.3.2.1. Les séquences N-terminales des protéines PPR**

Les séquences N-terminales des protéines PPR sont pour la plupart liées à l'adressage aux organites et montrent une faible conservation entre les protéines (Cheng et al., 2016).

#### **1.5.3.2.2. Les séquences C-terminales des protéines PPR**

A l'inverse des séquences présentent en N-terminal, les extensions C-terminales des protéines PPR présentent un niveau de conservation considérable dans la plupart des cas (Lurin et al., 2004; Cheng et al., 2016). L'alignement des séquences C-terminales des protéines PPR-PLS a permis de définir trois motifs : E, E+ et DYW (DYW étant le tripeptide terminal), qui ne sont retrouvés que dans la sous-famille PPR-PLS (Lurin et al., 2004). De plus, la structure répétée des protéines PPR s'étend au delà des motifs P, L et S dans la mesure où la partie N-terminale du domaine E semble contenir deux motifs PPR-like, appelés E1 et E2 (Cheng et al., 2016).

L'organisation relative des trois motifs C-terminaux suit quelques règles quasi-absolues (Lurin et al., 2004) :

- Les motifs ne sont jamais présents en copies multiples dans une même protéine
- Ils sont en général colinéaires et toujours dans le même ordre : E1 – E2 – DYW
- Les protéines portant le motif DYW portent pratiquement toujours les domaines E1 et E2

L'identification de ces motifs C-terminaux a permis de définir plusieurs sous-classes de protéines PPR-PLS (Figure 19) (Lurin et al., 2004; Cheng et al., 2016) :

- Les protéines qui n'ont aucun domaine C-terminal (sous-classe PLS)
- Les protéines ayant un motif E1 seul (sous-classe E1)
- Les protéines ayant les motifs E1 et E2 (sous-classe E2)
- Les protéines ayant les motifs E1, E2 et E+ (sous-classe E+)
- Les protéines ayant les motifs E1, E2 et DYW (sous-classe DYW)

### **1.5.3.3. Les variants du motif PPR canonique**

Au total, 10 variants du motif PPR ont été décrits et se présentent selon un schéma caractéristique. Le motif P présente les variants P1 et P2 (uniquement présents chez les PPR-PLS), le motif L devient L1 ou L2 et le motif S devient S1, S2 ou SS, ce dernier étant systématiquement juxtaposé à un autre motif S. Enfin, les motifs E1 et E2 dorénavant considérés comme des variants du motif PPR à part entière (Cheng et al., 2016). L'alignement des séquences consensus de ces différents variants en comparaison au motif P est représenté en Figure 18 et l'architecture des protéines PPR en incluant cette nouvelle nomenclature est représentée en Figure 19.

```

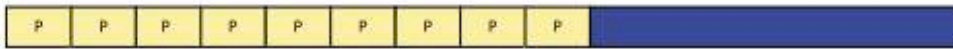
P      v v T Y N t L I N g y c K s G K I E E A m e L f e E M k e k . G I k P D
P1     V V S W N A M I S G Y a Q N G q s E E A L e L F r E M Q r s . G V K P D
P2     V V S W N A M I S G Y A m H G h G E E A L E L F E E M Q Q s . G I K P D
L1     e f T f a S V L s A C A n L g a L E q G K Q I H g y V I K s . G f E s D
L2     h V T F I g V L S A C S H A G L V D E G r Q Y F N S M k K d Y g I e P k
S1     V f V g N A L I D M Y A K C G s I E d A R K V F D e M . . . . p . E R D
S2     V E H Y a C M V D L L G R A G r L E E A y E f I K k M . . . . P I E P D
SS     V V S W N A M I S G Y a K n G e I D E A R K L F D E M . . . . P . E R N
E1     A a V W G A L L g A C R I H g N V E L G E m A A E K L L E L E P . E . N
E2     S G n Y V L L S N I Y A S A G R W D D V a K V R K M M K E R . G I K . K

```

Figure 18 – Alignement des séquences consensus des différents types de motifs PPR (Cheng et al., 2016)

Alignement des différents variants des motifs PPR et PPR-like. Des séquences de consensus, dérivées de EMBOSS, ont été obtenues en utilisant des séquences de motifs PPR à partir de 41 génomes représentatifs. Les résidus en majuscule sont fortement conservés dans chaque motif. Les résidus en gras correspondent à ceux du motif P. Les résidus soulignés indiquent les différences entre P2 et P1, L2 et L1, S2 et S1, SS et P1 et SS et S1. Les deux hélices  $\alpha$  de chacun des motifs sont surlignées en gris.

(a) P subfamily

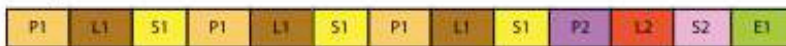


PLS subfamily

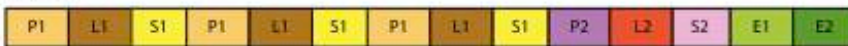
PLS subgroup



E1 subgroup



E2 subgroup



E+ subgroup



DYW subgroup



Other examples of architectures for the PLS domain



(b) Lurin *et al.*

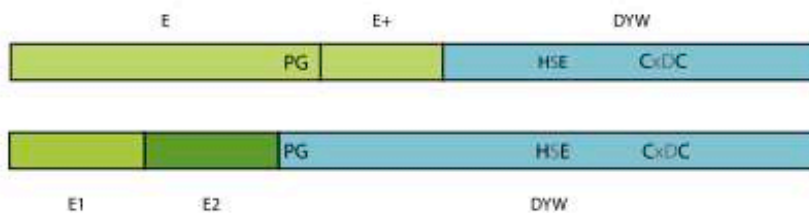


Figure 19 – Architecture des protéines PPR chez les plantes (Cheng *et al.*, 2016)

(a) Structures schématiques des protéines PPR des différentes sous-familles. Le nombre de motifs dans chaque protéine peut varier de 2 à 30, et le premier motif peut être indifféremment P, P1, L1, S1 ou SS. Le sous-groupe E + se compose de protéines avec un domaine DYW dégénéré ou tronqué.

(b) Comparaison de l'organisation des domaines C-terminaux E et DYW proposés par (Lurin *et al.*, 2004) (en haut), et ceux proposés par (Cheng *et al.*, 2016) (en bas). « PG » indique la « boîte PG » conservée (Hayes *et al.*, 2013) tandis que HSE et CxDC indiquent la séquence signature de la désaminase liant le zinc (Salone *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2013, 2015; Bousardon *et al.*, 2014; Wagoner *et al.*, 2015).

#### 1.5.4. Fonctions des protéines PPR

La plupart des données accumulées au sujet des protéines PPR provient de la caractérisation de plantes mutantes, mais certaines données fonctionnelles importantes proviennent aussi de la caractérisation de gènes restaurateurs de fertilité dans des systèmes de stérilité mâle cytoplasmique (Chase, 2007).

Il semblerait qu'il n'y ait pas de redondance entre les gènes PPR malgré leur grand nombre. Les protéines PPR sont pour la plupart adressées vers un transcrite spécifique, il ne s'agit donc pas de protéines de liaison aux ARN aspécifiques. La grande majorité d'entre elles ne présentent pas de domaine catalytique, on imagine donc qu'elles ont plutôt un rôle d'adaptateur pour aider l'action d'autres facteurs (Lurin et al., 2004).

La caractérisation fonctionnelle de mutants d'*Arabidopsis*, du maïs (*Zea mays*), du riz (*Oryza sativa*), de la mousse (*Physcomitrella patens*) et chez l'homme a révélé les rôles joués par les protéines PPR dans l'expression des gènes des organites. En effet, il a été montré qu'elles participent à la plupart des étapes de l'expression et de la maturation des ARNm (transcription, stabilisation, maturation des extrémités 5' et 3', épissage des introns, édition des cytosines en uracile, et traduction) (Schmitz-Linneweber & Small, 2008; Lightowlers & Chrzanowska-Lightowlers, 2013).

Sauf pour celles impliquées dans l'édition (cf. ci-après), l'activité des protéines PPR semble limitée à une capacité à s'associer spécifiquement avec de courtes séquences d'ARN (Dahan & Mireau, 2013). Il a été montré que cette liaison pourrait induire une réorganisation locale de la structure de la l'ARNm cible pour rendre accessibles des sites cachés. Par exemple, il a été montré que la protéine PPR10 chloroplastique permet, par sa seule liaison dans la 5'UTR de son ARNm cible, de défaire une structure tige-boucle comprenant la séquence Shine-Dalgarno (Shine & Dalgarno, 1974), et donc de rendre cette séquence accessible à la petite sous-unité du ribosome (Prikryl et al., 2011). La capacité des protéines PPR à influencer localement des structures secondaires ou tertiaires explique probablement la grande variété de fonctions associées à cette classe de protéines (Dahan & Mireau, 2013).

D'un point de vue plus macroscopique, il a été montré que les mutants PPR peuvent avoir des phénotypes variés (Barkan & Small, 2014) :

- défaut de photosynthèse
- développement foliaire aberrant
- changement de la pigmentation des feuilles
- croissance retardée
- défaut de développement de la graine ou de l'embryon
- hypersensibilité aux stress abiotiques
- hypersensibilité à l'acide abscissique
- tolérance à des inhibiteurs de différentes voies de biosynthèse
- stérilité mâle cytoplasmique

*Les fonctions des protéines PPR caractérisées et agissant dans les mitochondries végétales sont détaillées ci-après dans la partie 1.6.*

#### **1.5.4.1. La stérilité mâle cytoplasmique ou SMC**

En plus d'être impliquées dans des fonctions essentielles comme la respiration ou la biosynthèse de cofacteurs, les mitochondries végétales sont également responsables d'un caractère appelé stérilité mâle cytoplasmique (ou SMC). Ce caractère correspond à une condition largement répandue chez les plantes qui se manifeste par une incapacité à produire du pollen fonctionnel ; ces plantes sont appelées mâle-stériles (Budar et al., 2003).

Dans la nature, la SMC peut être observée dans les populations d'espèces sauvages gynodioïques dans lesquelles des plantes hermaphrodites et mâle-stériles (femelles) cohabitent. La SMC peut également apparaître dans les descendances de croisements interspécifiques dans lesquelles le fond nucléaire d'une espèce est combiné avec le fond cytoplasmique d'une autre. Dans ce cas, le phénotype mâle-stérile peut soit résulter de la perturbation de la coadaptation noyau-cytoplasme et la dérégulation de multiples facteurs génétiques ou de la réactivation d'un seul gène mitochondrial qui est réduit au silence lorsqu'il est combiné avec son noyau d'origine. Le premier type de SMC est considéré comme le résultat d'une perte de fonction alors que le second est interprété comme un gain de fonction associé à la renaissance d'une SMC en sommeil (Budar et al., 2003).

Puisque le phénotype de stérilité mâle force la pollinisation croisée, les SMC ont été transférées à partir d'espèces sauvages dans un certain nombre d'espèces cultivées et sont largement utilisées par l'industrie des semences pour réduire les coûts associés à la production de semences hybrides. Le fort intérêt agronomique pour les SMC a permis le développement de vastes programmes de recherche visant à déchiffrer la physiologie de ce caractère ainsi qu'à identifier les déterminants génétiques impliqués. Ces dernières années, des progrès importants ont été faits pour comprendre le contrôle nucléaire des SMC et plusieurs loci nucléaires régulant l'expression des déterminants de la SMC ont été identifiés dans diverses espèces cultivées (Dahan & Mireau, 2013).

Les SMC gain de fonction sont toujours associées à l'expression d'ORF mitochondriales peu conservées et souvent chimériques. Ces ORF sont généralement co-transcrites avec des gènes mitochondriaux essentiels, et cette association favorise vraisemblablement la stabilité et le maintien des gènes de SMC à l'intérieur du génome mitochondrial (Budar et al., 2003). La façon dont les protéines induisant la SMC interfèrent avec le développement du pollen et la raison pour laquelle leurs effets inhibent seulement la production du gamétophyte mâle en dépit d'être exprimé de façon constitutive sont encore largement incomprises. La cytotoxicité de plusieurs protéines inductrices de SMC lorsqu'elles sont exprimées dans *E. coli* suggère fortement que ces protéines peuvent être préjudiciables à la respiration mitochondriale (Duroc et al., 2005; Wang et al., 2006). Il a été montré que certaines protéines de SMC formaient des pores dans la membrane interne mitochondriale, mais le mécanisme conduisant à l'avortement du pollen est encore inconnu (Dahan & Mireau, 2013).

La fertilité mâle peut être restaurée par l'expression de gènes nucléaires appelés restaurateurs de fertilité (Rf), qui rétablissent la production de pollen (de façon partielle ou totale, selon les cas). La plupart des gènes restaurateurs semblent fonctionner en prévenant l'expression de l'ARNm ou de la protéine inductrice de SMC (Budar & Pelletier, 2001; Uyttewaal et al., 2008a). La restauration de la fertilité est donc généralement associée à une forte réduction de la production de protéines mitochondriales induisant la SMC. Des perturbations dans l'abondance ou le profil des transcrits issus des gènes de SMC sont également souvent observées. Cependant, les mécanismes moléculaires exacts conduisant à la perte de la protéine de SMC n'ont pas été résolus dans la plupart des cas. Ces dernières



années, plusieurs gènes *Rf* ont été clonés à partir de diverses espèces cultivées et la majorité d'entre eux codent des protéines appartenant à la famille PPR (Dahan & Mireau, 2013).

Il a été montré que toutes ces protéines PPR restauratrices de fertilité (Rf-PPR) sont adressées à la mitochondrie et agissent en réduisant spécifiquement l'accumulation de l'ARNm mitochondrial associé à la SMC ou des protéines apparentées. La prévalence des protéines PPR dans la maturation des ARN mitochondriaux et chloroplastiques est maintenant largement documentée et le fait que de nombreux gènes *Rf* codent des protéines PPR est cohérent avec les rôles que ces protéines exercent sur les ARN mitochondriaux induisant des SMC (Schmitz-Linneweber & Small, 2008; Dahan & Mireau, 2013).

Contrairement à la plupart des fonctions mitochondriales présentes chez les organismes aérobies obligatoires, le caractère non-essentiel du phénotype lié aux SMC a permis aux systèmes SMC/*Rf* de représenter des modèles précieux pour étudier les interactions génétiques nucléo-mitochondriales chez les plantes. La caractérisation fonctionnelle des protéines PPR restauratrices a grandement participé à la compréhension de l'activité moléculaire des protéines PPR et démontré que les protéines PPR-*Rf* interfèrent avec l'expression des ARNm issus des gènes de SMC en mettant en place les mêmes mécanismes de maturation de l'ARN que mettent en place les protéines PPR « classiques » pour promouvoir l'expression de leur cible (Dahan & Mireau, 2013).

Néanmoins, tous les restaurateurs de fertilité ne sont pas des protéines PPR. La première exception décrite concerne la SMC du maïs, pour laquelle le restaurateur identifié, *Rf2* ne code pas une protéine PPR mais une aldéhyde déshydrogénase (Cui et al., 1996). Par la suite, d'autres restaurateurs non-PPR ont été identifiés et correspondent à une protéine riche en glycine (GRP162), une protéine comportant une homologie partielle avec les protéines porteuses d'acyl (*Rf17*) ou encore une protéine ayant une forte homologie avec une métallopeptidase (*bvORF20*) (Gaborieau et al., 2016).

Ci-après sont présentés plusieurs systèmes de SMC faisant intervenir des protéines restauratrices de la famille PPR.

#### 1.5.4.1.1. Stérilité mâle cytoplasmique identifiée chez le pétunia

Le clonage du gène *Rf-PPR592* du pétunia a été le premier révélant que les gènes *Rf* peuvent coder des PPR mitochondriales (Bentolila et al., 2002). Chez cette espèce, un seul cytoplasme est connu pour induire une SMC, et c'est le gène *pcf* qui en est responsable (Young & Hanson, 1987). Le gène *pcf* code une protéine chimère de 43 kDa, comprenant des portions de la sous-unité 9 de l'ATP synthase (*Atp9*) et de la sous-unité 2 de la Cytochrome Oxydase (*Cox2*) fusionnées à une ORF inconnue, nommée *urfS* (Young & Hanson, 1987). Le locus *Rf* de ce système contient deux gènes PPR hautement homologues : *Rf-PPR591* et *Rf-PPR592* (Bentolila et al., 2002). Ces deux gènes résultent d'une duplication récente et codent des protéines semblables à 93 %, mais seule *Rf-PPR592* porte l'activité restauratrice (Dahan & Mireau, 2013)

La protéine *Rf-PPR592* est capable de rétablir la production de pollen en diminuant la quantité de la protéine PCF (Gillman et al., 2007). Le site de liaison de *Rf-PPR592* pourrait être situé au niveau de la 5'UTR de l'ARNm *pcf*, ce qui soutient son rôle potentiel dans la maturation du transcrit (Pruitt & Hanson, 1991; Gillman et al., 2007). Il reste également possible que cette liaison prévienne la traduction de l'ARNm *pcf*, ce qui impliquerait un rôle indirect de *Rf-PPR592* dans la traduction de *pcf* (Bentolila et al., 2002).

#### 1.5.4.1.2. Stérilités mâles cytoplasmiques identifiées chez le radis

Peu de temps après l'identification du restaurateur du pétunia, les gènes *Rfo* et *Rfk1* restaurant la fertilité des SMC Ogura et Kosena du radis (*Raphanus sativus*), ont été simultanément identifiés par trois groupes différents (Desloire et al., 2003; Brown et al., 2003; Koizuka et al., 2003). Ces SMC dites « sœurs » sont respectivement causées par l'*ORF138* (Ogura) ou l'*ORF125* (Kosena), qui codent des protéines inductrices de stérilité presque identiques, mais ne montrant aucune homologie avec d'autres protéines connues (Bonhomme et al., 1992; Dahan & Mireau, 2013). Ces deux SMC proviennent du radis et ont été transférées avec succès au colza par fusion de protoplastes (Pelletier et al., 1983).

Les loci restaurateurs de fertilité des SMC Ogura et Kosena sont identiques et codent trois protéines PPR très semblables (PPR-A, PPR-B et PPR-C) parmi lesquelles une seule, PPR-B (aussi appelé *Rfo*), porte l'activité de restauration (Desloire et al., 2003; Brown et al., 2003;

Koizuka et al., 2003; Uyttewaal et al., 2008a). Des analyses cytologiques ont ensuite montré que l'élimination complète de l'ORF138 du tapis et les microspores était essentielle à la restauration de la fertilité, indiquant que les principaux lieux d'action de PPR-B résident dans ces tissus (Uyttewaal et al., 2008a). D'autres analyses ont montré que la restauration de la fertilité médiée par PPR-B n'influe pas sur la taille ni sur l'abondance de l'ARNm *orf138*, même d'une façon tissu-spécifique (Grelon et al., 1994; Krishnasamy & Makaroff, 1994; Uyttewaal et al., 2008a). L'ARNm *orf138* co-immunoprécipite spécifiquement avec la protéine PPR-B. Ces données favorisent l'hypothèse selon laquelle PPR-B pourrait entraver la traduction de l'ARNm *orf138* en empêchant l'association ou la progression des ribosomes mitochondriaux (Uyttewaal et al., 2008a).

#### 1.5.4.1.3. Stérilités mâles cytoplasmiques identifiées chez le riz

Chez le riz, des restaurateurs de fertilité contrôlant l'expression de deux systèmes de SMC génétiquement indépendants ont été identifiés. Dans le premier système, la stérilité mâle est induite par le locus mitochondrial *B-atp6*, qui comprend une copie du gène *ATP6* et une séquence en aval contenant une ORF prédite appelé *ORF79*, partiellement identique au gène *COX1* de riz (Kadowaki et al., 1990; Akagi et al., 1994). La restauration de la fertilité de cette SMC est associée au locus *Rf-1*. Le gène restaurateur, codant une protéine PPR, a été identifié par plusieurs groupes de recherche et a finalement été nommé *RF1A* (Wang et al., 2006; Kazama & Toriyama, 2003; Komori et al., 2004; Akagi et al., 2004).

Un second restaurateur, également codé par le locus *Rf-1* et nommé *RF1B*, code une protéine PPR partageant 70% d'identité avec *RF1A*. Les deux protéines RF1A et RF1B sont adressées aux mitochondries de riz et bloquent la production de la protéine cytotoxique ORF79 par deux mécanismes distincts. RF1A induit des clivages endonucléolytiques dans trois régions majeures de l'ARNm *B-atp6/orf79*, libérant les ARNm *B-atp6* et *orf79* sous forme monocistronique. La protéine RF1B, médie la dégradation complète de l'ARNm *B-atp6-orf79*, mais la façon dont cette dégradation est orchestrée n'est actuellement pas claire (Wang et al., 2006). La deuxième copie (normale) du transcrit *atp6* n'est pas affectée par RF1B, ce qui suggère que la déstabilisation post-transcriptionnelle de l'ARNm *B-atp6-orf79* se produit au travers des séquences présentes au sein de l'*orf79*. Il a également été montré que RF1A est épistatique sur RF1B (Wang et al., 2006; Dahan & Mireau, 2013).

Le troisième système de SMC décrit chez le riz est nommé Hong-Lian. Le gène *RF5* code une protéine PPR identique à RF1A, mais le mécanisme associé à la restauration de la SMC Hong-Lian diffère de la SMC BT. Bien que la SMC soit causée par un gène mitochondrial presque identique à *ORF79* (appelé *ORF79H*), la restauration de la fertilité implique également un clivage endonucléolytique en amont du transcrit *orf79H*. La protéine RF5 ne possède pas la capacité de se lier à la région inter-génique du transcrit *atp6-orfH79*, mais elle interagit avec la protéine riche en glycine GRP162, qui elle, lie ce transcrit. Les protéines RF5 et GRP162 font donc partie d'un complexe de restauration de la fertilité, qui clive le transcrit *atp6-orfH79 in vitro* (Liu et al., 2004; Hu et al., 2012).

D'autres restaurateurs de fertilité, Rf-3 et Rf-4 ont été identifiés pour la SMC WA chez le riz mais aucun gène causant la stérilité n'a encore été identifié (Zhang et al., 1997; Ahmadikhah & Karlov, 2006).

#### 1.5.4.1.4. Stérilité mâle cytoplasmique identifiée chez le sorgho

Chez le sorgho, le locus *Rf1* restaurant la SMC du cytoplasme A1 a été identifié. Il s'agit d'un locus de 32-kb codant quatre ORFs, dont le gène *PPR13*. Ce dernier constitue le meilleur gène candidat pour promouvoir l'activité de restauration de la fertilité. Contrairement à l'ensemble des gènes PPR-Rf connus, *PPR13* code une protéine PPR appartenant au sous-groupe PLS (Klein et al., 2001, 2005; Cheng et al., 2016). S'il est vérifié que *PPR13* est bien une protéine restauratrice, cela indiquerait que la restauration de fertilité du cytoplasme A1 implique l'édition d'un transcrit mitochondrial (Dahan & Mireau, 2013).

Un second locus restaurateur, *Rf5*, a été identifié chez le sorgho. Contrairement au locus *Rf1* qui restaure la fertilité mâle des plantes ayant le cytoplasme A1, *Rf5* restaure à la fois celles présentant les cytoplasmes A1 et A2 (Jordan et al., 2011, 2010).

#### 1.5.4.1.5. Stérilité mâle cytoplasmique chez *Arabidopsis thaliana*

Une stérilité mâle dite « cryptique » a été découverte chez *Arabidopsis thaliana*. Elle a été mise en évidence en croisant des accessions génétiquement éloignées : Shahdara (Sha) originaire du Tadjikistan, et Monte-Rosso (Mr-0) originaire d'Italie. La stérilité mâle résulte de l'interaction entre le cytoplasme de Sha et deux régions du génome nucléaire de Mr-0,

localisées sur les chromosomes 1 et 3. Le facteur stérilisant du cytoplasme Sha correspondrait à une ORF mitochondriale nommée *orf117Sha* (Gobron et al., 2013).

Les auteurs ont montré que dans ce cas précis, l'avortement du pollen est dû à deux causes différentes. Tout d'abord, le cytoplasme Shahdara induit une stérilité mâle cytoplasmique gamétophytique contrôlée par plusieurs loci nucléaires (comportant des protéines PPR). Ensuite, des distorsions de ségrégation conduisant à un avortement du pollen opèrent chez ces hybrides quel que soit le cytoplasme (effet appelé Pollen Killer). La stérilité complète des plantes portant le cytoplasme Shahdara et le noyau Mr-0 résulte de la liaison génétique entre les deux causes de la mortalité du pollen (Simon et al., 2016).

#### **1.5.4.1.1. Stérilité mâle cytoplasmique chez l'orge**

Chez l'orge, le locus *Rfm1* restaure la fertilité-mâle des cytoplasmes *msm1* et *msm2*. Le gène restaurateur n'a pas été cloné mais il pourrait s'agir, d'une protéine PPR de la sous-famille DYW (Ui et al., 2014).

#### **1.5.4.2. Les protéines PPR Rf-like (ou RFL)**

##### **1.5.4.2.1. Présentation générale**

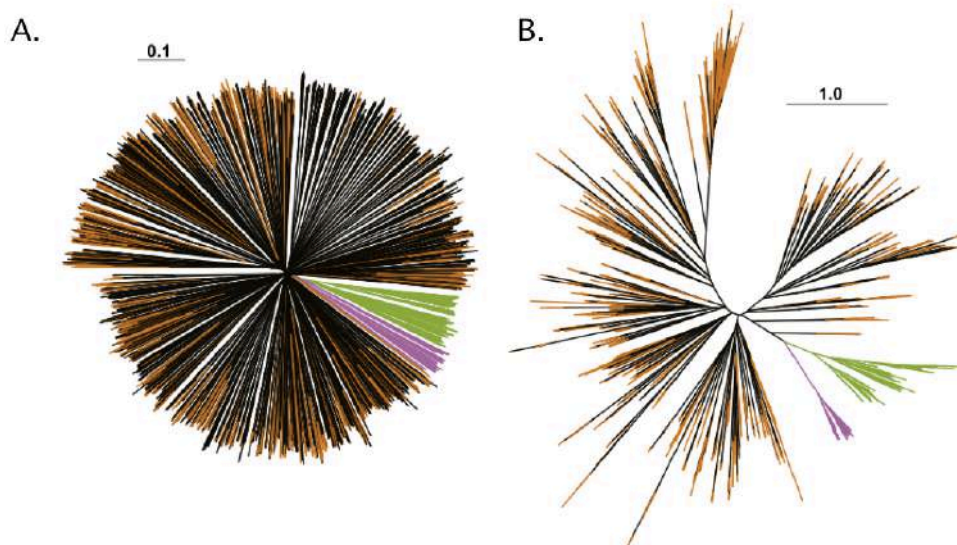
Les protéines RFL constituent un groupe de protéines PPR de type P partageant un fort niveau d'homologie avec les restaurateurs de fertilité identifiés. Elles sont de fait plus proches en séquence les unes des autres que des autres PPR et constituent un sous-groupe distinct de la famille PPR chez les angiospermes (Desloire et al., 2003; Geddy & Brown, 2007; O'Toole et al., 2008; Fujii & Small, 2011). Sur la base de ces homologies, des gènes RFL ont été identifiés chez de nombreux angiospermes, notamment *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Glycine max*, *Mimulus guttatus*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera*, et *Zea mays*. Néanmoins, aucune RFL n'a été trouvée chez *Carica papaya*, *Physcomitrella patens* ou encore *Selaginella moellendorffii* (Fujii et al., 2011).

Il y a relativement peu de protéines RFL en comparaison au nombre de protéines PPR chez les plantes terrestres (Tableau 2) (Schmitz-Linneweber & Small, 2008; Fujii et al., 2011).

Espèce	Nombre de protéines RFL
<i>Arabidopsis lyrata</i>	33
<i>Arabidopsis thaliana</i>	26
<i>Brachypodium distachyon</i>	9
<i>Glycine max</i>	41
<i>Mimulus guttatus</i>	13
<i>Oriza sativa (japonica)</i>	13
<i>Oriza sativa (indica)</i>	14
<i>Populus trichocarpa</i>	20
<i>Sorghum bicolor</i>	21
<i>Vitis vinifera</i>	10
<i>Zea mays</i>	5

**Tableau 2 - Nombre de protéines RFL identifiées chez diverses espèces de plantes terrestres (Fujii et al., 2011).**

Fujii et al. ont aligné les protéines PPR de type P des espèces précédemment citées (incluant 212 protéines RFL) pour créer des arbres phylogénétiques (Figure 20). Ces alignements ont permis de révéler que les protéines RFL ont une origine monophylétique chez les plantes et qu'elles sont apparues avant la divergence entre les monocotylédones et les dicotylédones (Fujii et al., 2011).



**Figure 20 - Arbres phylogénétiques résultant d'alignements multiples et montrant le niveau d'apparentement entre les protéines PPR de type P codées chez diverses espèces de plantes terrestres (Fujii et al., 2011).**

A. Arbre phylogénétique réalisé selon la méthode de « neighbor-joining » avec un peu plus de 2 400 protéines PPR de type P et n'ayant pas été sélectionnées sur la base d'un adressage vers un compartiment cellulaire particulier.

B. Arbre phylogénétique réalisé selon la méthode du « maximum de vraisemblance » et d'un peu plus de 1 000 protéines PPR ayant une forte probabilité d'être adressées à la mitochondrie.

Dans les deux cas, l'étude comprend 212 protéines RFL. La couleur orange correspond aux protéines PPR mitochondriales, le magenta aux protéines RFL de monocotylédones et le vert aux protéines RFL de dicotylédones.

Plusieurs caractéristiques font de la famille RFL une famille à part parmi les protéines PPR. Tout d'abord, contrairement à la plupart des gènes PPR pour lesquelles des orthologues putatifs peuvent être assez facilement identifiés dans d'autres espèces, les RFL forment des groupes de paralogues spécifiques à chaque organisme (Fujii et al., 2011). En effet, la conservation fonctionnelle des gènes PPR au cours de l'évolution, avec des pertes et gains limités chez la plupart des espèces, suggère qu'ils sont soumis à une pression de sélection « conservative ». Cela sous tend le rôle essentiel que tiennent ces protéines dans le fonctionnement des organites, datant d'avant la divergence entre les mono- et les dicotylédones (O'Toole et al., 2008). De façon opposée, le faible niveau de conservation apparent des gènes RFL entre espèces met en avant des contraintes évolutives diversifiantes. De plus, il a été montré que les acides aminés aux positions 1, 3 et 6 des répétitions PPR des RFL sont 5 à 15 fois plus variables que les acides aminés aux mêmes positions chez les PPR non-RFL (Fujii et al., 2011). Cela est d'autant plus intéressant que les

acides aminés aux positions 1 et 6 sont impliqués dans la spécificité de reconnaissance des protéines PPR vis à vis de leurs cibles ARN (cf. point 1.5.5).

Une autre différence importante entre les gènes PPR « classiques » et les RFL concerne leur distribution au sein du génome. Alors que les gènes PPR sont répartis aléatoirement sur tous les chromosomes, les gènes RFL se présentent principalement en cluster dans des régions génomiques non conservées. Chez *Arabidopsis thaliana*, la plupart des gènes RFL se trouvent dans deux régions sur chromosome 1 (Lurin et al., 2004). Ceci est cohérent avec le fait que les gènes *Rf* se retrouvent généralement dans des régions chromosomiques riches en gènes PPR dans plusieurs systèmes de SMC (Brown et al., 2003; Desloire et al., 2003; Wang et al., 2006; Uyttewaal et al., 2008a; Barr & Fishman, 2010).

L'existence de clusters de gènes RFL très proches en séquence est un indicateur de la duplication locale des gènes de cette sous-famille. Elle constitue un réservoir de gènes PPR évoluant activement par un processus de sélection de type « naissance et mort » impliquant des duplications de gènes, des recombinaisons alléliques, et enfin une sélection jusqu'à une divergence fonctionnelle. Ceci est en contraste complet avec le reste de la famille PPR, qui a évolué principalement par rétro-transposition (O'Toole et al., 2008). De plus, la sélection diversifiante a conduit à élargir les spécificités de reconnaissance des RFL, et donc à multiplier les possibilités de liaison vis-à-vis des ARNs (Fujii et al., 2011).

#### **1.5.4.2.2. Les protéines RFL caractérisées chez *Arabidopsis thaliana*.**

Aujourd'hui, seules 5 des 26 protéines RFL identifiées chez *Arabidopsis thaliana* ont été caractérisées fonctionnellement, et aucune d'entre elles n'a été associée à la suppression d'une SMC. Leur caractérisation a résulté entre autres d'une analyse comparative des extrémités 5' et 3' majeures dans différentes accessions d'*Arabidopsis thaliana* (Forner et al., 2007; Arnal et al., 2014; Fujii et al., 2016). Ces études ont confirmé que les ARNm mitochondriaux sont maturés différenciellement selon les différentes accessions. Des analyses génétiques ont montré que la plupart de ces différences étaient dues à un seul locus nucléaire dominant (Dahan & Mireau, 2013).



Ci-après sont présentées les cinq protéines RFL caractérisées à ce jour chez *Arabidopsis*.

### **La protéine RPF1**

La caractérisation de déterminants génétiques associés à la maturation différentielle en 5' de l'ARNm *nad4* chez *Arabidopsis* a conduit à l'identification du gène *RPF1* (RNA Processing Factor 1), codant une protéine RFL. La présence d'une copie fonctionnelle de *RPF1* corrèle avec la production d'une extrémité 5' de l'ARNm *nad4* située 228 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction chez les accessions Col-0 et C24. Les allèles *RPF1* dans les accessions présentant une 5'UTR de *nad4* différente de celle trouvée en majorité chez Col-0 et C24 présentent la même mutation stop dans la séquence codante de *RPF1*, prévenant la production d'une protéine RPF1 pleine longueur (Hölzle et al., 2011).

### **La protéine RPF2**

La protéine RFL RPF2 (RNA Processing Factor 2) est responsable de la production de l'extrémité 5' de l'ARNm mitochondrial *nad9* chez les accessions Col 0 et Landsberg erecta (Ler). L'analyse de mutants d'insertion ADN-T a montré que la protéine RPF2 est également responsable de la production de l'extrémité 5' majoritaire de l'ARNm *cox3*. L'analyse du gène *RPF2* chez *Arabidopsis* a révélé que les accessions C24, Oystese-1 et Yosemite-0 présentent des extrémités 5' pour les ARNm *nad9* et *cox3* différent de celles de Col-0 (Jonietz et al., 2010).

Les mutants *rpf1* et *rpf2* accumulent certains transcrits mitochondriaux rallongés en 5' sans que cela n'affecte leur abondance (Dahan & Mireau, 2013). Ces transcrits modifiés n'influent pas sur les niveaux d'accumulation des protéines mitochondriales correspondantes, ce qui indique que les extrémités 5' générées par les protéines RPF1 et RPF2 ne sont pas essentielles à la traduction de leurs cibles (Dahan & Mireau, 2013).

### **La protéine RPF3**

Une troisième étude a révélé la fonction du gène RFL *RPF3*, et a montré qu'il était essentiel à la maturation en 5' de l'ARNm mitochondrial *ccmC*. La stabilité du transcrit *ccmC* non mûri en 5' étant fortement amoindrie, ceci indique un rôle possible de la protéine RPF3

dans la stabilisation de cet ARNm, en plus d'être impliquée dans sa maturation. Néanmoins, malgré la diminution importante de l'accumulation de la protéine CcmC, les plantes mutantes *rpf3* présentent un phénotype sauvage (Jonietz et al., 2011).

### **La protéine RFL9**

La protéine PPR RFL9 a été caractérisée par notre équipe, et a été la première des protéines RFL caractérisées à avoir un rôle différent de la maturation de l'extrémité 5' de sa cible (Arnal *et al.*, 2014). Elle est associée à un clivage endonucléolytique partiel à l'intérieur de la séquence codante de l'ARNm *rps3* et de l'ORF mitochondriale 240a (*ORF240a*). Chez les mutants *rfl9*, le transcrite *rps3* clivé ne comprend plus le codon d'initiation de la traduction de l'ARNm *rps3*, puisque ce clivage survient 15 à 27 nucléotides en aval de l'AUG (Arnal et al., 2014).

Le clivage opéré par la protéine RFL9, en plus d'être partiel, est rare chez *Arabidopsis*. En effet, sur un panel de 48 accessions regroupant l'essentiel de la diversité génétique chez *Arabidopsis*, seules Col-0 et Mh-1 présentent ce clivage ; toutes deux étant originaires de Pologne. La majorité des accessions présente en effet une substitution d'un acide aspartique en sérine (en position 152) qui inactive la protéine RFL9. Ceci suggère que cet acide aminé, situé en position 1 du motif PPR n°4 a un rôle crucial dans l'activité de RFL9 (Arnal et al., 2014).

Puisque la fonction des Rf connus consiste en la suppression de l'expression d'ORF associées à des SMC, les auteurs ont cherché à voir si RFL9 pouvait être impliquée dans la maturation d'une des nombreuses ORF non conservées présentes chez *Arabidopsis* (Leino et al., 2005; Arnal et al., 2014). Ils ont montré que l'*orf240a* était aussi la cible de RFL9 et qu'elle subissait une coupure 152 nucléotides en aval du codon AUG de l'ORF en présence d'une copie active de RFL9. Comme observé précédemment, la substitution de l'acide aspartique en position 152 empêche RFL9 de cliver l'ARNm *orf240a*. Les coupures dirigées par RFL9 ont lieu dans un segment de 554 nucléotides communs à *rps3* et à l'*orf240a*. Le fait que ces deux transcrits partagent cette région explique le double rôle de la protéine RFL9. Néanmoins, les mutants *rfl9* ne présentent aucune altération phénotypique visible, indiquant que la protéine RFL9 n'impacte pas significativement l'expression de l'ARNm *rps3* (Arnal et al., 2014).

## **La protéine RFL2**

La dernière protéine RFL caractérisée chez *Arabidopsis* est nommée RFL2 et est requise pour le clivage endonucléolytique de l'*orf291*, au milieu de la phase codante. Pour se produire, ce clivage requiert l'intervention de la RNase P à la fois *in vitro* et *in vivo*, probablement recrutée par la protéine RFL2. Les auteurs proposent que le site de clivage par la RNase P sur le transcrit *orf291* ait une structure similaire à celle des ARNt (Fujii et al., 2016).

### **1.5.4.2.3. Ce que l'on peut conclure au sujet des protéines RFL chez *Arabidopsis***

Les quelques études fonctionnelles réalisées sur les protéines RFL ont permis de montrer qu'elles étaient principalement impliquées dans la maturation en 5' de transcrits mitochondriaux (Dahan & Mireau, 2013). La détection de fragment d'ARN situé en 5' des sites de clivage suggère fortement que la maturation médiée par ces protéines implique le recrutement d'une endoribonucléase et non le blocage d'une exoribonucléase 5'→3' (comme proposé dans le chloroplaste) (Pfalz et al., 2009; Haili et al., 2013). Ce mécanisme est similaire au mode d'action de certaines PPR-Rf comme la protéine RF1a chez le riz (Cf. paragraphe 1.5.4.1.3.) (Wang et al., 2006). Cependant, la maturation en 5' médiée par clivage endoribonucléolytique est également associée aux PPR mitochondriales classiques, ce qui exclut un rôle exclusif des protéines RFL dans ce type de prise en charge des transcrits (Dahan & Mireau, 2013).

Comme précisé ci-avant, les activités portées par les protéines RFL caractérisées aujourd'hui ne semblent pas être essentielles pour l'expression de leur ARNm cible, et les mutant *rfl* correspondant ne présentent pas d'anomalie phénotypique visible. La maturation différentielle des extrémités 5' des ARNm mitochondriaux peut néanmoins altérer des caractères plus subtils, comme la capacité adaptative de différentes accessions d'*Arabidopsis* présentant des allèles distincts de gènes *RFL* particuliers (Dahan & Mireau, 2013).

Ce qui apparaît clairement est que la suppression de ces gènes ne conduit pas à l'apparition de phénotypes male-stériles, et que les plantes mutantes sont complètement fertiles. De plus, une partie des cibles des RFL caractérisées correspondent à des ARNm mitochondriaux conservés, ce qui est en opposition par rapport aux PPR-Rf qui ont le plus

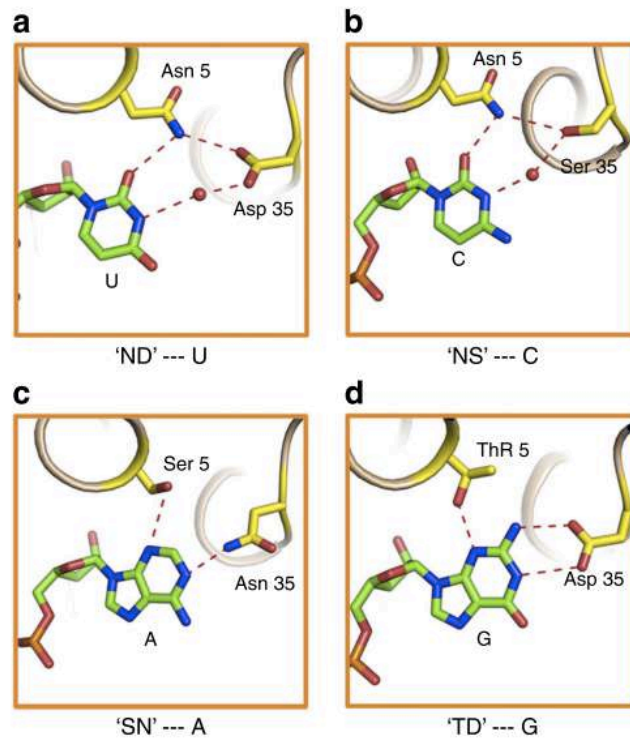
souvent pour cible des transcrits issus d'ORF non-conservées et souvent recombinaison. Ceci est néanmoins le cas pour les transcrits *orf240A* et *orf291*, mais, encore une fois, les mutants respectifs des RFL correspondantes ne sont pas mâles stériles (Dahan & Mireau, 2013; Arnal et al., 2014; Fujii et al., 2016).

### 1.5.5. Le code PPR

Les répétitions PPR lient l'ARN selon un mécanisme de reconnaissance modulaire, qui diffère de ceux précédemment décrits pour des interactions protéine-ARN et qui suggère l'existence chez les plantes d'une bibliothèque naturelle de partenaires protéine-ARN spécifiques d'une taille et d'une diversité sans précédent. De plus, la plasticité évolutive de ces protéines suggère que les motifs PPR sont particulièrement adaptés, du fait de cette reconnaissance modulaire, au développement de nouvelles spécificités de fonctions (Barkan et al., 2012).

Le modèle de reconnaissance séquence-spécifique des ARNs par les répétitions PPR, suggéré pour la première fois par Fujii et al. en 2011, a été développé à partir la protéine PPR10 du maïs, pour laquelle les sites de liaison et mécanismes moléculaires étaient particulièrement bien connus (Pfalz et al., 2009; Prikryl et al., 2011; Barkan et al., 2012). Il s'agit d'une protéine ayant 19 répétitions PPR, localisée dans le chloroplaste et liant deux ARNm différents ayant une similarité de séquence importante (Barkan et al., 2012).

Pour déterminer le mode de liaison d'une protéine PPR sur son ARNm cible, Barkan et ses collaborateurs sont partis du principe que chaque motif PPR entrainait en contact avec une base ARN. Ces suppositions étaient basées sur la similarité entre le nombre de répétitions PPR d'une protéine et le nombre de nucléotides des sites de liaison respectifs (Prikryl et al., 2011; Barkan et al., 2012; Okuda & Shikanai, 2012). Ces corrélations ont par la suite été confirmées par d'autres protéines PPR telles que HCF152 et CRP1 (Barkan et al., 2012). Chaque répétition PPR interagit avec un nucléotide de son ARN cible au travers de liaisons hydrogènes spécifiques, ce qui explique pourquoi les protéines PPR sont incapables de lier des ARNs double brins. Par exemple, le couple d'acides aminés ND lie préférentiellement l'uracile, le couple NS la cytosine, le couple SN l'adénine et le couple TD la guanine (Figure 21) (Shen et al., 2016).



**Figure 21 – Bases structurales de la reconnaissance des nucléotides par les répétitions PPR (Shen et al., 2016)**

Les acides aminés ciblent sélectivement les nucléotides en formant des liaisons hydrogène directes ou indirectes avec les nucléotides cibles. Les liaisons engagées dans la reconnaissance spécifiques des bases U (a), C (b), A (c) et G (d) par les répétitions PPR sont schématisées. Les chaînes latérales des résidus 5 et 35 de chaque répétition PPR sont représentées en jaune. Les bases sont colorées selon le type d'atome (carbone : vert, oxygène : rouge, azote : bleu). Les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes pointillées rouges. Les abréviations à une lettre pour les acides aminés et les nucléotides sont les suivantes : D, Asp ; N, Asn ; S, Ser ; T, Thr ; A, Adénine ; C, Cytosine ; G, Guanine et U, Uracile.

Les motifs PPR lient l'ARN dans une orientation parallèle *via* un mécanisme de reconnaissance modulaire. La spécificité du nucléotide lié dépendant des acides aminés présents à la position 6 d'une répétition et la position 1 de la répétition suivante (appelée 1'), ceci pour chaque répétition. La modification des acides aminés en position 6 et 1' de deux répétitions PPR adjacentes est suffisante pour modifier la spécificité de liaison, ce qui suggère que les acides aminés présents aux autres positions ne contribuent que très faiblement à la spécificité de reconnaissance (Barkan et al., 2012; Yagi et al., 2013; Takenaka et al., 2013; Shen et al., 2016).

De plus, le code PPR est dégénéré dans la mesure où de multiples combinaisons d'acides aminés aux positions 6 et 1' peuvent lier le même nucléotide, et que la même combinaison d'acides aminés à ces positions peut lier plusieurs nucléotides, même si certaines associations sont privilégiées (Barkan & Small, 2014; Yagi et al., 2013; Barkan et al., 2012; Cheng et al., 2016; Shen et al., 2016) (Barkan et al., 2012; Yagi et al., 2013; Barkan & Small, 2014; Cheng et al., 2016; Shen et al., 2016).

Depuis leur découverte en 2000, plusieurs matrices d'identification des motifs PPR ont été développées. Selon les auteurs, le premier résidu définissant l'origine du motif PPR n'est pas positionné au même endroit, impliquant des décalages de quelques acides aminés entre les prédictions. Sur la base de la structure résolue des motifs PPR, Cheng et al. ont récemment proposé en 2016 d'uniformiser les prédictions en se basant sur l'étude de Yin et al., datant de 2013, où le motif PPR démarre au premier acide aminé de la première hélice (Figure 22). Ce choix est justifié sur les plans fonctionnels et structurels. Tout d'abord, il présente l'avantage pratique que les deux acides aminés principalement impliqués dans la reconnaissance des nucléotides ARN soient ainsi définis au sein du même motif PPR (en l'occurrence le cinquième résidu dans la première hélice et le dernier résidu de la boucle interconnectant les motifs adjacents, soit les acides aminés présents aux positions 5 et 35) (Cheng et al., 2016; Yin et al., 2013). Deuxièmement, dans le cas des protéines PPR de type P, le résidu proline conservé présent deux résidus avant la première hélice (Gully et al., 2015) est impliqué dans des interactions inter-motifs et pourrait donc être attribué au motif précédent ou au motif suivant. Ainsi, il a été choisi d'utiliser la notation de Yin et al. faisant commencer les motifs au premier résidu de la première hélice (Cheng et al., 2016).

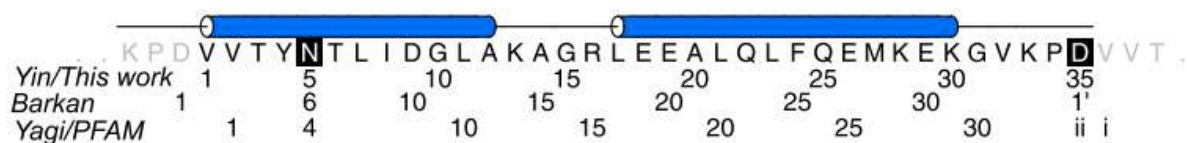


Figure 22 – Définition des motifs PPR par différentes équipes de recherche (Cheng et al., 2016)

Le motif PPR issu de (Gully et al., 2015) est représenté ainsi que les hélices correspondant aux cylindres bleus. Les acides aminés impliqués dans la reconnaissance de l'ARN sont encadrés en noir. Les trois systèmes de définition des motifs PPR les plus utilisés sont représentés : *Yin/this work* fait référence à (Yin et al., 2013) et (Cheng et al., 2016), *Barkan* à (Barkan et al., 2012) et *Yagi* à (Yagi et al., 2013).

## **1.6. L'expression du génome mitochondrial chez les plantes**

### **1.6.1. Import de protéines d'origine nucléaire dans la mitochondrie**

Le protéome mitochondrial d'*Arabidopsis* a été caractérisé par de nombreux moyens (Millar et al., 2001a; Krufft et al., 2001; Heazlewood et al., 2004; Millar et al., 2005; Klodmann & Braun, 2011; Taylor et al., 2011). Ces études ont permis d'assigner plus de 500 protéines à la mitochondrie d'*Arabidopsis*. Néanmoins, les outils de prédiction d'adressage lui assignent 1 500 à 2 500 protéines, même si le génome mitochondrial lui-même ne code qu'une toute petite fraction de ces protéines, 33 chez *Arabidopsis* (Unsel et al., 1997).

Plusieurs raisons sont avancées pour expliquer pourquoi on ne peut pas identifier autant de protéines mitochondriales qu'il y en a de prédites : il est difficile d'isoler et/ou de d'identifier des protéines très hydrophobes, très basiques ou encore faiblement abondantes par spectrométrie de masse ; ces caractéristiques étant en partie partagées par les protéines mitochondriales (Krufft et al., 2001; Klodmann et al., 2011).

Le moyen le plus utilisé pour l'import de protéines dans la matrice mitochondriale repose sur la charge positive d'hélices alpha amphipatiques localisées du côté N-terminal des protéines et qui joue un rôle de signal d'adressage mitochondrial. Des protéines cytosoliques chaperonnent les précurseurs mitochondriaux jusqu'à la machinerie d'import située sur la surface externe de la mitochondrie où les protéines sont prises en charges par des complexes spécifiques en fonction de leur destination finale (Wiedemann et al., 2004).

### **1.6.2. Le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana***

Les capacités de codage des génomes mitochondriaux sont très variables. Elles codent de 3 à 67 protéines (33 chez *Arabidopsis*), et 0 à 27 ARN de transfert (22 chez *Arabidopsis*) selon les organismes (Unsel et al., 1997; Adams & Palmer, 2003). La diversité du nombre de gènes codant des protéines reflète les différents degrés de transferts fonctionnels de gènes au noyau (Adams & Palmer, 2003). L'information contenue dans le génome mitochondrial des plantes est, bien qu'elle soit petite, essentielle pour chaque cellule.

Le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* a été complètement séquencé : il contient 57 gènes dans 366 924 paires de bases et comprend les éléments suivants (Figure 23) (Unsel et al., 1997) :

- Gènes (10 % du génome)
- Introns (8 % du génome)
- 85 ORFs de fonction inconnue mesurant plus de 100 acides aminés (10 % du génome)
- Duplications (7 % du génome)
- Retro-transposons d'origine nucléaire (4 % du génome)
- Séquences chloroplastiques (1 % du génome)
- Autres séquences, de fonction inconnue (60 % du génome)

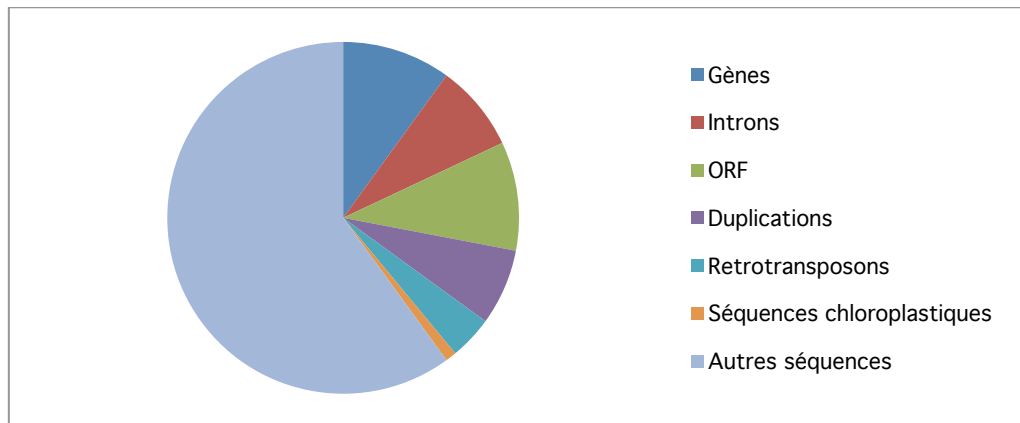


Figure 23 - Organisation du génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* (Unsel et al., 1997)

### 1.6.3. Transcription mitochondriale

L'arrangement physique des 57 gènes sur le génome mitochondrial d'*Arabidopsis* suggère le fait que plusieurs promoteurs sont nécessaires à leur transcription. En effet, il y a en moyenne une région codante tous les 8 kb (Unsel et al., 1997). Cette supposition a été confirmée par l'identification de 30 sites d'initiation de la transcription dans une étude globale de la transcription chez cette espèce (Kühn et al., 2005).



Dans la plupart des mitochondries, la transcription de l'ADN est effectuée par une ARN polymérase de type T7, importée à partir du cytosol (Andrés et al., 2007). La transcription est initiée à partir de promoteurs et donne lieu à des transcrits mono- ou polycistroniques. Chez *Arabidopsis*, 5 transcrits se présentent sous forme polycistronique : *rpl5-cob*, *rpl2-mttb*, *nad3-rps12*, *nad4L-atp3* et *rps3-rpl16*, 3 transcrits sous forme morcelée à trans-épisser : *nad1*, *nad2* et *nad5*, les 20 autres étant monocistroniques (Forner et al., 2007). Tandis que les polymérases codées par un phage ne nécessitent aucun cofacteur pour la reconnaissance de promoteurs, ce n'est pas le cas pour l'ARN polymérase mitochondriale (McCulloch et al., 2002). Chez les plantes dicotylédones, deux ARN polymérases de type T7 ont été identifiées : RPOTm and RPOTmp, la seconde étant doublement adressée à la mitochondrie et au chloroplaste (Kühn et al., 2009).

Etant donné les informations dont nous disposons sur les protéines PPR, il est probable qu'elles soient plutôt associées à des polymérases pour lier et stabiliser l'ARN naissant plutôt que l'ADN (Andrés et al., 2007). La seule protéine PPR ayant un rôle dans la transcription de l'ADN mitochondrial chez les plantes est nommée p63, et permet l'activation de la transcription de *COX2* grâce à sa liaison au niveau de la région promotrice du gène, chez le blé (Ikeda & Gray, 1999).

#### **1.6.4. Modifications post-transcriptionnelles des ARNm**

L'expression du génome des organites implique un certain nombre d'étapes post-transcriptionnelles distinctes. Les processus post-transcriptionnels tels que la maturation des UTR, l'épissage des introns, l'édition de l'ARN, la stabilisation des transcrits contrôlent de façon importante la quantité d'ARNm compétents pour la traduction (Binder & Brennicke, 2003).

##### **1.6.4.1. Stabilisation des ARNm**

La dégradation des ARNm dans les mitochondries est en général initiée à partir du côté 3' de la molécule par des RNases exoribonucléolytiques 3'→5'. Les éléments prévenant cette dégradation se trouvent donc généralement dans la région 3'UTR des transcrits (Binder & Brennicke, 2003). Dans les mitochondries végétales, un certain nombre de transcrits se terminent par une séquence répétée inversée, permettant, du moins en théorie, de former une structure tige-boucle empêchant la progression de nucléases (Schuster et al., 1986;

Forner et al., 2007). L'ARNm mature peut également être protégé mécaniquement de la dégradation par des exoribonucléases 3'->5' grâce à la fixation de protéines PPR (Haili et al., 2013; Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017).

Les protéines PPR mitochondriales permettant la stabilisation de leur ARNm cible chez les plantes sont listées dans le Tableau 3.

Protéine PPR	Rôle Principal	Mécanisme	Espèce	Références
MTSF1	Stabilisation en 3' de <i>nad4</i>	Fixation en 3'UTR	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Haili et al., 2013)
MTSF2/PPR19	Stabilisation en 3' d'un des pré-messagers de <i>nad1</i>	Fixation en 3'UTR	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017)

**Tableau 3 - Protéines PPR mitochondriales impliquées dans la stabilisation de transcrits mitochondriaux chez les plantes.**

#### 1.6.4.2. Epissage des introns

Les introns, quasi-exclusivement de groupe II dans les mitochondries végétales, ont perdu leur capacité à s'auto-épisser et nécessitent des cofacteurs protéiques pour leur épissage, dont les protéines PPR font partie (Binder & Brennicke, 2003; Barkan & Small, 2014). Les introns de groupe II possèdent une architecture 2D distincte comprenant six domaines (I à VI) et leur épissage consiste en une trans-estérification en deux étapes (Bonen & Vogel, 2001). Le seul intron de groupe I présent dans les mitochondries végétales concerne l'intron de *cox1* et est trouvé chez *Peperomia* (Cho et al., 1998; Bonen, 2008).

Il est proposé que la plupart des protéines PPR impliquées dans l'épissage de leur cible pourraient aider au repliement correct de l'intron concerné sous forme active. Le rôle précis que ces protéines tiennent dans l'épissage n'est pas connu à ce jour (Barkan & Small, 2014).

En plus d'introns linéaires « classiques », les mitochondries de plantes comportent un certain nombre d'introns morcelés, nommés trans-introns. *Arabidopsis thaliana* possède trois ARNm mitochondriaux porteur de ce type d'introns nécessitant d'être trans-épissés : *nad1*,

*nad2* et *nad5*. Cela signifie que plusieurs ARN pré-messagers sont assemblés post-transcriptionnellement pour former les transcrits matures, compétents pour la traduction. Le trans-épissage requiert des facteurs additionnels pour maintenir dans la bonne conformation les portions d'introns contenus dans les précurseurs ARN (Bonen & Vogel, 2001).

Les protéines PPR mitochondriales impliquées dans l'épissage des introns de groupe II chez les plantes sont listées dans le Tableau 4.

Protéine PPR	Rôle	Espèce	Références
ABO5	Epissage de l'intron 3 de <i>nad2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Liu et al., 2010)
ABO8	Epissage de l'intron 3 de <i>nad4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Yang et al., 2014)
BIR6	Epissage de l'intron 1 de <i>nad7</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Koprivova et al., 2010)
Dek2	Epissage de l'intron 1 de <i>nad1</i>	<i>Zea mays</i>	(Qi et al., 2017b)
Dek35	Epissage de l'intron 1 de <i>nad4</i>	<i>Zea mays</i>	(Chen et al., 2017)
Emp10	Epissage de l'intron 1 de <i>nad2</i>	<i>Zea mays</i>	(Cai et al., 2017)
Emp16	Epissage de l'intron 4 de <i>nad2</i>	<i>Zea mays</i>	(Xiu et al., 2016)
MTL1	Epissage de l'intron 2 de <i>nad7</i> , et des introns 1 et 2 de <i>nad2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Haili et al., 2016)
MTSF1	Epissage des introns 1 et 2 de <i>nad2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Haili et al., 2013)
MTSF2/PPR19	Epissage des introns 1 et 2 de <i>nad2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017)
OTP43	Trans-épissage de l'intron 1 de <i>nad1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(de Longevialle et al., 2007)
OTP439	Trans-épissage de l'intron 2 de <i>nad5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Colas des Francs-Small et al., 2014)
PpPPR_43	Epissage de l'intron 3 de <i>cox1</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Ichinose et al., 2012)

<b>SLO3</b>	Epissage de l'intron 2 de <i>nad7</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Hsieh et al., 2015)
<b>SLO4</b>	Epissage de l'intron 1 de <i>nad2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Weienberger et al., 2017)
<b>TANG2</b>	Trans-épissage de l'intron 3 de <i>nad5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Colas des Francs-Small et al., 2014)

**Tableau 4 - Protéines PPR mitochondriales impliquées dans l'épissage d'introns de groupe II chez les plantes**

### 1.6.4.3. Edition des ARNm mitochondriaux

#### 1.6.4.3.1. Considérations générales

L'édition des ARNm mitochondriaux chez les plantes consiste au remplacement de cytosines codées par l'ADN en uracile au niveau de l'ARN mature. Elle a été observée pour les ARN mitochondriaux et chloroplastiques mais pour aucun ARN cytoplasmique (Ichinose & Sugita, 2017). L'édition de l'ARNm a principalement lieu au niveau des séquences codantes (où elle change quasi systématiquement l'acide aminé codé), mais on en trouve aussi dans les introns et les UTR. De plus, elle se produit également au niveau des ARNt et ARNr (Binder & Brennicke, 2003; Bentolila et al., 2005, 2008). L'édition est très fréquente dans les mitochondries de plantes. En effet, on retrouve 619 sites édités chez *Arabidopsis* (Giegé & Brennicke, 1999; Bentolila et al., 2013b; Ichinose & Sugita, 2017), 491 chez le riz (Notsu et al., 2002) et plusieurs milliers chez le lycophyte, environ 2 100 dans la mitochondrie de *Selaginella moellendorffii* (Hecht et al., 2011) et environ 3 400 dans le chloroplaste de *Selaginella uncinata* (Oldenkott et al., 2014)

Dans la mitochondrie (tout comme dans le chloroplaste) d'*Arabidopsis*, aucune édition inverse d'uracile en cytosine n'a été identifiée (Bentolila et al., 2005; Takenaka et al., 2014). Cependant, dans les organites de certaines espèces, comme chez les lycophytes ou les fougères, un certain nombre d'événements d'édition concerne des changements d'uracile en cytosine, permettant notamment d'éliminer des codons stop en phase (Binder & Brennicke, 2003; Knie et al., 2016).

Les mécanismes mis en jeu pour l'édition des ARNm mitochondriaux et chloroplastiques sont certainement les mêmes. Des systèmes d'édition *in vitro* suggèrent que ce processus passe par la désamination de la cytosine. De plus, ils ont permis d'identifier la région de l'ARNm essentielle pour une édition efficace. Dans les organites de plantes, cette région correspond aux 20 nucléotides avant et aux 10 nucléotides après le site à éditer (Yu & Schuster, 1995; Farre et al., 2001; Reed et al., 2001; Takenaka et al., 2004).

#### **1.6.4.3.2. Implication des motifs C-terminaux dans l'édition des ARNm**

Il a été proposé que le motif DYW des protéines PPR PLS puisse être un domaine catalytique dans la mesure où, d'une part, il partage des résidus conservés pouvant lier le zinc avec les cytidines désaminases et d'autre part, la distribution phylogénétique du domaine DYW est strictement corrélée à l'édition des ARNs dans les organites. Il a été montré *in vitro* que le domaine DYW peut lier deux atomes de zinc par polypeptide et *in vivo* qu'il est indispensable pour l'édition de l'ARN (Salone et al., 2007; Hayes et al., 2013; Boussardon et al., 2014; Shikanai, 2015). Certains facteurs d'édition ne comprennent pas domaine DYW, comme CRR4 (chloroplastique). Dans ces cas, il semble que ces protéines PPR puissent recruter un domaine DYW fonctionnel à partir d'autres protéines, comme cela a été montré pour la protéine PPR chloroplastique CRR4 qui s'associe à la protéine DYW1 pour être active (Boussardon et al., 2012). Il a été montré dans le cas de la protéine PPR mitochondriale MEF12 chez *Arabidopsis*, qu'une altération de séquence du domaine E perturbe l'activité de la protéine PPR. Il est donc probable qu'à l'inverse du domaine DYW, le domaine E ne puisse pas être recruté en trans (Härtel et al., 2013b).

#### **1.6.4.3.3. Intervention de protéines non-PPR dans l'éditosome**

Malgré leur importance cruciale dans l'édition, les protéines PPR ne sont pas les seules à intervenir. En effet, il a été décrit une famille de protéines appelée MORF/RIP (Multiple Organellar RNA editing Factor / RNA editing factor interacting proteins), requises au niveau de la plupart des sites d'édition. Par exemple, dans la mitochondrie d'*Arabidopsis*, les protéines MORF8, MORF3 et MORF1 sont impliquées respectivement dans 77 %, 26 % et 19 % des événements d'édition (Sun et al., 2016). Les protéines MORF comportent une séquence conservée appelée MORF-box, forment des homo- et des hétéromères et

interagissent avec des protéines PPR qui reconnaissent les sites d'édition. La fonction moléculaire de la MORF-box est pour le moment inconnue, de plus, elle ne partage aucune similitude de séquence avec des domaines protéiques connus. Récemment, la structure des MORF-box de la protéine mitochondriale MORF1 et de la protéine chloroplastique MORF9 a été résolue et a permis de mettre en évidence que le domaine MORF présente des similarités structurales avec le domaine NFLD (N-terminal ferredoxin-like domain), conférant le positionnement de l'ARN dans certaines aminoacyl ARNt synthétases bactériennes. Ceci laisse ouverte la possibilité d'un contact direct entre les MORF et l'ARN à éditer (Haag et al., 2017). De plus, il a été montré dans le cas de MORF9 que sa présence permet d'augmenter considérablement l'activité de liaison aux ARNs d'une PPR PLS artificielle ainsi que de la PPR PLS naturelle LPA66 (Yan et al., 2017).

La machinerie d'édition des ARNs étant particulièrement complexe, d'autres familles de protéines sont impliquées comme les protéines ORRM (organelle RNA recognition motif), les protéines OZ (organelle zinc-finger) et la protéine PPO1 (protoporphyrinogen oxidase 1) (Sun et al., 2016).

#### 1.6.4.3.4. Protéines PPR impliquées dans l'édition d'ARNm mitochondriaux chez les plantes

Les protéines PPR impliquées dans l'édition d'ARNm mitochondriaux chez les plantes sont listées dans le Tableau 5.

Protéine PPR	Rôle	Espèce	Références
AHG11	Edition de <i>nad4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Murayama et al., 2012)
COD1	Edition de <i>cox2</i> et <i>nad4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Dahan et al., 2014)
CWM1	Edition de <i>ccmB</i> , <i>ccmC</i> et <i>nad5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Hu et al., 2016)
CWM2	Edition de <i>ccmC</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Hu et al., 2016)
Dek10	Edition de <i>nad3</i> et <i>cox2</i>	<i>Zea mays</i>	(Qi et al., 2017a)
Dek36	Edition d' <i>atp4</i> , <i>nad7</i> et <i>ccmF<sub>N</sub></i>	<i>Zea mays</i>	(Wang et al., 2017b)
Emp5	Edition de <i>rpl16</i> , <i>nad9</i> , <i>cox3</i> et <i>rps12</i>	<i>Zea mays</i>	(Liu et al., 2013)

## Introduction

<b>Emp5</b>	Edition de <i>rpl16</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Liu et al., 2013)
<b>Emp7</b>	Edition de <i>ccmF<sub>N</sub></i>	<i>Zea mays</i>	(Sun et al., 2015)
<b>Emp9</b>	Edition de <i>ccmB</i> et <i>rps4</i>	<i>Zea mays</i>	(Yang et al., 2017)
<b>GRS1</b>	Edition de <i>nad1</i> , <i>nad4L</i> , <i>nad6</i> et <i>rps4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Xie et al., 2016)
<b>MEF1</b>	Edition de <i>rps4</i> , <i>nad7</i> et <i>nad2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Zehrmann et al., 2009)
<b>MEF3</b>	Edition de <i>atp4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Verbitskiy et al., 2012a)
<b>MEF7</b>	Edition de <i>cob</i> , <i>ccmB</i> , <i>nad2</i> et <i>nad4L</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Zehrmann et al., 2012)
<b>MEF8</b>	Edition de <i>nad5</i> et <i>nad6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Verbitskiy et al., 2012b)
<b>MEF8S</b>	Edition de <i>nad5</i> et <i>nad6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Verbitskiy et al., 2012b)
<b>MEF9</b>	Edition de <i>nad7</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Takenaka et al., 2010)
<b>MEF10</b>	Edition de <i>nad2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Härtel et al., 2013a)
<b>MEF11/LO11</b>	Edition de <i>cox3</i> , <i>nad4</i> , et <i>ccmF<sub>N2</sub></i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Verbitskiy et al., 2010; Sechet et al., 2015)
<b>MEF12</b>	Edition de <i>nad5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Härtel et al., 2013b)
<b>MEF13</b>	Edition de <i>ccmF<sub>C</sub></i> , <i>cox3</i> , <i>nad2</i> , <i>nad4</i> et <i>nad5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Glass et al., 2015)
<b>MEF14</b>	Edition de <i>matR</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Verbitskiy et al., 2011)
<b>MEF18</b>	Edition de <i>nad4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Takenaka et al., 2010)
<b>MEF19</b>	Edition de <i>ccmB</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Takenaka et al., 2010)
<b>MEF20</b>	Edition de <i>rps4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Takenaka et al., 2010)
<b>MEF21</b>	Edition de <i>cox3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Takenaka et al., 2010)
<b>MEF22</b>	Edition de <i>nad3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Takenaka et al., 2010)
<b>MEF25</b>	Edition de <i>nad1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Arenas-M et al., 2013)
<b>MEF26</b>	Edition de <i>cox3</i> et <i>nad4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Arenas-M. et al., 2014)
<b>MEF29</b>	Edition de <i>nad5</i> et <i>cob</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Sosso et al., 2012)
<b>MEF32</b>	Edition de <i>nad1</i> , <i>ccmB</i> et <i>cox2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Takenaka et al., 2013)
<b>MEF35</b>	Edition de <i>cob</i> , <i>nad4</i> et <i>rpl16</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Brehme et al., 2015)
<b>MPR25</b>	Edition de <i>nad5</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Toda et al., 2012)
<b>OGR1</b>	Edition de <i>cox2</i> , <i>cox3</i> , <i>ccmC</i> , <i>nad2</i> et <i>nad4</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Kim et al., 2009)
<b>OTP71</b>	Edition de <i>ccmF<sub>N2</sub></i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Chateigner-Boutin et al., 2013)
<b>OTP72</b>	Edition de <i>rpl16</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Chateigner-Boutin et al., 2013)
<b>OTP87</b>	Edition de <i>nad7</i> et <i>atp1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Hammani et al., 2011a)

Introduction

PPME	Edition de <i>nad1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Leu et al., 2016)
PpPPR_56	Edition de <i>nad3</i> et <i>nad4</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Ohtani et al., 2010)
PpPPR_65	Edition de <i>ccmF<sub>C</sub></i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Ichinose et al., 2013)
PpPPR_71	Edition de <i>ccmF<sub>C</sub></i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Tasaki et al., 2010)
PpPPR_77	Edition de <i>cox2</i> et <i>cox3</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Ohtani et al., 2010)
PpPPR_78	Edition de <i>cox1</i> et <i>rps14</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Uchida et al., 2011)
PpPPR_79	Edition de <i>nad5</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Uchida et al., 2011)
PpPPR_91	Edition de <i>nad5</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Ohtani et al., 2010)
PpPPR_98	Edition d' <i>atp9</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	(Ichinose et al., 2013)
PPR2263	Edition de <i>nad5</i> et <i>cob</i>	<i>Zea Mays</i>	(Sosso et al., 2012)
PPR596	Edition de <i>rps3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Doniwa et al., 2010)
REME1	Edition de <i>nad2</i> et <i>orfX</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Bentolila et al., 2010)
REME2	Edition de <i>rps3</i> et <i>rps4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Bentolila et al., 2013a)
SLG1	Edition de <i>nad3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Yuan & Liu, 2012)
SLO1	Edition de <i>nad4</i> et <i>nad9</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Sung et al., 2010)
SLO2	Edition de <i>mttB</i> , <i>nad1</i> , <i>nad4L</i> et <i>nad7</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Zhu et al., 2012b, 2012a)
SLO4	Edition de <i>nad4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Weienberger et al., 2017)
SMK1	Edition de <i>nad7</i>	<i>Zea mays &amp; Oryza sativa</i>	(Li et al., 2014b)

Tableau 5 - Protéines PPR mitochondriales impliquées dans l'édition des cytosines en uracile, chez les plantes



#### 1.6.4.4. Maturation des extrémités 5' et 3' des ARNm mitochondriaux

Après la transcription des gènes mitochondriaux en transcrits primaires, les ARNm voient le plus souvent leur extrémités 5' et 3' raccourcies. En 2007, Forner et al. ont cartographié les extrémités 5' et 3' de tous les gènes mitochondriaux d'*Arabidopsis thaliana* codant des protéines. La plupart des transcrits présentent une extrémité 3' unique tandis qu'ils comportent plusieurs extrémités 5'. Seul un petit nombre d'extrémités 5' ont été trouvées au niveau de séquences promotrices, la grande majorité d'entre elles étant générées post-transcriptionnellement. L'analyse des séquences environnant les extrémités 5' et 3' a révélé que leur terminaison coïncidait parfois avec la fin d'éléments t ou de structures tige-boucle, ce qui suggère que les RNases Z et P sont parfois impliquées dans cette maturation, puisqu'elles sont impliquées dans la maturation des ARNt (Forner et al., 2007).

Les protéines PPR peuvent également être impliquées dans la maturation en 5' des ARNm mitochondriaux (Tableau 6), mais ne semblent pas porter d'activité endonucléasique. Chez *Arabidopsis*, les protéines MNU1 et MNU2 (Mitochondrial Nuclease 1 et 2) ont été identifiées comme jouant ce rôle de nucléase, complémentaire à celui des protéines PPR (Stoll & Binder, 2016).

Le fait qu'un certain nombre d'ARNm présentent de multiples extrémités 5' soulève la question suivante : pourquoi certains ARNm gardent leur extrémité 5' originale tandis que d'autres la voient maturée ? La nature de la 5'UTR pourrait influencer la traduction et il est possible que certains ARNm ne soient compétents pour la traduction qu'après avoir été maturés. Deux scénarios sont possibles : soit la séquence d'entrée des ribosomes est bloquée chez l'ARNm non maturé, soit la liaison de facteurs de traduction est impossible avant la maturation (Forner et al., 2007). Le premier scénario semble peu plausible dans la mesure où aucune séquence de type Shine-Dalgarno n'a été identifiée dans les mitochondries végétales. Bien que des éléments de séquence conservée aient été trouvés en 5' de quelques ARNm, le fait qu'ils ne soient pas tous concernés exclut un mécanisme général d'action. De plus, il n'existe pas de preuve expérimentale montrant l'importance de ces séquences. Le second scénario est donc le plus probable (Pring et al., 1992; Forner et al., 2007).

En ce qui concerne la maturation de l'extrémité 3' des ARNm mitochondriaux, il semblerait qu'il n'y ait pas de structure primaire, ni d'éléments de structures secondaires conservés, c'est donc que des déterminants spécifiques de chaque ARNm doivent exister (Forner et al., 2007). C'est le cas des protéines MTSF1 et MTSF2 (PPR19) présentées dans la partie 1.6.4.1., stabilisant respectivement l'ARNm *nad4* et le pré-messager central de *nad1* (Haïli et al., 2013; Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017).

Les protéines PPR mitochondriales impliquées dans la maturation de l'extrémité 5' de leur cible ou dans des clivages au sein de leur séquence codante chez les plantes sont listées dans le Tableau 6.

Protéine PPR	Rôle	Espèce	Références
RFL2	Clivage dans la phase codante de l' <i>orf291</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Fujii et al., 2016)
RFL9	Clivage dans la phase codante de <i>rps3</i> et de l' <i>orf240A</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Arnal et al., 2014)
RPF1	Maturation en 5' de <i>nad4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Hölzle et al., 2011)
RPF2	Maturation en 5' de <i>nad9</i> et <i>cox3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Jonietz et al., 2010)
RPF3	Maturation en 5' de <i>ccmC</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Jonietz et al., 2011)
RPF4	Maturation en 5' de <i>ccmB</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Stoll et al., 2017)
RPF5	Maturation en 5' de <i>nad6</i> , <i>atp9</i> et l' <i>ARN26S</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Hauler et al., 2013)
RPF6	Maturation en 5' de <i>ccmC</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Stoll et al., 2015)
RPF7	Maturation en 5' de <i>nad2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Stoll et al., 2014)
PPR6	Maturation en 5' / Traduction de <i>rps3</i>	<i>Zea mays</i>	(Manavski et al., 2012)

**Tableau 6 - Protéines PPR mitochondriales impliquées dans la maturation d'extrémités 5' de leur cible ou dans des clivages au sein de leur séquence codante chez les plantes**

Les protéines PPR RPF1, RPF2, RPF3, RFL2 et RFL9 font partie de la sous-famille Rf-like.

#### **1.6.4.5. La traduction mitochondriale**

Cette partie a été traitée dans le projet de revue ci-après (Section 2).



# Projet de revue : La traduction mitochondriale



## 2. Traduction mitochondriale : Projet de revue

### Composition and functioning of the mitochondrial translational apparatus.

Noelya Planchard<sup>1,2</sup>, Hakim Mireau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, RD10, 78026 Versailles Cedex, France

<sup>2</sup>Paris-Sud University, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

*Cette revue sera publiée dans l'ouvrage Nucleic Acid and Molecular Biology de Springer*

#### 2.1. Introduction

Mitochondria have an exogenous origin and come from the endosymbiosis of an  $\alpha$ -proteobacteria (Gray et al., 1999; Gray, 2012). They house a large number of essential functions of eukaryotic cells, the primary of which being their role in the energy metabolism. They are effectively the site of the cellular respiration, coupling the oxydation of NADH with the phosphorylation of ADP into ATP by the ATP synthase. Mitochondria are also involved in many anabolic reactions like the synthesis of amino acids, nucleotides, fatty acids, vitamins, prosthetic groups such as heme, biotin and lipoic acid (Rébeillé et al., 1997; Bartoli et al., 2000; Gueguen et al., 2000; Baldet et al., 1993). Moreover, mitochondria play a central role in apoptosis in mammals (Gottlieb, 2000), and responds to cellular signals such as oxidative stress (Moller, 2001; Sweetlove et al., 2002). Mitochondria of plants carry additional functions (Mackenzie & McIntosh, 1999). For instance, they indirectly participate in photosynthesis, as glycine decarboxylation (an important step in the photorespiratory pathway) takes place in mitochondria (Raghavendra et al., 1998) and causes cytoplasmic male sterility (CMS) (Chen & Liu, 2014).

To achieve all these functions, mitochondria require a large number of proteins, most of which are encoded by the nucleus and imported into the matrix after translation (Murcha et al., 2014). However, a few proteins, that are mostly hydrophobic, are produced by mitochondria, which possess their own genome inherited from the  $\alpha$ -proteobacteria, varying in size and content depending on organisms (Andersson & Kurland, 1998a; Gray et al., 1999).

The mitochondrial genome, localized in the matrix, encode 13 proteins in humans, 8 in yeast, 33 in *Arabidopsis thaliana* and most of the necessary RNAs (rRNAs and tRNAs) for intra-mitochondrial protein synthesis. All other components arise from the cytosol (Unseld et al., 1997; Braun & Schmitz, 1999; Laloi, 1999; Anderson et al., 1981; Ott et al., 2016). It is therefore a small genome, far from coding all the necessary proteins for mitochondrial functions, but the genes it contains are essential for the cell and the whole organism.

Human mitochondria contain a 16.6 kb circular genome, which is transcribed on both strands into two polycistronic transcripts which are cleaved into nine monocistronic mRNAs, two bicistronic mRNAs (encoding 13 final proteins), 2 rRNAs (12S and 16S), and 22 tRNAs. All proteins encoded by human mitochondria are involved in the respiratory chain (Anderson et al., 1981; Wolf & Mootha, 2014). Yeast mitochondrial genome is a 75 kb circular genome, transcribed in one bicistronic and 6 monocistronic mRNA (encoding 8 final proteins), 2 rRNAs (15S and 21S), 24 tRNAs, and the 9S RNA component of RNase P (Ott et al., 2016). The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is a 366 kb circular genome, transcribed into 5 bi-cistronic mRNAs, 3 fragmented mRNA which have to be trans-spliced, 20 monocistronic mRNAs (encoding 33 final proteins), 3 rRNAs (5S, 18S and 26S) and 22 tRNAs (Unseld et al., 1997).

Before being translated, mitochondrial mRNAs go through many stages of post-transcriptional modifications. In mammals, all mitochondrial mRNAs (except *nad6*) are matured by a mitochondrial poly(A) polymerase (mtPAP) (Tomecki et al., 2004; Slomovic et al., 2005). This process adds a poly(A) extension at the 3' ends of transcripts, which allows for seven of them to complete the UAA stop codon (Ojala et al., 1981). In contrast to yeast and *Arabidopsis*, human mitochondrial transcripts have no significant 5' UTR (Richter-Dennerlein et al., 2015; Forner et al., 2007). Transcripts processing is partly directed by the natural positioning and folding of the tRNAs, which are excised by the long form of RNase Z, coded by ELAC2 (Ojala et al., 1981; Rossmannith, 2011) and the protein-only subunits of the



mitochondrial RNase P (Holzmann et al., 2008). The maturation of all the light-strang protein-encoding RNAs is facilitated by the addition of a poly(A) tail of about 50 nucleotides by the mt-PAP (Ojala et al., 1981; Tomecki et al., 2004; Temperley et al., 2010).

In Arabidopsis, mitochondrial transcripts go also through many stages of processing before being competent for translation. They are matured at their 5' ends, stabilized and matured through their 3' ends (without the addition of a poly(A) tail), transcripts which include introns are spliced (trans-spliced for *nad1*, *nad2* and *nad5* mRNAs) and some cytosines are edited in uracil (Binder & Brennicke, 2003; Bonen & Vogel, 2001; Giegé & Brennicke, 1999; Forner et al., 2007; Ichinose & Sugita, 2017). The pentatricopeptide repeat (PPR) protein family take part to all these stages (Small & Peeters, 2000; Lurin et al., 2004; Barkan & Small, 2014; Hammani & Giegé, 2014). PPR proteins are nuclear factor controlling mRNA expression in mitochondria and chloroplasts by various process by participating in their transcription, maturation, stabilization, editing or translation (Barkan & Small, 2014)

In this review, we present an update of the current knowledge in mammals, yeast and plants on mitochondrial translation through several aspects. First, we describe the composition of the mitochondrial translation apparatus, then its functioning and the regulation it follows. In a last section, we present and discuss the role that PPR proteins play in mitochondrial translation.

## **2.2. The Mitochondrial translational apparatus**

### **2.2.1. Mitoribosome composition**

Mitoribosomes are composed of two subunits: the small subunit (mt-SSU), which binds mRNA and select tRNA molecules (Ogle et al., 2009; Schmeing & Ramakrishnan, 2009), and the large subunit (mt-LSU), which catalyzes peptide bond formation (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000; Beringer & Rodnina, 2007; Polikanov et al., 2014). They are both ribonucleoprotein particles composed of ribosomal RNAs (rRNAs) and mitochondrial ribosomal proteins (MRP).

In contrast to the 70S bacterial ribosome of 2,3 MDa, the mammalian mitoribosome is composed of a 28S mt-SSU and a 39S mt-LSU, forming a 55S particle of 2,7 MDa. The 28S subunit comprises 30 MRPs (called MRPSs) and a 12S rRNA. The 39S subunit comprises 52-53 MRPs (called MRPLs) and a 16S rRNA (Richter-Dennerlein et al., 2015). Yeast mitoribosome is composed of a 37S mt-SSU and a 54S mt-LSU, forming a 74S particle of 3 MDa. The 37S mt-SSU comprises 34 MRPSs and a 15S rRNA. The 54S mt-LSU comprises 46 MRPLs and a 21S rRNA (Desmond et al., 2011; Amunts et al., 2014; Desai et al., 2017) (Table 7).

Mammalian mitochondrial rRNAs are significantly shorter than the bacterial ones, while the protein content of mammalian mitoribosome increases considerably (Richter-Dennerlein et al., 2015). The protein composition of the mitoribosome is variable, in terms of the number of MRPs but also owing to their specificities. For example, the mammalian mitoribosome only shares 74 and 43% of MRPs with the yeast and *Leishmania* mitoribosomes, respectively (Smits et al., 2007). Until now, no structure or exact composition of a mitoribosome has been described in plants.

	Bacteria	Porcine mt	Human mt	Yeast
<b>RIBOSOME</b>				
Sedimentation coefficient	70S	55S	55S	74S
Molecular weight	2.3 MDa	2.7 MDa	nd	3-3.3 MDa
Number of rRNAs	3	2	2	2
Number of proteins	54	82	83	80
RNA:protein	2:1	1:2	1:2	1:2
<b>LARGE SUBUNIT</b>				
Sedimentation coefficient	50S	39S	39S	54S
rRNA	23S 5S	16S	16S	21S
Number of proteins	33	52 (22 mt-specific)	53 (23 mt-specific)	46
<b>SMALL SUBUNIT</b>				
Sedimentation coefficient	30S	28S	28S	37S
rRNA	16S	12S	12S	15S
Number of proteins	21	30 (15 mt-specific)	30 (14 mt-specific)	34 (14 mt-specific)
References	(Yusupova & Yusupov, 2014)	(Greber et al., 2014a, 2014b, 2015)	(Brown et al., 2014; Amunts et al., 2015)	(Desmond et al., 2011; Amunts et al., 2014; Desai et al., 2017)

Tableau 7 - Overview of bacterial and mitochondrial ribosomes composition.

### 2.2.2. Evolution of mitoribosome protein compositions

Mitoribosomes have derived from the bacterial ribosome (Bonen & Calixte, 2006; Gray et al., 1999; Gray, 2012), which consisted in a microbial core of 54 ribosomal proteins. Prior to the divergence between fungi, plants and metazoans, supernumerary ribosomal proteins were recruited to the mitoribosome, while a single bacterial core protein was lost at this stage (RPS20). This results in a primary eucaryotic mitoribosome that might have contained 68 MRPs (Smits et al., 2007). Compared to these 54 initial MRPs, the additional 81 human

MRPs represent a significant gain in complexity. This increase in MRPs content is related together with the elongation of the MRPs already present (by addition of functional domains), the duplication of MRPs and the recruitment of new MRPs from various origins. Nevertheless, some MRPs have also been lost during evolution, some of which have been lost independently in several lineages-(Smits et al., 2007; Gabaldon et al., 2005; Van Der Sluis et al., 2015).

Mammalian mitoribosomes comprise about 80 MRPs (Koc et al., 2001a, 2001b; O'Brien et al., 1999, 2000; Suzuki et al., 2001a). In yeast, approximately 70 MRPs have been identified, although there may be more (Gan et al., 2002; Graack & Wittmann-Liebold, 1998). In Arabidopsis, 55 MRPs were identified so far, 48 of which are coded by the nucleus and 7 by the mitochondrial genome. Plant mitoribosomes seem to be more bacterial-like than mammalian ones that lack 12 of the 54 core (bacterial) ribosomal proteins (Bonen & Calixte, 2006).

It has been suggested that the main reason for the newly recruited ribosomal proteins is to provide structural compensations to mitochondrial components that have been structurally destabilized by mutations throughout the evolution. On one hand, these proteins therefore offer a structural advantage but on the other hand, their presence has also allowed the development of new specific functions of the mitochondria (Van Der Sluis et al., 2015).

### **2.2.3. RNA:protein ratios in mitoribosomes**

Mammalian mitoribosomes have been shown to be less dense (55S) than the cytosolic (80S) and bacterial (70S) ribosomes (O'Brien, 1971). This density decrease is largely due to the inversion of the RNA:protein ratio. Indeed, since 50 % of the mitochondrial ribosomal subunits do not have orthologues in bacteria, this leads to an inverted RNA:protein ratio of 1:2, whereas it is 2:1 in bacterial ribosomes (Table 7) (Sharma et al., 2003; Smits et al., 2007).

The reduction of rRNAs is not due to a stochastic loss of nucleotides but to a selective excision of regions, including especially the anti-Shine-Dalgarno region (Shine & Dalgarno, 1974), which is consistent with the specific lack of the SD sequence in mammalian and plant mitochondrial mRNA 5' regions. Although the conservation of certain domains is

clear, such as the sarcin-castor loop or the helix 45 of the mt-SSU, there is little overall conservation of the rRNA nucleotide sequences between eukaryotes (Sharma et al., 2003; Koc et al., 2010; Pring et al., 1992; Montoya et al., 1981). This difference in RNA:protein ratio leads to a difference in the composition of the intersubunit bridges. In bacteria, the two subunits of the ribosome interact with each-other mainly *via* RNA-RNA bridges (Liu & Fredrick, 2016), while in the mammalian mitoribosome a more important proportion of protein-protein and RNA-protein connections are found. Moreover, the intersubunit bridges in mammalian mitoribosome are shorter than in bacterial ribosomes, mostly due to the reduction of interacting rRNA segments (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015; Greber & Ban, 2016).

#### 2.2.4. Roles of mitoribosome-specific MRPs

In some cases, the protein mass of new MRPs fills the void left by the deletion of rRNA, but this increase in protein content is mainly found at the periphery, near the solvent accessible surface (Brown et al., 2014). It has been suggested that it is a protective layer for mitochondrial rRNA, thus preventing damage that can be caused by the high levels of ROS in mitochondria. In addition, the presence of mitochondrial specific proteins mostly at the outer surface suggests that the functional core of the mitoribosome, composed of the mitochondrial RNA decoding site in the mt-SSU and the peptidyl transferase center in the mt-LSU, has been preserved throughout the evolution (Mai et al., 2016; Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015, 2014b, 2014a; Brown et al., 2014).

Almost half of the mammalian MRPs are mitoribosome-specific, while the remaining ribosomal proteins are homologous to bacterial ones (Sharma et al., 2003). It has been suggested that several mitochondria-specific MRPs have additional and specific roles. For example, mS29 (DAP3) (Kissil et al., 1999), mL37 (Levshenkova et al., 2004), mL41 (Yoo et al., 2005) and mL65 (previously named mS30) are directly or indirectly linked to the control of apoptosis, while bL12m stimulates promoter-dependent and promoter-independent *in vitro* transcription by binding and activating mitochondrial RNA polymerase (Mai et al., 2016; Surovtseva et al., 2011; Nouws et al., 2016). In addition to its potential role in apoptosis, mS29 protein has an intrinsic binding site for phosphorylated GTP, which can affect the formation of monosomes since it is at the mitoribosome interface (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015).

Moreover, cryo-EM studies on human and porc have confirmed the presence of ICT1 (immature colon carcinoma transcript-1) as a structural component of the large subunit of mitoribosome (Richter et al., 2010). ICT1 is a ribosome-dependent peptidyl-tRNA hydrolase acting as a ribosome rescue factor which may help to release stalled ribosomes (Richter et al., 2010; Akabane et al., 2014; Feaga et al., 2016).

Another additional role for a mitoribosomal protein relates to uL18m (MRP-L18). Under heat shock, a cytosolic isoform of this protein is generated by the initiation of translation to an internal CUG within its transcript. This isoform is integrated into the 80S cytosolic ribosomes, which selectively translate mRNAs encoding the heat shock proteins. This is a unique example of how a mitoribosomal protein can influence stress adaptation in the eukaryotic cell (Mai et al., 2016; Zhang et al., 2015). uL18m also has a role in 5S rRNA import into mitochondria and in the integration of 5S rRNA in bacterial ribosomes. However, no potential function of 5S rRNA in mitochondria has yet been determined (Mai et al., 2016; Smirnov et al., 2011). Additionally, in mammalian mitoribosomes 5S rRNA has been replaced by a tRNA, which differs according to species (Mai et al., 2016). 5S rRNA has also disappeared in yeast mitoribosomes. In bacteria, the central protuberance, a structural scaffold to which number of MRPs bind, is in association with tRNAs. In yeast, it is made up entirely of proteins, suggesting that 5S rRNA may have only a structural role (Greber & Ban, 2016).

Moreover, recent mitoribosome structures revealed that specific MRPs have likely adapted the mitoribosomes polypeptide tunnel to membrane proteins synthesis. Effectively, the tunnel's walls of mitoribosomes appear partly coated with MRPs bearing hydrophobic residues to favor the chaneling of membrane (Brown et al., 2014).

### **2.2.5. Structure of mammalian mitoribosomes**

As indicated, despite of its higher molecular weight (2.7 MDa) the mammalian mitoribosome has a lower sedimentation coefficient (55S) than the bacterial ribosome (70S). This suggested that mitoribosomes have a more porous structure than their bacterial counterparts (Sharma et al., 2003; O'Brien, 1971). The mammalian mitoribosome has a structure with compact and globular large masses protruding from the main core. The

diameter of the mitoribosome is about 320 Å, so about 60 Å longer than the bacterial ribosome (Sharma et al., 2003). Recent high resolution structures of porc (Greber et al., 2014b, 2014a, 2015) and human (Brown et al., 2014; Amunts et al., 2015) mitoribosomes show differences in structure and composition (Mai et al., 2016).

It has been shown that homologous MRPs found near the binding site of the regions where the rRNA is truncated are significantly larger than the corresponding proteins in bacteria. This confirms that structural and functional compensation of these truncated rRNA segments has occurred by increasing the size of these homologous proteins (Sharma et al., 2003; Suzuki et al., 2001a, 2001b).

The mitoribosome has a gate-like structure at the mRNA entry site, which may be involved in the recruitment of specific mitochondrial mRNAs, and it has an exit tunnel polypeptide which allows access to the solvent before the exit site, suggesting a unique exit mechanism for the nascent polypeptide. Moreover, the overall structural organization of the two subunits differs markedly from that of the other ribosomes. The two subunits contain notably an intersubunit space which has an overall similarity with their cytoplasmic counterparts (Sharma et al., 2003; Greber & Ban, 2016).

#### 2.2.5.1. The 28S small subunit

The mammalian mt-SSU is composed of 12S rRNA and 30 proteins, 15 of which in porc and 14 in humans are mitochondria specific (Table 7), and therefore have no homologs in bacterial, archaeobacterial, chloroplastic or cytosolic ribosomes (Koc et al., 2001a). All but two of these mitoribosomal proteins have a homolog in *D. melanogaster* while all but three are found in the genome of *C. elegans*, and five of them have homologs in *S. cerevisiae* (Koc et al., 2001a; Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015).

The increase of protein amount in the mitoribosome results in a mt-SSU more elongated in comparison to the bacterial one. One of the most remodeled parts is the entrance of the mt-RNA channel. In bacteria, uS4 and uS3 proteins are important for defining the ring shape entrance of the channel, both of which are absent in the mt-SSU of the mitoribosome. Mammalian mitoribosome compensate for this loss with the extension of uS5m protein, which defines the entrance of the channel. mS39 is a mitochondria specific protein

comprising a PPR. It is also close to the channel and associates with the 12S rRNA (Mai et al., 2016; Davies et al., 2009; Lightowers & Chrzanowska-Lightowers, 2013; Barkan & Small, 2014). The presence of the PPR repeat and the localization of mS39 suggest that it may help in the recruitment of mRNA up to the monosome in the absence of the anti-Shine-Dalgarno domain in the 12S rRNA. The space left by the absence of the anti-Shine-Dalgarno domain is occupied by a mitochondria specific protein, mS37, which is responsible for interaction with mitochondrial 12S rRNA. In contrast to these structural changes, the central portion of the mRNA channel that is directly involved in the translation process is conserved (Greber et al., 2014b, 2014a; Mai et al., 2016).

#### 2.2.5.2. The 39S large subunit

The mammalian mt-LSU is composed of the 16S rRNA and 52 proteins (53 in humans), 22 of which are specific to mitochondria (23 in humans). These mitochondria specific proteins have no apparent homologs in bacterial, archaeobacterial, chloroplastic or cytosolic ribosomes (Greber et al., 2014b, 2014a; Brown et al., 2014; Koc et al., 2001b). All but 2 of these proteins have homologs in *D. melanogaster* while they are all found in *C. elegans*. Ten of them have homologs in *S. cerevisiae*, and 2 in *A. thaliana* (Koc et al., 2001b). The large bacterial subunit comprises the 23S and 5S rRNAs, located in the central protuberance (Ban et al., 2000).

The cryo-EM structure of the mammalian mitoribosome revealed an RNA density resembling the 5S bacterial domain, but the authors were unaware of its nature. Similar studies of mt-LSU in porc and human confirmed the presence of an additional RNA species and identified it as mt-tRNA<sup>Phe</sup> and mt-tRNA<sup>Val</sup>, respectively (Mai et al., 2016; Greber et al., 2014b, 2014a; Brown et al., 2014). The genes encoding these two tRNAs are found in close apposition to the genes encoding the 12S and 16S rRNAs and are transcribed in a single polycistronic unit in mammalian mitochondria (Mai et al., 2016).

One of the parts of the mitoribosome, which has changed the most through evolution, is the polypeptide exit site (PES). The output of the tunnel is defined by the circle of universally preserved proteins: uL22m, uL23m and uL24m, but in mammals, a second layer of mitochondria specific proteins exists and is composed of mL39, mL44 and mL45.



The recruitment of these additional proteins around the exit site could be linked to the synthesis of the very hydrophobic proteins encoded by the mitochondria (Mai et al., 2016).

### **2.2.5.3. A, P and E sites of mitoribosomes**

Mitoribosomes (like cytoplasmic and bacterial ribosomes) possess three functional sites located in the mt-LSU, near to the interface between the two subunits. These sites are named A for Acceptor, P for Peptidyl and E for Exit. The A site corresponds to the entry site of free aminoacyl-tRNAs, accompanied by the elongation factor, the P site holds the peptidyl-tRNA attached to the nascent polypeptide chain and the E site corresponds to the exit site of the deacylated tRNA which can be recycled after giving its amino acid (Schmeing & Ramakrishnan, 2009). A, P and E sites were identified for the mitoribosome.

Residues of the A site, provided by the mt-SSU, are important for decoding. The mt-LSU retained the ability to mediate the primary contact between tRNAs and 16S rRNA, although the finger structure of site A is absent (Greber et al., 2014b, 2014a, 2015). This loss may be related to the different characteristics of mammalian tRNAs, which do not all adopt the canonical cloverleaf structure (Suzuki et al., 2011).

The P site is also relatively conserved, but the interactions it establishes with tRNAs are stronger than those observed for the bacterial ribosome since the mt-LSU has a P-site finger that interacts with the T-Loop of tRNAs. Since the T-loop of mammalian tRNAs is smaller than the one of bacterial tRNAs, finger-like structure is probably necessary to maintain the required orientation of RNA species during peptide bond formation (Mai et al., 2016; Schuwirth et al., 2005).

The presence of an E site in mitoribosome is controversial because most of the points of contact between the bacterial ribosome and tRNA appear to be lost due to the shortened rRNA. However, the existence of this site has been confirmed in cryo-EM studies that have demonstrated the presence of a modified tRNA binding pocket (Greber et al., 2014b, 2014a).

#### **2.2.5.4. Mitoribosome assembly**

Several studies support the idea that assembly of mitoribosomes takes place in two mitochondrial subcompartments: the mitochondrial nucleoids and RNA granules present in the stroma (Mai et al., 2016). Nucleoids are the centers of mt-DNA maintenance, replication and transcription, whereas post-transcriptional processing and maturation of RNAs occurs in RNA granules. Both compartments contain mitoribosome assembly factors and proteins involved in RNA stability, as well as several mitoribosomal proteins (Antonicka & Shoubridge, 2015; Dalla Rosa et al., 2014; Bogenhagen et al., 2014). As a result, it has been suggested that early mitoribosome biogenesis is initiated in nucleoids and carry on in RNA granules. In other words, processing of the mRNA and at least the early stages of mitoribosome assembly take place in the immediate vicinity of mtDNA, which is consistent with co-transcriptional processing and mitoribosomal assembly (Mai et al., 2016).

#### **2.2.6. Association of mitoribosomes to the inner membrane**

Mitoribosomes are almost exclusively dedicated to membrane proteins translation. All mitochondria-encoded proteins in animals are hydrophobic, versus 90 % in fungal and 60 % in plants (Ott & Herrmann, 2010). Because of this, most mitoribosomes are localized at the inner membrane of mitochondria, allowing a co-translational membrane insertion of the newly synthesized proteins, thus avoiding proteins aggregation and precipitation in the matrix (Ott & Herrmann, 2010; Richter-Dennerlein et al., 2015; Pfeffer et al., 2015). Since they translate a significant proportion of membrane proteins, it is though that at least some metazoan-specific MRPs are involved in the positioning of the mitoribosome during the co-translational insertion of the nascent polypeptides into the inner membrane (Smits et al., 2007).

In yeast, mitoribosomes were found at a preferred distance of 17 nm of the inner membrane. Assuming that the mitoribosome has a 13 to 14 nm radius, this would correspond to a distance of 3-4 nm between the surface of the mitoribosome and the inner membrane. This supports the hypothesis that in yeast, the majority of mitoribosomes are bound to the inner membrane. It was also shown that yeast mitoribosomes are clustered on the inner mitochondrial membrane, suggesting the presence of membrane-bound polyribosomes, wich have a similar structure to polyribosomes linked to mammals

endoplasmic reticulum (Pfeffer et al., 2012, 2015). Mitoribosomes are bound to the membrane by two contact sites, called C1 and C2, located on the opposite side to the bacterial peptide exit tunnel, one of them being 96-ES1 extension of the rRNA, the second one being the membrane protein Mba1, which is absent in bacteria, and may therefore be a mitoribosome specific protein (Pfeffer et al., 2015).

Biochemical studies of bovine mitoribosomes have shown that 40 to 50 % of mitoribosomes interact with the inner membrane. Moreover, a significant fraction of them is stably associated with the inner membrane independently of the presence of a nascent chain. It has been suggested that this association is mediated by electrostatic forces between the ribosomal proteins and the inner membrane (Liu & Spremulli, 2000).

It has been shown also that some proteins interact with both the inner membrane and the mitoribosome. One of them, Oxa1, a polytopic membrane insertase and a member of the YidC-Alb3-Oxa1 family, which is found in both mammals and yeast mitochondria, mediates the insertion of proteins into the inner membrane through its N-terminus. Thus, it constitutes the central component of the insertion machinery for mitochondrial membrane bound proteins (Hennon et al., 2015; Haque et al., 2010; Jia et al., 2003; Hell et al., 2001).

The structure of the mammalian mt-LSU suggested a potential role of mL45 (Mba1 in yeast) in the association of mitoribosome with the inner membrane (Greber et al., 2014b, 2014a). This protein is located near the PES (Peptide Exit Site), which is an ideal position to allow rapid insertion of newly synthesized hydrophobic proteins into the membrane. The hypothesis of the involvement of mL45 in the interaction with the membrane is reinforced by its structural homology with Tim44 protein (Handa et al., 2007) and by the confirmation of the capacity of its homologue Mba1 in yeast to mediate mitoribosomes and inner membrane interaction (Ott et al., 2006; Pfeffer et al., 2015). The putative role of mL45 in anchoring the mitoribosome to the membrane is puzzling, but if it does, it is likely to share it with other anchor sites in the mitoribosome which can directly interact with the membrane or *via* one or more integral membrane proteins functioning as a receptor(s) for the mitoribosome (Mai et al., 2016).

It has been suggested that Mba1 is not only a passive receptor of mitoribosomes but that it cooperates with Oxa1 to allow alignment between mitoribosomes and the membrane insertion machinery (Preuss et al., 2001; Ott et al., 2006; Pfeffer et al., 2015). Interestingly,

Mba1 was part of the primitive eukaryotic mitoribosome and was recruited from  $\alpha$ -proteobacteria (Smits et al., 2007). In addition to Oxa1 and Mba1, yeast mitoribosomes have a third physical connection to the inner membrane, formed by an extension of 12S rRNA called 96-ES1 (Pfeffer et al., 2015).

Among other proteins involved in membrane association of mammalian mitoribosomes, MPV17L2 protein, an integral inner membrane protein was co-located with mt-LSU on sucrose gradients, suggesting its involvement in anchoring the mt-LSU to the inner membrane (Dalla Rosa et al., 2014).

The LetM1 protein in human, another inner membrane protein which comprises a large matrix domain, has been reported that its homologue in yeast, Mdm38, interacts with the mitoribosome (Lupo et al., 2011). *In vitro* studies have shown that LetM1 interacts with ribosomal protein bL36m (MRP-L36), so it could be also a membrane locator for mitoribosome in mammals (Piao et al., 2009).

## **2.3. Functioning and regulation of the mitochondrial translation machinery**

### **2.3.1. The different steps of the mitochondrial translation and codon assignments in mitochondria**

Informations mentioned below are based on analyzes carried out mainly on mammalian mitochondria. Nevertheless, conservation of most factors indicates that the entire process is conserved in eukaryotes. The first step in the initiation of protein synthesis is mRNA recruitment by the mt-SSU that is physically linked to the mtIF3 initiation factor to prevent premature reassociation with the mt-LSU. As previously indicated, the PPR protein mS39, located at the entrance of the mt-mRNA channel may bind and guide mitochondrial mRNAs into the ribosomal mRNA channel in mammals mitochondria (Mai et al., 2016; Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015).

The codons recognised as translation initiating triplets are AUG, AUA and AUU to which f-Met-tRNA<sup>Met</sup> is recruited by mtIF2:GTP. If a positive codon:anticodon interaction occurs, then a stable complex is created and the ribosome gets assembled. This triggers the

hydrolysis of the mtIF2-bound GTP to GDP concomitantly with the release of initiation factors IF2 and IF3 from the mt-SSU (Mai et al., 2016). Once the ribosome is constituted, elongation of the nascent chain can start and protein synthesis is complete once a stop codon enters the A-site. The two major termination codons UAA and UAG are recognised, in human mitochondria by mitochondrial release factor 1a (mtRF1a) which is believed to be sufficient to terminate all mitochondrial transcripts (Mai et al., 2016; Soleimanpour-Lichaei et al., 2007).

After the release of the newly synthesized protein, ribosomal recycling factors, (mtRRF1 and mtEF-G2 in mammals), promote the dissociation of the mitoribosome and the release of mt-mRNA and deacylated mt-tRNA. These factors are released and the translation cycle can reinitiate (Mai et al., 2016; Rorbach et al., 2008; Tsuboi et al., 2009). For more detailed informations about molecular mechanisms of mitochondrial translation, see Mai *et al.*, 2016.

In some organisms, mitochondrial mRNAs have a modified codon usage. Mitochondria from different organisms vary in which codon is reassigned, but frequent change is that the stop codon UGA is recognized as a tryptophan. Other changes include the recognition of AAU as methionine and AGA or AGG becoming unallocated codons that are not recognized by any tRNA or protein factor (Chrzanowska-Lightowlers et al., 2011; Suzuki et al., 2011). This peculiarities do not concern plant mitochondria, which follow the universal genetic code (Bonen, 2004).

### **2.3.2. The notion of translational activators**

In mitochondria, translation initiation codons are generally not preceded by the Shine-Dalgarno sequence (Shine & Dalgarno, 1974), but preserved sequence blocks have been described as preceding some translation initiation sites. However these blocks are not found near all the initiators AUG codons, and we still do not know how the mitoribosome is guided and anchors on the start codon (Montoya et al., 1981; Pring et al., 1992).

Translational activators are proteins which in most cases bind in the 5'UTR of their target mRNA, to promote its translation. In *S. cerevisiae*, every mitochondrial mRNA possess its own translational activator(s) (Table 8) (Herrmann et al., 2013), and some of them

belong to the PPR protein family (Table 9) (Kühl et al., 2011; Herbert et al., 2013). Translation regulation depends mainly on translation initiation, which is believed to correspond to the most limiting step in most systems (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). In *S. cerevisiae*, one protein, Smt1p was described as a translational repressor. The mutation of the corresponding gene restores translation of *Atp6-Atp8* bicistronic mRNA (Rak et al., 2016).

Translational Activator	Target mRNA	References
Atp22	<i>atp6, atp8</i>	(Helfenbein et al., 2003; Zeng et al., 2007)
Aep1 (Nca1) Aep2 (Atp13)	<i>atp9</i>	(Ackerman et al., 1991; Payne et al., 1991; Ziaja et al., 1993; Godard et al., 2011; Payne et al., 1993)
Pet309 Mss51 Mam33	<i>cox1</i>	(Decoster et al., 1990; Manthey & McEwen, 1995; Tavares-Carreón et al., 2008; Roloff & Henry, 2015)
Pet111	<i>cox2</i>	(Poutre & Fox, 1987; Mulero & Fox, 1993)
Pet54 Pet122 Pet494	<i>cox3</i>	(Costanzo & Fox, 1988; Haffter et al., 1990; Brown et al., 1994)
Cbs1 Cbs2 Cbp1 Cbp3 Cbp6	<i>cytochrome b</i>	(Rodel, 1986; Mittelmeier & Dieckmann, 1995; Islas-Osuna et al., 2002; Gruschke et al., 2011)
Sov1	<i>var1</i>	(Caballero et al., 2011)

**Tableau 8 - Translational activators identified in *S. cerevisiae***

Although most RNAs required for translation are mitochondria-encoded (all in mammals), MRPs, some RNAs (especially tRNA) and other factors necessary for mitochondrial translation are encoded by the nucleus and imported into mitochondrial matrix, except for *Arabidopsis* whose genome encode some mitochondrial proteins (Rps3, Rps4, Rps7, Rpl2, Rpl5, Rpl12 and Rpl16) (Unseld et al., 1997; Duchêne et al., 2009; Salinas-Giegé et al., 2015; Mai et al., 2016).

Translation factors in *S. cerevisiae* are generally conserved between yeast species but not with plants, which means that plants and yeast have created their mitochondrial translational activators independently after they separated (Kuzmenko et al., 2014). In yeast, these factors are generally present in small quantity, are often found in association with the mitoribosome and participate in its recruitment to the inner membrane (Herbert et al., 2013; Herrmann et al., 2013). Their exact mode of action remains unknown, but some of these activators establish a feedback loop in which the absence of some key subunits of respiratory complexes can prevent the corresponding transcript translation (Mai et al., 2016).

By opposition to *S. cerevisiae*, where regulation of mitochondrial translation is firmly linked to mRNA-specific translation activators, human mitoribosomes must recognize transcripts in the absence of translational activators linked to mRNAs and alternate mechanisms must exist to promote translation in order to adapt mitochondria-encoded proteins stock to the influx of imported subunits and the incorporation of co-factors (Richter-Dennerlein et al., 2015). In human mitochondria, one translational activator was describe and named translational activator of COX I (TACO1). Its absence leads to the selective loss of *mtco1* mRNA translation, encoding COX I protein of respiratory complex IV. The mechanism of action of TACO1 is not known but cannot be mediated by the 5'UTR of *mtco1* mRNA, since it does not possess one. It has been proposed that TACO1 promotes the recognition of the start codon *mtco1* mRNA or stabilizes the polypeptide during its synthesis. TACO1 could also interact with translation termination factors to ensure that the nascent polypeptide is not released until fully translated (Weraarpachai et al., 2009).

In Arabidopsis, mitochondrial mRNAs carry 5'UTRs of variable length which can be relatively long in some cases (Forner et al., 2007). Although we know very little about translation regulation in plant mitochondria, these regions are likely potential target for mRNA-specific translational activators, like the PPR protein MTL1 which specifically promotes *nad7* mRNA translation (Haili et al., 2016).

### 2.3.3. Regulation of mitochondrial translation

Since mammalian translational activators are unlikely to function similarly to yeast, one wonders how the level of mitochondrial translation can be modulated in response to components of respiratory complexes imported from the cytosol. An overview of this process was made possible by the identification of an early assembly of complex IV: MITRAC (mitochondrial translation regulation assembly intermediate of cytochrome c oxidase) (Richter-Dennerlein et al., 2015; Mick et al., 2012). This dynamic complex seems to link the assembly of complex IV with the translation of Cox1 (encoded by mitochondria). Pathogenic mutations have been reported in two components of MITRAC: C12orf62 (ortholog of COX14 in *S. cerevisiae*) and MITRAC12 (also called COA3), which have a function in complex IV early assembly. Their loss leads to the inhibition of Cox1 synthesis (Mick et al., 2012; Szklarczyk et al., 2012; Weraarpachai et al., 2012). MITRAC assembles on the newly synthesized Cox1 protein to accompany the initial stages of COX assembly (Mick et al., 2012). It has been proposed that ribosomes committed to Cox1 translation associate with early MITRAC components: C12ORF62 and MITRAC12, with C12ORF62 acting upstream of MITRAC12 and associating with Cox1 in a ribosome nascent chain complex (Richter-Dennerlein et al., 2016). The molecular mechanisms by which C12orf62 and MITRAC12 affect translation have not been elucidated. It is suggested that regulation of translation by assembly factors helps to avoid accumulation of non-assembled intermediates. Complex IV comprises several other assembly factors: surfeit locus protein 1 (SURF1), COX assembly mitochondrial protein 1 (CMC1) and MITRAC15 (ortholog of COA1 in *S. cerevisiae*) (Richter-Dennerlein et al., 2015). Furthermore, MITRAC is also associated with TIM21, a subunit of the inner-membrane presequence translocase, constitutive of TIM23 complex, which associates it with the inner membrane (Mick et al., 2012; Richter-Dennerlein et al., 2015).

A similar regulatory mechanism for human complex III has been suggested. Indeed, the ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 1 and 2 (UQCC1 and UQCC2) would be involved in translation or stability of CYTB subunit of complex III which is mitochondria encoded (Tucker et al., 2013).

No similar complex has yet been reported to coordinate the complex I assembly in yeast or in other eukaryotes, but since translational retro-control mechanisms exist for some complexes, it may be the case for all those with mitochondria-encoded subunits (Richter-Dennerlein et al., 2015).



#### **2.3.4. Potential roles of micro-RNAs in mitochondrial translation regulation**

MicroRNAs (miRNAs) play a crucial role in the regulation of cytoplasmic translation due to their ability to bind Argonaute 2 (AGO2) and thus may be responsible for the inhibition of RNA translation and degradation (Richter-Dennerlein et al., 2015).

It has also been proposed that miRNAs and AGO2 form a complex within mitochondria, where they promote translation of mitochondrial transcripts. Effectively, miR-1 and AGO2 were found to bind *Mtco1* and *Mtnd1* mRNAs (encoding subunits of complexes IV and I, respectively, in mammalian mitochondria) and to increase their translation level during muscle differentiation. Enhanced translation of other mitochondrial mRNAs mediated by either miR-1, miR-499-5p, miR-101 or miR-499-5p were also reported (Richter-Dennerlein et al., 2015; Zhang et al., 2014). However, the existence of microRNAs in mitochondria is still controversial, since no evidence for their presence was found in transcriptome analysis of purified human mitochondria (Richter-Dennerlein et al., 2015; Mercer et al., 2011).

#### **2.4. The case of PPR proteins that can promote or dowregulate translation of specific mitochondrial mRNAs**

PPR proteins are specific RNA binding proteins discovered by searching for *Arabidopsis thaliana* proteins predicted to target mitochondria or chloroplasts. It is a very large family of proteins of plants, for which 496 members were identified in *Arabidopsis* and 475 in rice (Small & Peeters, 2000; Lurin et al., 2004; Cheng et al., 2016). Following their discovery, PPR proteins were found in other eukaryotes, but in much lower numbers compared to plants, for exemple, 10 PPR proteins were found in *S. pombe*, 15 in *S. cerevisiae* (Kühl et al., 2011; Herbert et al., 2013), 14 in *C. reinhardtii* (Tourasse et al., 2013) and 7 in humans (Lightowlers & Chrzanowska-Lightowlers, 2013). In all systems, it was shown that PPR proteins are involved in all stages of mitochondrial mRNAs expression, including translation. Some PPRs promote the translation of specific mRNAs, while others prevent the translation of specific ORFs involved in cytoplasmic male sterility (CMS) in plants (Barkan & Small, 2014; Gaborieau et al., 2016).

## 2.4.1. PPR proteins promoting translation

### 2.4.1.1. In mammals mitochondria

A large number of PPR proteins have been found to promote mitochondrial translation in various organisms. In some cases, PPR proteins are part of the mitoribosome and thereby play a more general role in translation. However, most often PPR proteins act as transcript-specific translation activators (see above) and facilitate translation initiation on specific mitochondrial mRNAs.

The mammalian PPR protein mS29 (DAP3, PTC3) was found to be part of the mitoribosome (Koc et al., 2001c). As a mitoribosome subunit, this protein seems to play a role in the association of mt-LSU and mt-SSU which is likely regulated by its association with GTP. Although mS29 was found to associate with the mt-SSU, its loss did not appear to affect mitoribosome formation. Depleting mS29 in 143B osteosarcoma cells, however, did have a general effect on mitochondrial protein synthesis (Davies et al., 2009). Moreover, mS29 was shown to interact with the mitochondrial ribosome recycling factor 1 (mtRRF1), further supporting its regulatory role in mitoribosome assembly (Richter et al., 2010; Rorbach et al., 2008; Davies et al., 2009). Another example concerns the human mitoribosomal protein MRPS27, which contains six PPR repeats and was shown to associate with the 12S rRNA and the tRNA<sup>Glu</sup>. MRPS27 is essential for mitochondrial protein synthesis and its knockdown causes decreased abundance in respiratory complexes and cytochrome c oxidase activity in human mitochondria (Davies et al., 2012).

### 2.4.1.2. In yeast mitochondria

Many PPR proteins promoting translation of specific mitochondrial transcripts have been identified notably in *S. cerevisiae* and *S. pombe* (Herbert et al., 2013).

One example concerns Pet309 in *S. cerevisiae* (Manthey & McEwen, 1995; Kühl et al., 2011) and its ortholog CYA5 in *Neurospora* (Coffin et al., 1997) which are essential for *cox1* mRNA translation. It has been shown that Pet309 associates with the 5'UTR of *cox1* mRNA and is part of a protein complex attached to mitochondrial inner membrane (Naithani et al., 2003; Manthey et al., 1998). Pet309 also associates with Nam1p, which binds the

mitochondrial RNA polymerase. This creates a link between transcription and translation, the general belief being that the transcription, translation and assembly of respiratory complexes are linked to mitochondrial inner membrane (Naithani et al., 2003; Shadel, 2004). Other PPR proteins involved in *S. cerevisiae* translation are Aep1, Aep2, Atp22, Cbp1, Pet111, Pet309 and Sov1 (Table 9).

In *S. pombe*, several PPR proteins have also been characterized as translational activators (Table 9). Some of them are stabilization and translation factor of one or two specific transcripts. This is the case of Ppr1, Ppr4 (Pet309 in *S. cerevisiae*), Ppr6 (Aep2 in *S. cerevisiae*) and Ppr7, required for the stabilization and translation of *cox2/cox3*, *cox1*, *atp9* and *atp6*, respectively. Ppr2 and Ppr8 constitute general translation factors, with a more pronounced effect on *cox1* mRNA in *ppr8* mutants, while Ppr2 could be associated to the mt-SSU. Ppr5 corresponds likely to a translational inhibitor since its deletion leads to a global increase in synthesis of all mitochondrial transcripts with no effect on mRNA levels (Kühl et al., 2011; Herbert et al., 2013)

#### 2.4.1.3. In plants mitochondria

Little is known about the effect of PPR proteins on translation in plant mitochondria. It has been shown that some mitochondrial PPRs in Arabidopsis and maize associate with polysomes but their exact mode of action remains unknown (Uyttewaal et al., 2008b; Haili et al., 2016; Hammani et al., 2011b) (Table 9).

In Arabidopsis, the Mitochondrial Translation Factor 1 (MTL1) promotes *nad7* mRNA translation. It was shown to be associated with polysomes and Nad7 protein is not detectable in *mtl1* mutant (Haili et al., 2016). PPR336 was identified to be associated with polysomes too (Uyttewaal et al., 2008b), but its function in Arabidopsis mitochondrial translation is currently unclear. However, its ability to associate with a large panel of mitochondrial mRNAs suggests that it may help in recruiting mRNAs to the mitoribosome. Similarly, the PNM1 protein in Arabidopsis also appeared to associate with mitochondrial polysomes, but its role in translation is currently not understood (Hammani et al., 2011b).

In maize, PPR6 was demonstrated to be essential for *rps3* mRNA translation. However, *mppr6* mutants accumulate 5'-extended *rps3* transcripts, suggesting that the primary

function of MPPR6 resides in the 5' processing of *rps3* transcripts to yield translatable mature mRNA (Manavski et al., 2012).

PPR Protein	Target mRNA(s)	Specie	References
Aep1	Atp9	<i>S. cerevisiae</i>	(Payne et al., 1991, 1993; Ziaja et al., 1993; Godard et al., 2011)
Atp22	Atp6 Atp8	<i>S. cerevisiae</i>	(Helfenbein et al., 2003; Zeng et al., 2007)
Cbp1		<i>S. cerevisiae</i>	(Islas-Osuna et al., 2002)
CYA5	Cox1	<i>N. crassa</i>	(Coffin et al., 1997)
MRRP6	Rps3	<i>Z. mays</i>	(Manavski et al., 2012)
MTL1	Nad7	<i>A. thaliana</i>	(Haili et al., 2016)
Pet111	Cox2	<i>S. cerevisiae</i>	(Poutre & Fox, 1987; Mulero & Fox, 1993)
Pet309	Cox1	<i>S. cerevisiae</i>	(Manthey & McEwen, 1995; Tavares-Carreón et al., 2008)
Ppr1	Cox2 Cox3	<i>S. pombe</i>	(Kühl et al., 2011)
Ppr4	Cox1	<i>S. pombe</i>	(Kühl et al., 2011)
Ppr6	Atp9	<i>S. pombe</i>	(Kühl et al., 2011)
Ppr7	Atp6	<i>S. pombe</i>	(Kühl et al., 2011)
Sov1	Var1	<i>S. cerevisiae</i>	(Caballero et al., 2011)

Tableau 9 - PPR proteins promoting translation of specific mitochondrial mRNAs

#### 2.4.2. PPR proteins preventing mitochondrial translation

In addition to being involved in essential functions such as respiration or cofactor biosynthesis, plant mitochondria are also responsible for widely expanded trait called cytoplasmic male sterility (CMS). It corresponds to a widespread condition in plants which is characterized by an inability to produce functional pollen leading to male-sterile individual (Chen & Liu, 2014). CMS are associated with the expression of poorly conserved and often chimeric open reading frames (ORFs) found on mitochondrial genomes. Male fertility can be restored by nuclear genes called fertility restorers (or *Rf*), which can partially or totally restore pollen production.

Most *Rf* genes appear to function by preventing the expression of CMS-inducing mRNAs and thereby significantly reducing the production of mitochondrial CMS-inducing proteins (Chen & Liu, 2014). In the last years, several *Rf* genes were cloned from various crop species and the majority of them encode proteins belonging to the pentatricopeptide repeat family (Dahan & Mireau, 2013; Gaborieau et al., 2016).

Three of them were shown to directly or indirectly interfere with the translation of CMS-inducing mRNAs (Table 10). In petunia, Rf-PPR592 protein is known to restore male sterility caused by the *pcf* gene (Young & Hanson, 1987; Bentolila et al., 2002). Rf-PPR592 binding site could be located in the 5'UTR of *pcf* mRNA, which supports its potential role in 5' maturation or translation of the transcript (Pruitt & Hanson, 1991; Gillman et al., 2007; Bentolila et al., 2002). In radish, the *Rfo* (*PPR-B*) gene restores the fertility of Ogura CMS by specifically impeding the expression of the *orf138* mitochondrial mRNA (Desloire et al., 2003; Brown et al., 2003; Uyttewaal et al., 2008a). Molecular events associated with fertility restoration in this system do not impact the size or the abundance of the *orf138* mRNA, even in a tissue-specific manner (Uyttewaal et al., 2008a). The *orf138* mRNA was shown to associate with the Rfo protein *in vivo* strongly supporting that inhibitory role of Rfo may consist in specifically impeding the translation of *orf138* mRNA by preventing the association or progression of mitoribosomes (Uyttewaal et al., 2008a). Finally, in rice, RF1A is responsible of endoribonucleolytic cleavages within *B-atp6/orf79* transcripts, liberating *B-atp6* and *orf79* mRNAs as mono-cistronic mRNAs. Then, it was shown that most of *orf79* transcripts (90 %) were not associated with mitoribosomes in the presence of RFL1A. Consequently, RF1A has a dual role in processing the bicistronic transcript *B-atp6/orf79* and diminishing the translation rate of *orf79* (Kazama et al., 2008).

PPR Protein	Target mRNA/Orf	Specie	Reference
RF1A	<i>orf79</i>	O. sativa	(Kazama et al., 2008)
Rf-PPR592	<i>pcf</i>	P. hybrida	(Young & Hanson, 1987; Pruitt & Hanson, 1991; Bentolila et al., 2002; Gillman et al., 2007)
Rfo (PPR-B)	<i>orf138</i>	R. sativus	(Desloire et al., 2003; Brown et al., 2003; Uyttewaal et al., 2008a)

Tableau 10 - Restorer of fertility PPR proteins preventing translation of specific mRNA or ORF

## **2.5. Conclusion**

As we have seen in this review, many actors intervene in mitochondrial translation, and some of them differ from one species to another. In this complex process, many PPR proteins are required, both for the composition of mitoribosome and for specific or aspecific activation of mitochondrial mRNA translation. The needed factors for harmonious mitochondrial translation are both mitochondria and nuclear-encoded, which requires a fine regulation of this process together with a reliable communication system between the different cellular compartments

# Problématique





### 3. Problématique

Les 26 gènes RFL identifiés chez *Arabidopsis thaliana* sont listés dans le Tableau 11 (Fujii et al., 2011). Au moment où j'ai démarré ma thèse, nous disposions de peu d'informations sur leur utilité au sein de la mitochondrie. En effet, les études fonctionnelles réalisées sur cinq protéines RFL ont permis de montrer qu'elles étaient impliquées soit dans la maturation en 5' de transcrits mitochondriaux issus de gènes essentiels (RPF1, RPF2 et RPF3) (Jonietz et al., 2010, 2011; Hölzle et al., 2011), soit dans le clivage partiel de transcrits ou d'ORF non conservées (RFL2 et RFL9) (Arnal et al., 2014; Fujii et al., 2016). Aucune de ces protéines ne porte de fonction essentielle puisqu'aucune d'entre elles ne cause d'altérations phénotypiques en son absence.

Comme mentionné ci-avant, la suppression des gènes *RFL* d'*Arabidopsis* ne conduit pas à l'apparition de phénotypes de stérilité mâle. De plus, les cibles des RFL caractérisées correspondent en majeure partie à des ARNm mitochondriaux conservés, ce qui est en opposition par rapport aux véritables restaurateurs de fertilité qui ont le plus souvent pour cible des transcrits issus d'ORF non-conservées inductrices de SMC.

Nous nous sommes demandés à quoi pouvaient servir toutes ces protéines RFL chez *Arabidopsis* alors que seule une SMC, de plus cryptique, été décrite chez cette espèce (Gobron et al., 2013). Pour répondre à cette question, notre équipe s'est engagée dans l'étude systématique de tous les mutants *rfl* d'insertion ADN-T chez *Arabidopsis thaliana*. Nous avons découvert que la plupart des mutants homozygotes ne présentaient aucun phénotype visible, mis à part deux d'entre eux : les mutants *rfl22* et *rfl23* (indiqués en rouge dans le Tableau 11), présentant d'importants problèmes développementaux. La mutation du gène *At1g62720* (mutant *rfl22*) est létale à l'état embryonnaire tandis que celle du gène *At1g62720* (mutant *rfl23*) occasionne un important retard de croissance. Il est à noter qu'aucun des mutants *rfl* chez *Arabidopsis* ne présente de stérilité mâle.

Mon projet de thèse a porté sur la caractérisation fonctionnelle des gènes *RFL22* et *RFL23* afin de trouver leur fonction et leur mode d'action chez *Arabidopsis*. Pour mener à bien ce projet, j'ai identifié la fonction des protéines RFL22 et RFL23 ainsi que l'identité de leur cible ARN. Pour cela, j'ai été amenée à développer un protocole de profilage de ribosomes adapté aux mitochondries végétales, à partir de protocoles déjà publiés. De plus, une cartographie du site de liaison de la protéine RFL22 sur sa cible ARN a été réalisée par plusieurs méthodes complémentaires.

Nom du gène	Nom de la protéine donné par Fujii et al.	Nom de la protéine donné si elle a été caractérisée	Fonction	Références
At1g06580	AtRFL1		?	
At1g12300	AtRFL2	RFL2	Clivage dans la phase codante de l' <i>orf291</i>	(Fujii et al., 2016)
At1g12620	AtRFL3		?	
At1g12700	AtRFL4	RPF1	Maturation en 5' de <i>nad4</i>	(Hölzle et al., 2011)
At1g62590	AtRFL5		?	
At1g62670	AtRFL6	RPF2	Maturation en 5' de <i>nad9</i> et <i>cox3</i>	(Jonietz et al., 2010)
At1g62680	AtRFL7		?	
<b>At1g62720</b>	<b>AtRFL8</b>	<b>RL22</b>	<b>Objectif de ma thèse</b>	
At1g62910	AtRFL9	RFL9	Clivage dans la phase codante de <i>rps3</i> et de l' <i>orf240A</i>	(Arnal et al., 2014)
At1g62915	AtRFL10		?	
At1g62930	AtRFL11	RPF3	Maturation en 5' de <i>ccmC</i>	(Jonietz et al., 2011)
At1g63070	AtRFL12		?	
At1g63080	AtRFL13		?	
At1g63130	AtRFL14		?	
At1g63150	AtRFL15		?	
At1g63330	AtRFL16		?	
At1g63400	AtRFL17		?	
At1g64100	AtRFL18		?	

At1g64580	AtRFL19		?
At3g16710	AtRFL20		?
At3g22470	AtRFL21		?
At4g26800	AtRFL22		?
<b>At5g16640</b>	<b>AtRFL23</b>	<b>RFL23</b>	<b>Objectif de ma thèse</b>
At5g41170	AtRFL24		?
At1g12770	AtRFL25		?
At1g64585	AtRFL26		?

Tableau 11 – Liste des fonctions des gènes *RFL* identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Fujii et al., 2011).



# Résultats

## Partie 1 : Caractérisation fonctionnelle de la protéine

RFL22



## 4. Résultats

### 4.1. Caractérisation fonctionnelle de la protéine RFL22

La protéine RFL22 est l'une des deux seules protéines RFL à avoir un rôle indispensable chez *Arabidopsis thaliana*, puisque son absence cause la mort du mutant au stade embryonnaire. Nous avons cherché à déterminer son rôle dans la mitochondrie. Pour cela nous avons caractérisé dans un premier temps le mutant homozygote pour l'insertion SALK\_015489 dans le gène *RFL22*, et avons fait dans un second temps des analyses avec la protéine RFL22 recombinante portant une étiquette HA.

Un seul allèle muté étant disponible, la complémentation fonctionnelle du mutant à été réalisée avec le gène *RFL22* portant une étiquette HA, pour vérifier que le phénotype observé sur le mutant *rfl22* était bien causé par l'inactivation du gène *RFL22*.

#### 4.1.1. Le mutant *rfl22* meurt à l'état embryonnaire mais peut être sauvé par culture *in vitro*

Le mutant *rfl22* présente un phénotype de létalité au stade embryonnaire. Les embryons mutants se développent dans des graines plus claires que celles portant des embryons sauvages ou hétérozygotes. Les embryons mutants *rfl22* arrêtent leur développement prématurément comparés aux embryons sauvages et finissent par mourir au cours de la dessiccation des graines (Figure 24). Il a été mis en place au laboratoire un protocole de sauvetage *in vitro* permettant de faire germer et ensuite de maintenir en vie certains mutants embryon-létaux d'*Arabidopsis* (Dahan et al., 2014), dont le mutant *rfl22*. Pour cela, les graines claires correspondant aux mutants homozygotes sont collectées à partir de siliques de plantes hétérozygotes âgées de 8 à 9 semaines. Les graines mutantes sont mises à germer puis cultivées sur des milieux de culture adaptés au sauvetage embryonnaire (Cf. matériel et méthodes). Après 3 mois de culture environ, le mutant *rfl22* atteint une taille de 1 cm de haut, ne présente pas de racines, émet parfois des fleurs certainement stériles à la fois du côté mâle et femelle (Figure 25).

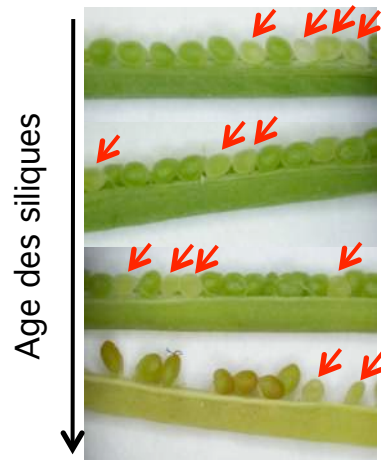


Figure 24 - Siliques disséquées à partir de plantes hétérozygotes RFL22/ *rfl22* montrant les graines décolorées (flèches rouges) porteuses d'embryons *rfl22* homozygotes mutants (Travaux de J. Dahan).

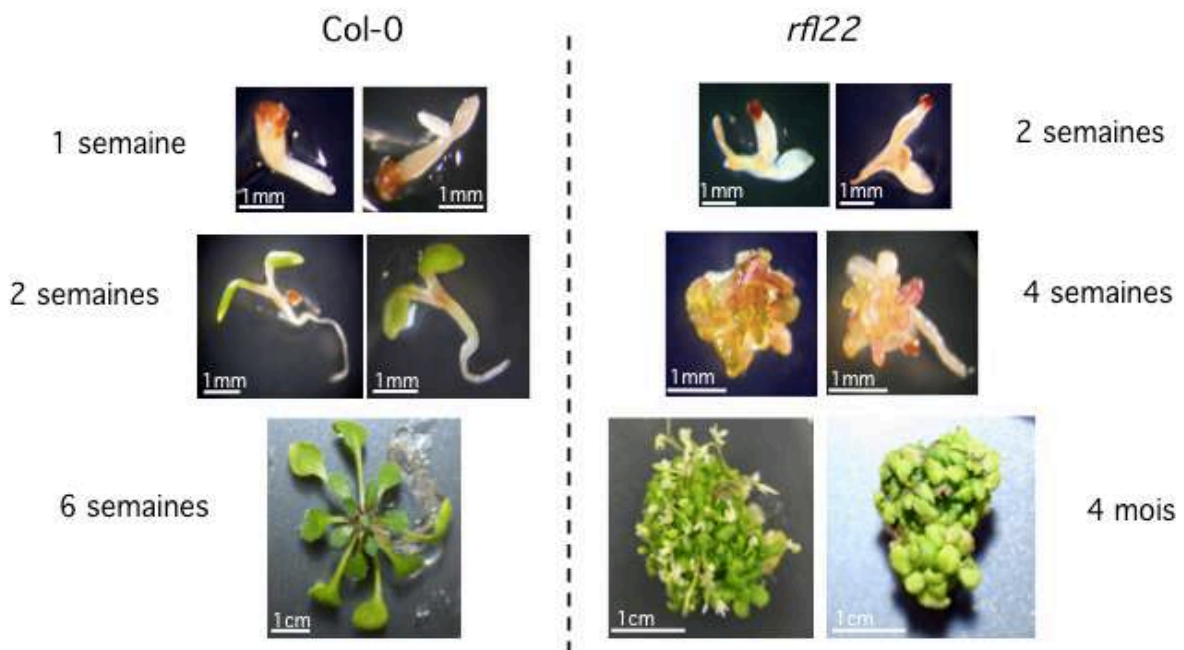


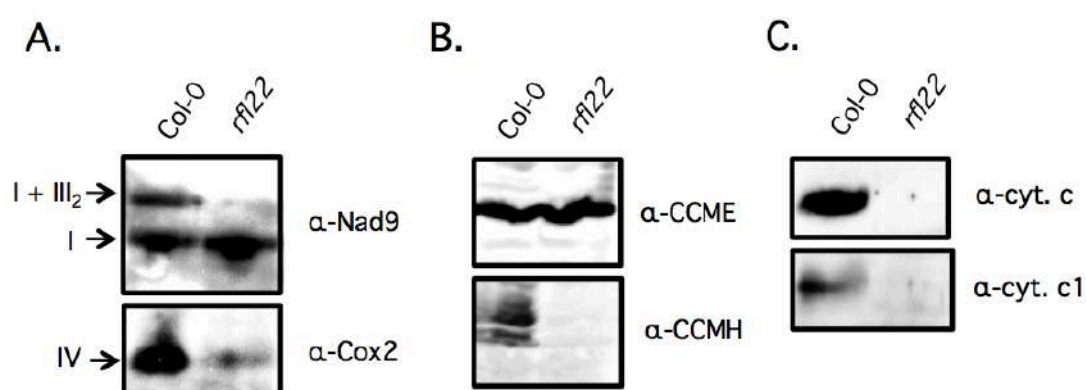
Figure 25 - Croissance *in vitro* du mutant *rfl22* en comparaison au sauvage Col-0 (Travaux de J. Dahan).

Des graines immatures du mutant *rfl22* et du sauvage (Col-0) ont été sorties de leur silique et semées *in vitro*. Elles ont poussé 10 jours sur un milieu MRP puis plusieurs mois sur un milieu MRPlant (cf. Matériel et méthodes).



#### 4.1.2. Les complexes respiratoires III et IV et le complexe hème lyase sont sous-accumulés chez le mutant *rfl22*

Le phénotypage moléculaire du mutant *rfl22* par western-blot et gels Bleu Natifs-PAGE (BN-PAGE) a montré qu'il ne présente plus de complexe hème lyase (Figure 26B), impliqué dans la maturation des cytochromes de type c, ces derniers étant également absents chez le mutant (Figure 26C). De plus, le complexe III n'est pas détectable tandis que le complexe IV l'est à peine (Figures 26A et 27).



**Figure 26 – Mesure du niveau d’accumulation de complexes respiratoires, de complexes impliqués dans la maturation des cytochromes de type c et des cytochromes c et c<sub>1</sub>, par western-blot. Les anticorps utilisés sont mentionnés à côté de chaque image (Travaux de J. Dahan).**

A. Détection des complexes respiratoires I ( $\alpha$ -Nad9) et IV ( $\alpha$ -Cox2) ainsi que du super-complexe I<sub>1</sub>+III<sub>2</sub> ( $\alpha$ -Nad9).

B. Détection du complexe de transport de l’hème ( $\alpha$ -CCME) et de l’hème lyase ( $\alpha$ -CCMH), impliqués dans la maturation des cytochromes de type c.

C. Détection de cytochromes de type c.

Ces analyses montrent que le mutant *rfl22* n’a plus de complexe I<sub>1</sub>+III<sub>2</sub>, un complexe IV à peine détectable, plus de complexe hème lyase ni de cytochromes de type c.

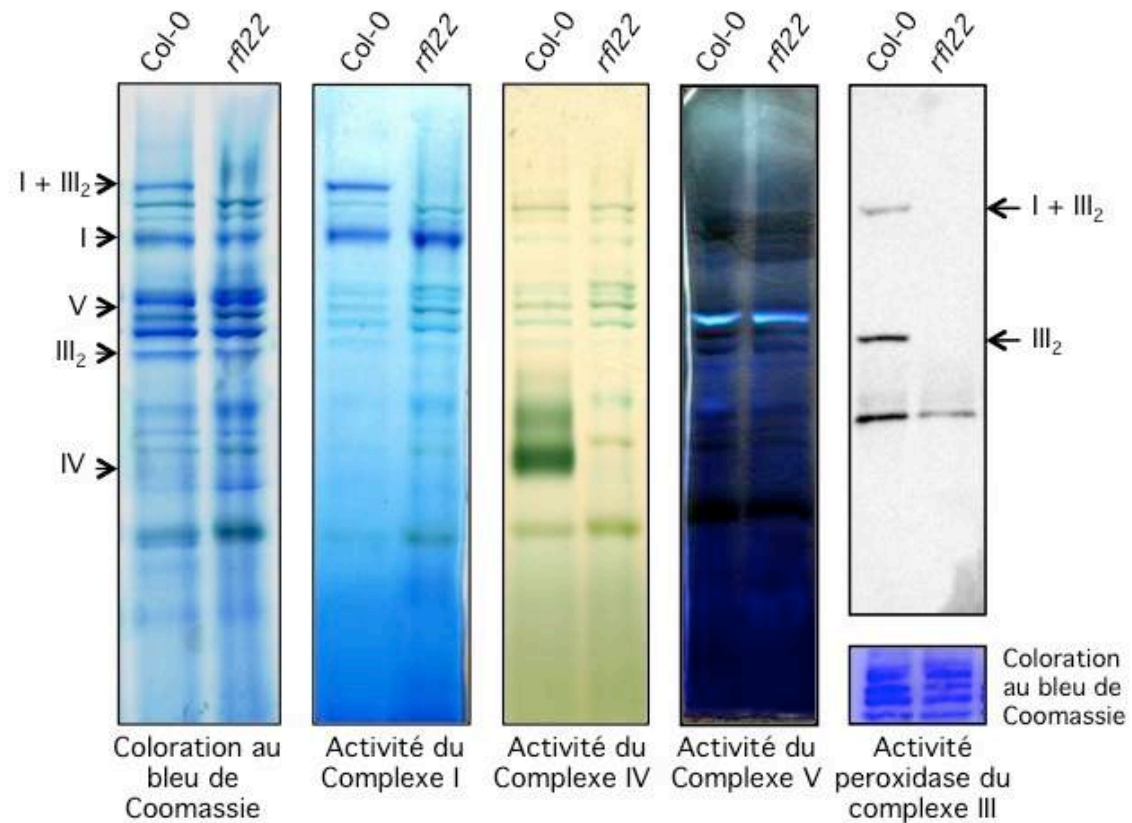


Figure 27 – Le mutant *rfl22* n'accumule plus à un niveau détectable les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Travaux de J. Dahan).

BN-PAGE réalisé à partir d'extraits de membranes d'Arabidopsis. Coloration au bleu de Coomassie (à gauche), détection des activités des complexes I, IV et V (de gauche à droite) et détection du complexe III par l'activité peroxydase (à droite).

L'induction de respiration alternative chez le mutant *rfl22* a été évaluée en mesurant le niveau d'expression des ARNm codant les différentes isoformes de l'alternative oxydase et des NADH déshydrogénases alternatives (Figure 28). Plusieurs d'entre elles sont surexprimées chez *rfl22*, en particulier *AOX1A*, *AOX1C*, *AOX1D*, *NDB3* et *NDB4* ; les transcrits *NDB3* et *NDB4* étant les plus surexprimés, respectivement 685 et 70 fois par rapport au sauvage.

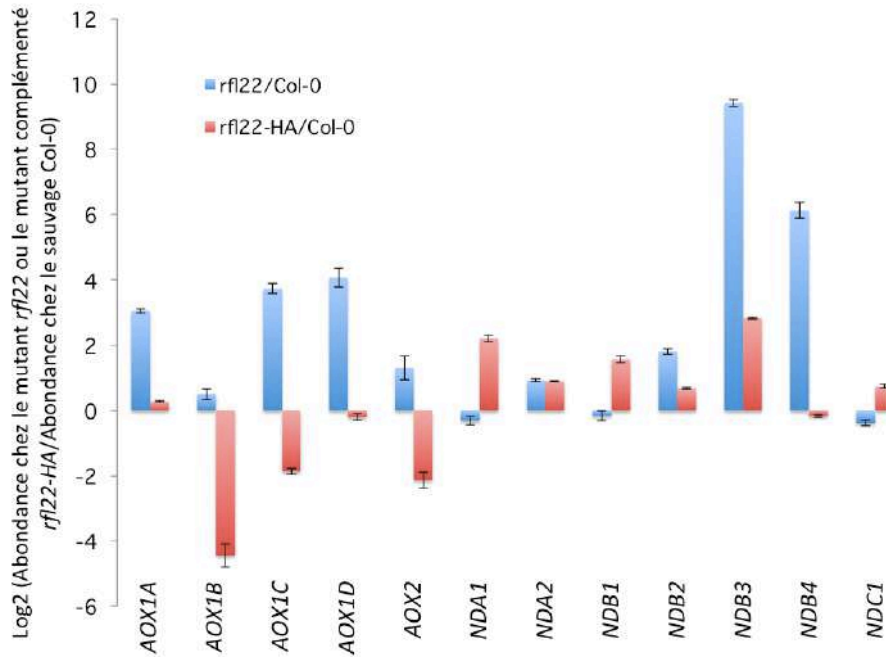


Figure 28 - Mesure du niveau d'accumulation des ARNm codant des différentes isoformes de l'alternative oxydase et des NADH déshydrogénases alternatives chez le mutant *rfl22* et le mutant complémenté *rfl22*-HA en comparaison au sauvage.

Quantifications par q-RT-PCR. Pour chaque génotype, 2 réplicats biologiques et 3 réplicats techniques ont été réalisés. Les résultats ont été normalisés avec l'ARNr 26S mitochondrial entre les différents jours et avec l'ARN nucléaire 18S entre les différents réplicats biologiques. Les transcrits *AOX1A*, *AOX1C*, *AOX1D*, *NDB3* et *NDB4* sont surexprimés chez le mutant *rfl22*.

#### 4.1.3. Les ARNm mitochondriaux sont sur-accumulés chez le mutant *rfl22*

L'analyse du transcriptome mitochondrial du mutant *rfl22* et du mutant complémenté *RFL22*-HA en comparaison au sauvage Col-0 a montré que tous les ARNm mitochondriaux sont surexprimés chez *rfl22*, entre 1,5 et 27 fois (Figure 29).

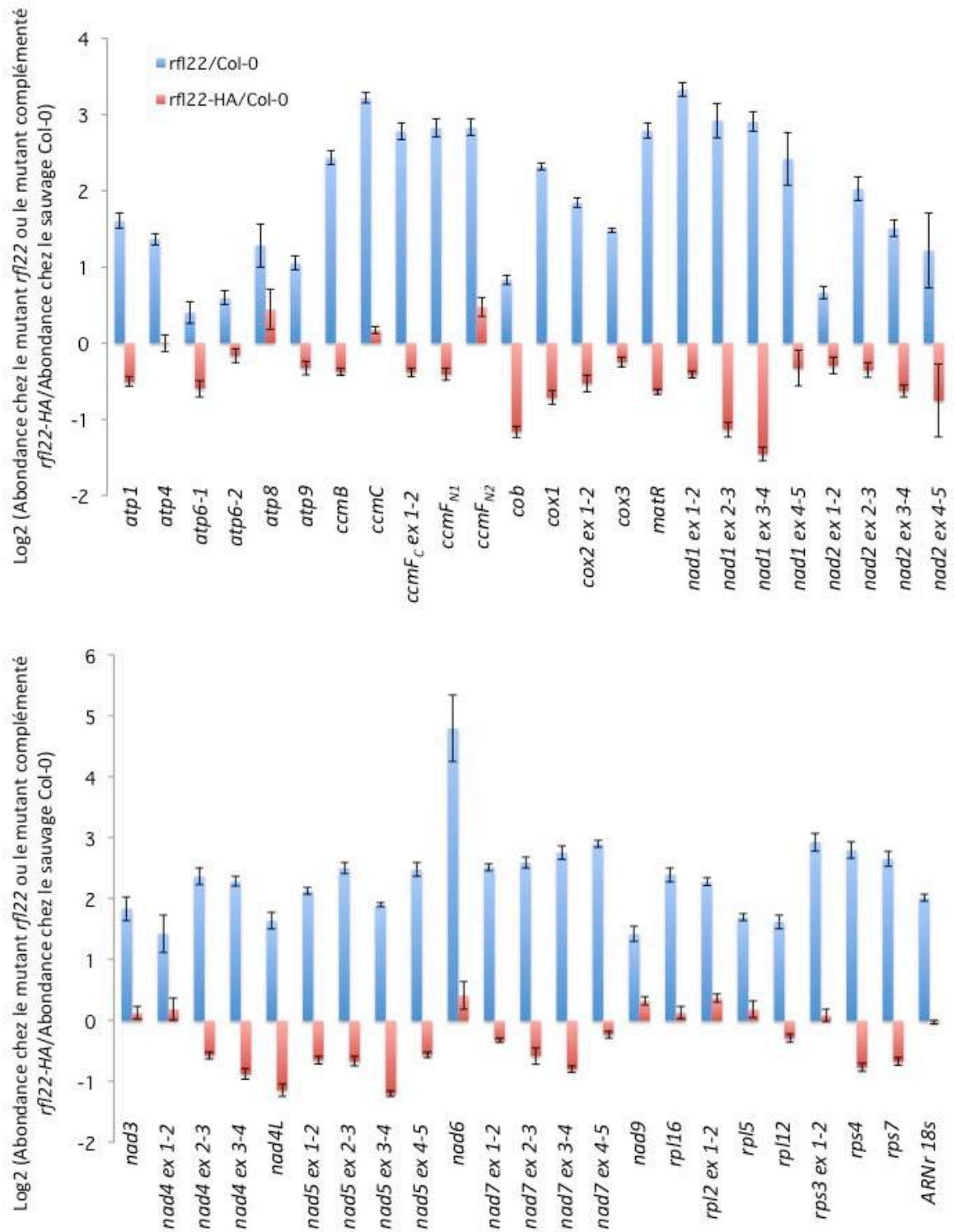
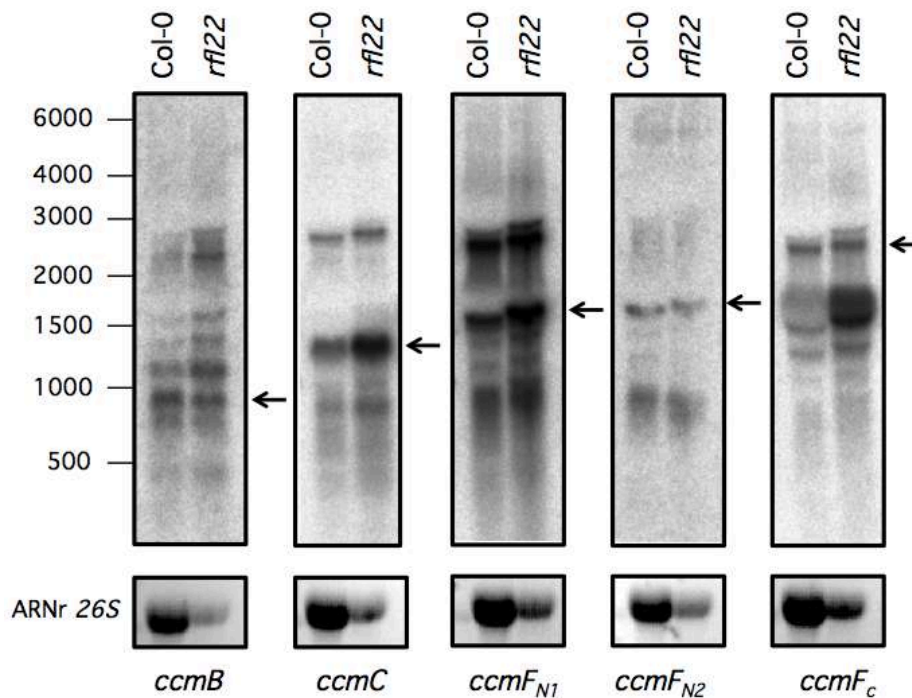


Figure 29 - Mesure du niveau d'accumulation des ARNm mitochondriaux chez le mutant *rfl22* et le mutant complémenté *rfl22*-HA, en comparaison au sauvage Col-0.

Quantifications par RT-PCR quantitative. Pour chaque génotype, 2 réplicats biologiques et 3 réplicats techniques ont été réalisés. Les résultats ont été normalisés avec l'ARN 26S mitochondrial entre les différents jours et avec l'ARN nucléaire 18S entre les différents réplicats biologiques. Les ARNm mitochondriaux sont surexprimés chez le mutant *rfl22*.

De façon à confirmer ces résultats sur les ARNm candidats comme pouvant être la cible de la protéine RFL22, des hybridations de type northern-blot ont été réalisées afin de vérifier l'accumulation des ARNm mitochondriaux impliqués dans la maturation des cytochromes de type c, soit les transcrits suivants : *ccmB*, *ccmC*, *ccmF<sub>N1</sub>*, *ccmF<sub>N2</sub>* et *ccmF<sub>C</sub>*. Cette expérience a confirmé leur surexpression, dans la mesure où l'on détecte autant ou plus de transcrits chez le mutant *rfl22* malgré un chargement trois fois moins important d'ARN sur le gel (Figure 30).



**Figure 30 - Analyse par northern-blot des ARNm impliqués dans la maturation des cytochromes de type c**

15  $\mu$ g d'ARN total ont été chargés par puits pour Col-0, 5  $\mu$ g pour *rfl22*, ce chargement différentiel en ARN s'est révélé nécessaire pour réussir à comparer les profils d'accumulation de transcrits entre les deux génotypes. Les ARNm matures sont indiqués par des flèches noires. Toutes les sondes ADN ont été produites par PCR puis radio-marquées.

#### 4.1.4. La protéine RFL22 est nécessaire à l'épissage de l'intron 1 de l'ARNm *nad2*

La mesure de l'efficacité d'épissage de chaque intron mitochondrial par RT-PCR quantitative a montré que l'intron 1 de l'ARNm *nad2* présente un défaut partiel d'épissage chez le mutant *rfl22* (Figure 31). En effet, le mutant présente 6,7 fois moins de transcrits *nad2* ayant l'intron 1 épissé en comparaison au sauvage. Cette diminution est toutefois insuffisante pour expliquer le phénotype de létalité embryonnaire du mutant dans la mesure où l'ARNm *nad2* mature s'accumule malgré tout plus que chez le sauvage (Figure 29) et que le complexe I n'est pas sous-accumulé chez le mutant *rfl22* (Figure 27). L'épissage d'autres introns tels que l'intron 2 de *nad2*, l'intron 2 de *nad4* et les introns 1 et 2 de *nad5*, est également légèrement diminué chez le mutant.

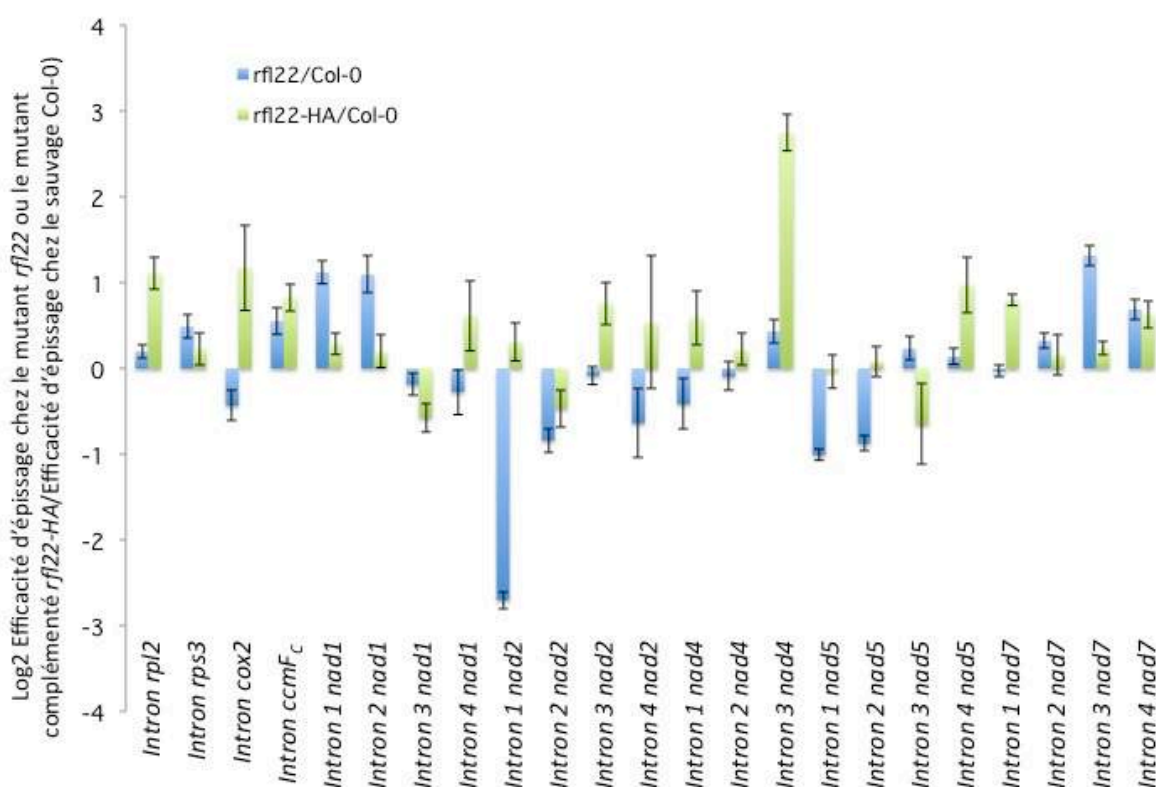


Figure 31 - Efficacité d'épissage des ARNm mitochondriaux chez le mutant *rfl22* et les plantes complémentées *rfl22*-HA en comparaison au sauvage Col-0.

Quantifications par q-RT-PCR. Pour chaque génotype, 2 réplicats biologiques et 3 réplicats techniques ont été réalisés. Les résultats ont été normalisés avec l'ARN 26S mitochondrial entre les différents jours et avec l'ARN nucléaire 18S entre les différents réplicats biologiques. La plupart des introns mitochondriaux présentent un taux d'épissage globalement similaire chez le mutant *rfl22* et le sauvage Col-0, mis à part l'intron 1 de *nad2* présentant une efficacité d'épissage 6,7 fois moins importante chez *rfl22*.

#### 4.1.5. La forme courte de l'ARNm *ccmF<sub>C</sub>* disparaît chez le mutant *rfl22*

Puisque nous savons que certaines protéines RFL sont impliquées dans la maturation des extrémités de leur ARNm cible, nous avons analysé la maturation des extrémités 5' et 3' des ARNm codant les sous-unités du complexe hème lyase par RT-PCR sur des ARNs circularisés. Cela a révélé que la forme courte de l'ARNm *ccmF<sub>C</sub>* (-125/+10) a disparue chez le mutant *rfl22* (Figure 32). L'absence de ce transcrit, raccourci en 3' par rapport à la forme longue, ne semble pas suffisante pour expliquer l'absence complète du complexe hème lyase. Les autres ARNm codant des sous-unités de ce complexe présentent des maturations de leurs extrémités 5' et 3' équivalentes chez le sauvage Col-0 et le mutant *rfl22* (Figure 32). La protéine RFL22 serait donc impliquée directement ou indirectement dans la stabilisation ou la production de la forme courte en 3' de l'ARNm *ccmF<sub>C</sub>*.



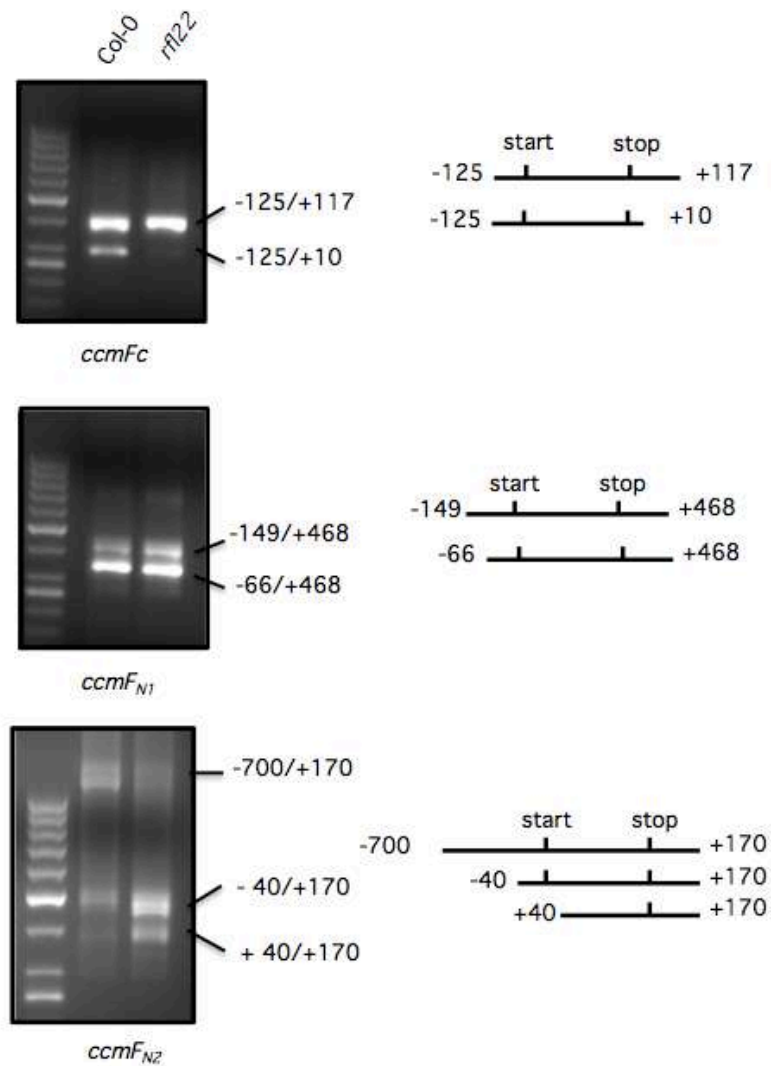


Figure 32 - Cartographie des extrémités des ARNm *ccmF<sub>C</sub>*, *ccmF<sub>N1</sub>* et *ccmF<sub>N2</sub>* chez le mutant *rfl22* en comparaison au sauvage.

Cartographie réalisée par RT-PCR sur des ARNs circularisés. Les transcrits *ccmF* sont maturés de façon équivalente chez le mutant *rfl22* et *Col-0*

Les chiffres indiqués sur les schémas de droite correspondent aux positions des extrémités identifiées relativement au codon initiateur de la traduction (start) en 5' et au codon stop en 3'.



#### 4.1.6. L'ARNm $ccmF_{N2}$ n'est pas traduit chez le mutant *rfl22*

Puisque qu'aucun rôle pour la protéine RFL22 expliquant le phénotype du mutant n'a pu être révélé en étudiant l'abondance et la maturation des transcrits mitochondriaux, nous avons fait l'hypothèse que cette protéine était impliquée dans la traduction d'un ARNm mitochondrial spécifique. Pour valider ou infirmer cette hypothèse, nous avons adapté le protocole de profilage de ribosomes aux mitochondries de plantes à partir de protocoles existants (Zoschke et al., 2013; Baudin-Baillieu et al., 2016). Au moyen de cette technique, nous avons estimé les niveaux de traduction des ARNm mitochondriaux du mutant *rfl22* et du sauvage Col-0 cultivés dans les mêmes conditions (Figure 33). En première approximation, cette étude a permis d'observer que les niveaux de traduction des ARNm mitochondriaux n'étaient pas strictement équivalents entre le mutant et le sauvage.

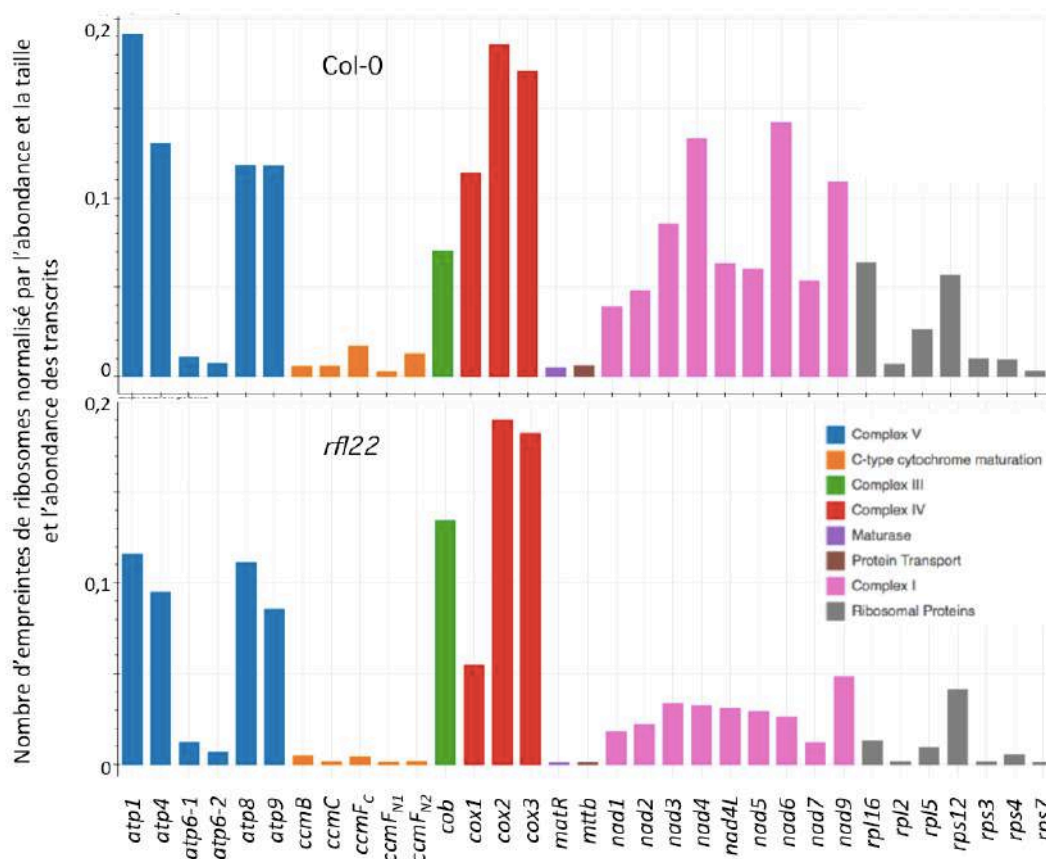
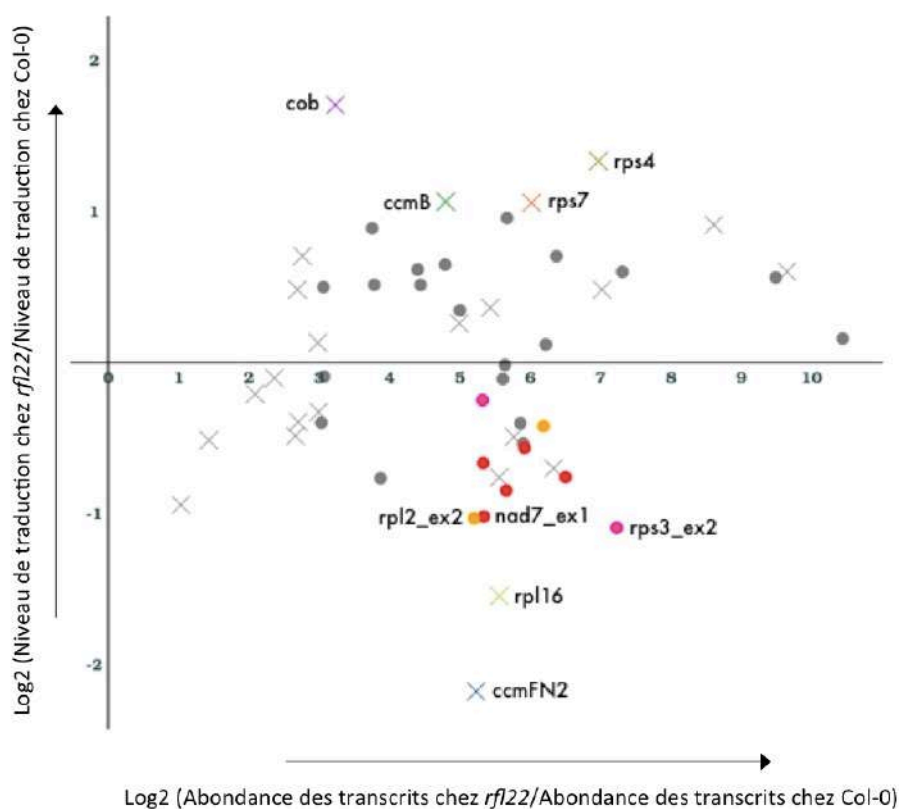


Figure 33 - Traductomes mitochondriaux de Col-0 et du mutant *rfl22*

Traductomes mitochondriaux mesurés par profilage de ribosomes. Le sauvage Col-0 a poussé *in vitro* dans les mêmes conditions de culture que le mutant *rfl22*. Cette figure permet de comparer les niveaux de traduction entre les transcrits d'un même génotype mais ne permet pas de faire de comparaisons entre génotypes.

Pour d'affiner ces résultats, une comparaison statistique des niveaux d'accumulation et de traduction des ARNm mitochondriaux entre le mutant et le sauvage a été réalisée (Figure 34). Il ressort de cette analyse que les ARNm *rpl16* et *ccmF<sub>N2</sub>* sont significativement moins traduits chez *rfl22*, d'un facteur 2,8 et 4,6 respectivement. De plus, nous remarquons que l'exon 1 de *nad7*, l'exon 2 de *rpl2* et l'exon 3 de *rps3* sont environ 2 fois moins associés aux ribosomes chez le mutant que chez le sauvage. Il est important de noter qu'il n'y a pas de corrélation entre les niveaux de transcription et de traduction, donc la surexpression des ARNm n'est pas répercutée sur leur niveau de traduction. Nous observons également que plusieurs ARNm sont légèrement plus traduits chez le mutant *rfl22*, comme *cob*, *ccmB*, *rps4* et *rps7* (Figure 34).

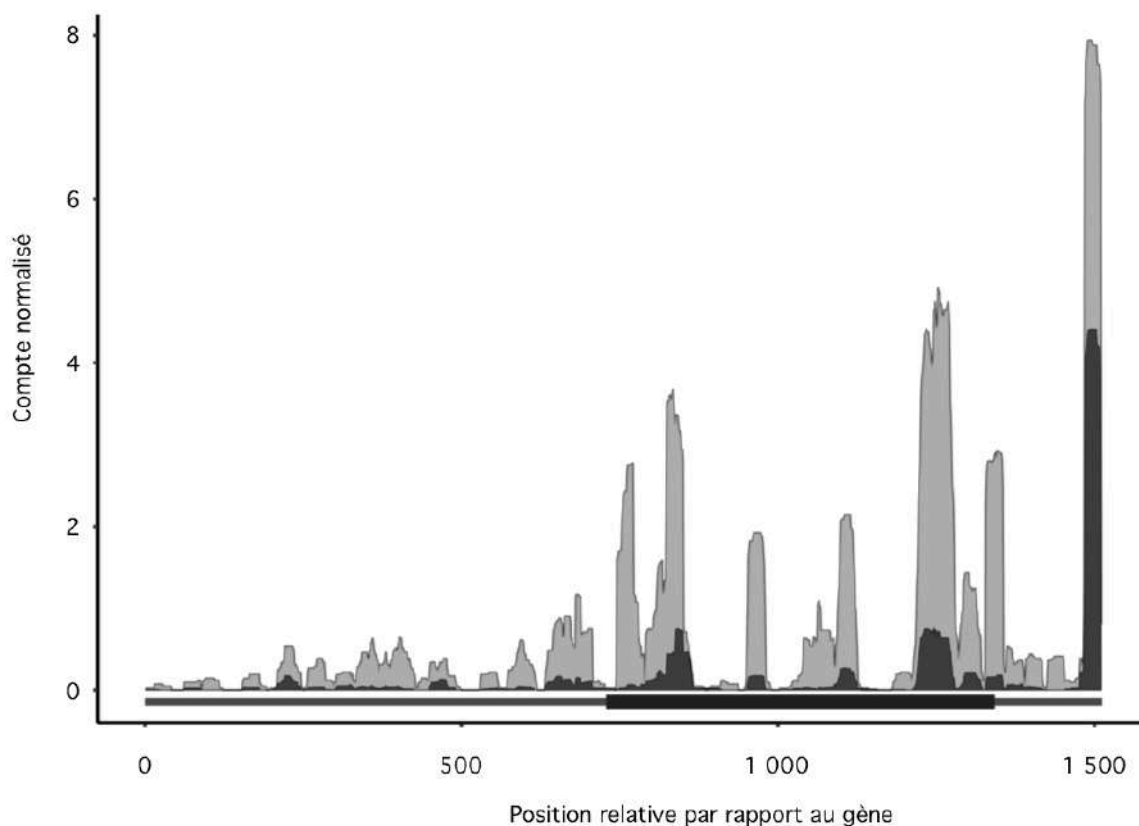


**Figure 34 - Analyse différentielle des changements transcriptionnels et traductionnels des ARNm mitochondriaux chez le mutant *rfl22*.**

Chaque exon mitochondrial a été quantifié par q-RT-PCR. Les niveaux de traduction de chaque exon ont été mesurés par profilage de ribosomes. Le témoin sauvage (Col-0) a été cultivé *in vitro* dans les mêmes conditions de culture que le mutant *rfl22*.

Les croix représentent les gènes ne comprenant qu'un exon, les ronds les gènes comprenant plusieurs exons. Si le gène est en couleur et que le nom de l'exon est indiqué, alors le log<sub>2</sub> (niveau de traduction chez *rfl22*/niveau de traduction chez Col-0) est supérieur à 1 ou inférieur à -1 (variation d'un facteur 2 au minimum). Si un exon (rond) est en couleur sans que le nom du gène ne soit indiqué, alors un des autres exons du même gène vérifie la condition précédente.

L'observation de la densité en ribosomes le long de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* nous a permis de mettre en évidence le fait que la couverture en ribosomes de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* chez le mutant *rfl22* est diminuée tout au long du transcrit, comparée à celle chez le sauvage (Figure 35).



**Figure 35 - Représentation de la densité en ribosomes le long de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* chez Col-0 et le mutant *rfl22***

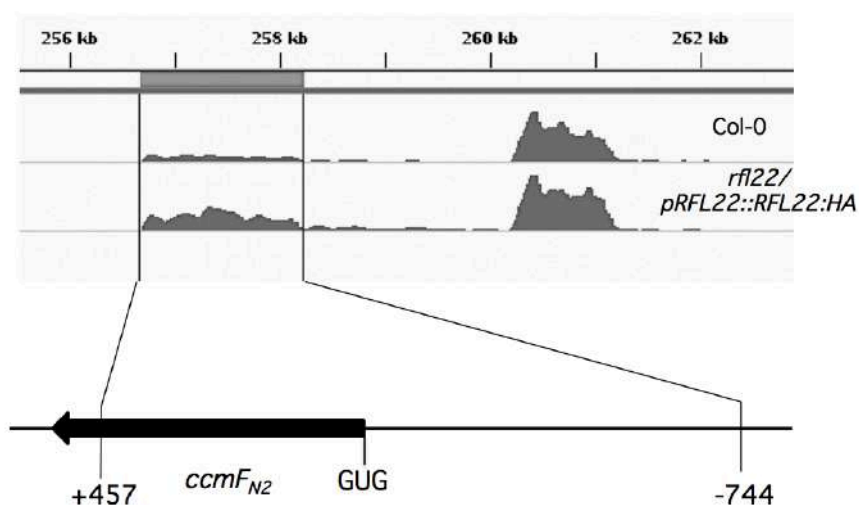
Les couvertures sont exprimées en nombre d'empreintes de ribosomes par base, normalisée par la taille des banques de séquençage pour permettre une comparaison entre les génotypes.

La couverture de *ccmF<sub>N2</sub>* chez Col-0 est représentée en gris, celle chez *rfl22* l'est en noir. La phase de lecture du gène *ccmF<sub>N2</sub>* est matérialisée par le rectangle noir en bas de la figure.

#### **4.1.7. La protéine RFL22 lie l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* *in vivo***

Afin d'identifier la cible ARN de RFL22, la protéine RFL22-HA a été immunoprécipitée à partir de mitochondries purifiées de plantes mutantes *rfl22* complémentées et les ARN co-enrichis ont analysés par RNA-seq. L'analyse statistique des ARN co-immunoprécipités montre un enrichissement spécifique d'un facteur d'environ 3 de la région comprenant

l'ARNm  $ccmF_{N2}$  chez les plantes complémentées (Figure 36), suggérant très fortement que la protéine RFL22 est associée à l'ARNm  $ccmF_{N2}$  *in vivo*.



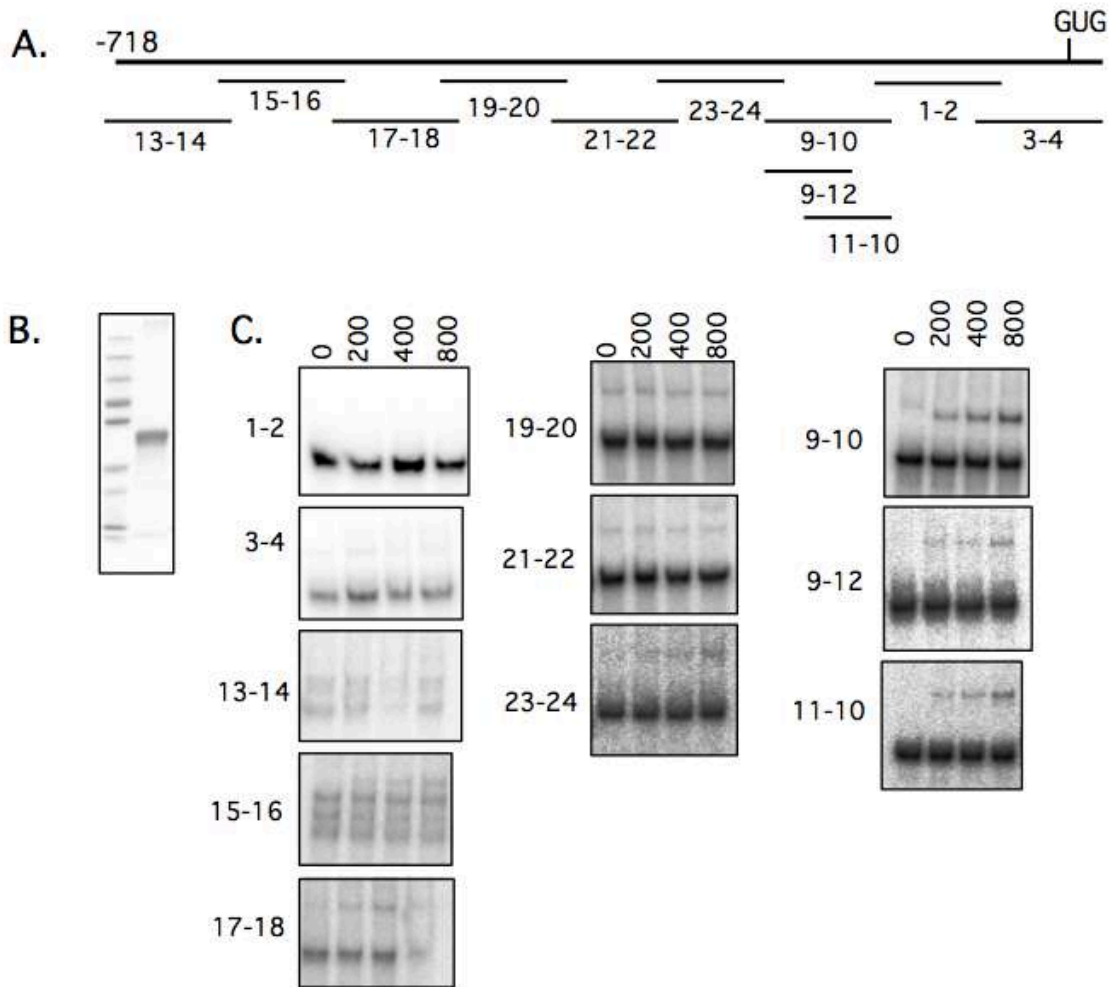
**Figure 36 - Co-immunoprécipitation de l'ARNm  $ccmF_{N2}$  avec la protéine RFL22-HA (Travaux de J. Dahan)**

L'immunoprécipitation a été réalisée sur le sauvage Col-0 (couverture du haut) ainsi que sur le mutant *rfl22* complété par le gène *RFL22*-HA. Les ARNs co-immunoprécipités ont été alignés sur le génome mitochondrial d'Arabidopsis. La région significativement enrichie chez la plante complémentée correspond à l'ARNm  $ccmF_{N2}$ , entre les positions -744 et +457 (respectivement par rapport au codon start GUG  $ccmF_{N2}$ ).

#### 4.1.8. La protéine RFL22 lie l'ARNm $ccmF_{N2}$ *in vitro*

Afin de préciser le site de fixation de la protéine RFL22 sur l'ARNm  $ccmF_{N2}$ , des expériences de « gel-retard » ont été réalisées. Cette approche permet de visualiser directement l'association d'une protéine et d'un ARN *in vitro* grâce au retard de migration sur gel de la sonde ARN (radio-marquée) occasionné en cas de liaison à la protéine.

La protéine RFL22 a été produite sous forme recombinante chez *E. coli* et purifiée par affinité sur nickel-agarose (Figure 37B). Les sondes ARN ont été produites par transcription *in vitro* de produits de PCR répartis tout le long de la 5'UTR de l'ARNm  $ccmF_{N2}$  (Figure 37A). Les expériences de gels-retard ont montré que la protéine recombinante RFL22-HA se lie spécifiquement aux sondes 9-10, 9-12 et 11-10, chevauchantes (Figure 37C). Cela signifie que la protéine se lie dans la région commune aux trois sondes, mesurant 74 nucléotides de long (Figure 38).



**Figure 37 - La protéine PPR RFL22 reconnaît spécifiquement une courte région de la 5' UTR de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* *in vitro***

A. Répartition des sondes ARN sur la 5'UTR de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>*. B. Protéine recombinante 6HIS-RFL22 purifiée. C. Expériences de gels retard permettant de visualiser l'affinité de la protéine RFL22 recombinante pour chacune des sondes ARN. La protéine RFL22 se lie spécifiquement sur les sondes 9-10, 9-12 et 11-10, chevauchantes. Comme indiqué, 0, 200, 400 et 800 nM de protéine RFL22 recombinante purifiée ont été utilisés.

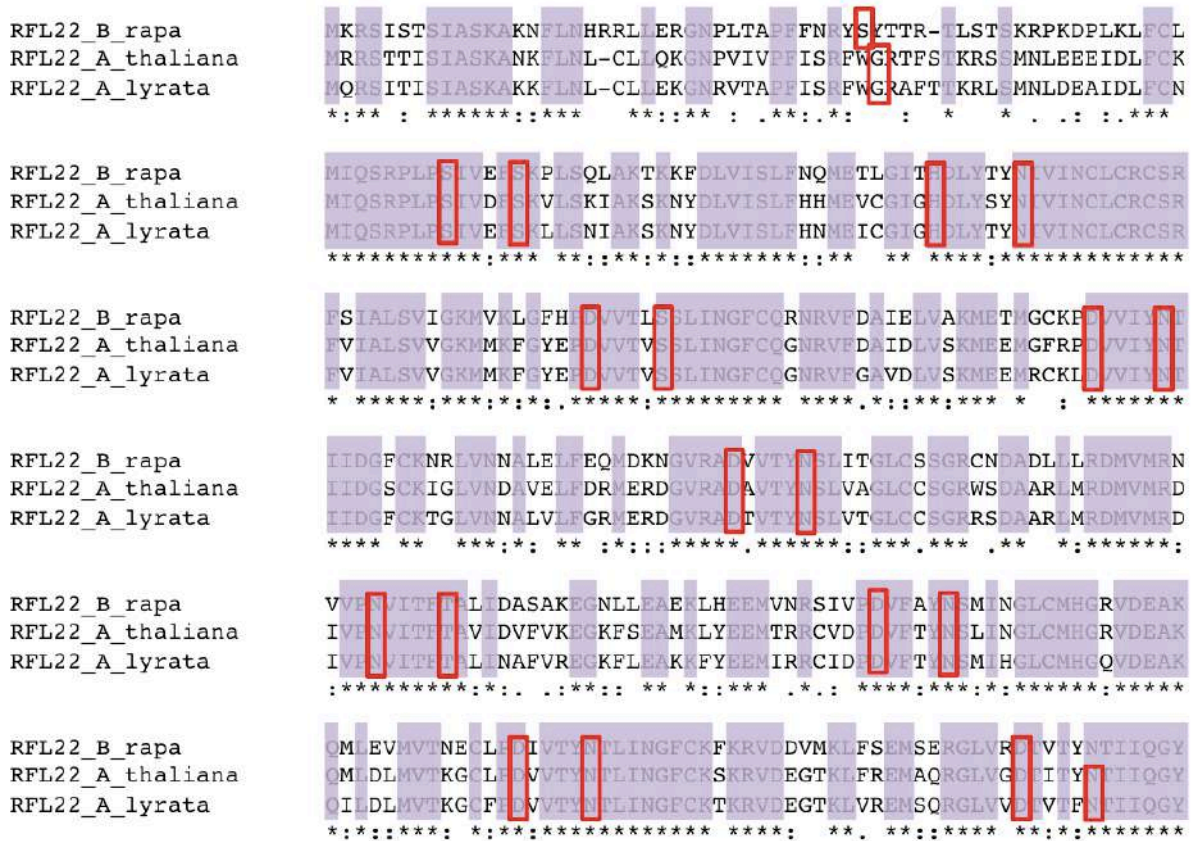


**Figure 38 - Détermination de la région cartographiée comportant le site de fixation de la protéine RFL22-HA sur la 5'UTR de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>***

La protéine 6HIS-RFL22 se lie spécifiquement aux sondes 9-10, 9-12 et 11-10. Son site de liaison se trouve donc dans la région commune aux trois sondes, appelée « séquence commune » sur la figure, longue de 74 nucléotides.

#### 4.1.9. Complémentation fonctionnelle du mutant *rfl22* d'*Arabidopsis* avec les orthologues putatifs du gène *RFL22* identifiés chez *Arabidopsis lyrata* et *Brassica rapa*.

De façon à évaluer la conservation de la protéine RFL22 chez les *Brassicaceae* et à préciser le site de fixation de RFL22 sur l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>*, des expériences de complémentations fonctionnelles croisées ont été réalisées. Cette approche s'est révélée intéressante dans la mesure où le gène *RFL22* présente un bon niveau de conservation chez les *Brassicaceae* (Figure 39) tandis que la 5' UTR du gène *ccmF<sub>N2</sub>* est moins conservée notamment entre *Arabidopsis thaliana* et les autres *Bassicaceae* (Figure 40). La 5'UTR de *ccmF<sub>N2</sub>* chez *A. lyrata* est en effet identique à celle de *A. thaliana*, tandis que celle de *ccmF<sub>N2</sub>* chez *B. rapa* est très différente. Des constructions géniques hybrides comprenant le promoteur de *RFL22* d'*A. thaliana* suivi de la séquence du gène orthologue putatif de *RFL22* chez *A. lyrata* (appelé ici *RFL22-L*) ou de *B. rapa* (appelé ici *RFL22-R*) ont été réalisées (cf. Matériel et méthodes).





Caractérisation fonctionnelle de la protéine RFL22

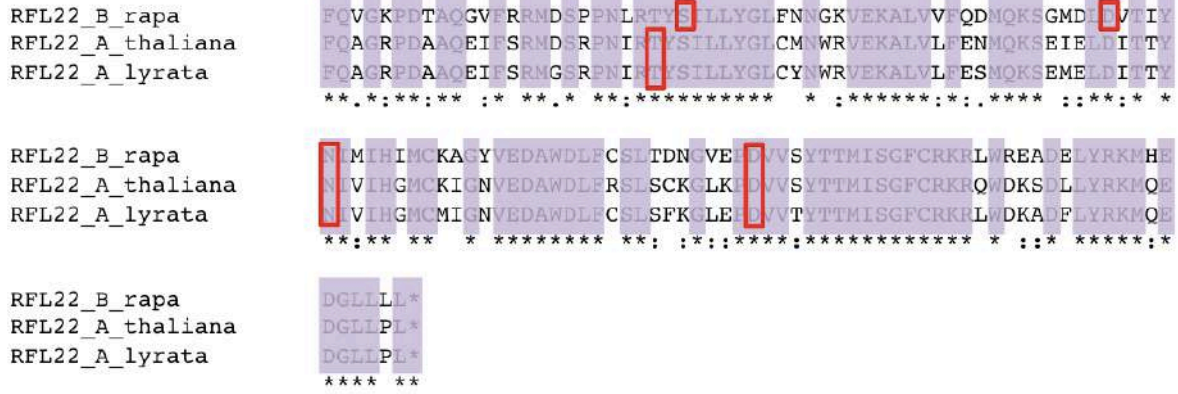


Figure 39 - Alignement des séquences protéiques de la protéine RFL22 chez *A. thaliana* et de ses orthologues putatifs chez *A. lyrata* et *B. rapa*

L'alignement a été réalisé avec Clustal Omega. Les acides aminés identiques entre les 3 protéines sont surlignés en violet, les acides aminés présents aux positions 5 et 35 des répétitions PPR, potentiellement impliqués dans la spécificité de reconnaissance de l'ARN cible sont encadrés en rouge, et ont été prédites par le site TPRpred.



## Caractérisation fonctionnelle de la protéine RFL22

```

5'UTR_Arabidopsis      gcattctccaactgtaagctctgatggaccaacacttatgcatgcgatttcaagtcttcat
5'UTR_Brassica_rapa    gcttgcata-----aagcc-----cttttcggcaatctctttcatg-----
** *      *      ****                * ** ** * * ** ** *

5'UTR_Arabidopsis      aatgagaaagtctcgagtcattacacaagcaaggatagctataacgagaaaaaggattt
5'UTR_Brassica_rapa    -aatgtgagggtgg-----aaccaaggaagacttttgaatacc-----ggatct
**** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

5'UTR_Arabidopsis      tgattttgctaatacccaaggggaatgtgaaatgtggaatgaatcaggaaatagccctttg
5'UTR_Brassica_rapa    tcaatttgatattgaagtg---aagctacaggacgctctacgtagcgatggctacctttc
* * **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

5'UTR_Arabidopsis      -----atztatcaaaaatacagaagtagtagtct-tcccg---ggtctcaactgt--tcg
5'UTR_Brassica_rapa    gtcctccattttggaacaaaggaagccattaagtgggcccgcctttagccccgattcgcg
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

5'UTR_Arabidopsis      gataacttttcttttaatcc---tac-----tgcataaggcaagatctc
5'UTR_Brassica_rapa    tacagcctttctctctgtcaggctcactgcagagaattttgaactgcccggacataagatc
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

5'UTR_Arabidopsis      atccttcggcgcaatcatgtgggctcagaagagtgctccctacgacggtaaatcggggca
5'UTR_Brassica_rapa    t-acttcatggtatgaaagagttgtgaaaaacatcaacttgaacctaatctctacgaa
****      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

5'UTR_Arabidopsis      aaagaccctttcttcgacgac
5'UTR_Brassica_rapa    aaaggtagtt-----
****      **

```

Figure 40 - Alignement des 5'UTR de *ccmF<sub>N2</sub>* d'*Arabidopsis thaliana* et de *Brassica Rapa*

Pour rappel, les séquences promotrices de *ccmF<sub>N2</sub>* d'*A. thaliana* et de *A. lyrata* sont identiques. L'alignement a été réalisé avec Clustal Omega.

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* hétérozygotes RFL22/*rfl22* ont été transformées avec les constructions obtenues et des plantes homozygotes mutantes *rfl22* exprimant les constructions RFL22-L ou RFL22-R ont été identifiées. Ces expériences ont montré que l'orthologue de *A. lyrata* (Figure 41) et l'orthologue de *B. rapa* peuvent compléter fonctionnellement le mutant *rfl22* chez *Arabidopsis thaliana*, et ce malgré les différences dans la région promotrice de *ccmF<sub>N2</sub>* entre ces espèces.





**Figure 41 - La protéine RFL22-L complémente fonctionnellement le mutant *rf22* d'*Arabidopsis thaliana*.**

Le sauvage Col-0 est à gauche, le mutant *rf22* complétementé avec la protéine RFL22-L se trouve à droite. Des résultats similaires ont été obtenus avec la protéine RFL22-R.

L'alignement de la 5'UTR de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* de *B. rapa* avec la région ARN de 74 bases comportant la région identifiée par les expériences de gels-retard (voir ci-avant) et comportant le site de liaison putatif de RFL22 révèle 3 régions présentant des similitudes ; l'une d'entre elles pourrait correspondre au site de liaison de RFL22 *in vivo* (Figure 42).

Caractérisation fonctionnelle de la protéine RFL22

```

5'UTR_Brassica_rapa      aggttagaatgtatagctcgcggggtgggattgacgggatagatcactcttgcagaaggag
Séquence_commune        -----caaaaatacagaagt--
                               ** * *****

5'UTR_Brassica_rapa      gtagaaccgggatctttataggagtgacttgggaagtcccgaaccggggtcaagctaca
Séquence_commune        -----

5'UTR_Brassica_rapa      acttgtgaattgtcaaaaaggctggtttttctgcttgcataaagcccttttcggcaatctc
Séquence_commune        -----agtag-----tcttcccggtctcactgttcggataac--
                               ** * * * * * * * * * * * *

5'UTR_Brassica_rapa      tttcatgaatgtgaggggtggaaccaaggaagacttttgaataccggatcttcaatttgat
Séquence_commune        -----

5'UTR_Brassica_rapa      attgaagtgaagctacaggacgctctacgtagcgatggctacctttcgtctccattttg
Séquence_commune        -----

5'UTR_Brassica_rapa      gaacaaaggaagccattaagtgggcgcctttagccccgattcgcgtacagcctttctc
Séquence_commune        -----

5'UTR_Brassica_rapa      tctgtcaggtcactgcagagaattttgaaactgccggacataagatctacttcatgttat
Séquence_commune        -----

5'UTR_Brassica_rapa      gaaagagtttgaaaaacatcaacttgaacctaatcctctacgaaaaggtagtttctt
Séquence_commune        -----tttcttttaactactgcataggc-----
                               ** ** * ***** * *** *

5'UTR_Brassica_rapa      tgctctgggcaggagcgcta
Séquence_commune        -----

```

Figure 42 - Alignement de la 5'UTR de *ccmF<sub>N2</sub>* de *Brassica rapa* avec la région de liaison de la protéine RFL22 sur la 5' UTR de *ccmF<sub>N2</sub>* d'*Arabidopsis thaliana* identifiée par gel retard.

L'alignement a été réalisé avec Clustal Omega.

# Résultats

## Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle de la protéine

RFL23



## 4.2. Caractérisation fonctionnelle de la protéine RFL23

La protéine RFL23 est la seconde protéine RFL essentielle d'*Arabidopsis thaliana*. Tout comme pour la protéine RFL22, nous avons cherché à connaître son rôle dans la mitochondrie en étudiant un mutant homozygote présentant une insertion ADN-T (SALK\_071636) dans le gène *RFL23*, appelé par la suite mutant *rfl23*.

Un seul allèle muté étant disponible, la complémentation fonctionnelle du mutant a été réalisée avec le gène *RFL23* portant une étiquette FLAG pour vérifier que le phénotype mutant observé était bien lié à l'inactivation du gène *RFL23*.

### 4.2.1. Le mutant *rfl23* présente un retard de croissance

Le mutant *rfl23* présente un retard de croissance en comparaison au sauvage Col-0 (Figure 43), ses feuilles sont légèrement recroquevillées et il est quasiment stérile.



Figure 43 - Le mutant *rfl23* présente un retard de croissance important par rapport au témoin sauvage (Col-0).

Photographies prises après 9 semaines de culture.

#### 4.2.2. Le mutant *rfl23* n'accumule plus de complexe I mais un intermédiaire d'assemblage de 200 kDa

Le phénotypage moléculaire du mutant *rfl23* par BN-PAGE a montré qu'il ne présente plus de complexe I fonctionnel (Figure 44). Néanmoins, il accumule un intermédiaire d'assemblage de 200 kDa (Figure 45A), ce qui indique que l'assemblage du complexe I est initié mais s'arrête de façon précoce chez le mutant, entre l'ajout de la protéine Nad2 et celui des trois protéines Nad3, Nad4L et Nad6 (Figure 45B).

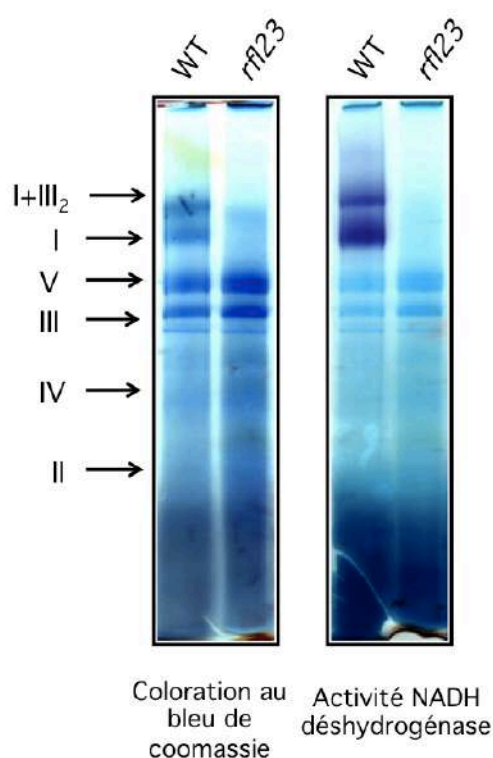
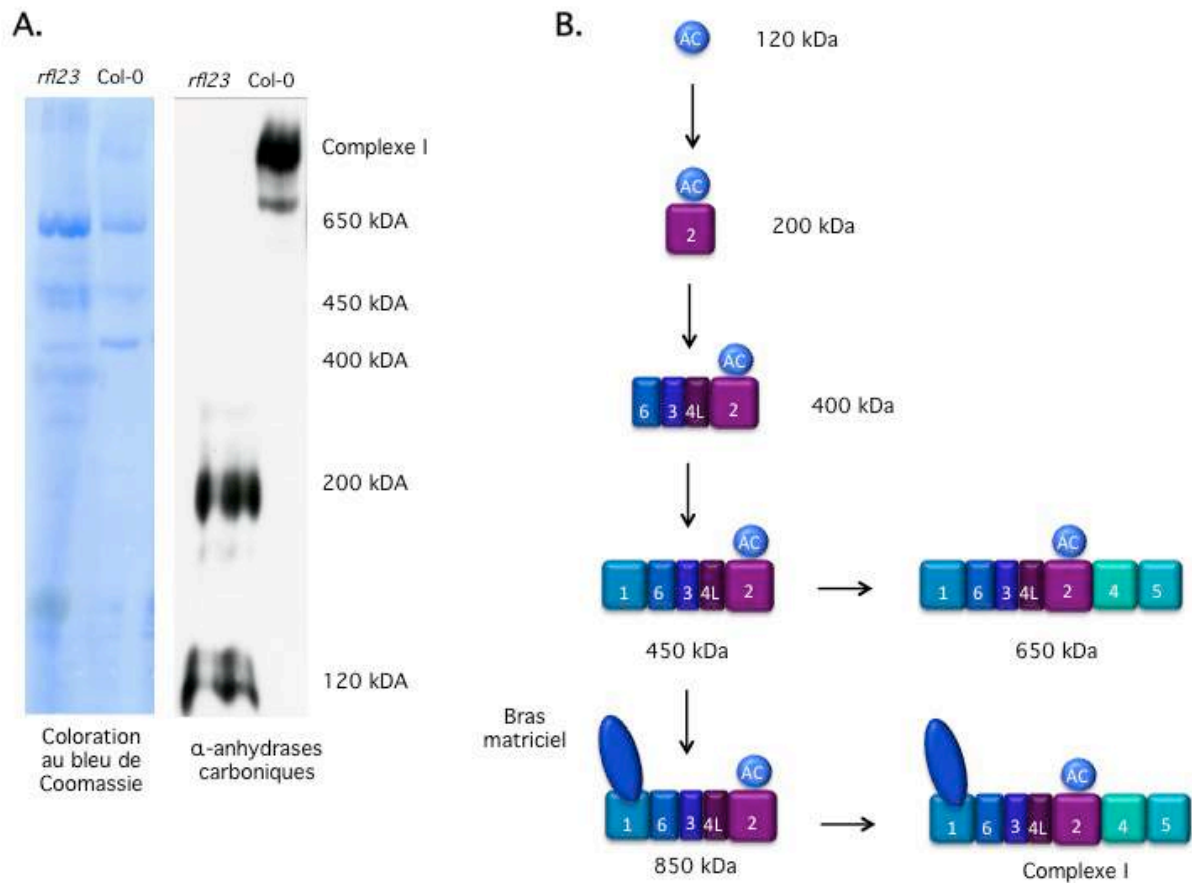


Figure 44 - Le mutant *rfl23* n'accumule plus le complexe I de la chaîne respiratoire (Travaux de J. Dahan).

BN-PAGE réalisé à partir d'extraits de membranes d'*Arabidopsis*. Coloration au bleu de Coomassie (à gauche) et détection de l'activité NADH déshydrogénase du complexe I (à droite).



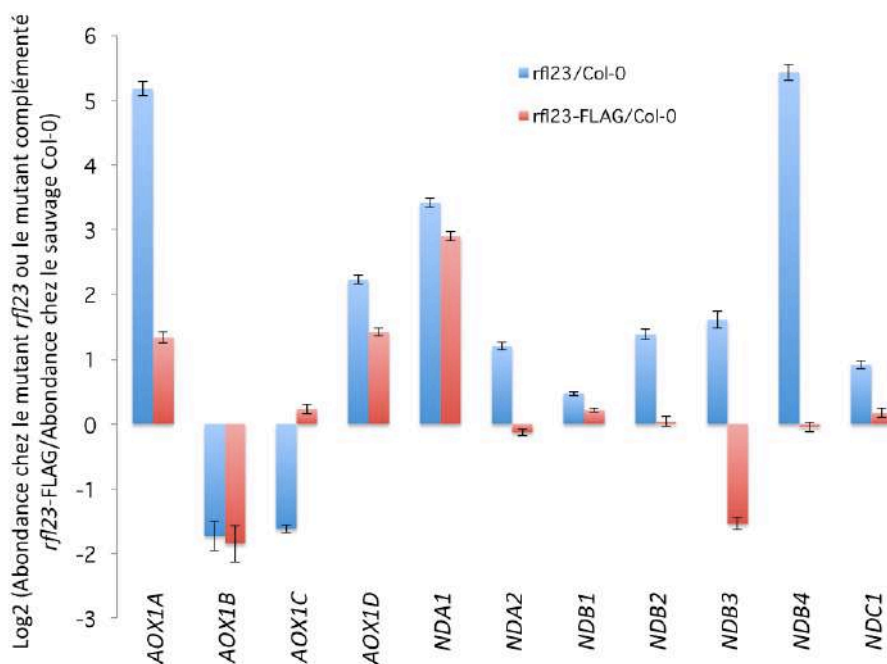
**Figure 45 - Détection du complexe I et de ses intermédiaires d'assemblage chez Col-0 et le mutant *rfl23* (Travaux d'E. Meyer)**

A. Détection du complexe I et des intermédiaires d'assemblage par BN-PAGE suivi d'un western-blot avec un anticorps dirigé contre les anhydrases carboniques (AC), présentes à toutes les étapes de l'assemblage du complexe I. La coloration au bleu de Coomassie du BN-PAGE est à gauche, le western-blot réalisés à l'aide de l'anticorps anti-AC est à droite.

B. Modèle d'assemblage du complexe I de plantes (communication personnelle - Etienne Meyer, MPI Potsdam).

Les noms des protéines Nad sont indiqués par leur numéro.

L'induction de la respiration alternative chez le mutant *rfl23* a été évaluée en mesurant le niveau d'expression des ARNm codant les différentes isoformes de l'oxydase alternative et des NADH déshydrogénases alternatives (Figure 46). Plusieurs d'entre elles sont surexprimées chez le mutant : *AOX1A*, *AOX1D*, *NDA1* et *NDB4*. En particulier, les transcrits *AOX1A* et *NDB4* le sont environ 32 fois.



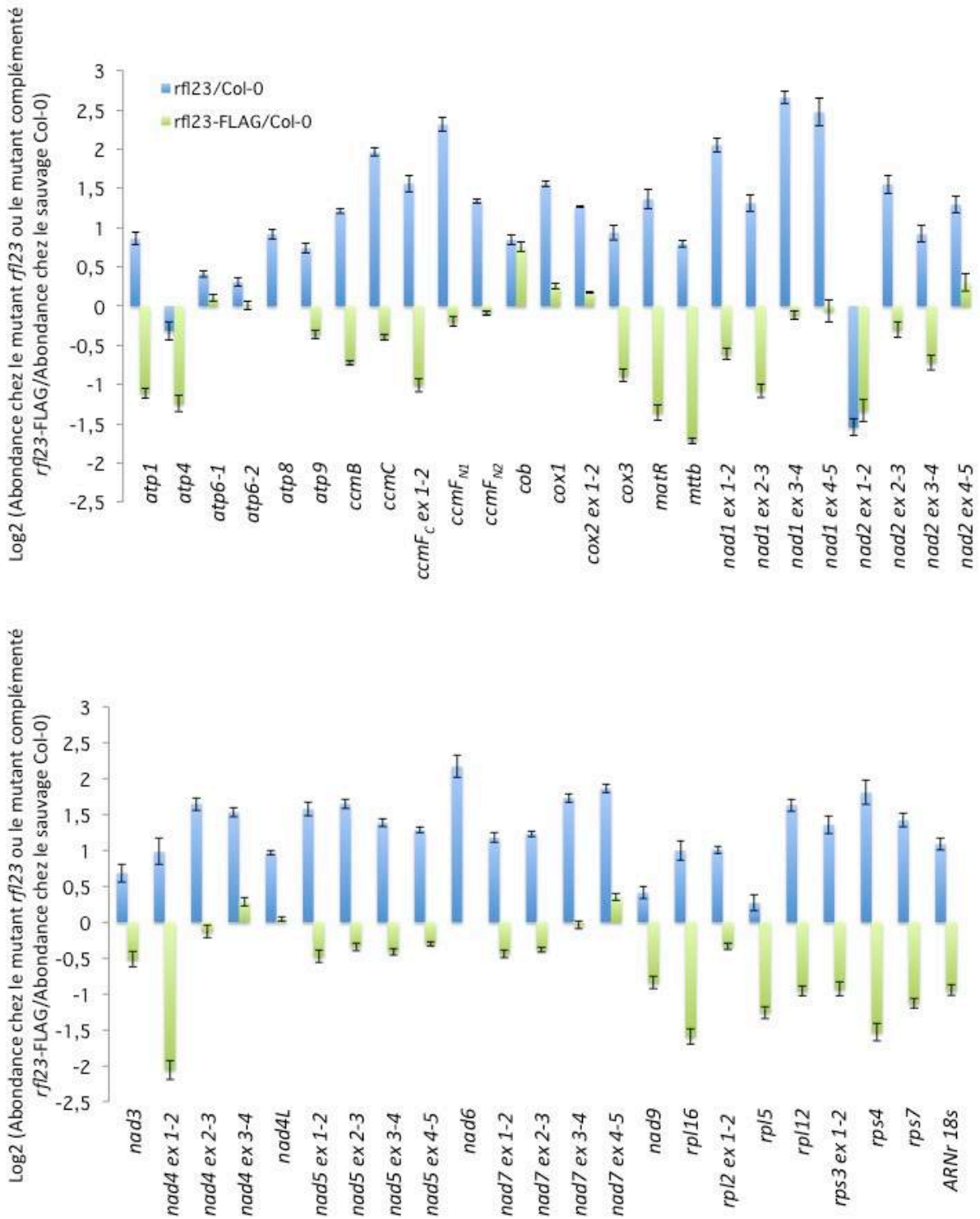
**Figure 46 - Mesure du niveau d'accumulation des ARNm codant des différentes isoformes de l'alternative oxydase et des NADH déshydrogénases alternatives chez le mutant *rfl23* et le mutant complémenté *rfl23*-FLAG en comparaison au sauvage.**

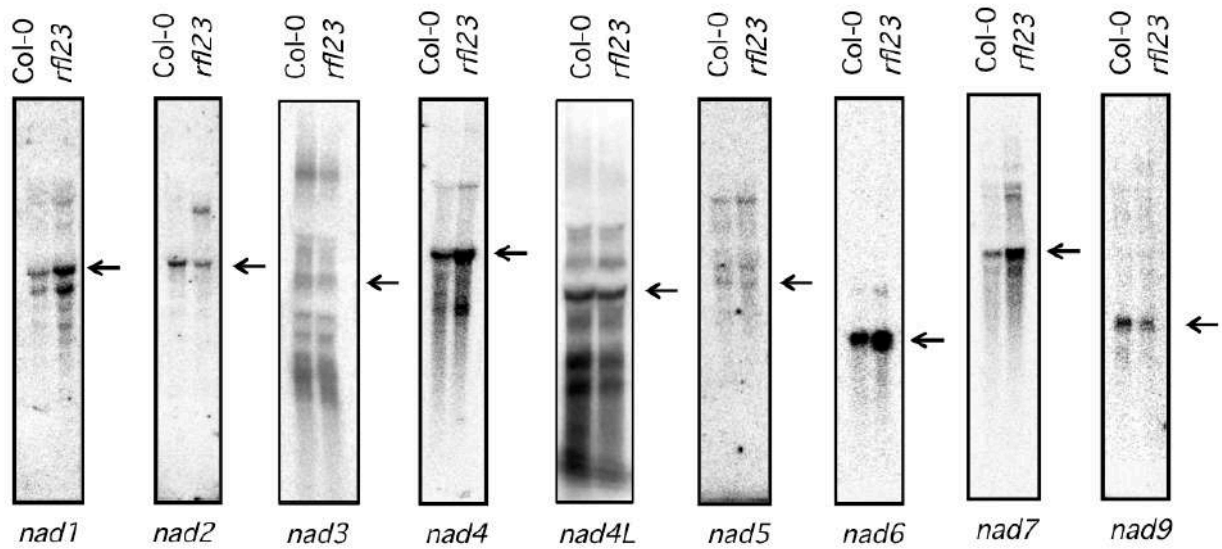
Quantifications par q-RT-PCR. Pour chaque génotype, 3 réplicats biologiques et 3 réplicats techniques ont été réalisés. Les résultats ont été normalisés avec l'ARNr 26S mitochondrial entre les différents jours et avec l'ARN nucléaire 18S entre les différents réplicats biologiques. Les transcrits *AOX1A* et *NDB4* sont spécifiquement surexprimés chez le mutant.

### 4.2.3. Les ARNm mitochondriaux sont sur-accumulés chez le mutant *rfl23*

L'analyse du transcriptome mitochondrial du mutant *rfl23* et du mutant complémenté *rfl23*-FLAG en comparaison à celui du sauvage Col-0 a montré que mis à part *atp4*, tous les ARNm mitochondriaux sont surexprimés chez *rfl23*. Nous observons également une diminution l'abondance de la forme épissée de l'intron 1 de *nad2*, notée *nad2* ex 1-2 sur la Figure 47. De façon à confirmer ces résultats, des hybridations de type « northern-blot » ont été réalisées pour tous les ARNm mitochondriaux codant des sous-unités du complexe I et ont confirmé leur surexpression. Nous confirmons également le défaut d'épissage partiel du premier intron de l'ARNm *nad2*, et observons une légère déstabilisation de l'ARNm *nad9* chez *rfl23* (Figure 48).







**Figure 48 - Les ARNm codant les sous unités du complexe I sont surexprimés chez le mutant *rfl23***

Northern-blot réalisés sur 10  $\mu$ g d'ARN total. Les sondes ADN ont été produites par PCR puis radio-marquées.

L'ARNm *nad2* présente un défaut d'épissage partiel et l'ARNm *nad9* est légèrement sous-accumulé chez le mutant *rfl23*, les autres ARNm sur surexprimés.

#### 4.2.4. Les extrémités des transcrits mitochondriaux du complexe I sont maturées de façon équivalente chez le mutant *rfl23* et le sauvage

Puisque nous savons que certaines protéines RFL sont impliquées dans la maturation des extrémités de leur ARNm cible, nous avons analysé la maturation des extrémités 5' et 3' des ARNm codant les sous-unités du complexe I par RT-PCR sur des ARNs circularisés. Cette cartographie nous a montré que les transcrits *nad* étaient maturés de façon équivalente chez le mutant *rfl23* et le sauvage Col-0 (Figure 49).

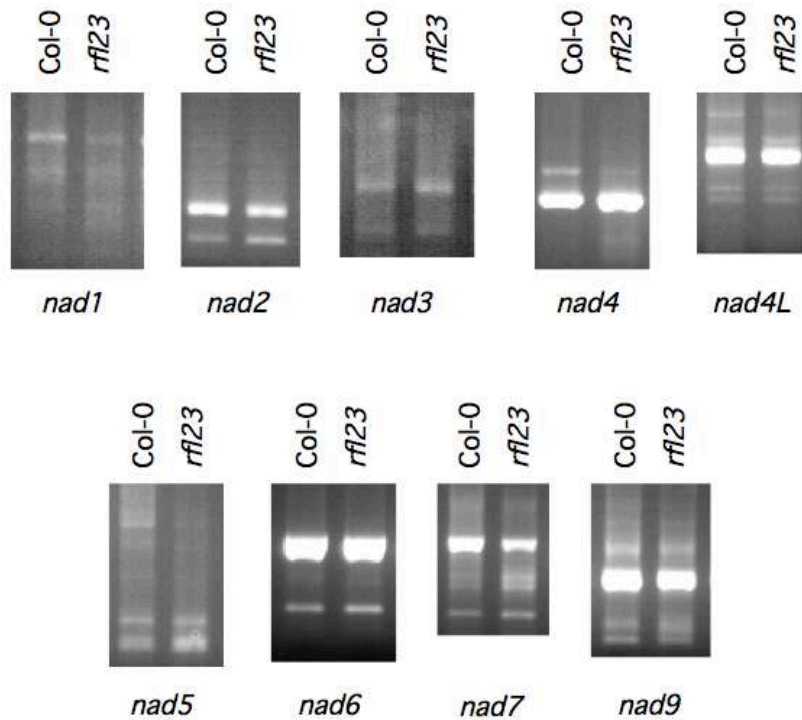
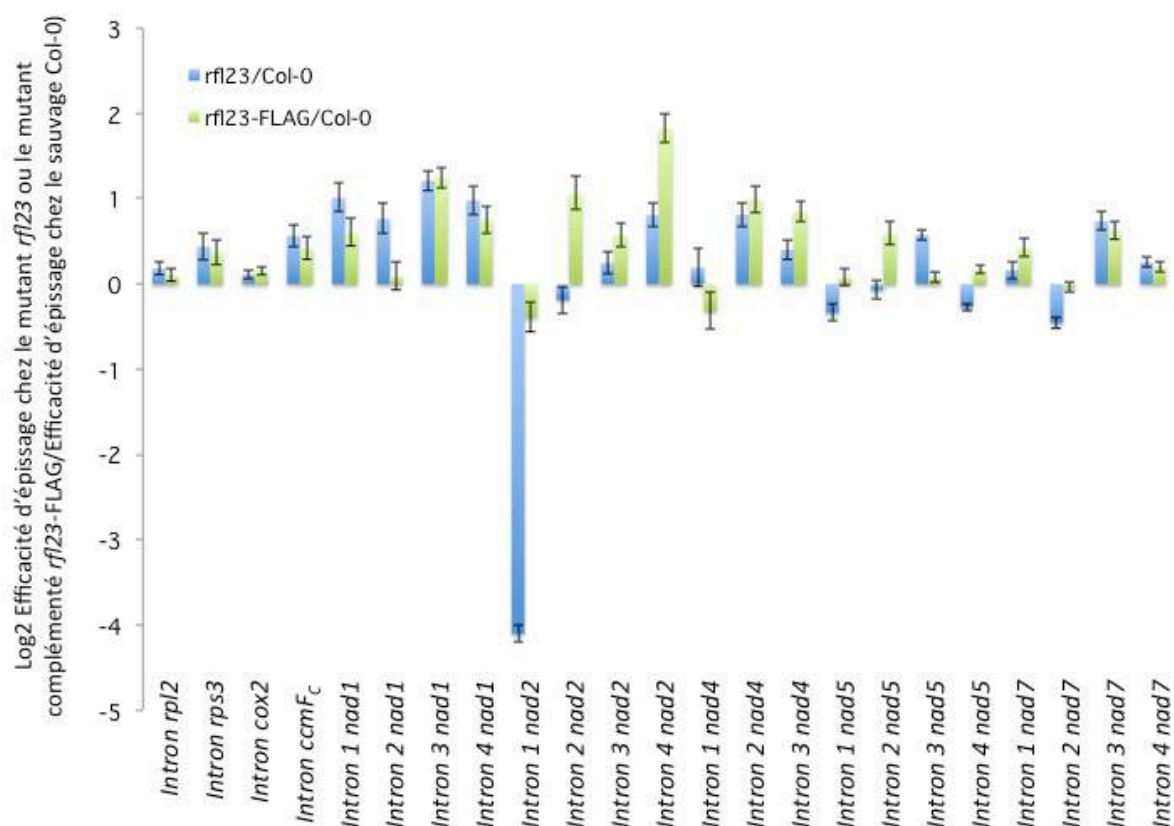


Figure 49 – Cartographie des extrémités des ARNm mitochondriaux du complexe I chez le mutant *rfl23* en comparaison au sauvage Col-0.

Cartographie réalisée par RT-PCR sur des ARNs circularisés. Les transcrits *nad* sont maturés de façon équivalente chez le mutant *rfl23* et Col-0.

#### 4.2.5. La protéine RFL23 est requise pour l'épissage de l'intron 1 de *nad2*

La mesure de l'efficacité d'épissage de chaque intron mitochondrial par RT-PCR quantitative nous a permis de confirmer et quantifier le défaut partiel d'épissage de *nad2* chez le mutant *rfl23* (Figure 50). En effet, le mutant *rfl23* présente 17 fois moins de transcrits *nad2* ayant l'intron 1 épissé.



**Figure 50 - Mesure de l'efficacité d'épissage des ARNm mitochondriaux chez le mutant *rfl23* et le mutant complémenté *rfl23-FLAG* en comparaison au sauvage Col-0**

Quantifications par RT-PCR quantitative. Pour chaque génotype, 3 réplicats biologiques et 3 réplicats techniques ont été réalisés. Les résultats ont été normalisés avec l'ARN 26S entre les différents jours et avec l'ARN nucléaire 18S entre les différents réplicats biologiques. L'intron 1 de *nad2* est 17 fois moins épissé chez le mutant *rfl23* par rapport au sauvage.

#### 4.2.6. L'ARNm mitochondrial *nad4L* n'est pas traduit correctement chez *rfl23*

Comme pour le mutant *rfl22*, puisque qu'aucun rôle pour la protéine RFL23 pouvant expliquer le phénotype du mutant n'a pu être révélé en étudiant l'abondance et la maturation des transcrits mitochondriaux, nous avons fait l'hypothèse que cette protéine pouvait être impliquée dans la traduction de son ARNm cible. Pour valider ou infirmer cette hypothèse, nous avons utilisé la technique du profilage de ribosomes afin d'estimer le niveau de traduction des ARNm mitochondriaux chez *rfl23* en comparaison au sauvage (Figure 51). De la même façon que pour le mutant *rfl22*, cette étude nous a permis d'observer que les niveaux de traduction des différents ARNm mitochondriaux n'étaient pas strictement équivalents entre le mutant *rfl23* et le sauvage.

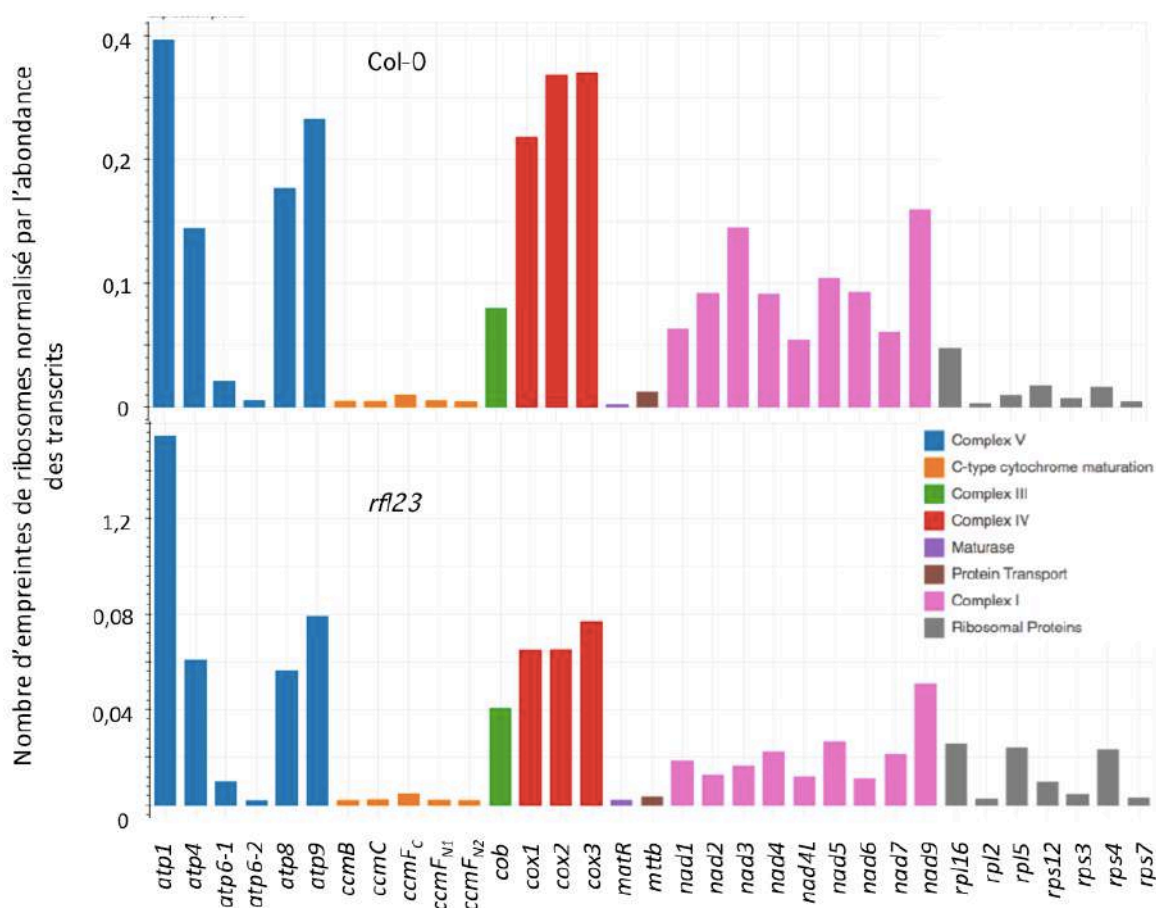
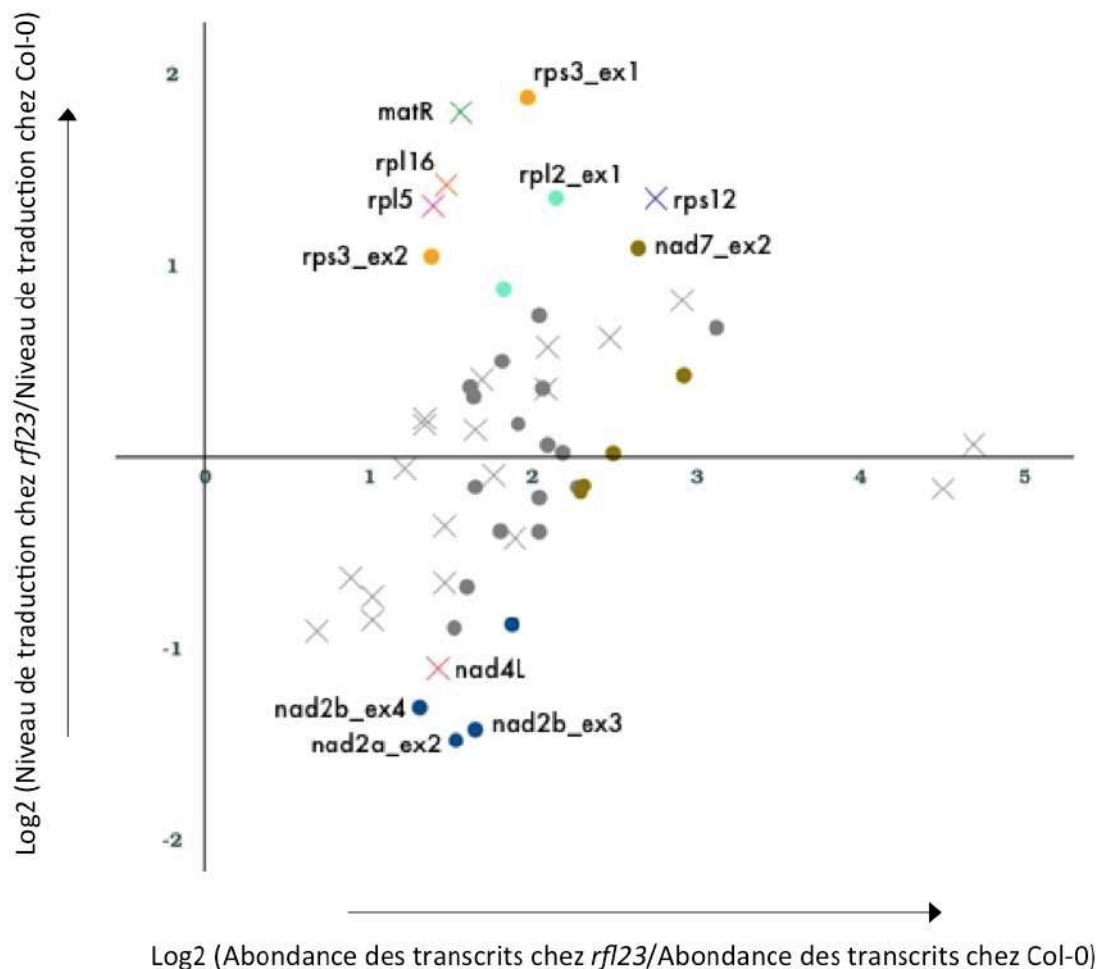


Figure 51 – Traductomes mitochondriaux de Col-0 et du mutant *rfl23*

Traductomes mitochondriaux mesurés par profilage de ribosomes. Cette figure permet de comparer les niveaux de traduction entre les transcrits d'un même génotype mais ne permet pas de faire de comparaisons entre génotypes.

Pour affiner ces résultats, une comparaison statistique des niveaux d'accumulation de traduction des ARNm mitochondriaux entre le mutant et le sauvage a été réalisée. Il ressort de cette analyse que les ARNm *nad4L* et *nad2* sont significativement moins traduits chez *rfl23* (Figure 52). Au sujet de *nad2*, nous observons que les exons concernés par cette baisse de niveau de traduction sont les exons 2, 3 et 4, soit ceux qui suivent intron 1, qui n'est que partiellement épissé chez ce mutant.



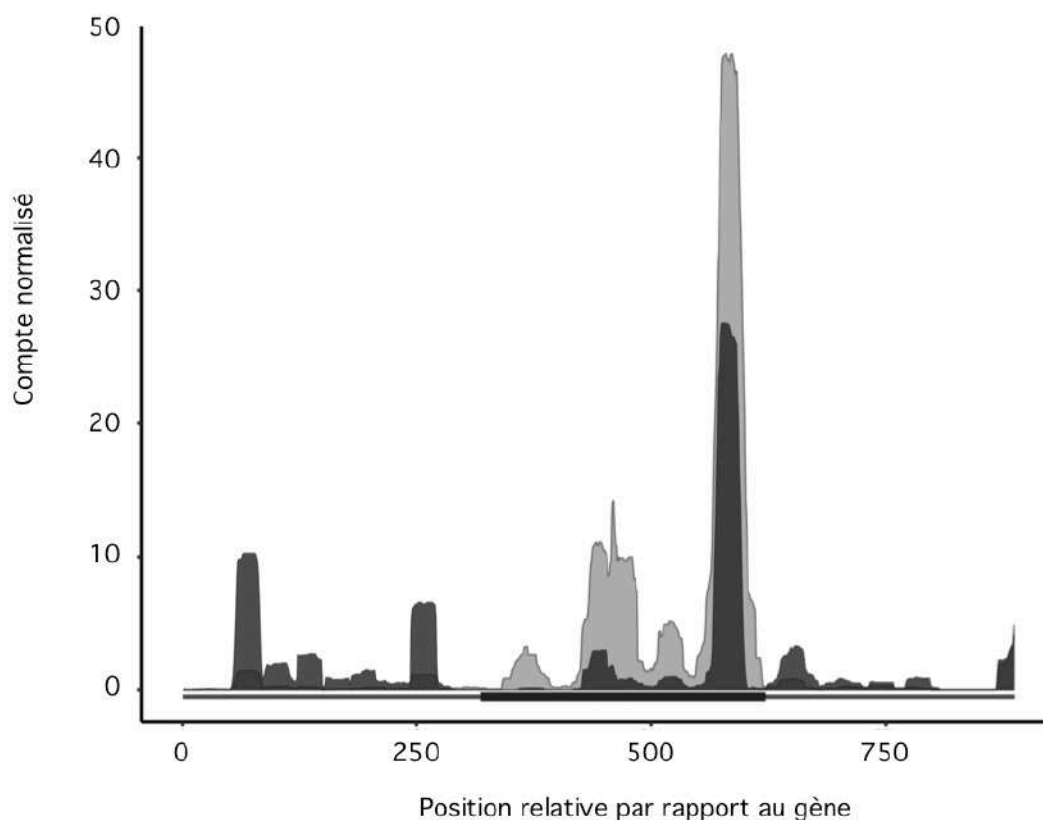
**Figure 52 - Analyse différentielle des changements transcriptionnels et traductionnels des ARNm mitochondriaux chez le mutant *rfl23*.**

Chaque exon mitochondrial a été quantifié par RT-PCR quantitative. Les niveaux de traduction de chaque exon ont été mesurés par profilage de ribosomes.

Les croix représentent les gènes ne comprenant qu'un exon, les ronds les gènes comprenant plusieurs exons. Si le gène est en couleur et que le nom de l'exon est indiqué, alors le  $\log_2$  (niveau de traduction chez *rfl23*/niveau de traduction chez Col-0) est supérieur à 1 ou inférieur à -1 (variation d'un facteur 2 au minimum). Si un exon (rond) est en couleur sans que le nom du gène ne soit indiqué, alors un des autres exons du même gène vérifie la condition précédente.

La répartition et la densité des empreintes de ribosomes le long de l'ARNm *nad4L* montre que la traduction est décalée en 3' chez le mutant *rfl23* en comparaison au sauvage et ne commence, qu'au début du deuxième tiers du transcrit (Figure 53). Il ressort donc que l'ARNm *nad4L* est pris en charge par les polysomes mitochondriaux, l'initiation traductionnelle chez *rfl23* n'a néanmoins pas lieu sur le codon AUG situé au début de la phase codante (comme chez le sauvage), mais au début du 2<sup>ème</sup> tiers du transcrit.

Enfin, plusieurs transcrits apparaissent significativement plus traduits chez le mutant par rapport au sauvage. Il s'agit notamment de *matR*, *rpl2*, *rpl5*, *rpl16*, *rps3* et *rps12* (Figure 52), soit entre autres cinq transcrits codant des sous-unités du mitoribosome.



**Figure 53 - Couverture ribosomale de l'ARNm *nad4L* chez Col-0 et le mutant *rfl23***

La couverture est exprimée en nombre d'empreintes de ribosomes par nucléotide, normalisée par la taille des banques de séquençage. La couverture de *nad4L* chez Col-0 est représentée en gris, celle chez *rfl23* l'est en noir. La phase de lecture du gène *nad4L* est matérialisée par le rectangle noir en bas de la figure.





# Résultats

## Partie 3 : Analyse du traductome mitochondrial chez *Arabidopsis thaliana*



#### 4.3. **Projet d'article : Analyse du traductome mitochondrial chez *Arabidopsis thaliana***

## **Analysis of the translational landscape of Arabidopsis mitochondria**

Noelya Planchard<sup>1,2,‡</sup>, Pierre Bertin<sup>3,‡</sup>, Martine Quadrado<sup>1</sup>, Céline Dargel-Graffin<sup>1</sup>, Isabelle Hatin<sup>3</sup>, Olivier Namy<sup>3,\*</sup>, Hakim Mireau<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, RD10, 78026 Versailles Cedex, France

<sup>2</sup>Paris-Sud University, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

<sup>3</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), UMR 9198 CEA, CNRS, Univ. Paris Sud, Bâtiment 400, 91405, Orsay, France.

‡These authors contributed equally to the paper as first authors.

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 130 833 070; Fax: +33 130 833 319; Email: [hakim.mireau@inra.fr](mailto:hakim.mireau@inra.fr)

Correspondence may also be addressed to Olivier Namy. Tel: +33 169 155 051; Fax: +33 169 157 296; Email: [olivier.namy@i2bc.paris-saclay.fr](mailto:olivier.namy@i2bc.paris-saclay.fr)

## Abstract

Unlike other mRNA expression processes at play in plant mitochondria, translation has remained largely unexplored up to now. Growing evidence indicate though that mitochondrial translation in most organisms differs from its bacterial counterpart in many key aspects. In this analysis, we used the ribosome profiling technology to generate a genome-wide snapshot of mitochondrial translation in *Arabidopsis*. We reveal that respiratory subunit-encoding mRNAs show much higher ribosome association than other mitochondrial mRNAs, implying that they are translated to higher levels. Homogenous ribosome densities were generally detected within each respiratory complex except for complex V where higher mRNA ribosome coverage corroborate with higher needs in specific subunits. In complex I respiratory mutants, a slight reorganization of mitochondrial mRNAs ribosome association was detected mostly involving an increase in ribosome densities on certain ribosomal protein encoding transcripts and a reduction in the translation of a few complex V mRNAs. Altogether, our observations reveal that plant mitochondrial translation is a dynamic process and that translational control is an important component of gene expression in plant mitochondria. This study paves the way for future advances in the understanding of translation in higher plant mitochondria.

### 4.3.1. Introduction

The functioning of eukaryotic cells relies on the integrated activity of several highly specialized subcellular organelles. Among them, mitochondria represent essential energy conversion powerhouses that produce most of the energy of cells through aerobic respiration. Mitochondria have an exogenous origin and the prevailing view is that they arose from the endosymbiotic adoption of an ancient  $\alpha$ -proteobacteria (Gray, 1999, 2012). Throughout evolution, the adoption of mitochondria has been associated with a profound reduction of their genetic content. Modern mitochondrial genomes encode only a handful of mRNAs (33 in *Arabidopsis thaliana*) that are translated within the organelle. This requires the existence of a complete gene expression machinery whose most involved factors are encoded by nuclear genes but that necessarily coevolved with mitochondrial genomes.

Thereby, gene expression in mitochondria involves a cooperation between highly degenerated bacterial-like features inherited from the original endosymbiont and eukaryotic-derived nuclear-encoded trans-factors that appeared throughout the evolution. This dual origin has resulted in complex mRNA expression processes that involve a high number of post-transcriptional modifications (Lightowers et al., 2014; Hammani & Giegé, 2014). In the last years, significant progresses have been made on certain aspects of gene expression in plant mitochondria (Hammani & Giegé, 2014). However, mitochondrial translation, the last level of mRNA expression that is also the least prone to easy molecular analyses, has remained largely unexplored in plants. Yet, we know that despite of its ancient prokaryotic origin, the mitochondrial translation machinery differs profoundly from its bacterial counterpart in many essential aspects and that major translation-associated components are substantially different from the ones found in bacteria (Lightowers et al., 2014; Janska & Kwasniak, 2014; Ott et al., 2016). In particular, the rRNA and protein compositions of mitoribosomes differ extensively from the one of *E. coli* ribosomes (Bonen, 2004; Greber & Ban, 2016).

Additionally, the constraints of translating few mRNAs mostly encoding hydrophobic membrane subunits have conducted to highly specialized translation mechanisms guided by membrane-associated mitochondrial ribosomes (mitoribosomes) to facilitate cotranslational insertion of mitochondria-encoded proteins into the inner mitochondrial membrane (Pfeffer et al., 2015). The divergence with bacteria is also particularly obvious for translation initiation step since plant mitochondrial mRNAs lack typical ribosome anchoring motif in their 5' leaders used in prokaryotes to help position the start codon at the P-site of the ribosome (Bonen, 2004). Thus, we currently don't know how mitochondrial ribosomes are recruited on 5' untranslated regions and especially how the correct translation initiation codon is recognized by the small ribosomal subunit. The high degree of sequence divergence among 5' leaders of plant mitochondrial mRNA has suggested a ribosome recruitment mechanism involving gene-specific cis-sequences and trans-factors (Hazle & Bonen, 2007; Choi et al., 2012).

Up to now only two proteins belonging to the large family of pentatricopeptide repeat (PPR) proteins have been shown to promote mitochondrial translation initiation in higher plants (Manavski et al., 2012; Haili et al., 2016). However, the mechanisms by which these PPR proteins help recruiting the mitoribosome on the mRNAs they target have not been determined yet.

The recent development of the ribosome profiling technology has greatly facilitated the detailed measurement of translation at the single-nucleotide level and on a genome-wide scale (Ingolia et al., 2009). Its general principle consists in the purification and subsequent sequencing of short mRNA segments covered by the translating ribosomes. These mRNA segments are called ribosome footprints and measure about 30-nucleotide long in most species (Brar & Weissman, 2015). The statistical analysis of their distributions reveals the identity and the boundaries of translated RNA regions and provides a measurement of the relative translational levels of mRNAs. This technology has recently revealed interesting functional aspects on ribosome behaviour in plastid and human mitochondria but had been never used to study plant mitochondrial translation (Zoschke et al., 2013; Rooijers et al., 2013; Chotewutmontri & Barkan, 2016).

Therefore, to get a comprehensive view of the Arabidopsis mitochondrial translome and the functioning of the plant mitochondrial machinery, we prepared and sequenced total ribosome footprints from Arabidopsis inflorescences, and mapped them to the Arabidopsis mitochondrial genome. In particular, this approach allowed us to estimate and compare the translational activity of mitochondrial mRNAs, to see how mitochondrial translation is reorganized in respiratory mutants.

## **4.3.2. Materials and methods**

### **4.3.2.1. Plant material**

*Arabidopsis (Arabidopsis thaliana)* Col-0 plants were obtained from the Arabidopsis Stock Centre of Institut National de la Recherche Agronomique in Versailles (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/portail/>). *Arabidopsis mtsf1* and *mtl1* mutants were previously described (Haili et al., 2013; Haili et al., 2016). Plants were grown in a greenhouse in long day conditions for 10 to 12 weeks before use. Flowers were harvested simultaneously for all genotypes, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

#### **4.3.2.2. Ribosome footprints preparation**

Total ribosome footprints were prepared from a mix of flower buds and open flowers following a procedure adapted from (Zoschke et al., 2013; Baudin-Baillieu et al., 2016). About 2.5 g of flowers were ground in liquid nitrogen and resuspended in 15 mL of ribosome extraction buffer (0.2 M sucrose, 0.2 M KCl, 40 mM Tris-acetate, pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM b-mercaptoethanol, 2 % polyoxyethylene 10 tridecyl ether, 1 % Triton X-100, 100 mg/mL chloramphenicol, and 100 mg/mL cycloheximide). The obtained solution was centrifuged twice for 10 min at 15 000 *g* at 4°C to remove the cell debris and the supernatant was transferred to a new tube. To estimate the RNA concentration contained in the supernatant, total RNA was extracted from a 0.5 mL aliquot using the TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. The supernatant was then digested with 10 U/OD260nm/mL of RNase I (Ambion), and incubated 1 h at 25°C to degrade unprotected RNA. The solution was then layered on an equal volume of a sucrose cushion (1 M Sucrose, 0.1 M KCl, 40 mM Tris-acetate, pH 8, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM b-mercaptoethanol, 100 mg/mL chloramphenicol, and 100 mg/mL cycloheximide) and centrifuged for 3 h at 55 000 *g* at 4°C in a TFT 65-13 rotor (Kontron). The obtained pellet was resuspended in 0.6 mL of RNA extraction buffer I (0.1 M EGTA pH 8, 0.1 M NaCl, 1 % SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8 and 1 mM EDTA), and RNAs were extracted with the TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's recommendations. Ribosomal footprints were further purified on 17 % (v/v) acrylamide-bisacrylamide (19:1) gel made with 7 M urea and 1 X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer. For this, 600 mg of RNAs were electrophoresed in two separated 15 cm-wide wells. The gel was pre-run for 1 h at 50°C and then run for 15-16 h at 90 V at the same temperature. A mix comprising 100 ng of 27-mer and 33-mer RNA oligonucleotides was loaded on both gel extremities and used as size marker. After staining for 30 min in 1X SYBR Gold (Life Technologies) diluted in 1X TAE, RNA contained in the 27 and 33 nucleotide regions were separately excised from the gel. The gels slices were stored at least 2 h at -20°C and then physically disrupted by centrifugation through a needle hole made in a 0.5 mL microcentrifuge tube nested in an outer 1.5 mL collection microtube. The tube assembly were centrifuged at maximum speed for 5 min. RNAs were eluted overnight from gel fragments by passive diffusion in 5 mL of RNA extraction buffer II (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, and 0.2 % SDS) at 4°C on a rotating wheel. The recovered RNAs were then isolated with the TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions, resuspended in 30 mL of RNase-free water and stored at -80°C until use.

Ribosome footprints were depleted from ribosomal RNA with the Ribo-Zero Plant kit (Illumina) following manufacturer's recommendations. Sequencing libraries were prepared with the TruSeq Small RNA library preparation kit (Illumina). Next generation sequencing was performed by Beckman (single end, 50 nt).

#### **4.3.2.3. Total RNA quantification**

The abundance of mitochondrial mRNAs contained in each used genotypes was determined by quantitative RT-PCR as described in (Haili et al., 2016). Primers were designed to quantify the abundance of each exon of mitochondrial mRNAs of known function, except for the *nad5* exon 3 that is too small to be quantified by quantitative RT-PCR (see Table 1).

#### **4.3.2.4. Bioinformatic Analysis : From raw data to alignment files**

Raw data were first trimmed to remove the 3' adapter sequence with CutAdapt 1.9.1 (Martin, 2011) configured with `-e 0.12`, `-m 24`, `-M 35` and `-a` options to select a read size in a range from 24nt to 35nt allowing 12% of error. The trimmed reads were then mapped against the rRNA sequences of *Arabidopsis thaliana* ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) with Bowtie 1.1.2 (Langmead et al., 2009) set up with `--all` and `--un` options. The `--un` option was used to select all unmapped reads. These filtered reads were finally mapped against the complete Col-0 mitochondrial genome (JF729201.1) or only the coding sequences with Bowtie 1.1.2. The latter alignments were configured with two mismatches allowed (`-n 2`) and only uniquely mapped reads were selected (`-m 1`). The sam formatted files generated by the aligner were converted to sorted and indexed bam formatted files using the Samtools program (Li et al., 2009). All the pipeline was automatized through the use of Snakemake workflow engine version 3.5.2 (Köster & Rahmann, 2012).

#### **4.3.2.5. Bioinformatic Analysis : Differential Expression**

The number of reads for each gene was calculated with featureCounts 1.5.0-p2 program (Liao et al., 2014) and normalized with DESeq2 method (Love et al., 2014) through



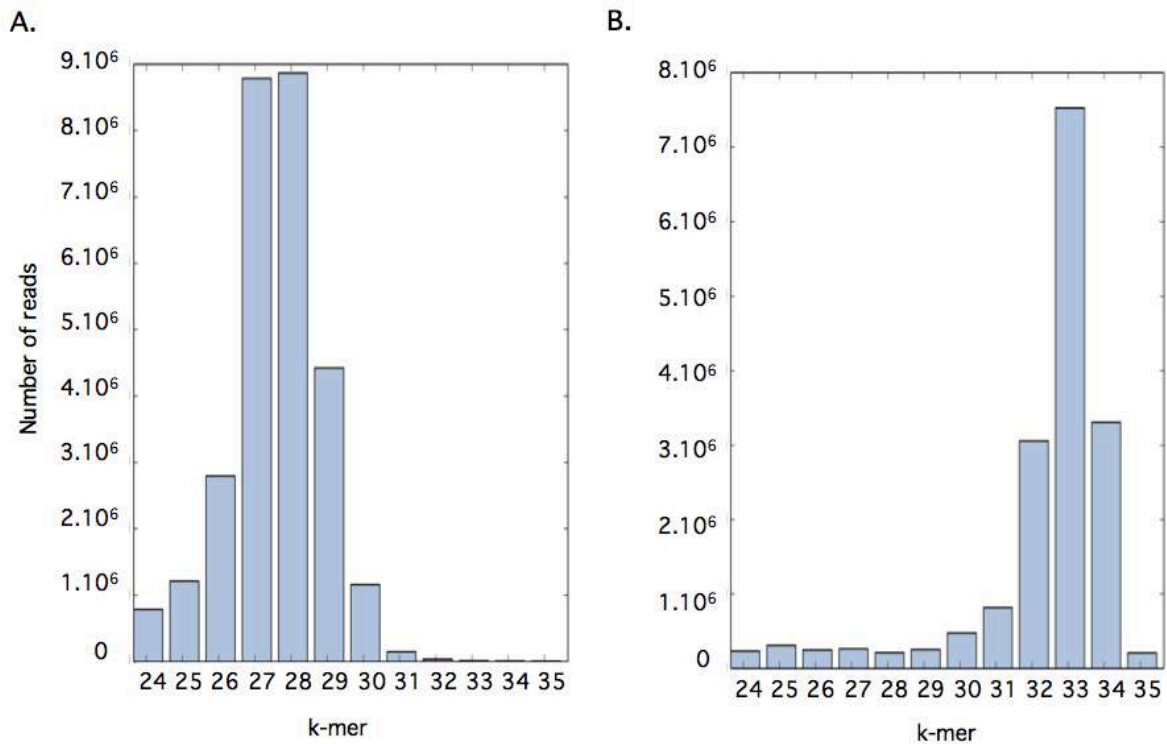
SARTools R Package (Varet et al., 2016). Snakemake workflow engine was also used to automatize the steps of this analysis.

Regarding the detection of non-annotated region with signal (NARS), we developed a Python3 script to detect ribosome footprint clusters outside of known annotations. First, a “per-base” coverage file was generated from the alignment files. Then, while parsing this “per-base” coverage file, NARS were retained if their size exceeded 100 nucleotides, if they were covered by at least 10 reads, and that at least 70% of their sequence were covered by at least one read and that the longest non-covered nucleotide chain did not exceed 40 nucleotides.

### **4.3.3. Results**

#### **4.3.3.1. The majority of mitochondrial ribosome footprints in Arabidopsis measure 27 and 28 nucleotides**

To get a comprehensive view of all ribosome-associated mRNA regions in Arabidopsis mitochondria, we generated total ribosome footprints and mapped the obtained reads to the Arabidopsis mitochondrial genome. To optimize the recovery of mitochondrial ribosome footprints from total extracts, polysomes were prepared from Arabidopsis flowers which are known to contain high amounts of active mitochondria (Huang et al., 1994). Since the size of selected RNA fragments on preparative gels can strongly influence the recovery of the desired ribosome footprints, we built upon a recent publication indicating that ribosome footprints in human mitochondria showed a bimodal distribution peaking at 27 and 33 nucleotides (Rooijers et al., 2013). To see if the ribosome-associated mRNA fragments in plant mitochondria follow a similar distribution, RNA bands at 27 and 33 bases were extracted from preparative polyacrylamide gels and sequenced. Sequence analysis of the reads mapping to the mitochondrial genome indicated that the 27-nucleotide RNA population mostly contained fragments of 27, 28 and 29 bases, whereas the 33-nucleotide band was essentially composed of 32, 33 and 34-base RNA fragments (Figure 54).

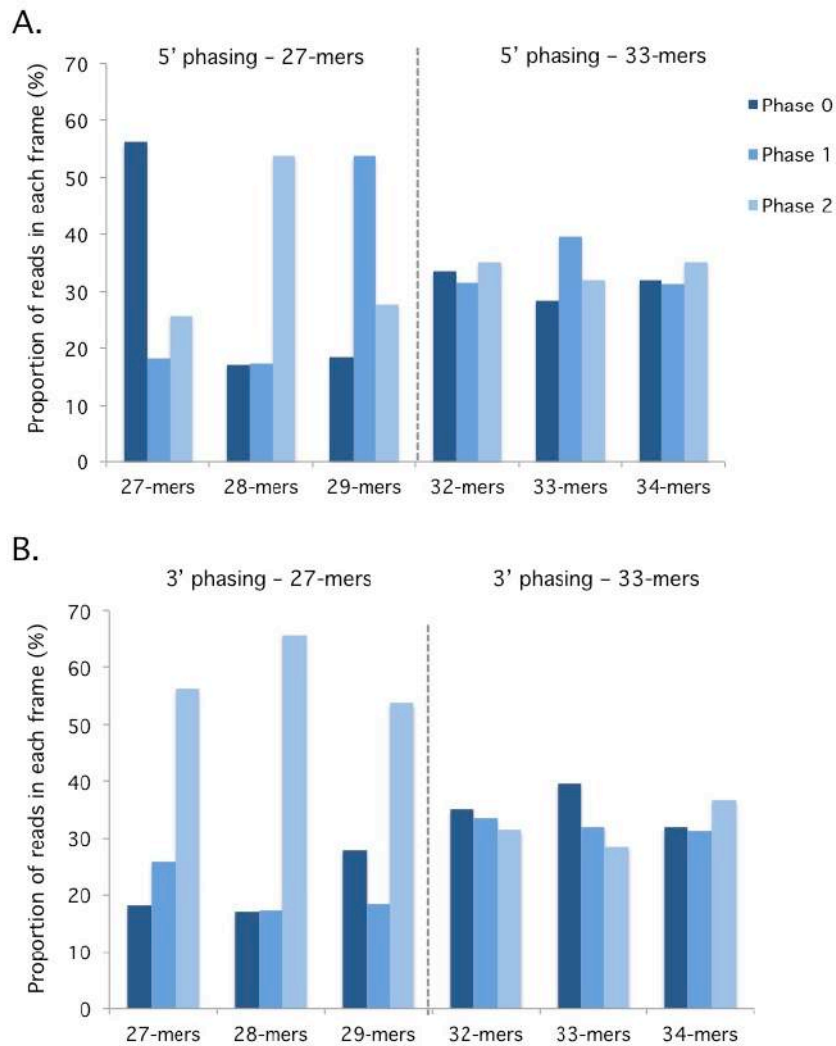


**Figure 54 - K-mers distribution in the 27 and 33-mers short RNA populations**

A. Quantification of sequencing results indicate that the 27-mers population is predominantly composed of 27, 28 and 29 bases fragments.

B: As shown, the 33-mers population is predominantly composed of 32, 33 and 34 bases fragments.

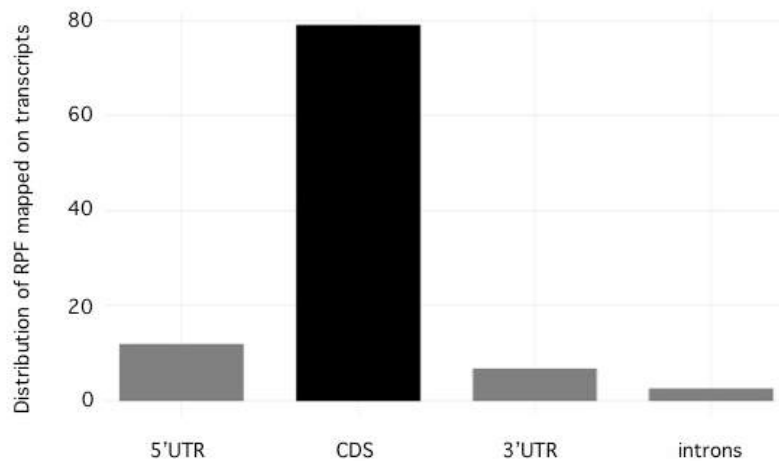
One of the strongest evidence to determine whether these fragments corresponded to ribosomal footprint relied on their biased repartition relatively to the start codon of mitochondrial coding sequences. Indeed, ribosomes move triplets by triplets, and we were expecting to observe a same regularity for their footprints. Actually, the two RNA categories show very different behavior regarding their bias to the start codon (Figure 55). The longest fragments displayed a perfect random distribution in the three possible reading frames whereas the smallest fragments (27-29 mers) showed a clear repartition bias. We could effectively observe a bias toward the phase 2 for all the k-mers when analyzing their 3' extremities, whereas the phase bias differed for each k-mers at their 5' end.



**Figure 55 - The 27-mers population ribosome protected fragments show a stronger repartition bias relative to mitochondrial start codon compared to the 33-mers population**

A. 5' phasing of the 27-mers and 33-mers populations.  
 B. 3' phasing of the 27-mers and 33-mers populations.

Mapping to mitochondrial genes further revealed that the 27 and 28-nucleotide reads mapped primarily to coding sequences and to a much lesser extent to UTRs and introns (Figure 56). Altogether, this preliminary analysis showed us that the majority of *Arabidopsis* mitochondrial ribosomes footprints measure 27 and 28 bases, and that the ones at 32, 33 and 34 nucleotides contribute very moderately to the mitoribosomes footprint population. Consequently, all our subsequent analyses were done after recovery of the 27-base RNA band from gels.



**Figure 56 - Most 27-mers population maps to the mitochondrial coding sequences.**

Reads derived from the 27-mers population were aligned to the *Arabidopsis* mitochondrial genes (Col-0 accession). 12 % mapped in 5'UTRs, 79 % in CDS, 7 % in 3'UTR and 2 % in introns.

#### **4.3.3.2. Analysis of ribosome footprint distributions along mitochondrial genes sequences**

A first global analysis of the distribution of *Arabidopsis* mitochondrial RPF was done from a total of 900 million high quality reads obtained from wild-type plants. Less than 2% (1.9%) of these reads could be aligned to the mitochondrial genome of the Col-0 accession (JF729201.1) and 38% to the nuclear and plastid genomes, indicating that mitochondrial ribosome footprints represent a rather mere fraction of total ribosome footprints generated from flowers. The vast majority of the reads aligned with exons corresponding to known mitochondrial genes, further supporting that they effectively corresponded to mitochondrial ribosome footprints.

Despite of its relative small size, the *Arabidopsis* mitochondrial genome contains a large number of duplicated regions, preventing a correct mapping of RPF along the entire sequence. This is especially obvious for *atp6-1* and *atp6-2* genes that share identical 3' regions. The partial overlap of the *rps3* and *rp16* genes was also problematic in this respect. Despite these classical limitations, the obtained alignments allowed us to first examine translation initiation and termination sites of genes of known function. For most genes, the

ribosome footprint distributions were perfectly coherent with the proposed positions of start and stop codons (<http://www.arabidopsis.org/>).

Regarding the few mitochondrial transcripts for which start or stop codons are known to be removed post-transcriptionally (Raczynska et al., 2006; Forner et al., 2007), we consequently observed that RPF distributions did not spread out all along the annotated coding sequences. This was particularly obvious for the *rps4* mRNA that is known to be processed 2 bases downstream of its AUG codon and for which the RPF coverage started at the 12<sup>th</sup> base (Figure 57). This can be also observed for the *nad6*, *mttB* and *ccmC* mRNAs that are matured 17, 10 and 46 nucleotides upstream of their annotated stop codon respectively and for which the RPF distributions do not cover the annotated stop codons (Figure 57). Surprisingly, similar shifts of RPF coverage with respect to the translation initiation or termination codons could also be observed for several other mitochondrial genes, even though their mature mRNAs bear predicted translational start and stop codons. This was mostly apparent for the *ccmF<sub>N2</sub>*, *nad4L*, *nad9* and *rps7* for which no ribosome footprints appear to overlap the proposed start codon (Figure 58). Also, no RPF was found to span the stop codon of *atp1*, *atp4* and *cox3* transcripts although high densities of reads cover these genes (Figure 59).

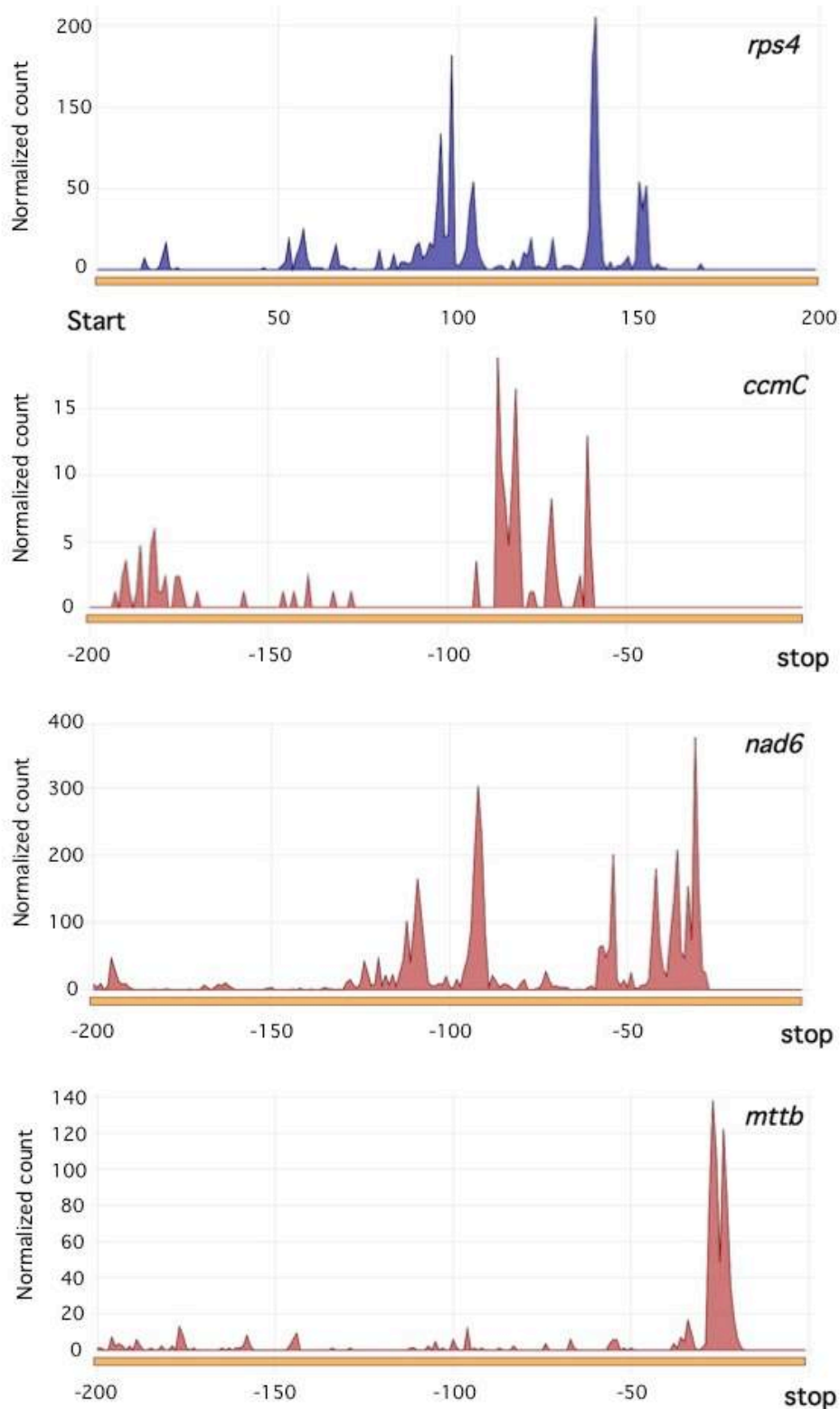
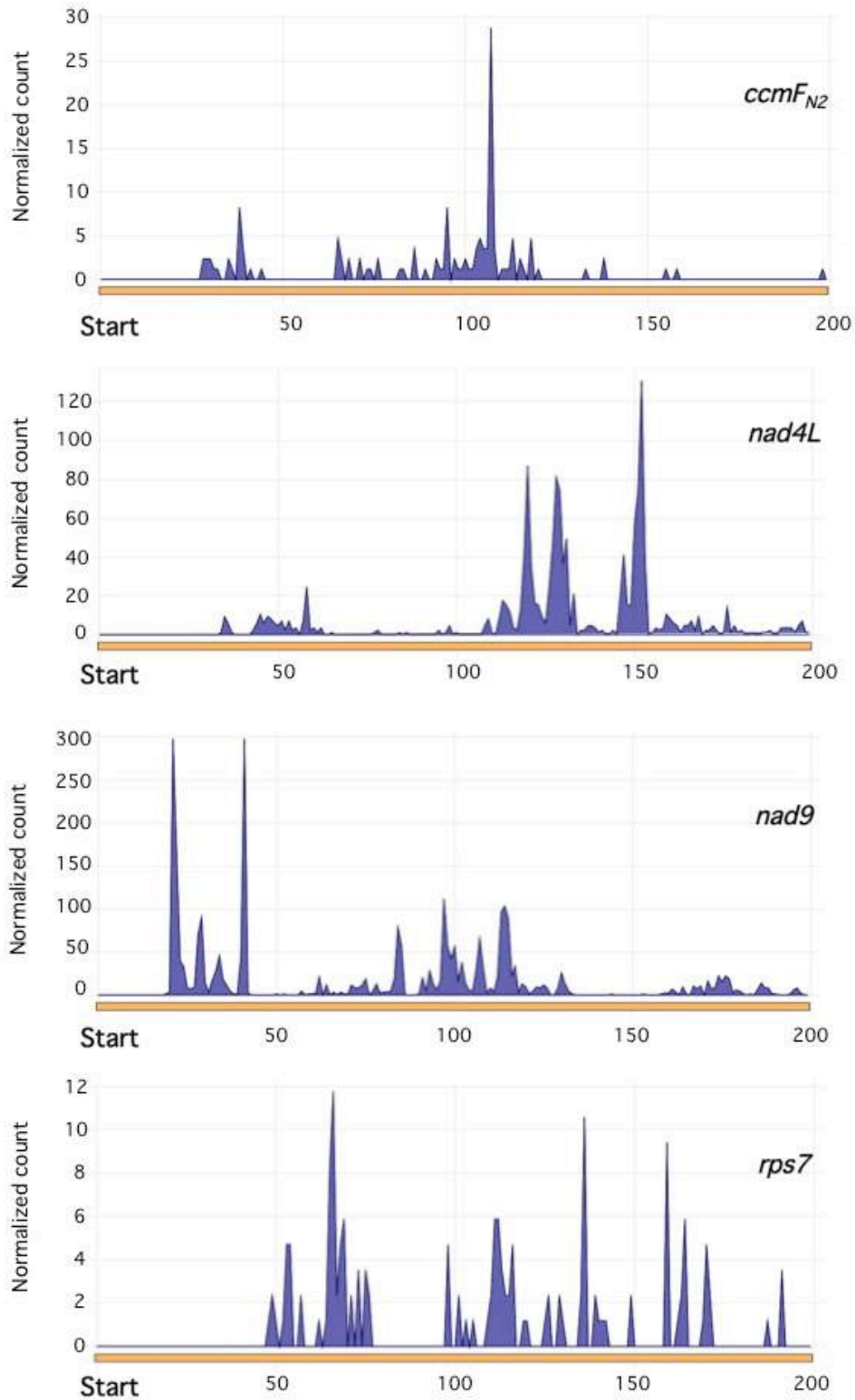


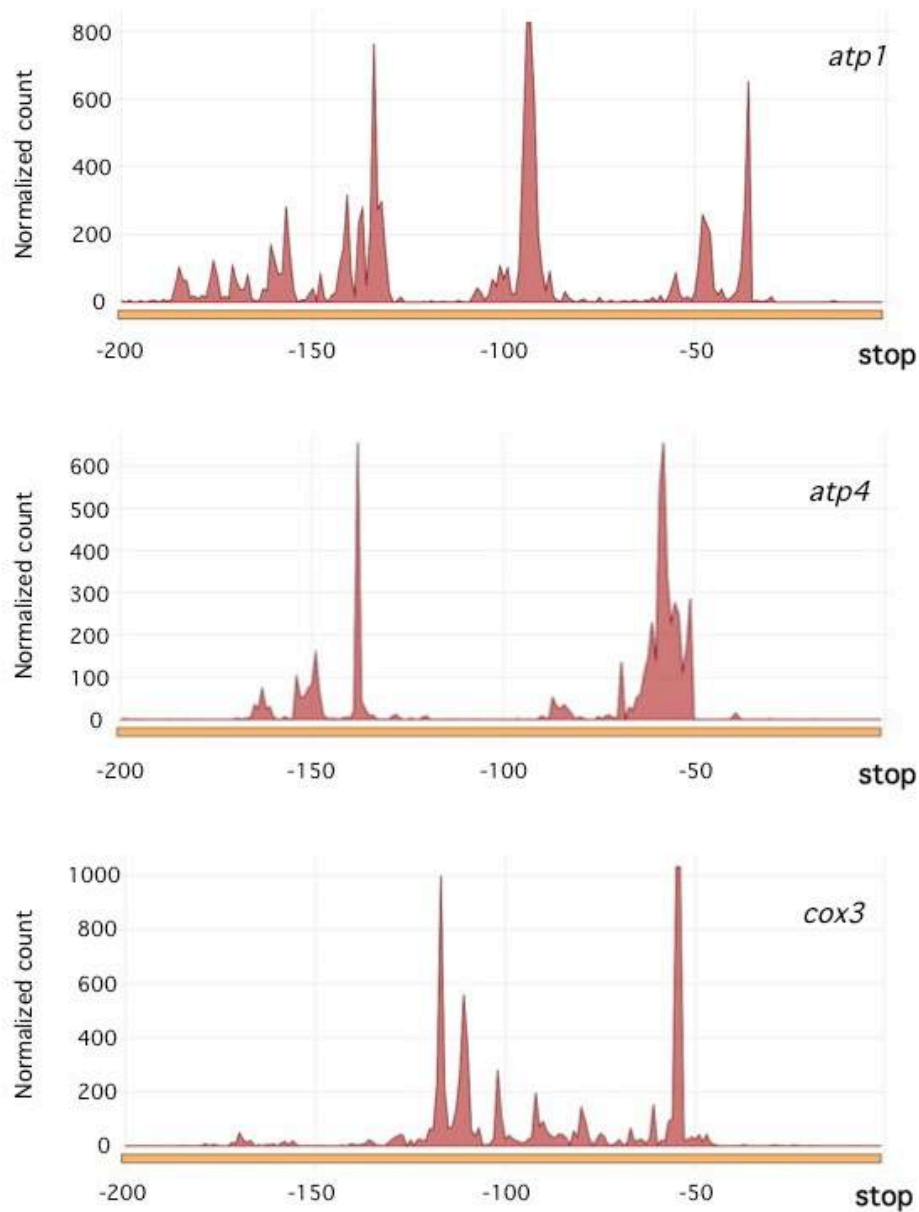
Figure 57 - Ribosome footprint distributions along *Arabidopsis* mitochondrial mRNAs in which start or stop codons are removed by post-transcriptional processing.

RPF coverage near the start or the stop codons are shown in blue and red respectively. Numbers represent nucleotide coordinates respectively to start or stop codons.



**Figure 58 - Analysis of RPF distributions around the start codon of a selected panel of *Arabidopsis* mitochondrial mRNAs.**

Only mitochondrial transcripts for which potential shifts between the start of RPF coverage and the location of translation initiation codons are shown. Numbers represent nucleotide coordinates respectively to start codons.



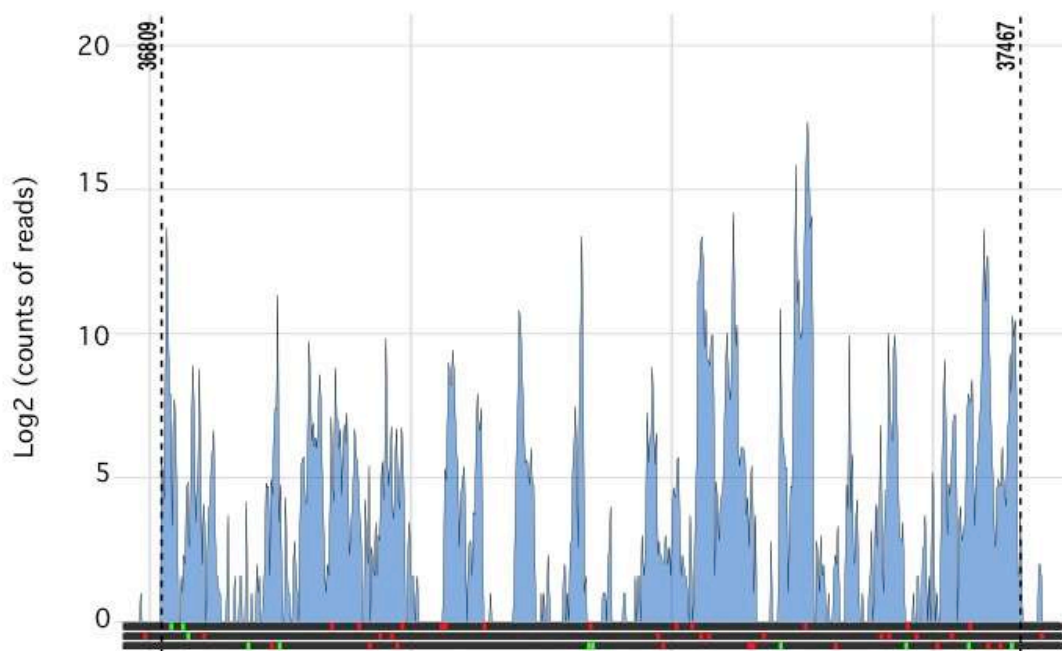
**Figure 59 – Analysis of RPF distributions around the stop codon of a selected panel of *Arabidopsis* mitochondrial mRNAs.**

Only mitochondrial transcripts for which potential shifts between the end of RPF coverage and the location of translation termination codons are shown. Numbers represent nucleotide coordinates respectively to stop codons.

To potentially identify new coding regions within the mitochondrial genome, we also searched for RPF signals located outside of annotated regions. We defined NARS (Non-Annotated Regions with Signal) as regions of at least 100 bases long, comprising a minimum of 10 ribosome footprints overall and in which 70% of the nucleotides are covered by at



least 1 RPF. The 5' and 3' extremities of these NARS were defined when a minimum of 40 nucleotides with no RPF is encountered. Using the criteria, a single NARS of 658 nucleotides was detected in the *Arabidopsis* mitochondrial genome (Figure 60). However, due to the high number of stop codons present in its sequence it is unlikely that this NARS encodes a protein. Therefore, besides the already known mitochondrial genes our approach did reveal any new translated protein-coding ORFs in *Arabidopsis* mitochondria.



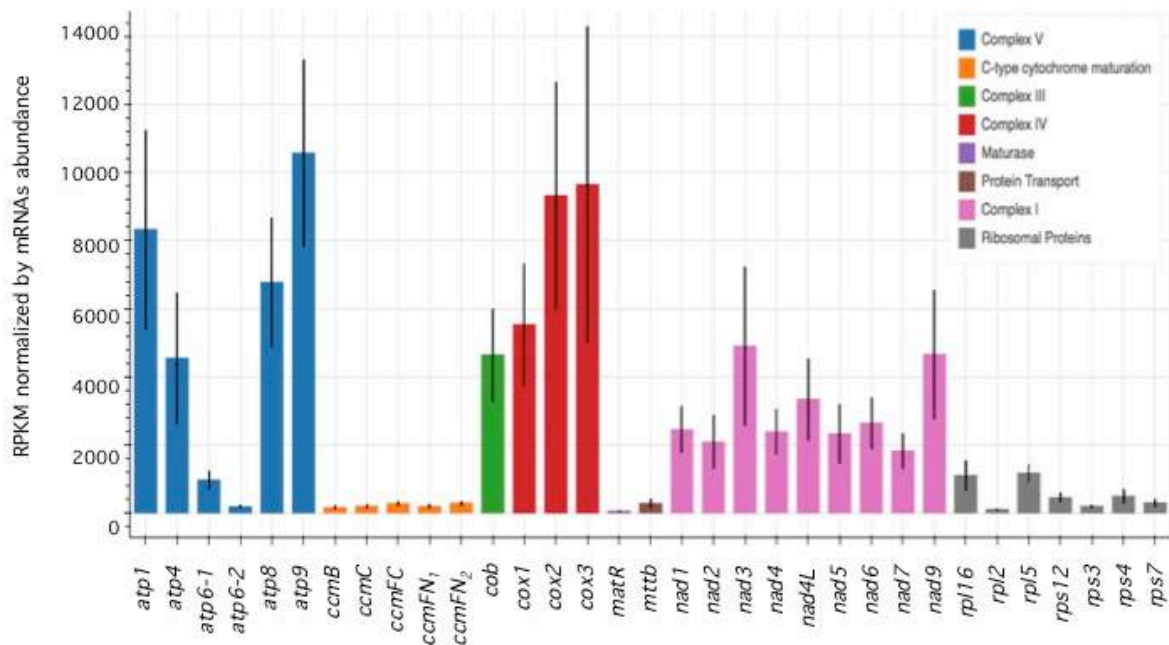
**Figure 60 - A single region outside of known mitochondrial genes seem to associate with ribosome in *Arabidopsis***

A single region showing a significant and relatively continuous RPF coverage could be detected outside of known protein-coding genes in *Arabidopsis* mitochondria. However, the presence of a high number of stop codons (shown as red squares) in the three open reading-frames make this region unlikely to encode a new mitochondrial protein

#### **4.3.3.3. *Arabidopsis* mitochondrial mRNA show different ribosome association levels and ribosome entry mechanisms**

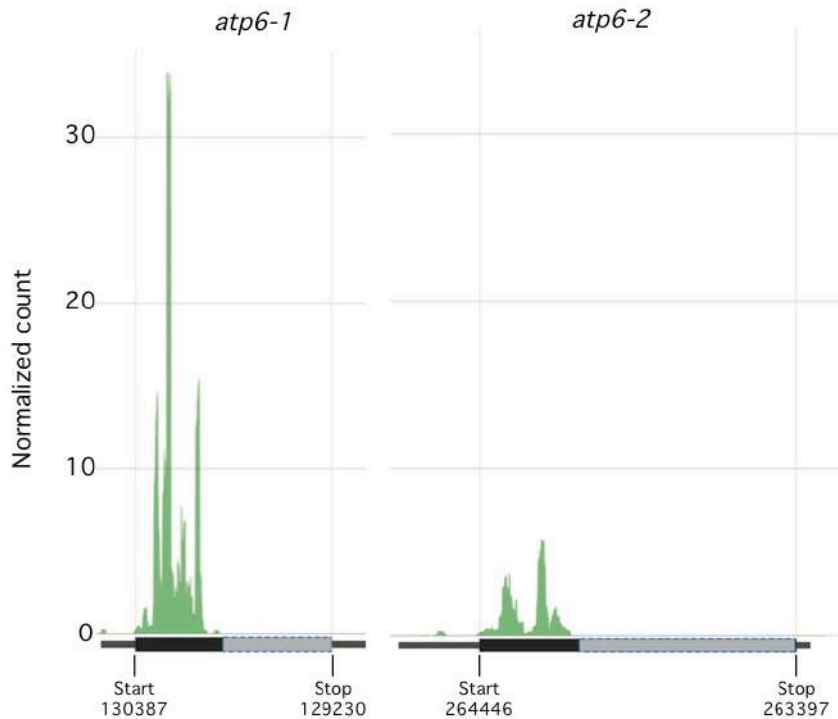
To estimate and compare the translational efficiencies of *Arabidopsis* mitochondrial mRNAs, we determined the relative density of ribosome footprints per gene. To allow for a comparison between genes, the calculated densities were normalized to both transcript

length and abundance. This approach revealed clear differences in ribosome density between mRNAs (Figure 61). Globally, mRNAs encoding respiratory chain subunits showed much higher ribosome loading levels compared to other mitochondrial transcripts, implying a greater translational activity for these genes. Within each respiratory complex, little differences in translational efficiencies were visible except for the ATP synthase complex (V). The *atp1*, *atp4*, *atp8* and mostly *atp9* showed significantly higher ribosome densities compared to *atp6-1* and *atp6-2*. Interestingly, the two copies of the *atp6* gene appear also to be translated at different levels, and the *atp6-1* gene shows much higher ribosome density compared to *atp6-2* (Figures 61 and 62). All other mitochondrial genes, notably the ones coding for c-type cytochrome maturation and ribosomal proteins, showed particularly low ribosomes loading densities on their transcripts suggesting that they are translated at low levels. Low levels of ribosome footprints was also detected for the *matR* and *mttb* coding sequences, supporting the proposed functionality of these two genes (Sultan et al., 2016; Carrie et al., 2016).



**Figure 61 - Protein coding mitochondrial transcripts show differential ribosome association in Arabidopsis**

RPF densities normalized to both mRNA length and abundance are shown. Mitochondrial mRNAs are indicated and color-coded according to the respiratory complex or the functional category to which they belong.



**Figure 62 - Comparative RPF densities on *atp6-1* and *atp6-2* transcripts**

Only RPF densities aligning in the 5' coding regions distinguishing the two *atp6* gene copies are shown. Coordinates of start and stop codons of both genes in the Col-0 mitochondrial genome are indicated.

The relative distributions of ribosome footprints along the five di-cistronic mitochondrial transcripts showed different patterns, implying different mechanisms to guide the ribosomes towards the downstream cistrons. Regarding the *nad4L-atp4* (3,300 vs 4,500 RPKM) and *rp15-cob* (1,150 vs 4,600 RPKM) transcripts, the ribosome loading on the downstream cistron appeared to be higher compared to the upstream open reading frame (Figure 61). An internal entry of mitoribosomes just upstream of the translation start codon of the downstream cistron in these two cases may explain this increase. Oppositely, the ribosome density on the downstream open reading frame was much lower in the case of the *nad3-rps12* mRNA (4,900 vs 450 RPKM), suggesting a less efficient translation of *rps12*. This can be explained either by an inefficient internal entry of ribosomes upstream of *rps12* or by a weak ribosome scanning downstream of *nad3*.

#### 4.3.3.4. Mitochondrial translation is reorchestrated in respiratory complex I mutants

To better understand the plasticity of mitochondrial translation and to which extent it participates in regulating gene expression in the organelle, we determined mitochondrial translational changes in two complex I respiratory mutants. For this approach, we chose the *mtl1* and *mtsf1* mutants, which are two *ppr* mutants affected in the translation of *nad7* mRNA and in the stability of *nad4* transcript respectively (Haïli et al., 2013; Haili et al., 2016). These two mutants show different growth retardation phenotypes, with *mtsf1* plants being much more impaired in their development than the *mtl1* plants. In both mutants, the ribosome densities and the steady state levels of mitochondrial mRNAs were quantified (Figures 63 to 66).

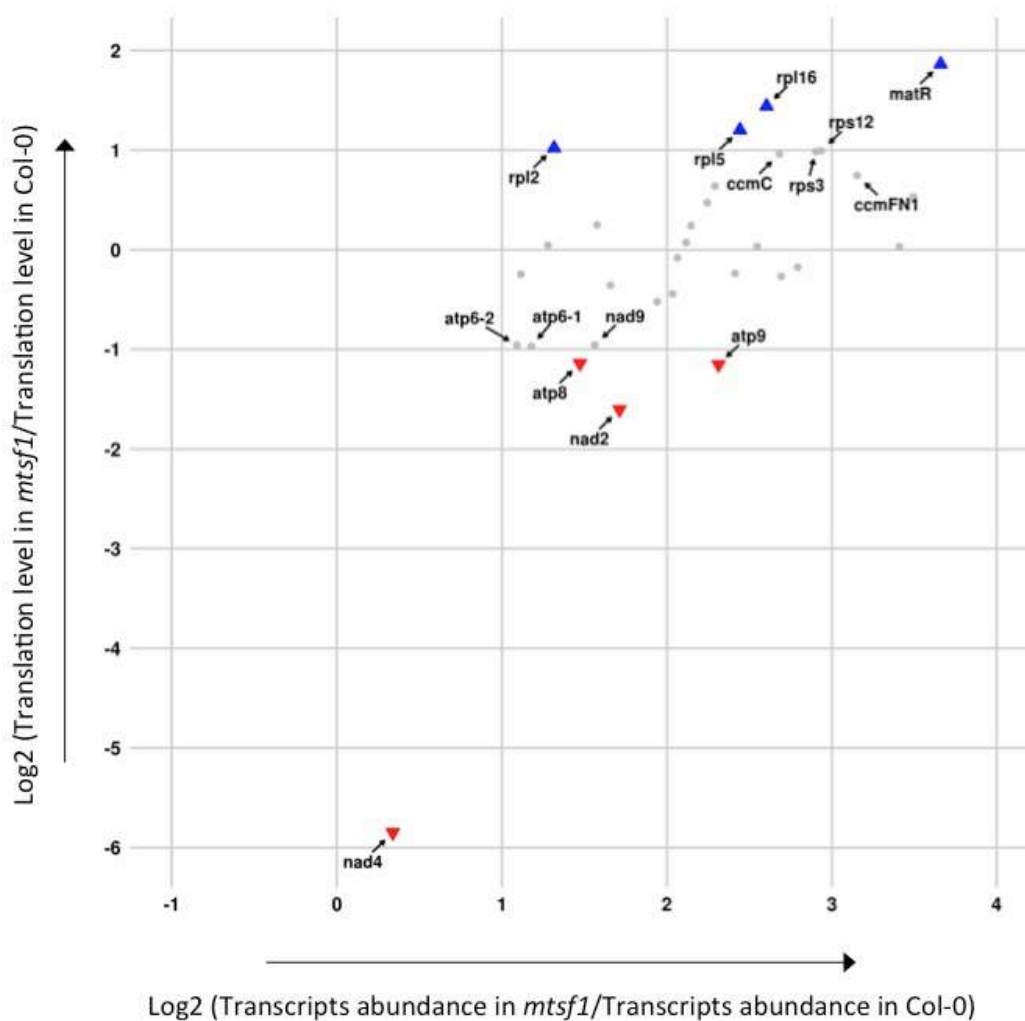
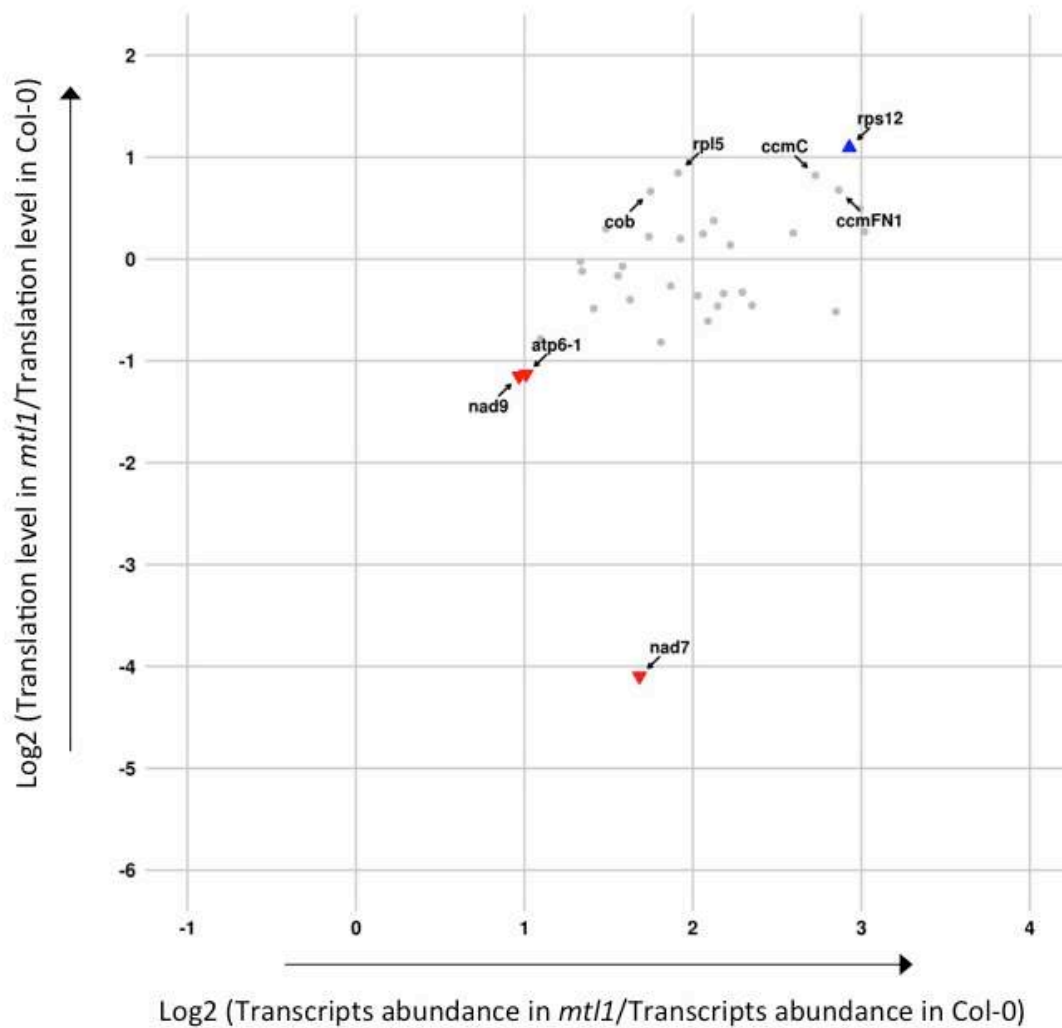


Figure 63 - Differential transcriptional and translational profiles of mitochondrial mRNAs between the *mtsf1* mutant and Col-0.

For each mitochondrial mRNA, relative RPF densities (Y axis) and transcript abundance (X axis) are reported. Blue triangles designate mRNAs that are significantly over-translated in the mutant compared to the wild type; red triangles indicate the ones that are under-translated.



**Figure 64 - Differential transcriptional and translational profiles of mitochondrial mRNAs between the *mt1* mutant and Col-0.**

For each mitochondrial mRNA, relative RPF densities (Y axis) and transcript abundance (X axis) are reported. Blue triangles designate mRNAs that are significantly over-translated in the mutant compared to the wild type; red triangles indicate the ones that are under-translated

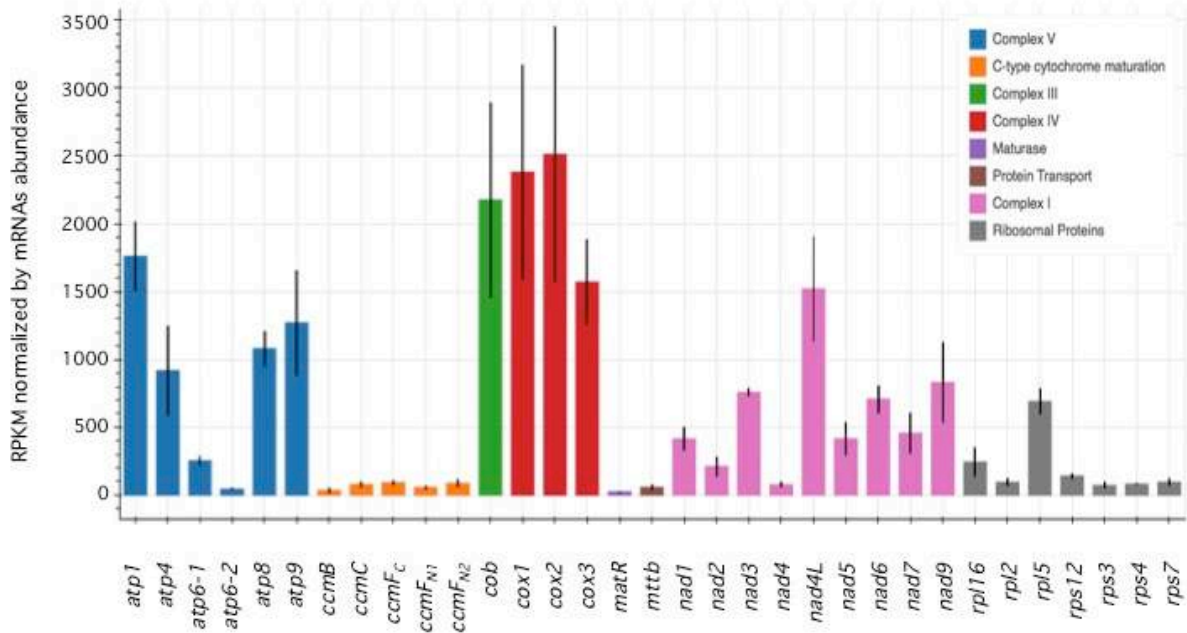


Figure 65 - RPF coverage of mitochondrial mRNAs in the *Arabidopsis mtsf1* mutant.

RPF densities normalized by both mRNA length and abundance are shown. Mitochondrial mRNAs are indicated and color-coded according to the respiratory complex or the functional category to which they belong.

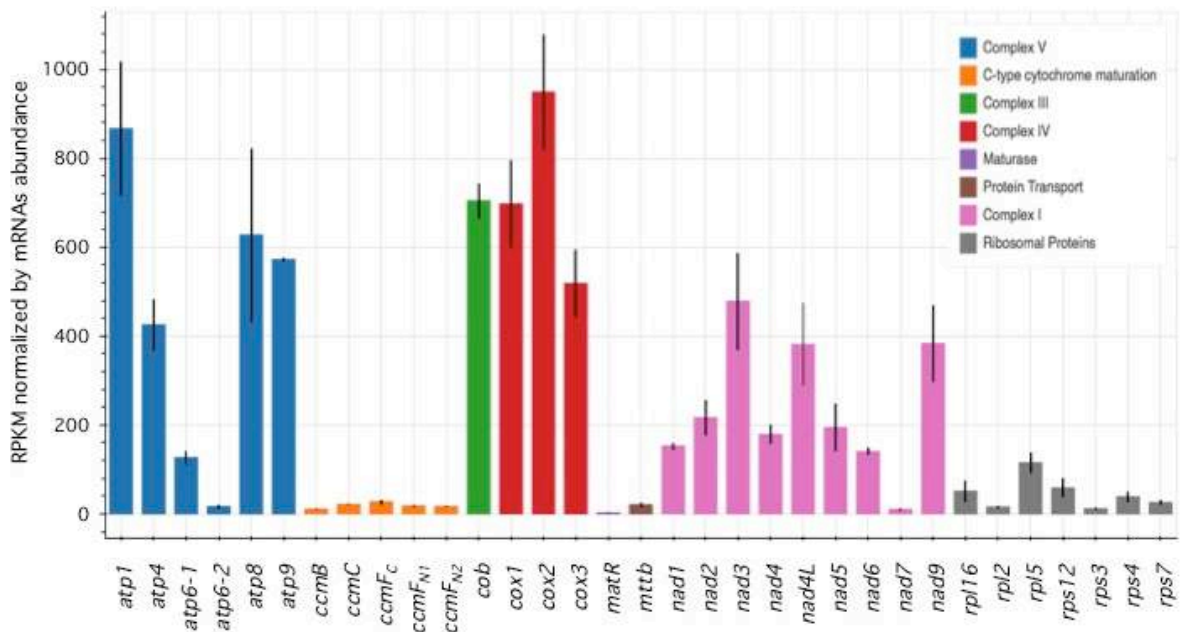


Figure 66 - RPF coverage of mitochondrial mRNAs in the *Arabidopsis mt1* mutant.

RPF densities normalized by both mRNA length and abundance are shown. Mitochondrial mRNAs are indicated and color-coded according to the respiratory complex or the functional category to which they belong.

In response to the lack of respiratory complex I, we observed a global over-accumulation of most mitochondrial transcripts in both mutants (Figure 67). The increase in transcript abundance varied between genes and was comprised between 1.5 to 4.5 fold. Interestingly, this change did not correlate with an equivalent increase in ribosome density on the majority of the transcripts.

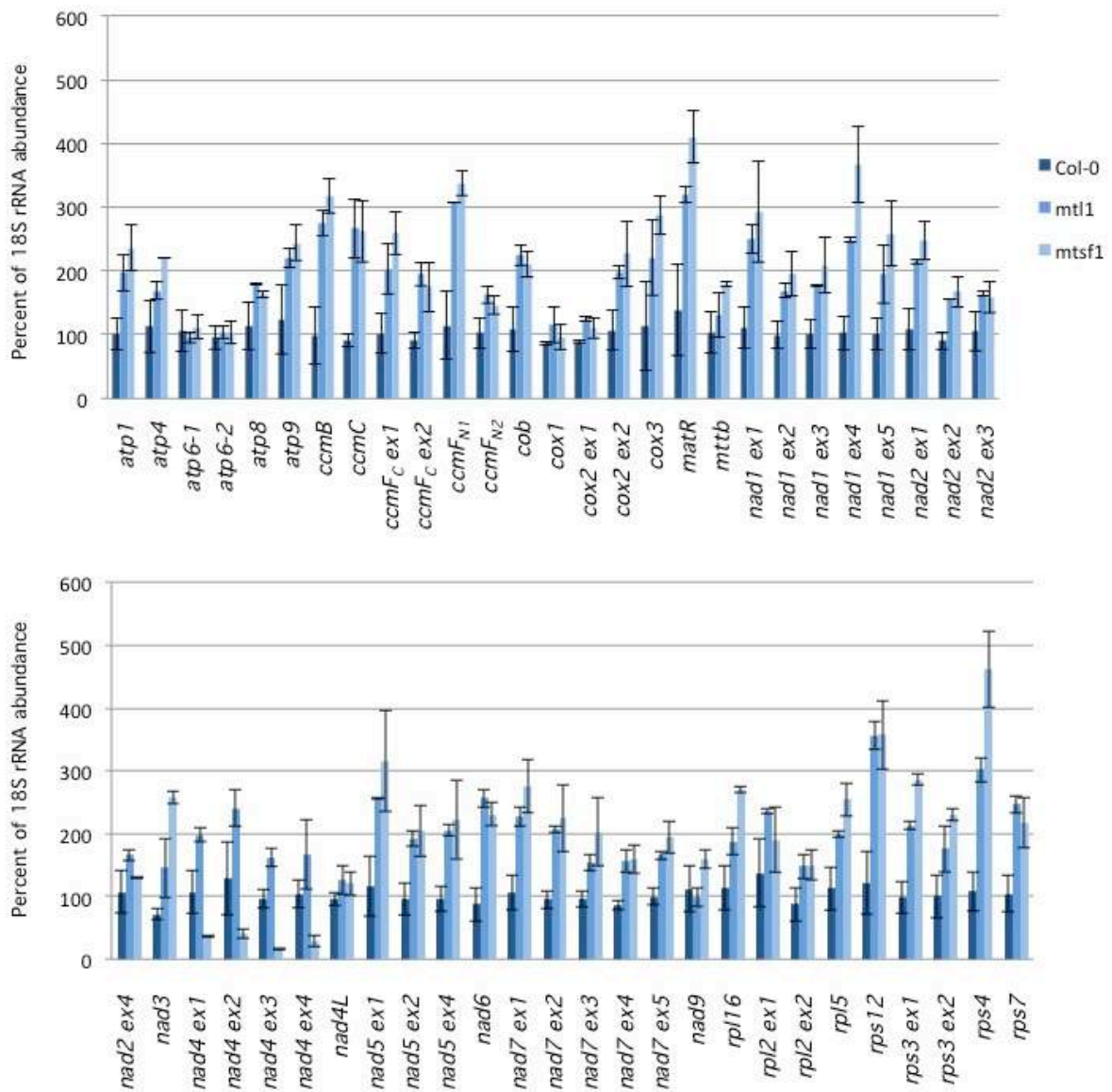
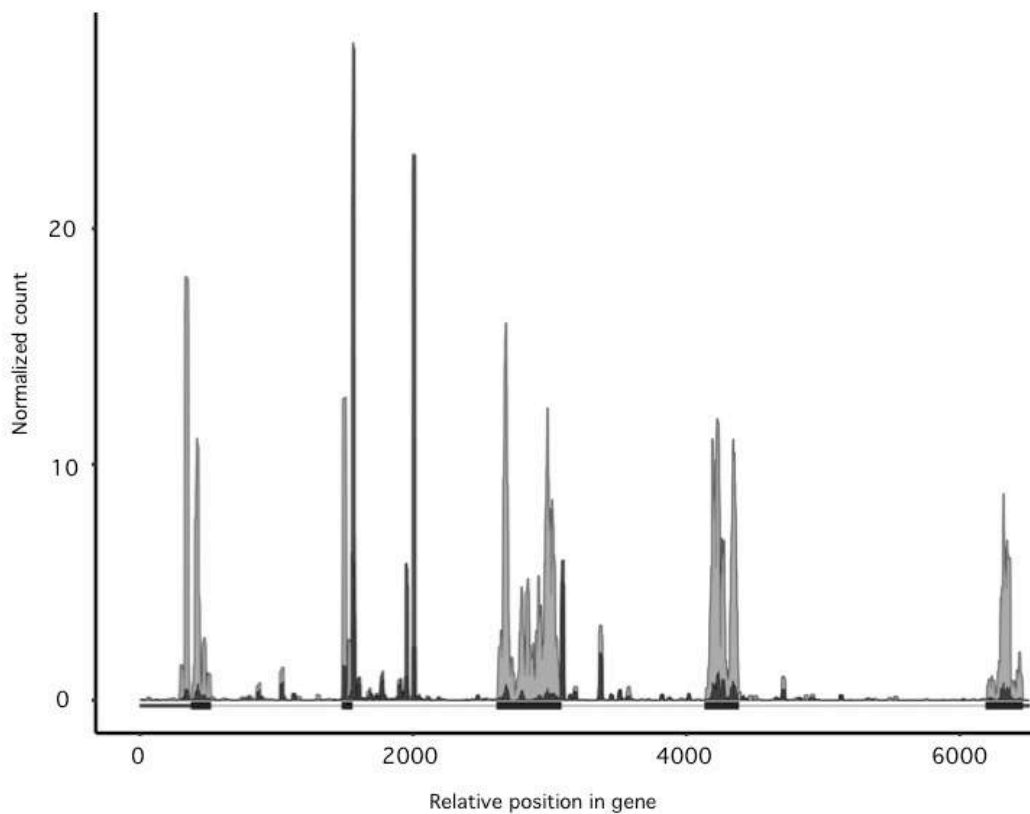


Figure 67 - Quantitative RT-PCR measuring the steady state levels of mitochondrial mRNA exon by exon in the indicated genotypes (Col-0, *mtl1*, *mtsf1*).



Effectively, many mRNA species showing higher abundance contained either similar or even lower ribosome loading compared to the wild type, suggesting that mitochondrial translation is a tightly regulated process that does not simply follow the changes in transcript abundance. Otherwise, the major transcript defects that are known to occur in *mtl1* and *mtsf1* mutants were confirmed by our analysis. Regarding *mtl1*, our ribosome profiling data verified effectively the strong and specific reduction of *nad7* mRNA translation despite a 4-time over-accumulation of its transcript (Figures 64 and 66 to 68).



**Figure 68 - RPF coverage along the *nad7* mRNA in Col-0 and *mtl1* plants.**

Coverage in Col-0 is shown in light grey, coverage in *mtl1* in black.

A highly reduced association of ribosomes with *nad4* mRNA was detected in *mtsf1* (Figure 63 and 65). However, this reduction correlates with the strong destabilization of this transcript, confirming that the main impact of MTSF1 occurs at the mRNA level (Figure 67). This does not support a role of MTSF1 in *nad4* translation. For other transcripts, the comparison of *mtsf1* and *mtl1* translation profiles showed differences but interesting overlaps could be observed. Among mRNAs whose translation varied most significantly in both mutants (P-value < 0.05 and  $RP \log_2(FC) \geq$  or  $\leq 1$ ) several correspond to ribosomal



protein genes. Out of the seven genes showing increased ribosome occupancy in *mtsf1* compared to the wild type, five corresponded to ribosomal protein mRNAs, namely *rps3*, *rps12*, *rpl2*, *rpl5* and *rpl16* (Figure 63). In the *mtl1* mutant, *rps12* and *rpl5* transcripts showed also significant increase in ribosome loading in comparison to the wild type (Figure 64).

The translation of the *nad9* transcript also appeared to vary similarly in both mutants. An about two-time decrease of *nad9* translation could be effectively measured in both mutants, whereas the abundance of *nad9* transcript remains the same in *mtl1* and is slightly increased in *mtsf1* relative to the wild type (Figures 63, 64 and 67 and 7). Interestingly, moderate but significant reductions in ribosome loading on several F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase transcripts were detected in both mutants. This concerned the *atp8*, *atp9*, *atp6-1* and *atp6-2* transcripts in *mtsf1* plants and the *atp6-1* transcript in *mtl1* plants (Figures 63 and 64).

#### 4.3.4. Discussion

##### 4.3.4.1. Arabidopsis mitochondrial ribosomes footprints do not show a bimodal distribution as in human mitochondria

Messenger RNA translation is a complex multistep process that is still poorly understood at the molecular level in genome-containing organelles like mitochondria. Growing evidence indicate though that despite of its prokaryotic origin mitochondrial translation has significantly diverged compared to bacteria. Additionally, mitochondrial translation displays considerable species-specific specialization that evolved to adapt translation requirements to mitochondrial genome organizations (Burger et al., 2003). These adaptations are exemplified by the variable compositions and structures of mitoribosomes that differ between species and from modern bacterial ribosomes (Amunts et al., 2015; Greber et al., 2015; Desai et al., 2017).

In this analysis, we used the ribosome profiling technology to generate a genome-wide snapshot of mitochondrial translation in *Arabidopsis*, which provided the first global view on a plant mitochondrial translome. This approach allowed us to first reveal that *Arabidopsis* mitochondrial ribosome footprints measure mostly 27 and 28 nucleotide long and thereby do not seem to follow a bimodal distribution at 27 and 33 nucleotide as previously found for

human mitochondria (Rooijers et al., 2013). Effectively, 27/28 nucleotides RPFs present a frame-specific distribution whereas the ones at 33 bases did not present any bias in their repartition (Figure 55). Additionally, the 27/28 nucleotide RPF lined up with translationally active mitochondrial mRNAs, as shown by the lack of coverage of *nad7* mRNA in the *mtl1* mutant that is specifically deficient in translation of this transcript (Figure 64) (Haili et al., 2016). The discrepancy between human and *Arabidopsis* regarding the size distribution of mitochondrial RPFs is currently unclear but may result from differences in sample preparation or in mitoribosome sizes or behaviors between the two species (Rooijers et al., 2013).

A global alignment to the mitochondrial genome showed that mitochondrial RPFs scattered all along the open reading frames of most genes of known function. For mRNAs like *rps4*, *ccmC*, *nad6* or *mttB* for which the start or the stop codons are removed post-transcriptionally the RPF distributions roughly coincided with their processed 5' or the 3' extremities (Figure 57), confirming that despite truncations in their coding sequence these transcripts are still competent for translation. Interestingly, ribosome footprints were found to begin few bases downstream of the annotated start codon of *ccmF<sub>N2</sub>*, *nad4L*, *nad9* and *rps7* transcripts (Figure 58) and did not reach the stop codon of *atp1*, *atp4* and *cox3* transcripts (Figure 59). Although these observations may simply result from insufficient coverage, we believe this reflects a *bona fide* unusual behavior of the *Arabidopsis* mitochondrial translation machinery. Altogether, these observations raise questions about the mechanisms guiding mitoribosomes towards translation initiation sites in plants and also how they are released from transcripts lacking stop codons like in the cases of *ccmC*, *nad6* or *mttB*. Several lines of evidence support that translation initiation in plant mitochondria may be a relaxed process and that mitoribosomes can easily accommodate different kinds of non-AUG start codons or can initiate translation internally in di-cistronic mRNAs as suggested for *nad4L-atp4* and *rpl5-cob* by our analysis (Unseld et al., 1997; Uyttewaal et al., 2008a). Almost nothing is known about these processes in plant mitochondria and important genetic and biochemical efforts are still required to shed light on the behavior of mitoribosomes.

#### 4.3.4.2. *Arabidopsis* mitochondrial mRNAs exhibit large differences in polysome association

The numbers of RPFs per gene, normalized by both transcript size and steady-state abundance, was used as a proxy to estimate the translational activity of each mitochondria-

encoded *Arabidopsis* mRNA. Assuming that the average translation elongation rate is similar for all mitochondrial genes, this approach revealed large coverage differences between mitochondrial protein-coding transcripts. We effectively observed that respiratory subunit mRNAs show much higher ribosome associations than other types of mRNAs, notably the ones coding for ribosomal proteins and c-type cytochrome biosynthesis which appeared to be translated at very low levels from our analysis (Figure 61).

These results are coherent with recent quantifications of plant mitochondrial proteomes which indicated that steady-state levels of respiratory chain proteins are abundant and well represented in mitochondrial proteome lists, whereas proteins of the genetic apparatus are of much lower abundance (Salvato et al., 2014; Rao et al., 2017). The c-type cytochrome maturation proteins, the MttB transporter or the MatR maturase are present at such a low abundance in mitochondria that they are generally not detected at all in plant mitochondrial proteomes. The high sensitivity of the ribosome profiling technology allowed us to detect the translational activity of these very poorly translated mitochondrial mRNAs though, strongly supporting their functionality.

Among respiratory complexes subunits, we observed very similar ribosome densities for genes encoding proteins belonging to the same complex, except for the  $F_1F_0$ -ATP synthase. Large differences were effectively detected between complex V mRNAs, particularly for the *atp1*, *atp4*, *atp8* and *atp9* transcripts, which are more covered by RPFs than the others (Figure 61). The *atp1* and *atp9* mRNAs encode the c and  $\alpha$  subunits of the  $F_1F_0$ -ATP synthase respectively and are present in 10 and 3 copies in the complex. The higher ribosome densities of these two transcripts therefore correlate with their relative stoichiometry in complex V, corroborating the proportional translation of the different ATP synthase subunits previously described in *E. coli* (Li et al., 2014a). Oppositely, the higher translational activity of *atp8* compared to other single-copy complex V subunits (*atp4* and *atp6*) cannot be explained by its higher stoichiometry in the  $F_1F_0$ -ATP synthase but suggest higher needs in this specific subunit for reasons that need to be clarified. Interestingly, we also observed a large difference of coverage between the two copies of *atp6* encoded in the *Arabidopsis* mitochondrial genomes, with *atp6-1* being significantly more translated than *atp6-2*. The two genes show small sequence variations in their 5' UTRs, which likely account for their differential association with mitoribosomes.

Altogether, the large differences in ribosome densities between the various mitochondrial mRNAs reveal that translational control is an important component of gene expression in plant mitochondria. How this control operates at the molecular level is currently unclear, as we still don't know how ribosomes get recruited on mitochondrial mRNAs in the absence of Shine and Dalgarno sequence in their 5' UTR (Bonen, 2004). This control can operate at the level of translation initiation, which is often proposed as being the most rate-limiting step of translation in most systems (Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Shah et al., 2013). Combinatory actions of cis-acting elements within the 5'UTRs and gene specific trans-factors may be responsible for the differential recruitment of ribosomes on mitochondrial mRNAs. However, up to now very few translational activators have been identified to operate in plant mitochondria (Kazama et al., 2008; Uyttewaal et al., 2008a, 2008b; Manavski et al., 2012; Haili et al., 2016) and the way by which they control translation of their cognate mRNA target remains to be determined. In bacteria, SD-like sequences within coding sequence were shown to impact translation elongation and to have a major effect on mRNA translation rates (Li et al., 2012; O'Connor et al., 2013). The lack of anti-SD sequence at the 3' end of the mitochondrial SSU rRNA strongly suggests that this mechanism cannot account for the differential translation of Arabidopsis mitochondrial mRNAs. Thus, much remains to be discovered before we understand how mitochondrial translation is really regulated in plant mitochondria.

#### **4.3.4.3. Mitochondrial translation is reorganized in Arabidopsis complex I mutants**

The regulation of mitochondrial gene expression is fundamental not only to ensure proportional synthesis of both mitochondria and nuclear-encoded subunits belonging to the same complexes but also to adapt mitochondrial activity to the changing requirements of plants throughout their life cycle or in response to environmental stimuli. The basis of this regulation is not well understood, however several lines of evidence support that most of the control is exerted at the post-transcriptional and/or at the post-translational levels (Giegé et al., 2000, 2005; Holec et al., 2006; Janska & Kwasniak, 2014).

To better understand to which extent mitochondrial translation participate in these regulatory circuits and get some hints on its plasticity, we measured mitochondrial translational and transcriptional changes in two contrasted complex I Arabidopsis mutants

that accumulate either no complex I (*mtl1*) or a truncated version of it (*mtsf1*). Although both mutants are strongly delayed in their development compared to the wild type, the growth defects exhibited by the *mtsf1* mutant are more severe than the ones of *mtl1* (Haili et al., 2013; Haili et al., 2016).

First of all, in response to complex I deficiency, we observed a 2 to 5 time over-accumulation of most mitochondrial transcripts compared to the wild type (Figure 67). This is not an isolated observation as this was also detected in most *Arabidopsis* complex I mutants (Sung et al., 2010; Kühn et al., 2011; Cohen et al., 2014). Our analysis revealed that this increase in transcript abundance is not associated with an equivalent rise in ribosome density on mitochondrial mRNAs. Our observation thus revealed that mitochondrial translation is a precisely regulated process that does not simply follow the changes in transcript abundance and that a transcript-specific translational control clearly operates in plant mitochondria.

We were able to detect significant changes in ribosome loading for several transcripts in the mutants we analyzed. The most important translational change concerned the strong decrease in *nad7* ribosome occupancy in *mtl1*, confirming previously published data on this mutant (Haili et al., 2016). The impact on other mitochondrial genes was less pronounced but some interesting tendencies were uncovered. The first one concerned the two fold decrease of *nad9* translation in both mutants, suggesting that the lack of functional complex I may induce a negative feedback control on the translation of this specific mRNA. We did not detect any significant decrease in the ribosome loading of other complex I mRNAs though, meaning that complex I deficiency does not induce a global down-regulation of *NAD* gene translation.

Interestingly and despite a significant rise in transcript abundance, the translation of several mRNAs encoding ATP synthase subunits was found to be reduced in both complex I mutants. This negative translational control impacts a few more *atp* genes in *mtsf1* than in *mtl1* (Figures 63 and 64) and may be therefore correlated with the gravity of developmental alterations associated with complex I deficiency. It has been recently demonstrated that complex I-lacking *Arabidopsis* mutants compensate for the deficit in ATP production derived from the respiratory chain by inducing higher metabolic fluxes through the glycolysis and the tricarboxylic acid cycle (Kuhn et al., 2015).

Our analysis thus reveals that these increased metabolic fluxes correlate with a slight reduction in the translation of mitochondria-encoded ATP synthase subunits. Whether or not this reduction results from a negative feedback loop induced by the reduced activity of the respiratory chain in complex I mutants remains to be clarified. Interestingly, our analysis also revealed higher ribosome association of several ribosomal protein encoding mRNAs in both *mtsf1* and *mtl1* mutants. The ribosome densities of four ribosomal protein mRNA transcripts in *mtsf1* (*rps12*, *rpl2*, *rpl5*, *rpl16*) and two in *mtl1* (*rps12*, *rpl5*) appeared to be effectively increased compared to the wild type. These observations nicely corroborates recent analyses showing that reducing the production of a mitochondria-targeted ribosomal protein resulted in an altered translation pattern in Arabidopsis mitochondria (Kwasniak et al., 2013). In this mutant context, ribosomal proteins were translated more efficiently at the expense of respiratory chain encoding mRNAs. Our results suggest that an analogous reorganization of mitochondrial translational occurs in respiratory mutants, further documenting that plant mitoribosomes do not translate mRNAs non-selectively but that a certain level of translational control likely operates in plant mitochondria.

#### **4.3.5. Concluding remarks**

Using the ribosome profiling technology, we generated a genome-wide snapshot of mitochondrial translation in Arabidopsis and monitored important aspects of its dynamic. We show that mitochondrial mRNAs are differentially translated. A slight reorganization of mitochondrial translation could be detected in complex I respiratory mutants involving notably a reduction in ribosome densities on  $F_1$ - $F_0$  ATP synthase mRNAs and an increase in the translation of several ribosomal protein encoding transcripts. We thus reveal mitochondrial translation is controlled at the transcript level and that translation likely participates in regulating the activity of plant mitochondria.

# Discussion et Conclusion





## 5. Discussion et conclusion

### 5.1. Physiologie des mutants

#### 5.1.1. L'absence de la protéine CcmF<sub>N2</sub> chez le mutant *rfl22* impacte la chaîne respiratoire mitochondriale à plusieurs niveaux

Nous avons découvert que la protéine CcmF<sub>N2</sub> n'est plus traduite chez le mutant *rfl22* (Figures 34 et 35), ceci entraînant de lourdes perturbations physiologiques, ce dernier ne pouvant survivre au stade embryonnaire sans une assistance de notre part. En effet, l'absence de la protéine CcmF<sub>N2</sub> conduit à l'absence du complexe hème lyase (Figure 26B), dont elle fait partie. Le complexe hème lyase participant à la maturation des cytochromes de type c, le mutant *rfl22* n'accumule plus ces derniers (Figure 26C). Enfin, ces cytochromes faisant partie intégrante de la chaîne respiratoire (le cytochrome c fait la navette entre les complexes III et IV et le cytochrome c1 est intégré au complexe III), leur absence a pour conséquence la déstabilisation complète du complexe III, et quasi-complète du complexe IV (Figure 27). Donc, chez *rfl22*, l'absence de traduction de l'ARNm mitochondrial *ccmF<sub>N2</sub>* est à l'origine de l'absence de trois complexes mitochondriaux et des cytochromes de type c, conduisant à un arrêt du développement embryonnaire du mutant.

#### 5.1.2. L'expression des oxydoréductases alternatives permet aux mutants de complexes respiratoire de survivre

Comme il l'a été mentionné ci-avant, les mitochondries végétales possèdent une oxydase alternative et des NAD(P)H déshydrogénases alternatives, correspondant à des enzymes intervenant dans la chaîne respiratoire (Eubel et al., 2004b). Les NAD(P)H déshydrogénases permettent le transfert d'électrons du NAD(P)H à l'ubiquinone, court-circuitant ainsi le complexe I, tandis que l'AOX permet le transfert d'électrons de l'ubiquinol à

l'oxygène, court-circuitant les complexes III et IV (Millar et al., 2011). Comme il l'a été observé chez la plupart des mutants de la chaîne respiratoire (de Longevialle et al., 2007; Haïli et al., 2013; Dahan et al., 2014; Haili et al., 2016; Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017), les mutants *rfl22* et *rfl23* surexpriment une partie des ARNm codant ces enzymes (Figures 28 et 46), à savoir les transcrits *AOX1A*, *AOX1C*, *AOX1D*, *NDB3* et *NDB4* pour *rfl22* et les transcrits *AOX1A*, *AOX1D*, *NDA1* et *NDB4* pour *rfl23*. De façon intéressante, les ARNm *AOX1D* et *NDB4* sont surexprimés chez tous ces mutants, sauf *otp43* pour lequel l'abondance du transcrit *AOX1D* n'a pas été mesurée (de Longevialle et al., 2007).

Il a été proposé que cette activation de la voie alternative chez les mutants de la respiration soit mise en place pour compenser l'absence d'un ou plusieurs complexe(s) respiratoire(s) et diminuer ainsi la production de ROS (Dahan et al., 2014). Néanmoins et de façon surprenante, que le mutant présente une déficience du complexe I, du complexe IV, ou des complexes III et IV simultanément, à la fois l'oxydase alternative et les NAD(P)H déshydrogénases alternatives sont surexprimées. Il semblerait donc que la surexpression de ces enzymes, codées par le génome nucléaire, soit une réponse automatique de la cellule lorsqu'un défaut de la chaîne respiratoire est détecté. De plus, nous ne savons pas si la surexpression de ces transcrits est suivie d'une augmentation globale de leur niveau de traduction ou si la cellule fait un « tri » dans un second temps et ne traduit que les ARNm codant l'enzyme alternative nécessaire à chaque mutant. Cette hypothèse est confortée par le fait que la protéine AOX soit surexprimée chez les mutants *ppr2263* du complexe III (Sosso et al., 2012) et *cod1* du complexe IV (Dahan et al., 2014). Néanmoins, c'est également le cas chez le mutant *otp43*, auquel il manque pourtant le complexe I (de Longevialle et al., 2007). De plus, la surexpression de la protéine AOX n'est pas suffisante pour réguler son activité puisqu'il semblerait que cette régulation ait lieu post-traductionnellement grâce à la présence de ponts disulfures qui régulent sa dimérisation, nécessaire à son activité (Selinski et al., 2017).

### **5.1.3. Les ARNm mitochondriaux sont surexprimés chez les mutants de complexes respiratoires**

Parmi les conséquences induites par les mutations des gènes *RFL22* et *RFL23*, nous observons une surexpression générale des ARNm mitochondriaux (Figures 29 et 47). Chez le mutant *rfl22*, une surexpression allant jusqu'à un facteur 27 est observée, alors qu'elle

atteint un maximum de 5,5 chez le mutant *rfl23*. Il est possible que la surexpression de tous les ARNm mitochondriaux soit de nouveau une réponse automatique de la mitochondrie en cas de stress respiratoire puisque nous avons également observé ce phénomène avec les mutants *mtl1* et *mtsf1* (Figure 67), et qu'il a également été observé dans la littérature chez d'autres mutants de la respiration, PPR ou non, *slo1*, *rcc1*, *nmat1* et *nmat4* (Sung et al., 2010; Kühn et al., 2011; Keren et al., 2012; Cohen et al., 2014). De plus, il semblerait que plus la chaîne respiratoire soit affectée, plus cette surexpression est importante. En effet, il ne manque que le complexe I aux mutants *rfl23* (Figure 44), *mtl1* (Haili et al., 2016) et *mtsf1* (Haili et al., 2013), qui présentent une surexpression modérée des transcrits mitochondriaux, tandis qu'il manque les complexes III et IV, le complexe hème lyase ainsi que les cytochromes de type c au mutant *rfl22* (Figures 26 et 27), qui présente une surexpression plus importante de ces derniers.

Néanmoins, nous ne savons pas si la présence d'une quantité plus importante de transcrits mitochondriaux chez les mutants est liée à une augmentation de la transcription de gènes mitochondriaux. En effet, cette augmentation pourrait résulter d'un accroissement de la stabilité des ARNm mitochondriaux ou bien d'une augmentation du nombre de mitochondries (et donc de génomes mitochondriaux) par cellule. Quoiqu'il en soit, plus de transcrits sont présents, mais d'après nos analyses par profilage de ribosome (Figures 34, 52, 63 et 64) le niveau de traduction n'augmente pas en conséquence. Cela signifie que la traduction est soit régulée de façon à ne pas traduire une quantité de transcrits trop importante par rapport aux besoins réels de la mitochondrie, soit cette dernière ne permet pas d'un point de vue matériel (nombre de MRPs et d'ARNr) d'assembler un nombre suffisant de ribosomes pour traduire tout ce qu'elle transcrit.

Dans la mesure où le niveau de traduction ne suit pas celui de la transcription, nous ne savons pas dans quel but la mitochondrie produit (ou stabilise) plus de transcrits en cas de stress respiratoire.

### 5.1.1. L'épissage de l'ARNm *nad2* est affecté chez les mutants de complexes respiratoire

Comme il l'a été observé chez les mutants *mtl1*, *mtsf1* et *mtf2*, l'absence de certaines sous-unités du complexe I (respectivement Nad7, Nad4 et Nad1), et donc du complexe I assemblé, a pour conséquence un défaut d'épissage partiel et systématique des introns 1 et 2 de l'ARNm *nad2* (Haili et al., 2013; Haili et al., 2016; Wang et al., 2017a; Lee et al., 2017), ceci a également été observé avec les mutants non PPR *nmat1* et *nmat4* (Keren et al., 2012; Cohen et al., 2014). Nos résultats sur les mutants *rfl22* et *rfl23* corroborent ces observations (Figures 31 et 50). En effet, l'intron 1 de *nad2* est 6,7 et 17 fois moins épissé chez *rfl22* et *rfl23* respectivement, en comparaison au sauvage. Ces résultats permettent d'ajouter Nad4L à la liste des protéines du complexe I qui en leur absence impactent la maturation de l'ARNm *nad2*, mais également d'apprendre que l'absence d'autres complexes respiratoires (ici les complexes III et IV) peuvent avoir la même conséquence sur l'épissage de *nad2*.

Il est également intéressant de noter que des problèmes de natures différentes tels que la déstabilisation de transcrits (*nad4* et *nad1*) ou un défaut de traduction (*nad7*, *nad4L* et *ccmF<sub>N2</sub>*) conduisent à un défaut d'épissage concernant systématiquement les premiers introns de *nad2* et que ce défaut est systématiquement partiel. Nous ne savons pas pourquoi le transcrit *nad2* est aussi souvent impacté chez les mutants du complexe I, ni pourquoi l'épissage spécifique de ses deux premiers introns est en cause. Il est envisageable que les facteurs d'épissage des deux premiers introns de *nad2* viennent à manquer en cas de stress respiratoire, et qu'ils ne soient pas capables d'épisser la totalité des transcrits *nad2* produits par la mitochondrie lorsque la chaîne respiratoire est affectée (cf. ci-avant). Cela pourrait en particulier résulter de la surexpression du transcriptome mitochondrial chez les mutants. Dans ce cas, le nombre de transcrits correctement épissés serait comparable au sauvage, et seule la proportion d'épissage changerait. Ceci expliquerait pourquoi un complexe I complet et fonctionnel peut être assemblé chez le mutant *rfl22*, qui est le seul présenté ici à ne pas être affecté par ailleurs dans une des sous-unités du complexe I.

Une autre hypothèse serait que l'épissage de l'ARNm *nad2*, qui fait partie des premiers éléments du complexe I à être assemblé (Figure 45B), soit la cible d'un rétrocontrôle négatif lorsque toutes les sous-unités du complexe I ne sont pas disponibles ou

lorsque la chaîne respiratoire est affectée. Néanmoins, et comme il l'a été mentionné ci-avant, le défaut d'épissage n'étant que partiel, ce rétrocontrôle n'empêche pas le complexe I d'être assemblé chez un mutant tel que *rfl22* (Figure 27), et ne semble donc pas être particulièrement déterminant.

## 5.2. Fonctions des protéines RFL22 et RFL23

### 5.2.1. La protéine RFL22 est à la fois impliquée dans la stabilisation et/ou la production de la forme courte de l'ARNm *ccmF<sub>C</sub>* ainsi que dans la traduction de *ccmF<sub>N2</sub>*

Mis à part son rôle, probablement indirect, dans l'épissage de *nad2*, nous avons montré que la protéine RFL22 était à la fois impliquée dans la production ou la stabilisation de la forme courte de l'ARNm *ccmF<sub>C</sub>* (Figure 32) et dans la traduction de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* (Figure 34), tous deux codant des protéines faisant partie du complexe hème lyase.

Du fait de l'absence d'exoribonucléases 5'→3' dans les mitochondries végétales, les ARNm mitochondriaux ne sont stabilisés que du côté 3'. Le transcrite *ccmF<sub>C</sub>* possède deux 3'UTR de tailles différentes (+10 et +117) (Forner et al., 2007) qui peuvent être stabilisées par association de protéines stabilisatrices terminales ou par la présence de structures tige-boucle. Ici, nous avons montré que la mutation du gène *RFL22* était à l'origine de la disparition de la forme courte du transcrite *ccmF<sub>C</sub>*, sans affecter aucunement sa forme longue (Figure 32).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'implication de la protéine RFL22 dans la production ou stabilisation de la forme courte de *ccmF<sub>C</sub>*. Comme pour d'autres protéines RFL (Arnal et al., 2014; Fujii et al., 2016), RFL22 pourrait diriger une coupure endonucléolytique partielle à la position +10 sur un transcrite *ccmF<sub>C</sub>* allant au delà de cette position, et pouvant correspondre à la forme +117 (transcrite long). RFL22 pourrait induire cette coupure et concomitamment protéger le transcrite court des exonucléases 3'→5'. La coupure dirigée par RFL22 pourrait avoir lieu un peu plus en aval de la position +10 et une autre protéine PPR ou une structure ARN en tige boucle pourrait être responsable de la stabilisation de l'ARNm à cette position. La forme courte du transcrite pourrait aussi résulter d'un arrêt de la transcription entre les positions +10 et +177 et être stabilisé par association de RFL22 sur la

position +10, suivi d'une dégradation exoribonucléolytique 5'→3' jusqu'à la position +10, stabilisée par RFL22.

D'autre part, nous avons montré que la protéine RFL22 était indispensable à la traduction de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* (Figure 34), son niveau de traduction étant diminué d'un facteur 4,6 chez le mutant. Ceci peut sembler peu, mais étant donné le faible niveau de traduction de ce transcrite chez le sauvage, cette diminution semble suffisante pour provoquer une chute significative de la quantité de complexe hème lyase ainsi que les conséquences physiologiques discutées ci-avant. Le rôle que la protéine RFL22 tient dans l'activation traductionnelle de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* est difficile à appréhender avec les données dont nous disposons pour le moment. Il est en effet difficile de comprendre comment elle oriente la petite sous-unité du ribosome et aide à identifier le codon initiateur de la traduction, qui pour rappel est un codon GUG sur ce transcrite.

### **5.2.2. La protéine RFL23 est requise pour permettre au ribosome d'initier la traduction de l'ARNm *nad4L* au bon codon AUG**

Tout comme pour la protéine RFL22, nous pensons que le rôle de la protéine RFL23 dans l'épissage de *nad2* est indirect. Nous avons observé par profilage de ribosomes une baisse des niveaux de traduction de *nad4L* et de certains exons de *nad2* chez *rfl23* (Figure 52).

La diminution du niveau d'association aux ribosomes de l'ARNm *nad4L* est d'un facteur à peine supérieur à 2 chez le mutant *rfl23* (Figure 52). Néanmoins, la répartition des empreintes de ribosomes sur ce transcrite nous a montré qu'aucun ribosome n'est retrouvé sur le premier tiers du transcrite, et très peu sur le deuxième chez le mutant *rfl23* (Figure 53). Les ribosomes sont donc incapables d'initier la traduction de *nad4L* au niveau de l'AUG se trouvant au début de la phase ouverte de lecture chez *rfl23*. La traduction de *nad4L* est tout de même initiée plus loin sur le transcrite, certainement au niveau de codons AUG internes à la séquence codante. Nous avons en outre montré que l'assemblage du complexe I chez *rfl23* s'arrête précocement sous la forme d'un pré-complexe mesurant environ 200 kDa (Figure 45A). D'après sa taille, il pourrait justement correspondre à l'intermédiaire auquel s'associent les protéines Nad3, Nad4L et Nad6 au cours de l'assemblage du complexe I. Cela est donc en

accord avec l'absence de production de la protéine Nad4L complète chez le mutant *rfl23*. Nos résultats de profilage de ribosomes permettent de suggérer qu'une protéine Nad4L tronquée pourrait être produite chez *rfl23*, mais si tel était le cas elle ne permet visiblement pas le recrutement des sous-unités Nad3 et Nad6 et la poursuite de l'assemblage du complexe I.

Nous observons également une baisse du niveau de traduction de certains exons de *nad2* (Figure 52). Il est important de noter qu'elle n'est présente que pour les exons 2, 3 et 4, soit les exons qui suivent l'intron 1, présentant un défaut partiel d'épissage. Puisqu'une partie des transcrits *nad2* présents dans la matrice mitochondriale possèdent l'intron 1, les ribosomes engagés dans leur traduction se heurtent aux codons stop présents dans ce dernier. Ceci explique pourquoi une partie des ribosomes n'atteignent pas les exons suivants. Nous pouvons donc conclure que le défaut de traduction de *nad2* est directement imputable au défaut d'épissage partiel.

### 5.3. Mode d'action des protéines RFL22 et RFL23

#### 5.3.1. Détermination du site de fixation de la protéine RFL22 sur l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* : deux hypothèses s'opposent

Nous avons essayé de déterminer le site de fixation de la protéine RFL22 sur son ARNm cible, *ccmF<sub>N2</sub>*, de plusieurs façons.

Tout d'abord *in vivo*, par co-immunoprécipitation (Figure 36). Cette expérience, présentant notamment l'avantage d'être faite sans *a priori*, nous a d'une part confirmé la liaison physique entre RFL22 et l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* mais ne nous a pas permis de déterminer la région précise sur laquelle la protéine RFL22 pourrait se lier, dans la mesure où la région ARN co-immunoprécipitée avec RFL22 comprend la 5'UTR de *ccmF<sub>N2</sub>* et quasiment toute sa séquence codante.

Grâce au code de reconnaissance des motifs PPR (Barkan et al., 2012; Yagi et al., 2013; Shen et al., 2016), nous avons cherché à prédire dans quelles région du génome mitochondrial pourrait se fixer la protéine RFL22 (Tableau 12). Cette expérience nous a

indiqué que parmi les séquences sur lesquelles cette protéine pourrait se lier se trouve la séquence CGUGUCGUUCG, positionnée au début de la séquence codante de *ccmF<sub>N2</sub>*.

Brin	Start	End	p-value	Séquence correspondante	ARNm concerné
+	236774	236783	9,09.10 <sup>-7</sup>	GUGUCGUUCU	<i>nad5</i> intron 2
+	161969	161978	1,66.10 <sup>-5</sup>	GUGUGGUUCU	<i>nad2</i> intron 1
-	120540	120549	1,66.10 <sup>-5</sup>	GUGUGGUUCU	<i>nad1</i> intron 2
+	290559	290568	3,52.10 <sup>-5</sup>	GUGUCGUUCG	<i>ccmF<sub>N2</sub></i> exon 1
+	238006	238015	4,58.10 <sup>-5</sup>	GUGUCUUUCU	<i>nad5</i> intron 2
-	238302	238311	4,58.10 <sup>-5</sup>	GUGUCUUUCU	<i>nad7</i> exon 5
+	97504	97513	4,8.10 <sup>-5</sup>	GUCUUGUUCU	<i>nad1</i> intron 1
+	99048	99057	5,84.10 <sup>-5</sup>	GUAUUGUUCU	<i>nad1</i> intron 1
-	119566	119575	8,01.10 <sup>-5</sup>	GUGUCGUUCA	<i>nad1</i> intron 3
-	183548	183557	8,28.10 <sup>-5</sup>	GUAUCGUUUU	<i>rpl5-cob</i>

**Tableau 12 - Prédiction des sites de liaison possibles de la protéine RFL22 sur le transcriptome mitochondrial d'Arabidopsis.**

Le programme de prédiction a été réalisé par F. Aubé.

Afin d'identifier avec plus de certitudes le site de fixation de RFL22 sur l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>*, des expériences de liaison *in vitro* (gels-retard) ont été réalisées au moyen de sondes couvrant toute la 5' UTR du transcrit et le début de la séquence codante afin de valider ou d'invalider les prédictions fournies par le code PPR (Figure 37). Les résultats ont révélé une liaison spécifique de la protéine RFL22 dans la 5'UTR de *ccmF<sub>N2</sub>* entre les positions -163 et -90 et une absence de liaison dans la zone prédite par le code PPR (sonde 3-4). Ceci suppose que soit la prédiction du code PPR n'est pas juste, soit RFL22 se lie effectivement dans la phase codante de *ccmF<sub>N2</sub>* *in vivo* mais nous n'avons pas été capable de confirmer cette association *in vitro* dans les conditions utilisées.

Pour trancher entre ces deux hypothèses, nous avons complété fonctionnellement le mutant *rfl22* avec les orthologues des gènes *RFL22* chez des espèces proches d'*Arabidopsis thaliana*, en l'occurrence *Arabidopsis lyrata* et *Brassica rapa* (Figure 41). La séquence codante de *ccmF<sub>N2</sub>* est extrêmement conservée entre ces espèces alors que la 5'UTR ne l'est pas toujours. En effet, la région 5' de *ccmF<sub>N2</sub>* est identique entre *A. thaliana* et *A. lyrata*, alors qu'elle est très différente chez *B. rapa* (Figure 40), et chez la



plupart des autres *Brassicaceae* d'ailleurs. Nos résultats montrent que les protéines RFL22 d'*A. lyrata* et de *B. rapa* peuvent remplacer fonctionnellement la protéine RFL22 d'*Arabidopsis thaliana*. Cela a permis de montrer que la protéine RFL22 est conservée entre les *Brassicaceae*, contrairement à la grande majorité des autres protéines de la famille RFL. Le rôle essentiel qu'elle tient dans le fonctionnement des mitochondries est en accord avec cette observation. Concernant le site de fixation de RFL22, le résultat obtenu avec le gène RFL22 de *B. rapa* suggère fortement que la protéine RFL22 se lierait plutôt dans la phase codante de *ccmF<sub>N2</sub>*, ce qui semble en désaccord avec les résultats de cartographie *in vitro* réalisés par gel-retard. En effet, si les éléments de séquences permettant à RFL22 de *B. rapa* de promouvoir la traduction de *ccmF<sub>N2</sub>* se trouvaient dans sa 5' UTR, elle n'aurait probablement pas pu compléter le mutant *rfl22* car le gène *ccmF<sub>N2</sub>* porte une 5' UTR très différente. Ce résultat est donc plutôt en accord avec les prédictions du « code PPR ».

Néanmoins, l'alignement de la 5' UTR de *ccmF<sub>N2</sub>* chez *B. rapa* et du site de liaison déterminé *in vitro* a montré que ces séquences présentent des similitudes partielles sur 3 régions (Figure 42), aucune d'entre elles ne présentant d'identité parfaite sur 12 bases consécutives toutefois, qui est la taille du site de liaison théorique de la protéine RFL22, comportant 12 répétitions PPR).

En tenant compte de toutes les informations dont nous disposons, je propose que la protéine RFL22 se lie dans la 5'UTR de *ccmF<sub>N2</sub>*, notamment au niveau d'une des régions présentant des similitudes. Ceci reste bien sûr à prouver *in vitro* par d'autres expériences de gels-retard avec de plus petites sondes et/ou *in vivo* en faisant une cartographie fine par co-immunoprécipitation. Il nous est malheureusement impossible de cartographier plus finement le site de liaison de RFL22 génétiquement car la transformation des mitochondries de plantes n'est pas encore possible techniquement.

Si cette hypothèse est vraie, alors la protéine RFL22 pourrait agir de deux façons : soit en participant au recrutement du mitoribosome, soit en libérant un site de fixation potentiel de la petite sous-unité du mitoribosome, comme il l'a été montré chez le maïs avec la protéine PPR10 chloroplastique. Cette protéine permet, en se liant au niveau de la 5'UTR de son ARN cible, de libérer une séquence de type Shine-Dalgarno d'une structure en tige-boucle et de permettre ainsi l'ancrage de la petite sous-unité du ribosome chloroplastique (Prikryl et al., 2011). Néanmoins, il ne s'agirait pas d'une séquence Shine-Dalgarno dans le

cas de RFL22, car ces motifs ne sont pas présents dans les 5'UTR des ARNm mitochondriaux chez les végétaux.

### 5.3.2. Détermination du site de fixation de la protéine RFL23 sur l'ARNm *nad4L*

Nous avons également cherché à prédire le site de liaison de la protéine RFL23 en utilisant le code PPR (Barkan et al., 2012; Yagi et al., 2013; Shen et al., 2016). Comme pour la protéine RFL22, nous avons cherché quelle était la région du génome mitochondrial pour laquelle la protéine RFL23 pourrait avoir le plus d'affinité (Tableau 13). Cette recherche nous a fourni entre autres la séquence ACAUUUGAAUUU, présente dans la 5'UTR de l'ARNm *nad4L*, ce qui est en adéquation avec le reste de nos résultats.

Brin	Start	End	p-value	Séquence correspondante	ARNm concerné
+	99109	99120	1,12.10 <sup>-5</sup>	ACAUCUGAACCA	<i>nad1</i> intron 1
+	360545	360556	1,71.10 <sup>-5</sup>	ACAUUUGAAUUU	5'UTR <i>nad4L-atp4</i>
+	112646	112657	3,79.10 <sup>-5</sup>	AAACCUGAAUUA	<i>atp1</i> exon 1
-	243268	243279	4,8.10 <sup>-5</sup>	ACACGCGAAUUA	<i>nad7</i> intron1
-	119583	119594	5,01.10 <sup>-5</sup>	AUAUUUGAACGA	<i>nad1</i> intron 3
-	218635	218646	5,55.10 <sup>-5</sup>	AUAUUUCTATTA	<i>mttb</i> exon 1
+	360679	360690	5,67.10 <sup>-5</sup>	UCAAUUGAAUUA	<i>nad4L</i> exon 1
-	218777	218788	5,84.10 <sup>-5</sup>	AGCUUUGAAUUA	<i>mttb</i> exon 1
+	64633	64644	7,57.10 <sup>-5</sup>	ACAUUUCCAUUA	<i>cox1</i> exon 1
-	183732	183743	7,88.10 <sup>-5</sup>	AAAUUUGAAUUG	<i>rp15-cob</i>

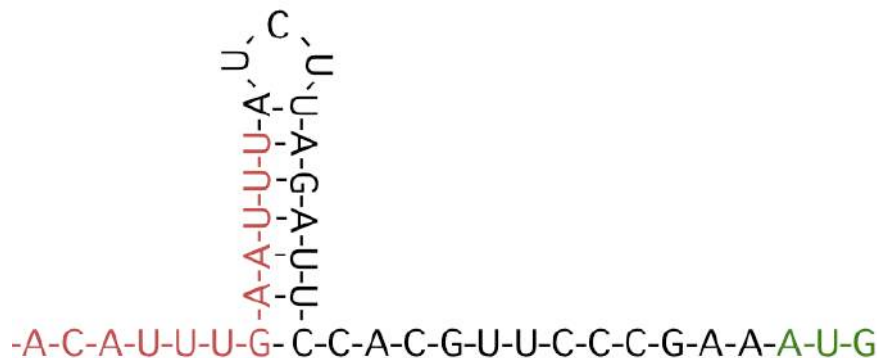
**Tableau 13 – Prédiction des sites de liaison possibles de la protéine RFL23 sur le transcriptome mitochondrial d'Arabidopsis.**

Le programme de prédiction a été réalisé par F. Aubé.

La recherche de structures secondaires au voisinage de l'AUG de *nad4L* a permis d'identifier une éventuelle structure en tige-boucle comprenant une partie du site de fixation de RFL23 prédit par le code PPR (Figure 69). De fait, RFL23 pourrait également avoir un mode d'action similaire à celui de PPR10 ou la protéine HAT (half-a-tetratricopeptide repeat) HCF107 et activer la traduction en dépliant une structure en tige-boucle proche d'un AUG

initiateur de traduction. Les structures tige-boucle des protéines PPR10 et HCF107 ont des dG de -2,9 kcal/mol et -4,8 kcal/mol, respectivement (Prikryl et al., 2011; Hammani et al., 2012), soit environ du même ordre de grandeur que celui de la tige boucle présente en amont du codon AUG de *nad4L* ayant un dG de -2,52 kcal/mol. L'appellation dG correspond à un paramètre thermodynamique appelé « énergie libre » et fait référence à la stabilité de la tige boucle à une température donnée : plus le dG est faible plus la stabilité de la structure est importante (Mathews et al., 1999). Ceci indique que la stabilité de ces structures est plus ou moins similaire.

Dans le cas présent, cette structure secondaire se trouve située 12 bases en amont du codon AUG initiateur de *nad4L*. Il est possible que cette tige-boucle gêne l'accessibilité à l'AUG de *nad4L* et que la fonction de RFL23 soit de déplier cette structure et de permettre à la petite sous-unité du mitoribosome de mieux le reconnaître le codon AUG et d'initier ainsi plus efficacement la traduction de l'ARNm *nad4L*. En absence de la protéine RFL23, nous observons une initiation traductionnelle aberrante sur l'ARNm *nad4L* à partir de codons AUG internes, donnant lieu à une protéine Nad4L incomplète, certainement non fonctionnelle et probablement dégradée.



**Figure 69 - Structure secondaire prédite en amont de l'AUG de l'ARNm *nad4L* (dG=-2,2 kcal/mol).**

Structure prédite par mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>)

Le site de liaison prédit par le code PPR est indiqué en rouge

Le codon AUG initiateur de la traduction de *nad4L* est indiqué en vert

## 5.4. Ce que l'on peut conclure sur les protéines PPR Rf-like chez *Arabidopsis thaliana*

Nous avons montré que les gènes *RFL22* et *RFL23* sont essentiels à l'activité des mitochondries et au développement d'*Arabidopsis*. Il s'agit donc des deux seules protéines de la sous-famille PPR-RFL d'*Arabidopsis* à être dans ce cas.

En l'absence de la protéine RFL22, les mutants meurent à l'état embryonnaire et une fois sauvés, ils sont stériles et ne possèdent pas de racines. Cette incapacité à former des racines est également trouvée chez un autre mutant d'*Arabidopsis* dépourvu de complexe IV et résulte très certainement de la nature auxotrophique et non-photosynthétique des tissus racinaires (Dahan et al., 2014). Il a également été proposé que ce la puisse être lié à une induction insuffisante de l'AOX dans les racines (Gapper & Dolan, 2006; Dahan et al., 2014). Il manque au mutant *rfl22* plusieurs composants de la chaîne respiratoire, à savoir les complexes III et IV, le complexe hème lyase et les cytochromes de type c (Figures 26 et 27). J'ai pu en outre montrer que la protéine RFL22 est indispensable à la traduction de l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>*, codant une sous-unité du complexe hème lyase (Figure 34), et cartographier son site de fixation putatif sur sa cible (Figures 36, 37 et 41).

En l'absence de la protéine RFL23, les mutants présentent un retard de croissance important, des feuilles recroquevillées et n'ont plus de complexe I fonctionnel (Figure 43 et 44). J'ai pu mettre en évidence le fait que protéine RFL23 est indispensable à la traduction correcte de l'ARNm *nad4L*, codant une sous-unité du complexe I (Figures 52 et 53), et proposer un site de liaison dans la 5'UTR de sa cible ainsi qu'un mode d'action pour cette protéine, bien qu'il soit nécessaire de le confirmer *in vivo* et/ou *in vitro*.

Les autres protéines RFL caractérisées chez *Arabidopsis* sont impliquées soit dans la maturation en 5' de transcrits (Jonietz et al., 2010, 2011; Hölzle et al., 2011), soit dans le clivage partiel de transcrits ou d'ORF non conservées (Arnal et al., 2014; Fujii et al., 2016) ; aucune d'entre elles ne portant de fonctions essentielles ni ne causant de phénotype en son absence.

La caractérisation des protéines RFL22 et RFL23 a permis de révéler qu'elles avaient pour cible des ARNm mitochondriaux portant des rôles essentiels, et non des ORF non

conservées comme c'est le cas pour les Rf dans les systèmes de SMC. Ceci nous conforte dans l'idée qu'elles sont en opposition par rapport aux restaurateurs de fertilité, et ont des fonctions comparables aux PPR non RFL, comme par exemple PPR10 ou MTL1 (Prikryl et al., 2011; Haili et al., 2016).

Il a été proposé que la plasticité évolutive des gènes *RFL* les place comme des candidats idéaux pour la surveillance du génome mitochondrial. La famille PPR pourrait avoir évolué et s'être diversifiée pour corriger les mutations potentiellement délétères dans les organites (hypothèse du « debugging » (Maier et al., 2008), cf. introduction), mais le fait que la sous-famille RFL évolue plus rapidement que le reste de la famille PPR pourrait aider à compenser certaines altérations ou modifications du génome mitochondrial (Dahan & Mireau, 2013).

Par exemple,, le gène *ccmF<sub>N</sub>* est scindé en deux gènes *ccmF<sub>N1</sub>* et *ccmF<sub>N2</sub>* chez les *Brassicaceae* (Unseld et al., 1997; Handa, 2003; Park et al., 2013), ceci aboutissant à un ARNm *ccmF<sub>N2</sub>* ne possédant pas le codon AUG initiateur de la traduction mais un codon GUG. Il est donc envisageable, dans la mesure où nous avons montré que le rôle de la protéine RFL22 est conservé chez les *Brassicaceae*, que RFL22 ait évolué chez ce groupe de plantes de façon à permettre l'initiation de la traduction de *ccmF<sub>N2</sub>* et soit apparue en réponse à la scission du gène *ccmF<sub>N</sub>*. En revanche, les raisons ayant conduit à la sélection et au maintien du gène *RFL23* restent à ce jour difficiles à appréhender.

Notre équipe essaye de comprendre le fonctionnement des gènes *PPR* chez les plantes, capables à la fois de promouvoir mais aussi de prévenir l'expression de gènes mitochondriaux.

Si nous étions un jour capables de bien comprendre les modes d'actions et spécificités de liaison des protéines PPR, nous pourrions alors envisager de produire à façon des PPR synthétiques capables de promouvoir ou prévenir l'expression de gènes mitochondriaux spécifiques, mais aussi chloroplastiques ou encore nucléaires. Ceci pourrait être utile à la fois en agronomie pour construire des restaurateurs de fertilité synthétiques, mais également en médecine où la plupart des maladies mitochondriales sont causées par un défaut de traduction de certains transcrits mitochondriaux spécifiques (Taylor & Turnbull, 2005).



# Annexes : Participation à d'autres projets





## **6. Annexes : participation à d'autres projets**

### **6.1. Caractérisation de la protéine PPR MTL1**

La caractérisation de la protéine MTL1 a fait partie du projet de thèse d'un ancien membre de notre équipe, Nawel Halli. J'ai participé à ce projet en réalisant une partie des expériences de RT-PCR quantitatives ainsi que les RT-PCR sur ARNs circularisés.

J'ai également continué à travailler avec le mutant *mtl1* en tant que témoin pour le développement du profilage de ribosomes adapté aux mitochondries de plantes (cf. Résultats).

# The MTL1 Pentatricopeptide Repeat Protein Is Required for Both Translation and Splicing of the Mitochondrial *NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT7* mRNA in Arabidopsis<sup>1</sup>

Nawel Haïli, Noelya Planchard, Nadège Arnal<sup>2</sup>, Martine Quadrado, Nathalie Vrielynck, Jennifer Dahan<sup>3</sup>, Catherine Colas des Francs-Small, and Hakim Mireau\*

Institut Jean-Pierre Bourgin, Institut National de la Recherche Agronomique, AgroParisTech, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Saclay, 78026 Versailles cedex, France (N.H., N.P., N.A., M.Q., N.V., J.D., H.M.); Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay cedex, France (N.H., N.P.); and Australian Research Council Centre of Excellence in Plant Energy Biology, University of Western Australia, Crawley, Western Australia 6009, Australia (C.C.d.F.-S.)

ORCID IDs: 0000-0002-6386-5672 (C.C.d.F.-S.); 0000-0002-2299-5139 (H.M.).

Mitochondrial translation involves a complex interplay of ancient bacteria-like features and host-derived functionalities. Although the basic components of the mitochondrial translation apparatus have been recognized, very few protein factors aiding in recruiting ribosomes on mitochondria-encoded messenger RNA (mRNAs) have been identified in higher plants. In this study, we describe the identification of the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) MITOCHONDRIAL TRANSLATION FACTOR1 (MTL1) protein, a new member of the Pentatricopeptide Repeat family, and show that it is essential for the translation of the mitochondrial *NADH dehydrogenase subunit7* (*nad7*) mRNA. We demonstrate that *mtl1* mutant plants fail to accumulate the Nad7 protein, even though the *nad7* mature mRNA is produced and bears the same 5' and 3' extremities as in wild-type plants. We next observed that polysome association of *nad7* mature mRNA is specifically disrupted in *mtl1* mutants, indicating that the absence of Nad7 results from a lack of translation of *nad7* mRNA. These findings illustrate that mitochondrial translation requires the intervention of gene-specific nucleus-encoded PPR trans-factors and that their action does not necessarily involve the 5' processing of their target mRNA, as observed previously. Interestingly, a partial decrease in *nad7* intron 2 splicing was also detected in *mtl1* mutants, suggesting that MTL1 is also involved in group II intron splicing. However, this second function appears to be less essential for *nad7* expression than its role in translation. MTL1 will be instrumental to understand the multifunctionality of PPR proteins and the mechanisms governing mRNA translation and intron splicing in plant mitochondria.

Translation is the fundamental process decoding the genetic message present on mRNAs into proteins. In plant cells, mRNA translation occurs in the cytoplasm

but also in two organelles, mitochondria and plastids. Because of their prokaryotic origin, the translation machineries operating in these two organelles share many characteristics with the bacterial translation apparatus (Bonen, 2004; Barkan, 2011). However, most of these bacteria-like features have been modified throughout evolution, and current organellar translation systems cooperate with numerous nucleus-encoded eukaryotic trans-factors. The divergence from bacteria is particularly obvious in plant mitochondria, notably because mitochondrial mRNAs lack the typical Shine and Dalgarno (SD) motif in their 5' leaders and alternative start codons other than AUG are often used to initiate translation (Bonen, 2004). Proteomic and bioinformatic analyses allowed the identification of most proteins and RNA factors forming the core of the plant mitochondrial translation machinery, including translation initiation and elongation factors as well as ribosomal proteins (Bonen, 2004; Bonen and Calixte, 2006). However, the dynamics of this machinery remains largely obscure. In particular, nothing is known about the recruitment of mitochondrial ribosomes on 5' untranslated

<sup>1</sup> This work was supported by the LabEx Saclay Plant Sciences (grant no. ANR-10-LABX-0040-SPS).

<sup>2</sup> Present address: Institut National de la Recherche Agronomique, Centre National de Ressources Génomiques Végétales, 31326 Castanet Tolosan, France.

<sup>3</sup> Present address: Department of Plant, Soil, and Entomological Sciences, University of Idaho, Moscow, ID 83844.

\* Address correspondence to hakim.mireau@versailles.inra.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Hakim Mireau ([hakim.mireau@versailles.inra.fr](mailto:hakim.mireau@versailles.inra.fr)).

N.H. performed most of the experiments; N.P. performed part of the experiments; J.D. performed part of the experiments; C.C.d.F.-S. performed part of the experiments; N.A. provided technical assistance to N.H. and J.D.; M.Q. provided technical assistance to N.H., J.D., and N.P.; H.M. conceived the project, supervised the experiments, and wrote the article with contributions of all the authors.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.01591](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.01591)

regions in the absence of the SD motif and about the recognition of the correct translation initiation codon by the small ribosomal subunit. The high degree of sequence divergence among 5' leaders of mitochondrial genes suggests a ribosome recruitment mechanism involving gene-specific cis-sequences and trans-factors (Hazle and Bonen, 2007; Choi et al., 2012). Up to now, only two proteins belonging to the Pentatricopeptide Repeat (PPR) family have been found to promote mitochondrial translation in higher plants (Uyttewaal et al., 2008b; Manavski et al., 2012). How they facilitate translation is still unclear, as for the few characterized PPR proteins shown to participate in plastid translation (Fisk et al., 1999; Schmitz-Linneweber et al., 2005; Cai et al., 2011; Zoschke et al., 2012, 2013). The plastid PENTATRICOPEPTIDE REPEAT PROTEIN10 (PPR10) protein of maize (*Zea mays*) is the only one for which the function has been elucidated at the molecular level. It was shown that, upon binding, PPR10 impedes the formation of a stem-loop structure in the 5' leader of the *ATP synthase subunit c (atpH)* mRNA, permitting the recruitment of ribosomes through the liberation of an SD motif (Prikryl et al., 2011).

PPR proteins represent a large family of RNA-binding proteins that has massively expanded in terrestrial plants (Barkan and Small, 2014). Most eukaryotes encode a handful of these proteins, whereas plant nuclear genomes express over 400 PPR proteins that are almost exclusively predicted to target mitochondria and/or plastids (Lurin et al., 2004; O'Toole et al., 2008). This family of proteins is characterized by the succession of tandem degenerate motifs of approximately 35 amino acids (Small and Peeters, 2000; Lurin et al., 2004). Based on the length of these repeats, the PPR family has been divided into two groups of roughly equal size in higher plants. P-type PPR proteins contain only successions of canonical 35-amino acid repeats (P), whereas PLS PPR proteins are composed of sequential repeats of P, short (S), and long (L) PPR motifs. P-type PPR proteins were shown to participate in various aspects of organellar RNA processing, whereas PLS PPR proteins have been almost exclusively associated with C-to-U RNA editing (for review, see Barkan and Small, 2014; Hammani and Giegé, 2014). Recent crystal structures showed that PPR motifs adopt an antiparallel helix-turn-helix fold whose repetition forms a solenoid-like structure (Ringel et al., 2011; Howard et al., 2012; Ban et al., 2013; Yin et al., 2013; Coquille et al., 2014; Gully et al., 2015). PPR tracks organize highly specific interaction domains that were shown to associate with single-stranded RNAs (Schmitz-Linneweber et al., 2005; Beick et al., 2008; Uyttewaal et al., 2008a; Williams-Carrier et al., 2008; Pfallz et al., 2009; Cai et al., 2011; Hammani et al., 2011; Prikryl et al., 2011; Khrouchtchova et al., 2012; Manavski et al., 2012; Zhelyazkova et al., 2012; Ke et al., 2013; Yin et al., 2013). The mechanism of sequence-specific RNA recognition by PPR proteins was recently uncovered, and combinations involving amino acid 6 of one motif and amino acid 1 of the subsequent motif correlate strongly with the identity of the RNA

base to be bound (Barkan et al., 2012; Takenaka et al., 2013; Yagi et al., 2013).

Besides those involved in RNA editing, few mitochondria-targeted PPR proteins have been characterized to date. Thus, our knowledge of the mechanisms governing the production and the expression of mitochondrial RNAs in higher plants is very limited. In this analysis, we describe the function of a novel mitochondria-targeted PPR protein of *Arabidopsis thaliana* called MITOCHONDRIAL TRANSLATION FACTOR1 (MTL1). Genetic and biochemical analyses indicate that MTL1 is essential for the translation of the mitochondrial *NADH dehydrogenase subunit7 (nad7)* mRNA. Effectively, the Nad7 protein does not accumulate to detectable levels in *mtl1* mutants, and this absence correlates with a lack of association of *nad7* mature mRNA with mitochondrial polysomes. Interestingly, a partial but significant decrease in *nad7* intron 2 splicing was also detected in *mtl1* mutants, suggesting that the MTL1 protein is also involved in group II intron splicing. Since the decrease in splicing was only partial, this second function of MTL1 appears less essential for *nad7* expression than its role in translation.

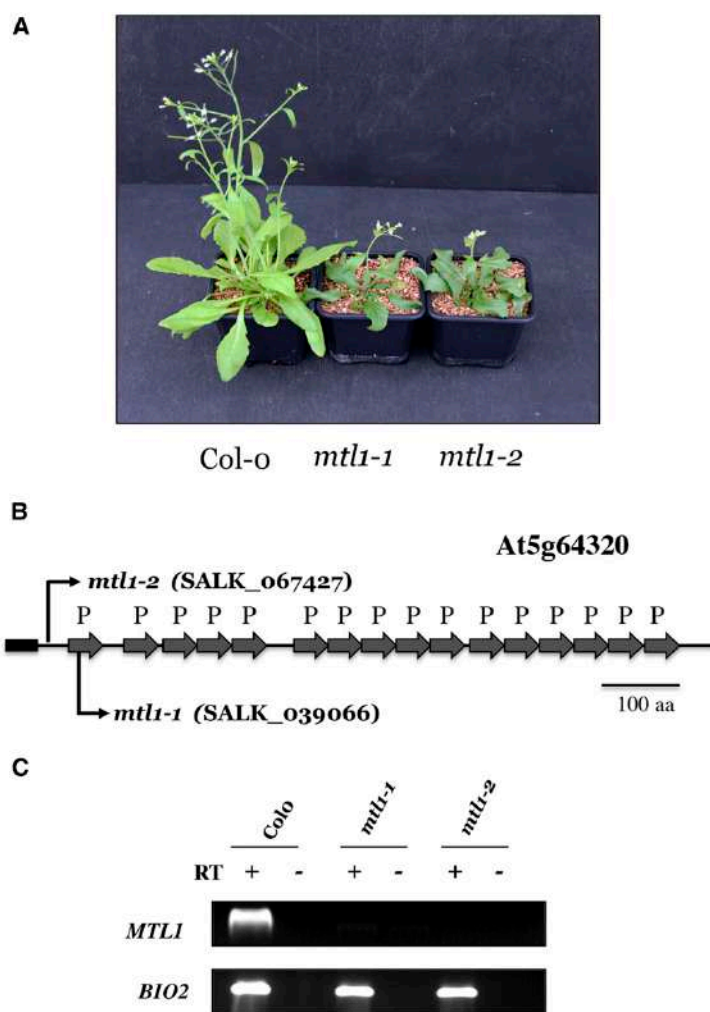
## RESULTS

### *Arabidopsis mtl1* Mutants Display a Slow-Growth Phenotype

In an effort to better understand gene expression in higher plant mitochondria, a series of *Arabidopsis* mutants bearing transfer DNA (T-DNA) insertions predicted to affect mitochondrially targeted P-type PPR proteins was collected. The search for interesting mutants revealed the *mtl1-1* line for which homozygous mutant plants displayed significantly retarded growth on soil compared with the wild type (Fig. 1A). The affected PPR gene in this line corresponded to the *At5g64320* gene and encoded an 82-kD protein comprising 16 PPR repeats according to predictions (Fig. 1B; Lurin et al., 2004). A second T-DNA insertion line affecting the same gene was subsequently identified. This second allelic mutant, named *mtl1-2*, displayed the same growth alterations as *mtl1-1*, strongly suggesting that the developmental phenotype observed in these lines was effectively associated with inactivation of the *At5g64320* gene (Fig. 1, A and B). Reverse transcription (RT)-PCR analysis indicated that no detectable full-length mRNA derived from the *At5g64320* gene accumulates in both *mtl1-1* and *mtl1-2* mutant plants, supporting that both identified mutant lines represented null mutants (Fig. 1C). *mtl1* mutant plants showed various developmental abnormalities compared with wild-type plants. Both mutant lines grew rather slowly compared with the wild type but reached about 80% of the size of Col-0 plants when cultured on soil for 2.5 months (Supplemental Fig. S1A). Additionally, *mtl1* plants generally bear deformed and dark green rosette leaves (Fig. 1A). They also needed nearly twice as much time to flower compared with the wild type, but they are

Haïli et al.

**Figure 1.** Arabidopsis *mtl1* mutants are delayed in their development. A, Comparative vegetative phenotypes of *mtl1* and Columbia-0 (Col-0) plants. Homozygous *mtl1* mutants grow much slower than wild-type plants on soil and produce plants with twisted rosette leaves. The photograph was taken after 10 weeks of culture in long-day conditions. B, Schematic diagram showing the predicted domain structure of the Arabidopsis MTL1 protein. Thick arrows along the protein indicate PPR-P repeats, and the black rectangle at the N terminus depicts the mitochondrial targeting sequence. Thin arrows above and below the protein indicate the locations of T-DNA insertions harbored in *mtl1-1* and *mtl1-2* mutants. C, RT-PCR analysis of *MTL1* transcripts in Col-0 and *mtl1* mutants. Five hundred nanograms of total RNA from plants of the indicated genotypes was reverse transcribed with random primers. Resulting complementary DNAs (cDNAs) were PCR amplified with oligonucleotides bracketing T-DNA insertion sites, and the resulting amplification products were size fractionated by agarose gel electrophoresis. The *BIO2* cDNA was separately amplified to control the efficiency of the RT reaction. Reverse transcriptase was either added (RT+) or omitted (RT-) from the initial RT reaction.

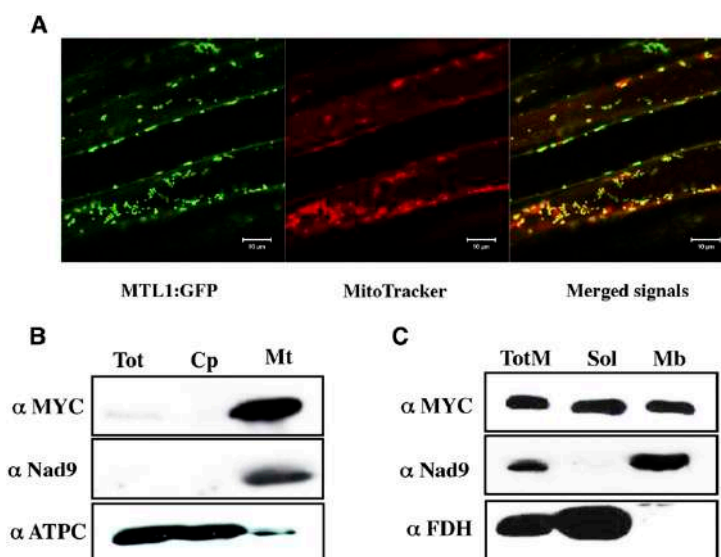


fertile (Supplemental Fig. S1B). Seeds produced by homozygous *mtl1* mutant plants were darker than normal Arabidopsis seeds, but they germinate with around 80% efficiency on soil or in vitro (Supplemental Fig. S1C).

#### The Arabidopsis *MTL1* Gene Encodes a Mitochondrion-Targeted PPR Protein

The cellular distribution of the MTL1 protein was verified by expressing a GFP translational fusion comprising the first 109 amino acids of MTL1 in transgenic Arabidopsis plants. Roots of transformed plants were observed with a confocal microscope, and the GFP fluorescence appeared as a punctuated signal distributed throughout the cytoplasm. The use of MitoTracker Red indicated that these signals corresponded to mitochondria (Fig. 2A). To confirm these results and to gain insight into the submitochondrial distribution of MTL1, a C-terminal fusion comprising the full-length MTL1 protein and 10 copies of the MYC epitope tag

was expressed in Arabidopsis. This strategy was favored, as rabbit polyclonal antibodies produced against fragments of MTL1 did not succeed in detecting the protein from Arabidopsis protein extracts. Expression of the MTL1-MYC protein in the *mtl1-1* mutant line rescued the mutant phenotypes, strongly supporting the functionality of the fusion protein (Supplemental Fig. S2, A and B). The distribution of the tagged MTL1 was then analyzed by probing total, plastid, and mitochondrial proteins prepared from transgenic plants with an anti-MYC monoclonal antibody. The MTL1-MYC fusion appeared to be highly enriched in the mitochondrial protein preparation, as attested by the anti-Nad9 and anti-ATPC control antibodies (Fig. 2B). The submitochondrial localization of MTL1-MYC was determined by probing soluble and membrane-bound mitochondrial proteins for the presence of MTL1-MYC. The tagged version of MTL1 was detected at similar levels in both soluble and membrane-associated protein preparations (Fig. 2C). The use of anti-Nad9 and



**Figure 2.** Subcellular and submitochondrial localization of the MTL1 protein. A, Confocal microscope images showing the cellular distribution of an MTL1-GFP fusion in Arabidopsis root cells. The MTL1-GFP fusion comprising the first 109 amino acids of MTL1 and the GFP was stably transformed into Arabidopsis plants. Prior to observation, roots were briefly soaked in MitoTracker Red to label mitochondria. The green channel on the left shows the GFP fluorescence; the center shows mitochondria labeled with the MitoTracker Red dye; the right presents the merged signals. B, Immunoblot analysis of total (Tot), chloroplast (Cp), and mitochondrial (Mt) protein fractions prepared from Arabidopsis plants expressing an MTL1-MYC fusion. The protein preparations were probed with an anti-MYC ( $\alpha$  MYC) monoclonal antibody to verify the mitochondrial localization of MTL1. The purity of the different fractions was tested with antibodies directed against the mitochondrial Nad9 ( $\alpha$  Nad9) and the chloroplast ATPC ( $\alpha$  ATPC) proteins. C, Assessment of proteins present in total mitochondrial protein preparation (TotM) and in soluble (Sol) as well as membrane-derived (Mb) protein fractions prepared from plants expressing an MTL1-MYC fusion. Protein gel blots were probed with an anti-MYC monoclonal antibody to detect the MTL1-MYC fusion, anti-Nad9 antibodies (corresponding to an extrinsic protein of the inner membrane of mitochondria), and anti-formate dehydrogenase ( $\alpha$  FDH) antibodies (a known soluble matrix protein). Each lane was loaded with about 50  $\mu$ g of protein preparation.

anti-FDH control antibodies confirmed the proper separation of both mitochondrial protein fractions.

#### *mtl1* Mutants Are Impaired in the Synthesis of Respiratory Complex I

The mitochondrial localization of MTL1 led us to consider that a defective respiratory activity may be at the origin of *mtl1* mutant phenotypes. To clarify the origin of a potential respiratory perturbation in these plants, we analyzed the steady-state levels of the different respiratory chain complexes in comparison with the wild type. Mitochondria prepared from *mtl1* and wild-type plants were lysed in the presence of digitonin, and the solubilized respiratory complexes were separated on blue-native gels. Coomassie Blue staining showed that most respiratory complexes accumulated to similar levels in wild-type and mutant plants, except for complex I and the supercomplex I + III (Fig. 3A, left). An in-gel NADH dehydrogenase activity test confirmed the lack of both forms of complex I in *mtl1* mutants (Fig. 3A, right).

To further analyze the impact of *mtl1* mutations on Arabidopsis respiration, oxygen uptake in the dark was determined on detached leaves in both mutant

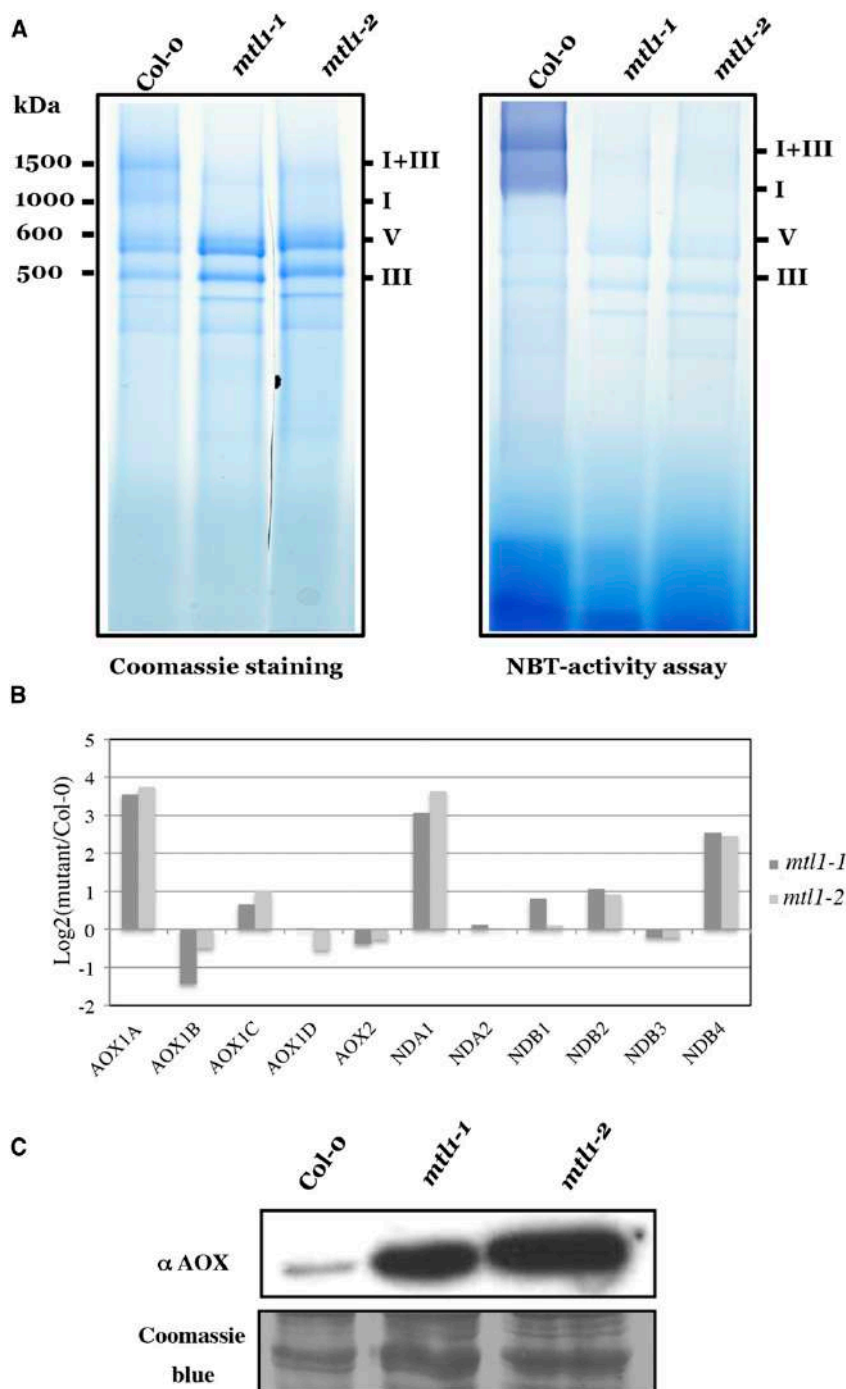
and wild-type plants. This led us to show that *mtl1* plants consumed nearly twice as much oxygen as Col-0 plants (Supplemental Fig. S3). Since this increase of oxygen consumption could be suggestive of a strong induction of the alternative respiratory pathways in the mutant plants, the expression levels of alternative NADH dehydrogenases (NDA and NDB) and alternative oxidase (AOX) genes were measured. Quantitative RT-PCR indicated that steady-state levels of *AOX1A*, *NDA1*, and *NDB4* transcripts overaccumulate from 4- to 8-fold in *mtl1* plants (Fig. 3B). The strong increase in AOX expression was further estimated by immunoblot analysis of mitochondrial extracts with an antibody to AOX. The results showed a highly significant increase in the AOX signal in both *mtl1* mutants (Fig. 3C). Our results indicated that *mtl1* plants are complex I respiratory mutants and that the alternative respiratory pathway is strongly activated in these plants.

#### *mtl1* Mutants Do Not Accumulate the Mitochondrial Nad7 Protein

To better understand the lack of assembled complex I in *mtl1* plants, we next analyzed the expression of all

Haïli et al.

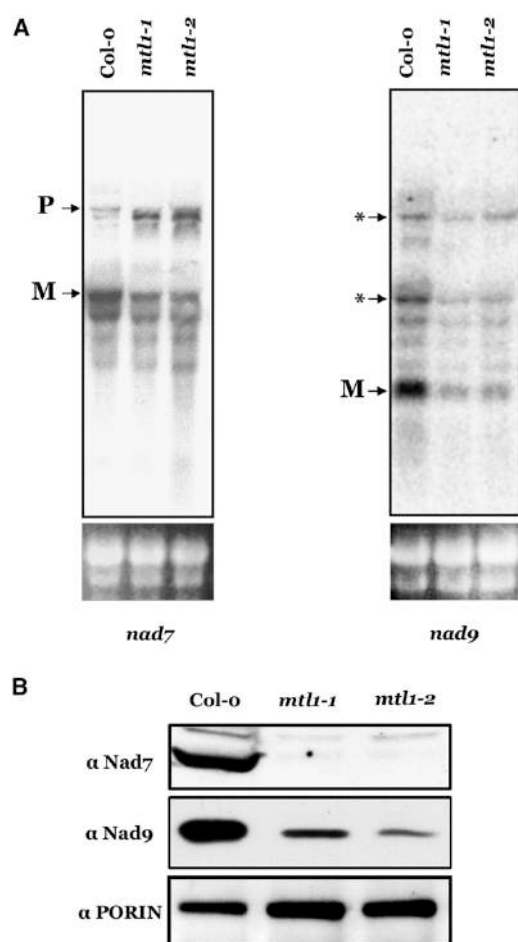
**Figure 3.** *mtl1* mutants are complex I respiratory mutants. A, Blue Native gel analysis of mitochondrial respiratory complexes extracted from wild-type and *mtl1* mutant plants. The gel presented on the left was stained with Coomassie Blue, whereas the gel on the right was stained to reveal the NADH dehydrogenase activity of complex I. About 200  $\mu$ g of protein treated with digitonin was loaded per lane. I, III, and V indicate the positions of the respective respiratory chain complexes. I+III corresponds to the I + III supercomplex. The locations of native molecular markers are indicated. NBT, Nitroblue tetrazolium. B, Quantitative RT-PCR measuring the relative steady-state levels of NDA, NDB, and AOX transcripts in *mtl1-1* and *mtl1-2* mutants. C, Analysis of the accumulation level of the mitochondrial AOX in both wild-type and *mtl1* plants. Total mitochondrial protein preparations obtained from plants of the indicated genotypes were probed with anti-AOX antibodies ( $\alpha$  AOX). Fifty micrograms of protein was loaded in each lane. Coomassie Blue staining of part of the gel is shown below the blots to attest for equivalent loading of the different samples.



mitochondria-encoded complex I subunits in the mutants. In a first approach, steady-state levels and processing efficiency of mitochondria-encoded complex I mRNAs were analyzed by RNA gel-blot analysis in both *mtl1* and wild-type plants. This approach showed

that all nine mitochondrial mRNAs encoding complex I subunits accumulate to detectable levels in *mtl1* plants (Fig. 4A; Supplemental Fig. S4). Most of the corresponding mature transcripts are produced in amounts close to wild-type levels, with a slight increase notably

for *nad1*, *nad4*, *nad5*, and *nad6* mRNAs. The only exceptions are the *nad7* and *nad9* mature transcripts, which are much less abundant in *mtl1* plants compared with Col-0 (Fig. 4A). In the case of *nad7*, this decrease was associated with the overaccumulation of an unspliced mRNA precursor, indicating that the loss of MTL1 caused, directly or indirectly, a splicing defect



**Figure 4.** The Nad7 mitochondrial protein does not accumulate in *mtl1* mutants. A, Analysis of *nad7* and *nad9* mRNA abundance in wild-type and *mtl1* plants. Fifteen micrograms of total RNA was size fractionated on denaturing agarose gels, blotted, and analyzed by hybridization to radiolabeled DNA probes corresponding to *nad7* and *nad9* mRNA. Signals corresponding to the expected mature transcripts are indicated by M and precursors by P. Asterisks indicate unexplained hybridization signals that may not be directly related to the *nad9* mitochondrial locus. Ethidium bromide staining of ribosomal RNAs is shown below the blots and serves as a loading control. B, Detection of both Nad7 and Nad9 proteins in mitochondrial extracts of *mtl1* mutants. Mitochondrial proteins prepared from plants of the indicated genotypes were analyzed by immunoblot assay. The blots were probed with antisera to Nad7 ( $\alpha$  Nad7) and Nad9 ( $\alpha$  Nad9) mitochondrial complex I subunits and to PORIN ( $\alpha$  PORIN) used as a loading control.

of *nad7* mRNA (Fig. 4A). Quantitative RT-PCR analysis measuring the splicing efficiency of all intron-containing mitochondrial transcripts allowed us to determine that this splicing defect concerns the second intron of *nad7* (Supplemental Fig. S5). A moderate 2-fold decrease of *nad2* intron 1 and 2 splicing efficiency was also detected in *mtl1* mutants with this analysis. To analyze the processing of *nad* transcripts in more detail, the 5' and 3' extremities of all mitochondria-encoded *nad* mRNAs were amplified by circular RT-PCR in both wild-type and *mtl1* plants. No obvious processing differences for any of these mRNAs could be identified in the mutants. Cloning and sequencing of the obtained amplification products further confirmed that all complex I mature transcripts in *mtl1* plants bear 5' and 3' extremities that are identical to the ones found in the wild type, including *nad7* (Supplemental Fig. S6). Shorter circular RT-PCR products for *nad7* were more apparent in *mtl1* plants compared with the wild type. Cloning and sequencing of these fragments in both Col-0 and *mtl1* mutants indicated that they derived from 5' truncated *nad7* transcripts that appear to accumulate to slightly higher levels in the mutants. Their abundance is insufficient to be visible on RNA gel blots (Fig. 4A). We next reasoned that the partial destabilization of *nad7* and *nad9* mature transcripts could result from difficulties in expressing the Nad7 and/or Nad9 proteins. Consequently, mitochondrial protein extracts were prepared from both mutants and wild-type plants and probed with anti-Nad7 and anti-Nad9 antibodies. Whereas the Nad9 protein was still detectable, although significantly reduced, no trace of Nad7 could be found in either *mtl1* mutant line (Fig. 4B). This showed that *mtl1* mutants did not accumulate detectable levels of Nad7 protein and that the lack of this mitochondrial protein was very likely responsible for the different molecular and physiological perturbations observed in *mtl1* plants.

#### The *nad7* mRNA Does Not Associate with Translating Mitochondrial Polysomes in *mtl1* Mutants

We next wondered whether the lack of Nad7 protein in *mtl1* plants could simply result from insufficient accumulation of the *nad7* mature mRNA. To answer this question, we used the Arabidopsis *bsi-insensitive roots6* (*bir6*) *ppr* mutant that was also described to accumulate low levels of mature *nad7* transcript in response to difficulties in splicing the first *nad7* intron (Supplemental Fig. S7A; Koprivova et al., 2010). Comparative RNA gel-blot analyses suggested that *bir6* plants accumulate less *nad7* mature transcript compared with *mtl1* mutants (Supplemental Fig. S7B). Indeed, quantitative RT-PCR further showed that *bir6* plants contain only 6% of wild-type levels of mature *nad7* transcripts, whereas *mtl1-1* plants contain about 20% (Supplemental Fig. S7C). Probing of mitochondrial proteins with anti-Nad7 and anti-Nad9 antibodies showed that *bir6* plants accumulate slightly reduced levels of the Nad9 protein



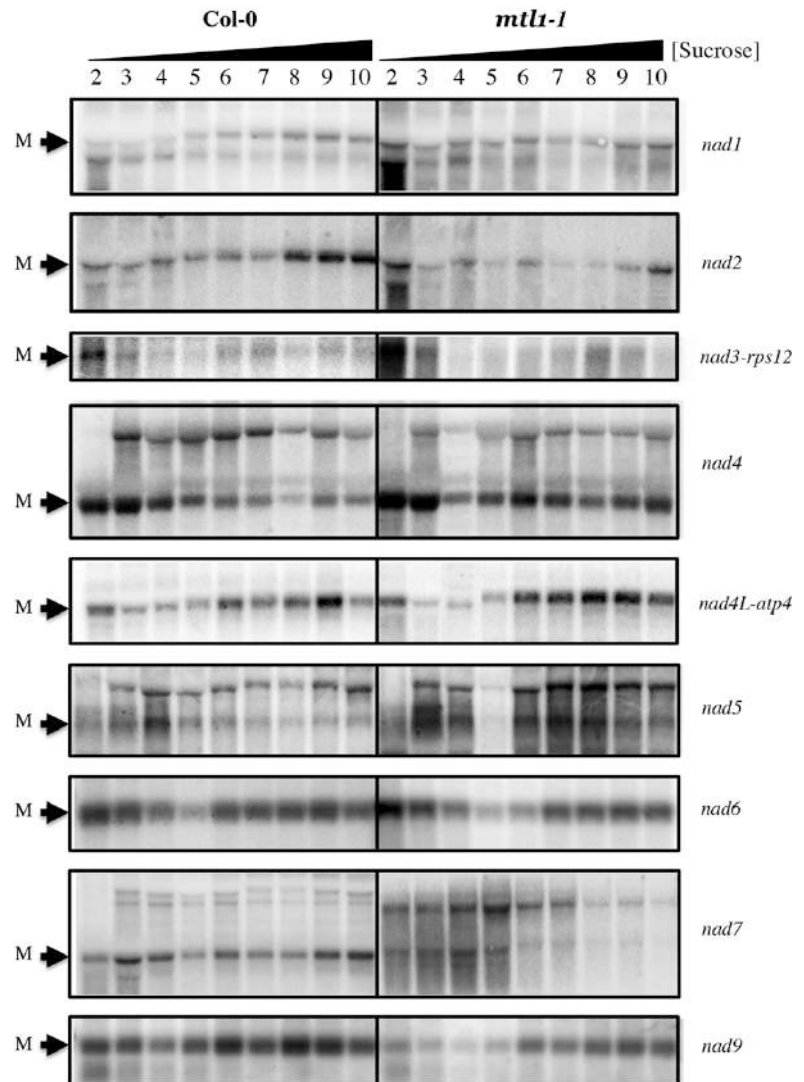
Haili et al.

compared with the wild type and, unlike *mtl1* mutants, very low but still detectable levels of Nad7 (Supplemental Fig. S7D). Therefore, the comparison between *mtl1* and *bir6* mutants supported that the loss of Nad7 in *mtl1* plants was not directly linked to the low levels of *nad7* mature transcript but likely from molecular events involved directly in the production of the Nad7 protein. However, the lack of antibody against the other mitochondria-encoded complex I subunits did not allow us to rule out the possibility that other Nad proteins were also missing in *mtl1* mutants.

Therefore, the translation status of all mitochondria-encoded *nad* transcripts was analyzed by polysome sedimentation analysis in both wild-type and *mtl1-1* plants. Polysomes were isolated from Arabidopsis inflorescences and fractionated on continuous sucrose density gradients. Ten fractions were collected along

the gradients after centrifugation. Polysome integrity was shown by the distribution of ribosomal RNAs along the gradients in the presence of MgCl<sub>2</sub> (Supplemental Fig. S8A). The disruption of polysomes by the addition of EDTA in the gradients indicated that polysomal RNA migrated toward the center and the bottom of the gradients, whereas free mRNAs accumulated in the upper fractions (Supplemental Fig. S8A). RNA was extracted from each fraction and subjected to RNA gel-blot analysis using probes specifically recognizing each mitochondria-encoded complex I transcript (Fig. 5). The hybridized membranes were then exposed to a phosphorimager screen, and the relative distribution of each hybridization signal was determined for each mature mRNA (Supplemental Fig. S9). Most mRNAs were distributed similarly all along the gradients in Col-0 and *mtl1* extracts, indicating that free and

**Figure 5.** The *nad7* mature mRNA does not sediment with mitochondrial polysomes in the *mtl1-1* mutant. Flower bud RNA extracts prepared from Col-0 and *mtl1-1* plants were fractionated in 15% to 55% sucrose density gradients by ultracentrifugation and under conditions maintaining polysome integrity. Nine fractions of equal volume were collected (fractions 2–10, as fraction 1, devoid of RNA, was discarded). Equal aliquots of each fraction were analyzed by RNA gel-blot analysis and hybridized to DNA probes detecting each one of the mitochondria-encoded complex I genes (*nad1*–*nad9*). A representative blot is shown for each mRNA and each genotype. M indicates the band corresponding to the mature transcript size for each gene.





polysome-associated transcripts exist for all complex I transcripts. In contrast, the distribution of *nad7* mRNA was drastically different between *mtl1-1* and wild-type plants. In the former, most of the *nad7* signal was concentrated in the top four fractions, suggesting that no ribosomes are loaded on *nad7* mature transcripts in the absence of a functional copy of *MTL1*. No such difference was found for the other complex I transcripts, supporting a specific role of *MTL1* in the translation of *nad7* mRNA. We could conclude from these results that *nad7* mRNA is not properly translated in the absence of *MTL1* and that, subsequently, Nad7 is indeed not produced in *mtl1* mutants.

To further support the role of *MTL1* in mitochondrial translation, we analyzed the distribution of the *MTL1*-MYC protein fusion on a polysome gradient prepared from *mtl1*-complemented plants (Supplemental Fig. S2A). Total proteins were prepared from the 10 collected fractions, and fractions 2 to 10 were subjected to immunoblot analysis using anti-MYC antibodies. The result indicates that the *MTL1*-MYC fusion is detected all along the gradient and does cosediment with heavy polysome fractions on sucrose density gradients (Supplemental Fig. S8B).

## DISCUSSION

### *MTL1* Is a P-Type PPR Protein Essential for *nad7* Mature mRNA Translation

PPR proteins have been implicated in multiple aspects of organelle gene expression, but very few of them have been specifically associated with the translation of mRNAs. In this study, we convincingly showed that the mitochondria-targeted *MTL1* protein of Arabidopsis is required for the translation initiation of the *nad7* mRNA. To reach this conclusion, we observed that the Nad7 protein did not accumulate in *mtl1* mutants and that this deficiency likely resulted from the lack of synthesis of Nad7, as *nad7* mature mRNA does not cosediment with translating mitochondrial polysomes on sucrose density gradients. We also showed that the absence of Nad7 synthesis does not result from an incorrect processing of *nad7* transcripts, as *nad7* mature mRNAs bear the same 5' and 3' extremities in *mtl1* and wild-type plants. Furthermore, comparison with another Arabidopsis *ppr* mutant (*bir6*; Koprivova et al., 2010) allowed us to show that the lack of Nad7 protein accumulation in *mtl1* plants did not result from an insufficient accumulation of *nad7* mature mRNA. Finally, *MTL1* was found to cosediment with translating polysome fractions on sucrose density gradients. We also observed a significant reduction of *nad9* expression in *mtl1* plants. A role of *MTL1* in *nad9* translation is unlikely, as *nad9* transcripts still cosediment with mitochondrial polysomes in *mtl1-1* plants. It is more likely that the effect observed on *nad9* expression is secondary to the loss of respiratory complex I, as observed in many other complex I-deficient mutants (Gutierrez et al., 1997; Keren et al., 2009; Kühn et al., 2011; Hsu et al., 2014; Hsieh et al., 2015).

Very little is known about the molecular mechanisms governing the expression of mitochondrial genes in plants. Translation is by far the least understood RNA processing step in plant mitochondria. Due to its origin, the mitochondrial translation machinery exhibits certain bacteria-type characteristics (Bonen, 2004). However, in plants, the vast majority of mitochondrial mRNAs lack an SD motif upstream of their translation initiation codon, certainly because the mitochondrial 18S ribosomal RNA does not contain the corresponding anti-SD sequence (Hazle and Bonen, 2007). In bacteria, the ribosomal S1 protein was shown to promote ribosome recruitment for mRNAs bearing leaders devoid of the SD motif (Sørensen et al., 1998). Such a mechanism is unlikely to permit ribosome association to mitochondrial mRNAs in plants, as the S1 counterpart lacks the necessary RNA-binding domain (Hazle and Bonen, 2007). To compensate for the absence of a general ribosome recruitment system on mitochondrial mRNAs in plants, translation initiation likely relies on gene-specific trans-factors to allow for ribosome anchoring and guidance toward the correct AUG start codon. Besides *MTL1*, very few other mitochondrial translation factors were identified in higher plants so far. The first one was the Arabidopsis PENTATRICOPEPTIDE REPEAT PROTEIN336, which copurifies with mitochondrial polysomes but whose action on mitochondrial translation is currently not understood (Uyttewaal et al., 2008b). More recently, the MAIZE PENTATRICOPEPTIDE REPEAT PROTEIN6 (MPPR6) was demonstrated to be essential for the translation of the *ribosomal protein s3* (*rps3*) mitochondrial mRNA (Manavski et al., 2012). However, *mppr6* mutants accumulate 5' extended *rps3* transcripts, suggesting that the primary function of MPPR6 resides in the 5' processing of *rps3* transcripts to yield translatable mature mRNA. Finally, two fertility-restorer PPR proteins were shown to directly or indirectly inhibit the translation of their cognate sterility-inducing mitochondrial gene. This concerns the rice (*Oryza sativa*) RESTORER OF FERTILITY1A (RF1A) protein that upon RNA processing produces a nontranslatable *open reading frame79* transcript and the radish (*Raphanus sativus*) PPR-B protein that is suspected to specifically impede the loading or the progression of mitochondrial ribosomes on the *orf138* mRNA (Kazama et al., 2008; Uyttewaal et al., 2008a).

Several PPR proteins have also been found to participate in plastid translation, and PPR10 is the only one for which the molecular action has been elucidated (Fisk et al., 1999; Schmitz-Linneweber et al., 2005; Cai et al., 2011; Prikryl et al., 2011; Zoschke et al., 2012, 2013). PPR10 function involves binding to the *atpH* 5' mRNA leader to prevent the formation of a stem-loop structure that otherwise would sequester an SD sequence and thereby impede ribosome entry to the *atpH* mRNA (Prikryl et al., 2011). The example of PPR10 indicates that altering the structure of RNA sequences could represent a major action of PPR proteins to disclose RNA segments and allow the action of other

Haïli et al.

RNA processing enzymes, notably the ones enhancing mRNA translation. In the case of MTL1, we showed that the 5' end processing of *nad7* is not perturbed in *mtl1* mutants, indicating that MTL1 primary function is not in *nad7* 5' processing. Thereby, this strongly supports a direct influence of MTL1 on *nad7* mature mRNA translation through a mechanism that still needs to be understood. According to the PPR code (Barkan et al., 2012), a rather good putative binding site (GAATCATCTCTTT) for MTL1 is present 35 nucleotides upstream of the *nad7* AUG. However, we did not observe obvious binding of recombinant MTL1 to this sequence by gel-shift assay. The 5' untranslated region of *nad7* transcript is 375 nucleotides long and, as in most mitochondrial mRNAs, lacks any obvious SD sequence. MTL1 may be necessary to recruit or guide the mitochondrial ribosomes toward the correct start codon of *nad7*. To this end, MTL1 may influence short- or long-range RNA interactions within the *nad7* 5' leader to prevent the formation of a stem-loop structure, as proposed for the plastid PPR10 protein. Alternatively, MTL1 may interact with the mitochondrial ribosomes or may be necessary to recruit other cofactors essential for *nad7* translation. Further molecular investigations of the mode of action of MTL1 are necessary to find which one of these hypotheses is correct.

#### The MTL1 Protein Is Also Essential for Optimal Splicing of *nad7* Intron 2

Our results showed that *mtl1* plants were also affected in the splicing of several mitochondrial group II introns. This concerned introns present in *nad2* and *nad7* pre-mRNAs (Supplemental Fig. S5). The decrease measured for *nad2* intron splicing was very modest and induced no reduction in the accumulation of the corresponding mature transcript (Supplemental Fig. S4). These very mild alterations could simply represent pleiotropic effects of the loss of complex I, as observed in several other complex I mutants (Haïli et al., 2013; Colas des Francs-Small et al., 2014; Hsieh et al., 2015), and do not support a direct role of MTL1 in the splicing of these introns. Oppositely, the 16-fold decrease of *nad7* intron 2 splicing efficiency resulted in a measured 4× reduction in the accumulation level of *nad7* mature mRNA (Fig. 4; Supplemental Fig. S5). This effect is sufficiently significant to support a role of MTL1 in the splicing of this intron. However, the comparison made with the *bir6* mutant clearly showed that the reduction of *nad7* splicing in *mtl1* mutants is insufficient to explain the lack of complex I in these plants. This conclusion is further supported by the recent study of the *slow growth3* (*slo3*) mutant, which displays a similar reduction in *nad7* intron 2 splicing but still accumulates detectable respiratory complex I (Hsieh et al., 2015). A comparison of published Arabidopsis mitochondrial splicing mutants indicates that splicing reductions of at least 500× compared with the wild type seems necessary to result in a nearly complete loss of complex I on

Blue Native gels (Koprivova et al., 2010; Kühn et al., 2011; Cohen et al., 2014; Colas des Francs-Small et al., 2014; Hsieh et al., 2015). The decrease in splicing efficiency can be much milder, though, when several complex I introns are concomitantly affected in a same mutant (Keren et al., 2012; Zmudjak et al., 2013). The manner by which PPR proteins assist group II intron splicing is currently unknown at the molecular level. Mitochondrial, but also plastid, group II introns have lost their ability to self-splice and require the participation of numerous nucleus-encoded general and specific factors to achieve efficient splicing in vivo (Bonen, 2008; Brown et al., 2014). Although poorly conserved at the sequence level, group II introns arrange themselves into a phylogenetically conserved secondary structure comprising six helical domains that radiate from a central hub (Pyle et al., 2007). It has been speculated, based on their activity that is likely limited to a passive binding to RNA, that P-type PPR proteins may facilitate intron splicing by stabilizing the structure of group II introns into their catalytically active forms. Several nucleus-encoded splicing factors were reported previously to assist the removal of *nad7* intron 2, namely the two general splicing factors NUCLEAR-ENCODED MATUREASE2 and MITOCHONDRIAL CHLOROPLAST RNA SPLICING ASSOCIATED FACTOR-like SPLICING FACTOR1 as well as the SLO3 PPR protein, which is specific for this intron (Keren et al., 2009; Zmudjak et al., 2013; Hsieh et al., 2015). It is interesting that none of the corresponding single mutants showed a complete loss of *nad7* intron 2 splicing. This suggests that the loss of one of these factors at a time may be partially compensated by the others and that, in the absence of MTL1, the *nad7* intron 2 conserves a poorly active structure resulting in a suboptimal splicing reaction. In the future, it will be interesting to explore the interfunctionality of these four splicing factors and understand how they may functionally promote the removal of *nad7* intron 2 in Arabidopsis.

#### MTL1 Is One of the First Mitochondrial Bifunctional PPR-P Proteins Identified in Plants

Therefore, our results revealed that the Arabidopsis MTL1 protein carries two independent activities, both of which are required for the proper expression of the *nad7* transcript. It is currently difficult to tell with certainty which of these two functions is the most essential with respect to *nad7* expression. However, as indicated, we obtained good indications supporting that the defect in *nad7* intron 2 splicing is insufficient to explain the lack of complex I in *mtl1* mutants, which would favor the translation as being the most essential role for MTL1. This hypothesis is hard to validate, since we have no way to verify that *nad7* mRNA translation would still not occur if only fully spliced *nad7* transcripts accumulated in *mtl1* plants. Effectively, an increase in the production of mature *nad7* mRNA may

result in a certain degree of translation of *nad7* transcript in the absence of MTL1. It is not uncommon to observe multiple and apparently unrelated effects of *ppr* mutations on RNA metabolism in plant organelles (for review, see Barkan and Small, 2014). Some of these effects can result from secondary consequences of *ppr* mutations, whereas others can be directly imputable to the inactivation of multifunctional PPR proteins. For instance, PPR proteins involved in C-to-U RNA editing are often considered multifunctional in the sense that they frequently edit multiple RNA targets, notably in plant mitochondria (Hammani and Giegé, 2014). PPR proteins supporting completely different RNA processing activities have been found much less frequently, and interestingly, known examples concern PPR proteins having a role in mRNA translation. The plastid PROTON GRADIENT REGULATION3 (PGR3) and PPR10 proteins were shown to be involved in both stabilization and translation of their cognate mRNA targets (Yamazaki et al., 2004; Cai et al., 2011; Prikryl et al., 2011).

The analysis of PPR10 in maize provided a molecular framework to explain how a PPR protein can achieve both of these functions. As already mentioned, PPR10 facilitates the translation of the *atpH* mRNA by uncovering a ribosome-binding site and, concomitantly, through the same binding site stabilizes the *atpH* transcript by blocking the progression of degrading ribonucleases (Prikryl et al., 2011). PPR proteins involved in organelle translation, like CRP1 and MPPR6 or the restorer of fertility RF1A of rice, have also been associated with RNA cleavage events (Fisk et al., 1999; Kazama et al., 2008; Manavski et al., 2012). Others, like PGR3, ATP4, and SUPPRESSOR OF VARIATION7 but also CRP1, are required for the translation of distinct mRNAs (Barkan et al., 1994; Yamazaki et al., 2004; Cai et al., 2011; Zoschke et al., 2012, 2013). Oppositely, PPR proteins engaged in intron splicing are rarely found to be involved in other mRNA processing events, and MTL1 stands as one of the first counterexamples in plants. A precedent was found, though, in plastids with the maize PPR5 protein, which was shown to facilitate intron splicing of *trnG-UCC* pre-mRNA and to concomitantly stabilize the unspliced precursor by masking an RNase-sensitive site (Williams-Carrier et al., 2008). Another example concerns ATPF EDITING FACTOR1/MITOCHONDRIAL PPR25, which is essential for the splicing of *atpF* in plastids but which also promotes RNA editing of *nad5* and *atpF* in mitochondria and plastids, respectively (Yap et al., 2015). The multifunctionality of PPR proteins is facilitated by the fact that this class of RNA-binding proteins show a relaxed recognition specificity to some extent, which allows them to recognize multiple RNA targets sharing limited sequence homology (Barkan et al., 2012). However, the apparent restriction of PPR proteins engaged in splicing to a single function could reflect the necessity for these proteins to fulfill their action with very high specificity, preventing them from having several RNA-binding targets. Therefore, the dual

activity of MTL1 in both *nad7* mRNA translation and splicing represents an interesting new situation for PPR proteins that very likely involves distinct RNA-binding sites. Additional investigations are required to understand how MTL1 can control these two apparently disconnected RNA processing events. Therefore, MTL1 stands as a valuable model to understand the multifunctionality of PPR proteins, and its molecular deciphering will provide new insight into the mechanisms governing mRNA expression in plant mitochondria.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material, Growth Conditions, and Complementation Analysis

The Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 plants were obtained from the Arabidopsis Stock Centre of the Institut National de la Recherche Agronomique in Versailles (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/portail/>). The N539066 (*mtl1-1*), N567427 (*mtl1-2*), and *bir6* (N500310) Arabidopsis T-DNA insertion lines were recovered from the European Arabidopsis Stock Centre (<http://arabidopsis.info/>). Plants homozygous for the insertions were identified by PCR genotyping. *mtl1-1* and *mtl1-2* mutants were genotyped using the *MTL1-3* and *MTL1-5* primers combined with the LBSALK2 primer. Plants were grown on soil under long-day conditions (16 h of light and 8 h of dark). For the complementation test with a MYC-tagged version of MTL1, the complete *MTL1* gene was amplified by PCR from Arabidopsis total DNA using *GWMTL1-1* and *GWMTL1-11* primers, cloned into the pDONR207 vector by Gateway BP reaction (Invitrogen), and subsequently transferred into the pGWB20 expression vector (Nakagawa et al., 2007) by LR reaction (Invitrogen). The resulting vector was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* C58C51 and used for floral dip transformation of *mtl1-1/MTL1* and *mtl1-2/MTL1* heterozygous plants. Transformed plants were selected on hygromycin, and transgenic homozygous mutants were identified by PCR analysis using the *GWMTL1-2* and *MTL1-8* primers to find homozygous mutant plants, the LBSALK2 and *GWMTL1-2* primers to check for the presence of the T-DNA mutations, and the P35SU and *GWMTL1-2* primers to check for the presence of the complementing transgene (*MTL1-MYC*).

### Primers

The primers used in this work are listed in Supplemental Table S1.

### Analyses of Targeting via GFP Fusion

The DNA region encoding the first 109 amino acids of MTL1 was PCR amplified with *GWMTL1-1* and *GWMTL1-6* primers. The AttB1 and AttB2 recombination sites were then completed in a second PCR amplification using the GW5 and GW3 oligonucleotides. The PCR product was cloned into pDONR207 vector using the Gateway BP clonase enzyme mix and sequenced to check PCR accuracy. The obtained entry clone was then transferred into pMDC83 expression vector (Curtis and Grossniklaus, 2003) by Gateway LR reaction to create a translational fusion between the MTL1 targeting sequence and the GFP coding sequence. The resulting vector was transformed into *A. tumefaciens* C58C51 and used for floral dip transformation of Arabidopsis Col-0 plants. Transgenic plants were selected on hygromycin, and GFP fluorescence was visualized in root cells by confocal microscopy. Prior to observation, root cell mitochondria were labeled by soaking the samples for 5 min in a solution containing 0.1  $\mu$ M MitoTracker Red (Molecular Probes).

### Protein Extraction and Immunoblot Analysis

Mitochondria and chloroplasts were isolated from Arabidopsis flower buds and young leaves, respectively, using protocols as described (Uyttewaal et al., 2008a). Total and organelle protein samples were extracted in buffer containing

Haïli et al.

30 mM HEPES/KOH, pH 7.7, 10 mM magnesium acetate, 150 mM potassium acetate, 10% (v/v) glycerol, and 0.5% (w/v) CHAPS and separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins on gels were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Perkin-Elmer) and incubated with specific polyclonal antibodies recognizing Nad9 (diluted 1:100,000; Lamattina et al., 1993), FDH (diluted 1:2,000; Colas des Francs-Small et al., 1992), ATPC (diluted 1:5,000; a gift of Jorg Meurer, Ludwig-Maximilians-Universität), Nad7 (diluted 1:2,000; Pineau et al., 2008), AOX (diluted 1:50; Elthon et al., 1989), and PORIN (diluted 1:10,000; a gift of D. Day, University of Western Australia). Following the hybridization of peroxidase-conjugated secondary antibodies, signals were detected using Western Lightning ECL plus reagents (Perkin-Elmer) and visualized by a LAS4000 chemiluminescence analyzer (Fuji Film). The apparent molecular masses of the proteins were estimated with prestained molecular mass markers (Fermentas). Analysis of the submitochondrial distribution of MTL1 protein was performed as described (Uytewaal et al., 2008a).

### Blue Native-PAGE and Complex I Activity Assay

The equivalent of 500  $\mu\text{g}$  of total mitochondrial proteins was solubilized in buffer containing 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7, 750 mM 6-aminohexanoic acid, 0.5 mM EDTA, and 5  $\text{g g}^{-1}$  mitochondrial protein of digitonin. Samples were electrophoresed in a 4% to 13% (w/v) Nupage Bis/Tris native gel (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Following electrophoresis, the gels were either stained with Coomassie Blue or incubated in a buffer containing 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mM NADH, and 0.2% (w/v) nitroblue tetrazolium to reveal the NADH dehydrogenase activity of complex I. A fixing solution containing 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid was then used to stop the reaction.

### RNA Extraction and Analysis

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Life Technologies) following the manufacturer's recommendations and treated with RNase-free DNase I (RNeasy Mini Kit; Qiagen). For the RT-PCR experiment, approximately 500 ng of total RNA was reverse transcribed using random hexamers (Eurofins) and 400 units of reverse transcriptase (Thermo Scientific) in a final volume of 20  $\mu\text{L}$ . For PCR amplification, 2  $\mu\text{L}$  of a 50-fold dilution of the cDNA solution was used as a template. Amplification of the *MTL1* gene transcript was performed using *GWMTL1-1* and *GWMTL1-6* primers. PCR on the *BIO2* gene transcript was used as a control using the *BIO2-6* and *BIO2-8* primers. Quantitative RT-PCR analyses of mitochondrial transcript abundance and splicing efficiency were performed as in described by Haïli et al. (2013). For northern-blot analysis, 15  $\mu\text{g}$  of RNA was loaded on formaldehyde agarose gels and transferred onto a nylon membrane (Genescreen). RNA integrity, loading, and transfer were verified by staining the membrane with Methylene Blue. Hybridizations with  $^{32}\text{P}$ -radiolabeled gene-specific probes were performed under high-stringency conditions overnight at 65°C in Church buffer (7% [w/v] SDS, 0.25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4, 2 mM EDTA, and 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  heparin). Blots were washed, and hybridized transcripts were detected and analyzed using a phosphor-imager screen (Fla5000; Fuji Film). Primers used to generate gene-specific probes are listed in Supplemental Table S1.

Circular RT-PCR analysis was performed as described by Haïli et al. (2013). Primer pairs used to perform the different circular RT-PCR tests on complex I genes are listed in Supplemental Table S1.

### Polysome Association Analysis

Polysomes were prepared as described previously (Barkan, 1993) except that they were isolated from flower buds and not from leaf tissue. Ten fractions of 900  $\mu\text{L}$  starting from the top of the gradients were collected. RNAs from each fraction were extracted using TRIzol reagent (Life Technologies) following the manufacturer's recommendations, precipitated with ethanol, and resuspended in 30  $\mu\text{L}$  of RNase-free water. Ten microliters of each RNA fraction was fractionated on 1.5% (w/v) formaldehyde agarose gels, transferred onto a nylon membrane (Genescreen), and hybridized with gene-specific probes as described above.

### Gas-Exchange Measurements

Respiratory oxygen consumption was measured as described by Haïli et al. (2013).

### Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

**Supplemental Figure S1.** Phenotypes of *mtl1* mutant plants in comparison with the wild type.

**Supplemental Figure S2.** An MTL1-MYC translational fusion can functionally complement *mtl1* mutants.

**Supplemental Figure S3.** Respiratory activity measurements in wild-type and *mtl1* plants.

**Supplemental Figure S4.** RNA gel-blot analysis determining the steady-state levels of mitochondria-encoded complex I mRNAs in the wild type and *mtl1* mutants.

**Supplemental Figure S5.** Quantitative analysis of intron splicing and mature mRNA accumulation in *mtl1* mutants.

**Supplemental Figure S6.** Circular RT-PCR analysis of mitochondrial complex I genes in the wild type and *mtl1* mutants.

**Supplemental Figure S7.** Comparative analysis of *mtl1* and *bir6* mutants.

**Supplemental Figure S8.** The MTL1 protein cosediments with mitochondrial polysomes on sucrose density gradients.

**Supplemental Figure S9.** Quantitation of polysome sedimentation hybridization results.

**Supplemental Table S1.** DNA primers used in this analysis.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guillaume Tcherkez for technical assistance with respiration measurements and Françoise Budar for critical reading of the article.

Received October 8, 2015; accepted November 3, 2015; published November 4, 2015.

### LITERATURE CITED

- Ban T, Ke J, Chen R, Gu X, Tan MHE, Zhou XE, Kang Y, Melcher K, Zhu JK, Xu HE (2013) Structure of a PLS-class pentatricopeptide repeat protein provides insights into mechanism of RNA recognition. *J Biol Chem* **288**: 31540–31548
- Barkan A (1993) Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *Plant Cell* **5**: 389–402
- Barkan A (2011) Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. *Plant Physiol* **155**: 1520–1532
- Barkan A, Rojas M, Fujii S, Yap A, Chong YS, Bond CS, 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
- Barkan A, Walker M, Nolasco M, Johnson D (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J* **13**: 3170–3181
- Beick S, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Jensen B, Barkan A (2008) The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Mol Cell Biol* **28**: 5337–5347
- Bonen L (2004) Translational machinery in plant organelles. In H Daniell, C Chase, eds, *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 323–345
- Bonen L (2008) Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria. *Mitochondrion* **8**: 26–34
- Bonen L, Calixte S (2006) Comparative analysis of bacterial-origin genes for plant mitochondrial ribosomal proteins. *Mol Biol Evol* **23**: 701–712
- Brown GG, Colas des Francs-Small C, Ostersetzer-Biran O (2014) Group II intron splicing factors in plant mitochondria. *Front Plant Sci* **5**: 35
- Cai W, Okuda K, Peng L, Shikanai T (2011) PROTON GRADIENT REGULATION 3 recognizes multiple targets with limited similarity and mediates translation and RNA stabilization in plastids. *Plant J* **67**: 318–327

- Choi B, Acero MM, Bonen L (2012) Mapping of wheat mitochondrial mRNA termini and comparison with breakpoints in DNA homology among plants. *Plant Mol Biol* 80: 539–552
- Cohen S, Zmudjak M, Colas des Francs-Small C, Malik S, Shaya F, Keren I, Belausov E, Many Y, Brown GG, Small I, et al (2014) nMAT4, a maturase factor required for nad1 pre-mRNA processing and maturation, is essential for holocomplex I biogenesis in Arabidopsis mitochondria. *Plant J* 78: 253–268
- Colas des Francs-Small C, Ambard-Bretteville F, Darpas A, Sallantin M, Huet JC, Pernollet JC, Rémy R (1992) Variation of the polypeptide composition of mitochondria isolated from different potato tissues. *Plant Physiol* 98: 273–278
- Colas des Francs-Small C, Falcon de Longevialle A, Li Y, Lowe E, Tanz SK, Smith C, Bevan MW, Small I (2014) The pentatricopeptide repeat proteins TANG2 and ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING439 are involved in the splicing of the multipartite nad5 transcript encoding a subunit of mitochondrial complex I. *Plant Physiol* 165: 1409–1416
- Coquille S, Filipovska A, Chia T, Rajappa L, Lingford JP, Razif MFM, Thore S, Rackham O (2014) An artificial PPR scaffold for programmable RNA recognition. *Nat Commun* 5: 5729
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133: 462–469
- Elthon TE, Nickels RL, McIntosh L (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol* 89: 1311–1317
- Fisk DG, Walker MB, Barkan A (1999) Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J* 18: 2621–2630
- Gully BS, Shah KR, Lee M, Shearston K, Smith NM, Sadowska A, Blythe AJ, Bernath-Levin K, Stanley WA, Small ID, et al (2015) The design and structural characterization of a synthetic pentatricopeptide repeat protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71: 196–208
- Gutierrez S, Sabar M, Lelandais C, Chetrit P, Diolez P, Degand H, Boutry M, Vedel F, de Kouchkovsky Y, De Paepe R (1997) Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3436–3441
- 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 Res* 41: 6650–6663
- Hammani K, des Francs-Small CC, Takenaka M, Tanz SK, Okuda K, Shikanai T, Brennicke A, Small I (2011) The pentatricopeptide repeat protein OTP87 is essential for RNA editing of nad7 and atp1 transcripts in Arabidopsis mitochondria. *J Biol Chem* 286: 21361–21371
- Hammani K, Giegé P (2014) RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends Plant Sci* 19: 380–389
- Hazle T, Bonen L (2007) Comparative analysis of sequences preceding protein-coding mitochondrial genes in flowering plants. *Mol Biol Evol* 24: 1101–1112
- Howard MJ, Lim WH, Fierke CA, Koutmos M (2012) Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 16149–16154
- Hsieh WY, Liao JC, Chang CY, Harrison T, Boucher C, Hsieh MH (2015) The SLOW GROWTH3 pentatricopeptide repeat protein is required for the splicing of mitochondrial *NADH Dehydrogenase Subunit7* intron 2 in Arabidopsis. *Plant Physiol* 168: 490–501
- Hsu YW, Wang HJ, Hsieh MH, Hsieh HL, Jauh GY (2014) Arabidopsis mTERF15 is required for mitochondrial nad2 intron 3 splicing and functional complex I activity. *PLoS ONE* 9: e112360
- Kazama T, Nakamura T, Watanabe M, Sugita M, Toriyama K (2008) Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant J* 55: 619–628
- Ke J, Chen RZ, Ban T, Zhou XE, Gu X, Tan MHE, Chen C, Kang Y, Brunzelle JS, Zhu JK, et al (2013) Structural basis for RNA recognition by a dimeric PPR-protein complex. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1377–1382
- Keren I, Bezawork-Geleta A, Kolton M, Maayan I, Belausov E, Levy M, Mett A, Gidoni D, Shaya F, Ostersetzer-Biran O (2009) AtnMat2, a nuclear-encoded maturase required for splicing of group-II introns in Arabidopsis mitochondria. *RNA* 15: 2299–2311
- Keren I, Tal L, des Francs-Small CC, Araújo WL, Shevtsov S, Shaya F, Fernie AR, Small I, Ostersetzer-Biran O (2012) nMAT1, a nuclear-encoded maturase involved in the trans-splicing of nad1 intron 1, is essential for mitochondrial complex I assembly and function. *Plant J* 71: 413–426
- Khrouchtchova A, Monde RA, Barkan A (2012) A short PPR protein required for the splicing of specific group II introns in angiosperm chloroplasts. *RNA* 18: 1197–1209
- Koprivova A, des Francs-Small CC, Calder G, Mugford ST, Tanz S, Lee BR, Zechmann B, Small I, Kopriva S (2010) Identification of a pentatricopeptide repeat protein implicated in splicing of intron 1 of mitochondrial nad7 transcripts. *J Biol Chem* 285: 32192–32199
- Kühn K, Carrie C, Giraud E, Wang Y, Meyer EH, Narsai R, des Francs-Small CC, Zhang B, Murcha MW, Whelan J (2011) The RCC1 family protein RUG3 is required for splicing of nad2 and complex I biogenesis in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 67: 1067–1080
- Lamattina L, Gonzalez D, Gualberto J, Grienenberger JM (1993) Higher plant mitochondria encode an homologue of the nuclear-encoded 30-kDa subunit of bovine mitochondrial complex I. *Eur J Biochem* 217: 831–838
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, et al (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089–2103
- Manavski N, Guyon V, Meurer J, Wienand U, Bretschneider R (2012) An essential pentatricopeptide repeat protein facilitates 5' maturation and translation initiation of rps3 mRNA in maize mitochondria. *Plant Cell* 24: 3087–3105
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T (2007) Development of series of Gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104: 34–41
- O'Toole N, Hattori M, Andrés C, Iida K, Lurin C, Schmitz-Linneweber C, Sugita M, Small I (2008) On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* 25: 1120–1128
- Pfalz J, Bayraktar OA, Prikryl J, Barkan A (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J* 28: 2042–2052
- Pineau B, Layoune O, Danon A, De Paepe R (2008) L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *J Biol Chem* 283: 32500–32505
- Prikryl J, Rojas M, Schuster G, Barkan A (2011) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 415–420
- Pyle AM, Fedorova O, Waldsich C (2007) Folding of group II introns: a model system for large, multidomain RNAs? *Trends Biochem Sci* 32: 138–145
- Ringel R, Sologub M, Morozov YI, Litonin D, Cramer P, Temiakov D (2011) Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* 478: 269–273
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A (2005) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 17: 2791–2804
- Small ID, Peeters N (2000) The PPR motif: a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 25: 46–47
- Sørensen MA, Fricke J, Pedersen S (1998) Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* in vivo. *J Mol Biol* 280: 561–569
- Takenaka M, Zehrmann A, Brennicke A, Graichen K (2013) Improved computational target site prediction for pentatricopeptide repeat RNA editing factors. *PLoS ONE* 8: e65343
- Uyttewaal M, Arnal N, Quadrado M, Martin-Canadell A, Vrielynck N, Hiard S, Gherbi H, Bendahmane A, Budar F, Mireau H (2008a) Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility. *Plant Cell* 20: 3331–3345
- Uyttewaal M, Mireau H, Rurek M, Hammani K, Arnal N, Quadrado M, Giegé P (2008b) PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J Mol Biol* 375: 626–636
- Williams-Carrier R, Kroeger T, Barkan A (2008) Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 14: 1930–1941
- 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: e57286
- Yamazaki H, Tasaka M, Shikanai T (2004) PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in Arabidopsis. *Plant J* 38: 152–163

Haïli et al.

- Yap A, Kindgren P, Colas des Francs-Small C, Kazama T, Tanz SK, Toriyama K, Small I (2015) AEF1/MPR25 is implicated in RNA editing of plastid atpF and mitochondrial nad5, and also promotes atpF splicing in Arabidopsis and rice. *Plant J* **81**: 661–669
- Yin P, Li Q, Yan C, Liu Y, Liu J, Yu F, Wang Z, Long J, He J, Wang HW, et al (2013) Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature* **504**: 168–171
- Zhelyazkova P, Hammani K, Rojas M, Voelker R, Vargas-Suárez M, Börner T, Barkan A (2012) Protein-mediated protection as the predominant mechanism for defining processed mRNA termini in land plant chloroplasts. *Nucleic Acids Res* **40**: 3092–3105
- Zmudjak M, Colas des Francs-Small C, Keren I, Shaya F, Belausov E, Small I, Osterseizer-Biran O (2013) mCSF1, a nucleus-encoded CRM protein required for the processing of many mitochondrial introns, is involved in the biogenesis of respiratory complexes I and IV in Arabidopsis. *New Phytol* **199**: 379–394
- Zoschke R, Kroeger T, Belcher S, Schöttler MA, Barkan A, Schmitz-Linneweber C (2012) The pentatricopeptide repeat-SMR protein ATP4 promotes translation of the chloroplast atpB/E mRNA. *Plant J* **72**: 547–558
- Zoschke R, Qu Y, Zubo YO, Börner T, Schmitz-Linneweber C (2013) Mutation of the pentatricopeptide repeat-SMR protein SVR7 impairs accumulation and translation of chloroplast ATP synthase subunits in Arabidopsis thaliana. *J Plant Res* **126**: 403–414

## **6.2. Caractérisation de la protéine PPR MTSF2**

La caractérisation de la protéine MTSF2 a été réalisée conjointement par plusieurs membres de notre équipe ; Chuande Wang, Fabien Aubé et moi-même. J'ai participé à ce projet en réalisant les expériences de RT-PCR sur ARN circularisés, une partie des RT-PCR quantitatives, en produisant et purifiant la protéine MTSF2 recombinante ainsi qu'en faisant une partie des gels-retard.

# The pentatricopeptide repeat protein MTSF2 stabilizes a *nad1* precursor transcript and defines the 3' end of its 5'-half intron

Chuande Wang<sup>1,2,†</sup>, Fabien Aubé<sup>1,†</sup>, Noelya Planchard<sup>1,2,†</sup>, Martine Quadrado<sup>1</sup>, Céline Dargel-Graffin<sup>1</sup>, Fabien Nogué<sup>1</sup> and Hakim Mireau<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, RD10, 78026 Versailles Cedex, France and <sup>2</sup>Paris-Sud University, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

Received January 11, 2017; Revised February 22, 2017; Editorial Decision February 24, 2017; Accepted February 28, 2017

## ABSTRACT

RNA expression in plant mitochondria implies a large number of post-transcriptional events in which transcript processing and stabilization are essential. In this study, we analyzed the function of the Arabidopsis mitochondrial stability factor 2 gene (*MTSF2*) and show that the encoded pentatricopeptide repeat protein is essential for the accumulation of stable *nad1* mRNA. The production of mature *nad1* requires the assembly of three independent RNA precursors via two trans-splicing reactions. Genetic analyses revealed that the lack of *nad1* in *mtsf2* mutants results from the specific destabilization of the *nad1* exons 2–3 precursor transcript. We further demonstrated that MTSF2 binds to its 3' extremity with high affinity, suggesting a protective action by blocking exoribonuclease progression. By defining the 3' end of *nad1* exons 2–3 precursor, MTSF2 concomitantly determines the 3' extremity of the first half of the trans-intron found at the end of the transcript. Therefore, binding of the MTSF2 protein to *nad1* exons 2–3 precursor evolved both to stabilize the transcript and to define a 3' extremity compatible with the trans-splicing reaction needed to reconstitute mature *nad1*. We thus reveal that the range of transcripts stabilized by association with protective protein on their 3' end concerns also mitochondrial precursor transcripts.

## INTRODUCTION

Mitochondria are essential organelles that are the site of cellular respiration, and a variety of other important biochemical processes such as heme biosynthesis, part of the urea cycle and Fe–S cluster formation. They descent from

ancient bacteria and contain their own genome that is separate from the nuclear chromatin (1,2). Modern mitochondria encode around 50 genes in most eukaryotes. Despite this conserved and limited coding capacity, the structure of mitochondrial genomes is highly variable among organisms, going from very small and compact genomes in animals to huge and likely multi-circular structures in higher plants (3). The size increase of plant mitochondrial genomes results mostly from the presence of extended intergenic regions that are rich in repeated sequences (4,5). The high recombinogenic activity of plant mitochondrial DNA results in genomic organizations involving complex arrays of inter-convertible linear and circular DNA molecules. Subsequently, mitochondrial gene order is poorly conserved among plant species and examples of gene fragmentations are frequent (5–10). In response, complex RNA expression processes involving a considerable number of post-transcriptional events have evolved to maintain proper expression of mitochondrial genes and generate mature mRNAs. These steps include over 400 C-to-U RNA editing events, cis and trans-intron splicing, 5' and 3' RNA processing as well as mRNA stabilization. The underlying mechanisms are still poorly understood at the molecular level and the vast majority of the involved protein factors have not been identified. However, in the last years, the pentatricopeptide repeat (PPR) protein family has shown to figure prominently in these processes (11,12). Nuclear genomes of higher plant encode over 450 PPR genes, and the vast majority encode proteins that are predicted to target mitochondria or chloroplasts (11,13). PPR proteins are almost exclusively composed of tandem repeats of a highly degenerate 35-amino-acid motifs (14). Length variants of PPR repeats have been detected however, with repeats that are longer (L) or shorter (S) than the initially-recognized 35-amino-acid (P) motif (11,15). PLS PPR proteins, which contain ordered series of P, L and S motifs, have been almost exclusively associated with RNA editing in both mitochon-

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 130 833 070; Fax: +33 130 833 319; Email: hakim.mireau@inra.fr

†These authors contributed equally to the paper as first authors.

Present address: Fabien Aubé, Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule, Ecole Normale Supérieure 69007 Lyon, France.

© The Author(s) 2017. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com



dria and chloroplasts (16,17). In contrast, PPR proteins exclusively composed of P-type repeats were shown to participate in various aspects of organellar RNA expression ranging from gene transcription to mRNA translation (for review see (12,18)). Recent crystal structures of PPR proteins showed that PPR repeats fold into a hairpin formed by two antiparallel alpha helices whose repetition assemble into a right-handed superhelical spiral (19–23). Indeed, PPR domains organize highly specific RNA binding interfaces and PPR–RNA co-crystallization studies revealed that the solenoid like structure formed by the succession of PPR repeats wraps around single-stranded RNA (24,25). Evolutionary, biochemical and structural data support that combinations involving amino acid 5 and 35 in each repeat are critical for RNA recognition and form contacts with the RNA base to be bound (15,26–30).

The production of translation-competent mRNAs implies the correct processing of 5' and 3' extremities as well as the stabilization of mature transcripts. The definition of mRNA ends appears to be particularly essential in plant mitochondria where genes are transcribed from multiple promoters and transcription termination is not tightly controlled (31–33). A global analysis of mitochondrial mRNA ends in *Arabidopsis thaliana* revealed that most protein-coding transcripts exhibit multiple 5' extremities whereas their 3' end is generally very well defined and unique (34). Moreover, the relative abundance of individual 5' ends identified for some transcripts can differ among *Arabidopsis* natural accessions (35,36). Further analyses have revealed that most plant mitochondrial mRNA extremities are generated post-transcriptionally. Several P-type PPR proteins—most of them belonging to the restorer of fertility-like subfamily—have been found to be involved in 5' end formation of mitochondrial transcripts in *Arabidopsis* (37–43). However, the functional significance of 5' formation for most mitochondrial mRNAs remains unclear as transcripts with incorrect 5' ends (accumulating in *ppr* mutants) remain stable and correctly translated in most cases, and have no impact on plant development. Most of these 5'-processing PPR proteins are predicted to bind near the cleavage site they condition and the detection of upstream cleavage products support the recruitment of an endoribonuclease to trigger the RNA clipping. The associated RNase activities have long remained mysterious but recently, two mitochondria-targeted nucleases of the Nedd4-BP1, YacP Nuclease (NYN) family were shown to be involved in transcript 5' end formation in plant mitochondria (44). Much less is known on the formation of mRNA 3' ends in plant mitochondria. A single factor involved in the 3' end processing of the *nad4* mitochondrial transcript has been identified so far (45). This factor, called mitochondrial stability factor 1 (MTSF1), encodes a PPR protein whose binding site coincides with the 3' end of *nad4* mRNAs. The strong destabilization of *nad4* transcript in *mtsf1* mutants revealed a tight connection between 3' end formation and mRNA stabilization in plant mitochondria. The associated mechanism supposes an early association of MTSF1 with the 3' region of precursor *nad4* mRNA and that 3'-to-5' exoribonucleases like PNP1 or RNRI degrade unnecessary 3' sequence extension until their progression is stopped by the presence of MTSF1. This protein-mediated protection

process was initially described to occur in plastids and was shown to apply for both 5' and 3' end formation in this organelle, whereas it seems limited to 3' processing in mitochondria (46–48).

Still, much remains to be understood regarding RNA processing and stabilization in plant mitochondria. In particular, the type and number of mitochondrial transcripts that are processed and stabilized by helical repeat proteins like PPR sitting on their 3' end awaits clarification. In this study, we analyzed the function of the mitochondria stability factor 2 (MTSF2) protein in *Arabidopsis* and demonstrated that this mitochondria-targeted PPR protein is required for the 3' processing and stabilization of the *nad1* exons 2–3 precursor transcript. This pre-mRNA is one of the three *nad1* precursor transcripts that are unified by two trans-splicing reactions to create the mature *nad1* mitochondrial mRNA. Our analysis reveals that the protein-based mechanism permitting the stabilization and the 3' end processing is not limited to mature mitochondrial mRNA but concerns also precursor transcripts that are substrates of trans-splicing reactions.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

The N654650 (*mtsf2-1*) *Arabidopsis* mutant line was obtained from the European *Arabidopsis* Stock Centre (<http://arabidopsis.info>). *mtsf2-1* mutant plants were genotyped with the MTSF2-3 and the MTSF2-5 primers combined with the LB-SALK2 primer.

The *mtsf2-2* mutant was generated using the CRISPR-CAS9 technology. The guide sequence 5'-GTAGGTAGAAAGCTGATTGA-3' specific to *MTSF2* and inducing a cleavage 684 nucleotides downstream of the ATG codon was chosen using the CRISPOR program on the Tefor web site (<http://crispor.tefor.net/>). A synthetic gRNA (sgRNA) expression cassette flanked by *attB* recombination sites and comprising the promoter of the *Arabidopsis* U6-26 snRNA (49), the 5'-G-N(19)-3' guide sequence targeting the *MTSF2* gene, the tracrRNA scaffold (50) was designed. The sgRNA cassette was chemically synthesized (Integrated DNA Technologies), subcloned into pDONR207 by Gateway™ BP reaction (Invitrogen) and subsequently combined with a CAS9 expression cassette by Gateway™ LR reaction (Invitrogen) into pDe-Cas9 binary vector (51). Col-0 plants were transformed and transgenic plants were selected on Basta (6 mg/l).

### RNA extraction and analysis

Depending on the amount needed, total RNAs were isolated from flower buds using either TRIzol reagent (Life Technologies) or the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations and treated with Room Temperature Stable (RTS) DNase only when RNA were prepared for quantitative (Q)-RT PCR (Mobio). RNA gel blot analyses were performed as indicated in (52). Gene-specific probes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers indicated in Supplementary Table S1 and radiolabeled with the Prime A Gene labeling

kit (Promega) following the recommendations of the manufacturer. Quantitative RT-PCR was performed as previously explained in (52), using the same set of primers.

### Primers

The DNA oligonucleotides used in this work are listed in Supplementary Table S1.

### Circular RT-PCR

Five microgram of total RNA were circularized with 40 U of T4 RNA ligase (New England Biolabs), following the manufacturer's instructions. Circularized RNA were phenol extracted and precipitated in one volume of isopropanol, for 2h at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Circularized RNA were resuspended in 14.5  $\mu\text{l}$  of water and first strand complementary DNA (cDNA) synthesis was done for 3 h at  $40^{\circ}\text{C}$  using 400 U of M-MLV reverse transcriptase (Fermentas), 8 mM of random hexamers (Eurofins), 1X M-MLV buffer, 0.5 mM dNTPs and 40 U of Riboblock RNase inhibitor (Fermentas). The obtained cDNA were diluted four times, and 5  $\mu\text{l}$  of the obtained cDNA solution were used for PCR amplification with divergent primers. The primers used for mapping *nad1* exon 1, exons 2–3 and exons 4–5 precursor transcripts are listed in Supplementary Table S1. Amplified PCR products were gel purified, cloned into pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> TA vector (ThermoFisher Scientific) and inserts of independent recombinant plasmids were sequenced after *Escherichia coli* transformation.

### Blue native gel and respiratory complex in-gel activity assay

Crude organelle extracts enriched in mitochondria were prepared as previously described (53) using young Arabidopsis seedlings grown *in vitro* for 10 days. Succinctly, 400 mg of Arabidopsis plantlets were ground in 4 ml of extraction buffer (75 mM MOPS-KOH pH 7.6, 0.6 M Sucrose, 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.2% [w/v] polyvinylpyrrolidone 40, 8 mM Cys and 0.2% [w/v] bovine serum albumin (BSA)). The lysate was filtered through one layer of Miracloth and centrifuged for 4 min at 1300 g, and the resulting supernatant was centrifuged again for 20 min at 25 000 g. Organelle containing pellets were resuspended in 400  $\mu\text{l}$  of 10 mM MOPS-KOH pH 7.2, and 0.3 M Sucrose, completed with three volumes of water (1.2 ml) and then centrifuged to 25 000 g for 20 min. The pellets were finally resuspended in 200  $\mu\text{l}$  of resuspension buffer (50 mM BisTris/HCl pH 7, 0.5 M 6-aminohexanoic acid, 1 mM EDTA and 0.3 M Sucrose) before subsequent analysis. Organelle suspensions were then complemented with 1% of n-dodecyl  $\beta$ -D-maltoside (DDM), incubated on ice for 30 min and centrifuged for 10 min at 100 000 g. The resulting supernatant was supplemented with a third volume of 5% (w/v) Coomassie Blue G-250 prepared in 20 mM BisTris/HCl pH 7, and 0.5 M 6-aminohexanoic acid. Subsequently, one-third of the sample volume was completed with 4 $\times$  loading buffer (200 mM BisTris, 64 mM HCl, 200 mM NaCl, 0.004% [w/v] Ponceau S and 40% [v/v] glycerol). Twenty microliter of protein samples per lane were loaded on a precast 3–12% (w/v) polyacrylamide NativePAGE<sup>™</sup>

Bis/Tris gel (Invitrogen). Gels were run at 80 V overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  and then for an additional 2 h at 200 V the next day following manufacturer's instructions.

Following electrophoresis, BN-PAGE gels were either transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (see below), or stained to reveal respiratory complexes. Complex I activity was revealed by incubating the gel in the presence of 0.2% nitroblue tetrazolium, 0.2 mM of NADH and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4). For complex IV, the gel was incubated in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4), 1 mg/ml reduced cytochrome c and 0.1% 3,3'-diaminobenzidine. When colorations were sufficient, gels were transferred to a fixing solution containing 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid to stop the reactions.

### Immunoblot analysis

Denaturing protein gels were electro-transferred to PVDF membrane under semidry conditions in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Gly, 20% [v/v] methanol and 0.025% [w/v] sodium dodecyl sulphate (SDS)) at 15 mA for 30 min. BN-PAGE gels were transferred under liquid conditions in 50 mM Bis/Tris and 50 mM Tricine at 20 V overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Membranes were incubated with antibodies specific to RISP (diluted 1:5000; 54), COX2 (diluted 1:2000; Agrisera), NAD9 (1:100 000; 55), alternative oxidase (AOX) (diluted 1:50; a gift of David Day, University of Western Australia) or ATP $\beta$  (diluted 1:5000; Agrisera). Detection was carried out using peroxidase-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence reagents (Western Lightning Plus ECL, Perkin Elmer). For SDS gels, the apparent molecular masses of the proteins were estimated with PAGERuler prestained protein ladder (Fermentas).

### Production of recombinant MTSF2 and gel shift assays

The *MTSF2* coding sequence deprived of the upstream region encoding the mitochondrial presequence was PCR amplified using the GWMTSF2-5 and GWMTSF2-3 primers (Supplementary Table S1). The obtained PCR product was subcloned into pDONR207 by Gateway<sup>™</sup> BP reaction (Invitrogen) and subsequently transferred into pMAL-TEV (homemade) by Gateway<sup>™</sup> LR reaction (Invitrogen). The resulting MBP-MTSF2 protein fusion was expressed in Rosetta<sup>™</sup> (DE3) *E. coli* strain for 3h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Bacterial pellets were lysed in 50 mM HEPES-KOH (pH7.8), 150 mM NaCl, 1% glycerol, 0.01% CHAPS and 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol using the One Shot cell disruption system (Constant Systems). After centrifugation at 20 000 g for 15 min, the MBP-MTSF2 fusion was purified from the supernatant on amylose resin (Brand) following manufacturer's recommendations. Protein purity was verified on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) before proceeding to gel shift experiment.

DNA fragments spanning the 3' end of *nad1* exons 2–3 pre-mRNA were PCR amplified using primers indicated in Supplementary Table S1. Radiolabeled RNA probes were generated by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase (Promega) in the presence of 30  $\mu\text{Ci}$  of [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]UTP according to manufacturer's instructions. Probes were gel purified on 5% polyacrylamide gel, precipitated and quantified on a NanoDrop apparatus (Thermo Scientific). Gel

shift reactions were performed in 50 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA, 4 mM DTT, 10% glycerol, 2 mg/ml heparin, 10 U Riboblock (Fermentas), containing 100 pM radiolabeled RNA and protein concentrations indicated in figure legends. Reactions were carried out for 30 min at 25°C, and run on 5% polyacrylamide gel at 150 volts in 1 × THE (66 mM HEPES, 34 mM Tris (pH 7.7), 0.1 mM EDTA). The gels were then dried and exposed to a phosphorimager screen (FLA-9500 Fujifilm).

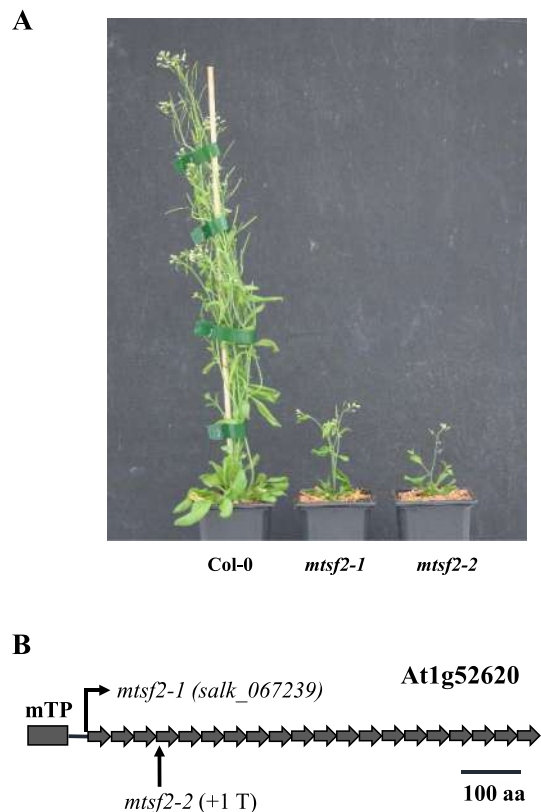
#### Prediction of MTSF2 RNA binding site

A putative RNA binding motif for MTSF2 was generated by using the combinations of amino acids at positions 5 and 35 of each PPR repeat (which were predicted with TPRpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>)) and weighting A/U/G/C nucleotides for each combination according to Barkan *et al.*, (27). To predict the best potential binding sites for MTSF2, we used the FIMO program (<http://meme-suite.org/tools/fimo>), which searches motifs within sequence databases and ranks them by *P*-values (56). The RNA binding motif obtained for MTSF2 was then used to search the entire Col-0 mitochondrial genome (JF729201.1) and its fully edited version (homemade) with FIMO and get a list of potential binding sites ranked by *P*-values.

## RESULTS

### Arabidopsis *mtsf2* display a globally retarded growth phenotype

In a global effort to better understand gene expression in higher plant mitochondria, we assembled a large collection of Arabidopsis mutants bearing transfer DNA (T-DNA) insertion in nuclear genes encoding mitochondrially targeted P-type PPR proteins. Its characterization revealed that the *mtsf2* mutant line for which homozygous mutants displayed a global retarded growth phenotype compared to wild-type plants (Figure 1A). The PPR gene affected in this line corresponded to the AT1G52620 gene and encoded a 92-kDa protein comprising 20 canonical P-type PPR repeats according to TPRpred predictions (Figure 1B; <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>). Reverse transcription (RT)-PCR analysis indicated that no detectable full-length mRNA derived from the AT1G52620 gene accumulated in the mutant, strongly suggesting that it corresponded to a null mutant (Supplementary Figure S1). To confirm that the observed phenotype was effectively associated with inactivation of the AT1G52620 gene and since no other T-DNA insertion within the coding sequence could be identified in public mutant collections, we decided to create a second mutant line using the CRISPR-Cas9 technology. A guide RNA mediating DNA cleavage at position 684 downstream of the ATG codon of AT1G52620 and with very unlikely off-target effects was chosen using the CRISPOR on-line tool (<http://crispor.tefor.net/>). The guide RNA coding sequence was cloned downstream of the Arabidopsis U6 promoter and inserted into the pDe-Cas9 binary vector (51). Nine independent Arabidopsis transformants were obtained and 200 plants derived from five independent progenies were phenotyped. Out of these 1000 plants, 164 plants displayed developmental alterations that were strictly identical to the



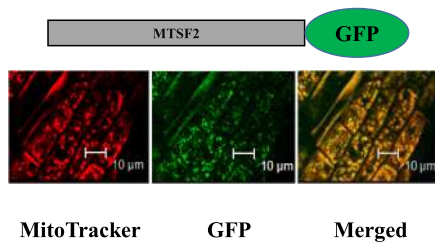
**Figure 1.** The Arabidopsis *mtsf2* mutants are strongly delayed in their development. (A) Eight-week-old plants showing the global vegetative phenotype of *mtsf2* mutants compared to the wild-type (Col-0). *mtsf2* mutant plants exhibit strongly reduced size and bear twisted and dark green rosette leaves. They are fertile but their siliques are shorter compared to Col-0. (B) Schematic representation of the MTSF2 protein depicting the 20 predicted PPR repeats and the positions of *mtsf2-1* (T-DNA insertion) and *mtsf2-2* (+1T at position 685) mutations. mTP: mitochondrial transit peptide.

*mtsf2-1* mutant line. A DNA fragment of AT1G52620 covering the guide RNA cleavage site was amplified by PCR from 20 of these plants and sequenced. Sequence analysis revealed that most mutant plants contained a single T insertion right after the induced DNA cleavage site. The associated frameshift created an in-frame TGA stop codon immediately downstream of the T insertion. This second mutant allele was named *mtsf2-2* and was chosen for further phenotypical and molecular characterization (Figure 1A and B).

*mtsf2* mutant plants exhibited large developmental differences compared with Col-0 reference plants. In particular, both mutant lines grew much slower than the wild-type and reached about half the size of Col-0 plants when cultured on soil in the greenhouse for 3 months (Figure 1A). Additionally, *mtsf2* plants showed deformed and dark green rosette leaves and were late flowering but remained fertile (Figure 1A).

The Arabidopsis subcellular database SUBA (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>) strongly supported the mi-





**Figure 2.** The *MTSF2* gene encodes a mitochondria-targeted PPR protein. Confocal microscope images analyzing the subcellular distribution of an MTSF2:GFP translational fusion in root cells of young Arabidopsis transgenic plants. Prior to observation, roots were soaked in a solution of Mitotracker Red to label mitochondria. The left panel shows the red fluorescence of mitochondria revealed by the Mitotracker Red. The center panel presents the green fluorescence of the GFP. Merged signals are shown in the right panel.

tochondrial localization of the MTSF2 protein. To verify the cellular distribution of MTSF2, a GFP translational fusion comprising the complete coding sequence of MTSF2 was generated and expressed in transgenic Arabidopsis plants. Root cells of transformed plants were analyzed by confocal microscopy and the GFP fluorescence distribution appeared to concentrate in small cell bodies throughout the cytosol. The use of Mitotracker Red as control on the same samples indicated that these signals corresponded effectively to mitochondria (Figure 2). This analysis confirmed that MTSF2 was effectively targeted to Arabidopsis mitochondria.

#### *mtsf2* mutants do not accumulate detectable respiratory complex I

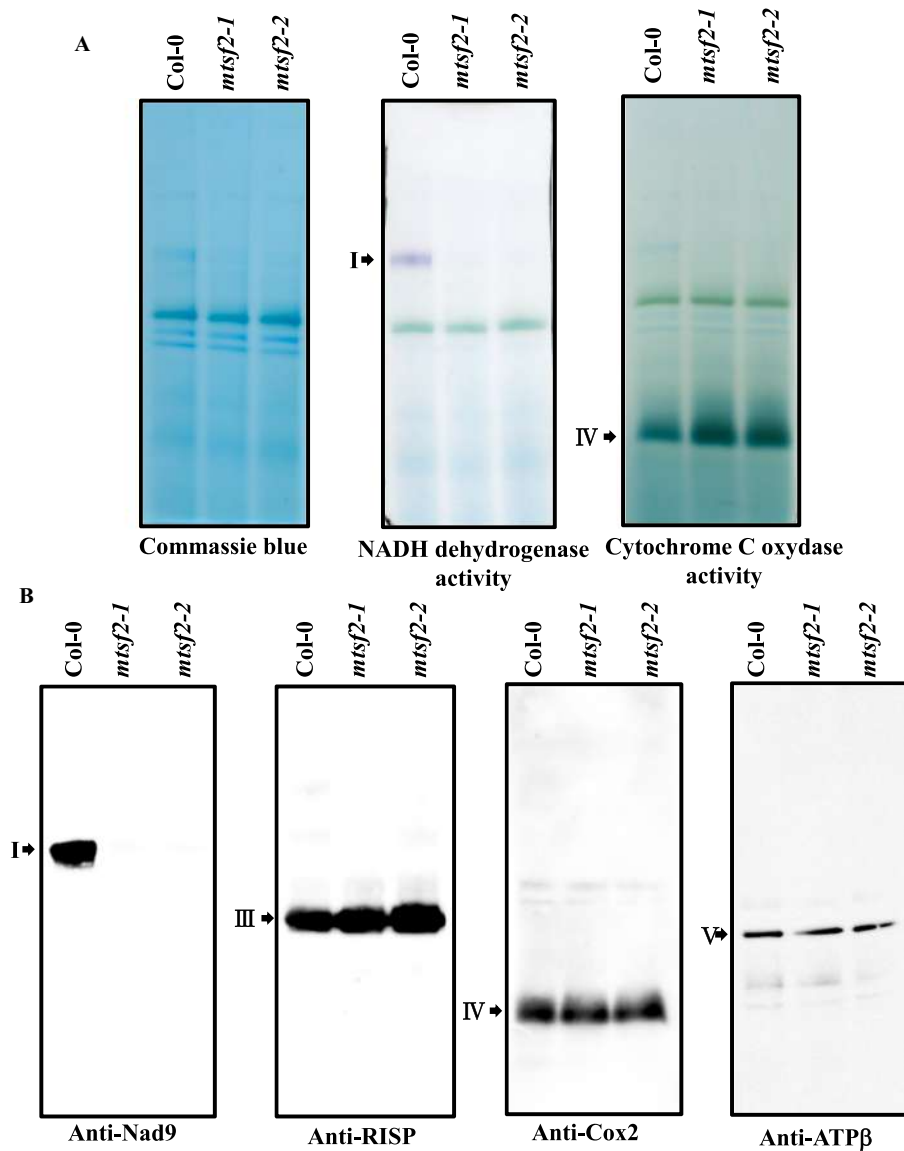
The confirmation of the mitochondrial localization of MTSF2 prompted us to consider that the developmental alterations observed in *mtsf2* mutants could result from a respiratory dysfunction in these plants. To identify the cause of this potential respiratory deficiency, we examined the steady-state levels of the different respiratory chain complexes on blue-native gels. Mitochondria-enriched pellets were prepared from both wild-type and mutant plants and solubilized in 1% DDM. Following migration, the abundance of respiratory complexes was either visualized by in-gel activity staining or by western blot analysis with appropriate antibodies. This allowed us to observe that most respiratory complexes accumulated to normal levels in both *mtsf2* mutants compared to the wild-type (Figure 3A and B). The only exception concerned complex I, which could not be detected in *mtsf2* extracts at all (Figure 3A and B). To further analyze the respiratory activity in *mtsf2* plants, we assessed the induction of the alternative respiratory pathways in the mutants by measuring the expression levels of alternative NADH dehydrogenases (NDA and NDB) and AOX genes. Quantitative RT-PCR analysis revealed the overexpression of several components of alternative respiratory pathways notably the *AOX1A*, *AOX1D*, *NDA1* and *NDB4* genes (Supplementary Figure S2A). The two *AOX* transcripts accumulated respectively four and eight times more compared to the wild-type. The NADH dehydroge-

nase genes over-accumulated respectively 2 and 64 times more than in wild-type plants. The overexpression of AOX was further visualized by probing total mitochondrial protein extracts with an antibody to AOX (Supplementary Figure S2B), confirming the strong engagement of the alternative respiratory pathways in *mtsf2* plants.

Altogether, these observations allowed us to conclude that *mtsf2* mutants represent complex I deficient plants. The developmental abnormalities of *mtsf2* plants (notably their slow growth, curly leaves and late flowering phenotype) are in complete agreement with this kind of respiratory alteration since they are typical of complex I mutants as previously observed either by us (6,45,52) or by other groups (see for instance (57–59)).

#### The stability of the *nad1* exons 2–3 precursor is compromised in *mtsf2* mutants

The role of PPR proteins in the processing of organellar RNA led us to hypothesize that the processing of one or several mitochondrial mRNAs encoding complex I subunit was defective in *mtsf2* mutants. In a first approach, the steady state levels of all mitochondria-encoded protein-coding mRNAs were measured by quantitative RT-PCR in *mtsf2* and wild-type plants. This approach revealed a major difference for the *nad1* transcript whose mature form was found to accumulate 500 times less in *mtsf2* mutants compared to the wild-type (Figure 4). This reduction was observed across the entire *nad1* transcript (for all exons), which strongly suggested a global destabilization of *nad1* mRNA in *mtsf2* plants. A slight decrease of *nad2* mature mRNA abundance was also detected, but this only concerned the upstream mRNA region encompassing the first two *nad2* exons. All other mitochondria encoded mRNAs accumulated to almost normal levels compared to the wild-type. In Arabidopsis, the mature form of *nad1* results from the fusion of three distinct pre-mRNA molecules named *nad1* exon 1, *nad1* exons 2–3 and *nad1* exons 4–5 that are reunified by two trans-splicing reactions (Figure 5A). To better understand the cause of *nad1* destabilization in *mtsf2* plants, the steady levels of these three precursors were measured by quantitative RT-PCR. Interestingly, whereas the steady state levels of *nad1* exon 1 and *nad1* exons 4–5 pre-mRNAs were increased, *nad1* exons 2–3 transcript abundance showed a significant reduction in *mtsf2* plants compared to the wild-type (Figure 5B). These observations were corroborated by RNA gel blot analysis, which confirmed the absence of detectable mature *nad1* mRNA and *nad1* exons 2–3 precursor forms in the two mutant lines (Figure 6A). A probe specific to the first portion of *nad1* intron 3 detected two *nad1* exons 2–3 transcripts in Col-0, which were both missing in the *mtsf2* mutants. The slight over-accumulation of *nad1* exon 1 and *nad1* exons 4–5 transcripts detected by quantitative RT-PCR was also visible in this second approach. The reduction of mature *nad2* mRNA abundance was noticeable in *mtsf2* plants, as well as the concomitant over-accumulation of unspliced precursor forms (Figure 6B). Quantitative RT-PCR further indicated that splicing of *nad2* intron 1 and 2 were significantly diminished in *mtsf2* mutants (Supplementary Figure S3).



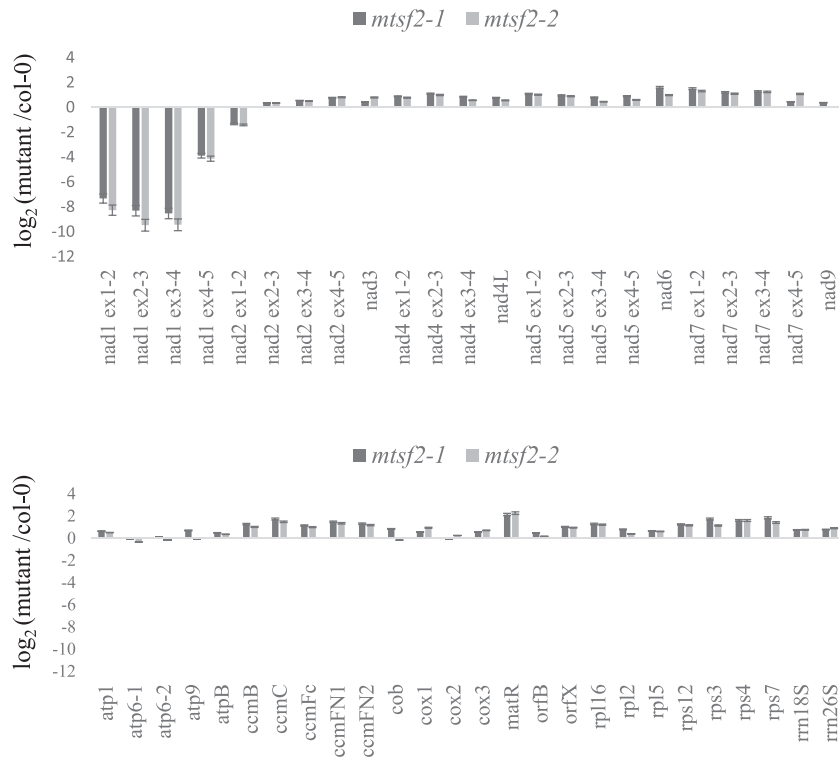
**Figure 3.** Arabidopsis *mts2* lack detectable respiratory complex I. (A) Crude mitochondrial extracts prepared from wild-type and *mts2* plants, separated on BN-PAGE gels and stained with Coomassie blue. In-gel staining revealing the NADH dehydrogenase activity of complex I and cytochrome c oxidase activity of complex IV are also presented. (B) Following migration, BN-PAGE gels were transferred to membranes and blots were hybridized with antibodies to mitochondrial NAD9, RISP, COX2 and ATPβ. The different respiratory complexes are designated by their roman numeral.

Overall, these results strongly suggested a global instability of *nad1* mRNA in *mts2* mutants that likely resulted from a specific destabilization of *nad1* exons 2–3 precursor transcript. The moderate increase (4–16 times) of *nad1* exon 1 and *nad1* exons 4–5 pre-mRNA abundance were likely consecutive to this absence since the two trans-splicing reactions involving *nad1* introns 1 and 3 cannot occur in the absence of *nad1* exons 2–3 precursor. Additionally, a partial

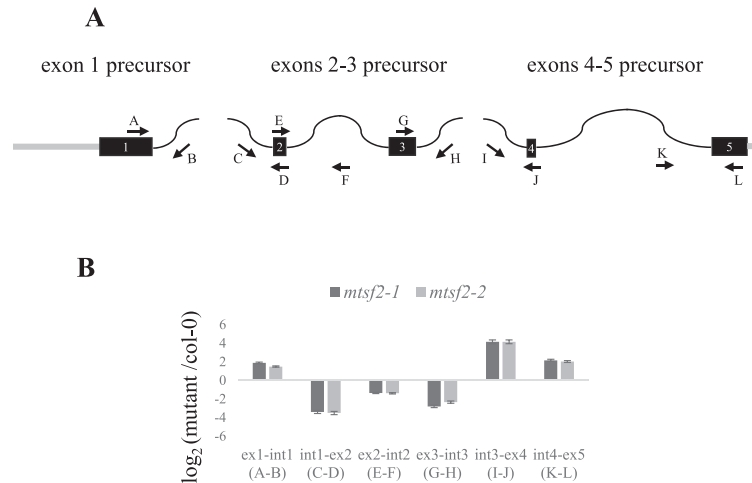
effect of *mts2* inactivation on *nad2* intron 1 and 2 splicing was also detected from these analyses.

#### The MTSF2 binding site lies in the 3' region of *nad1* exons 2–3 transcript

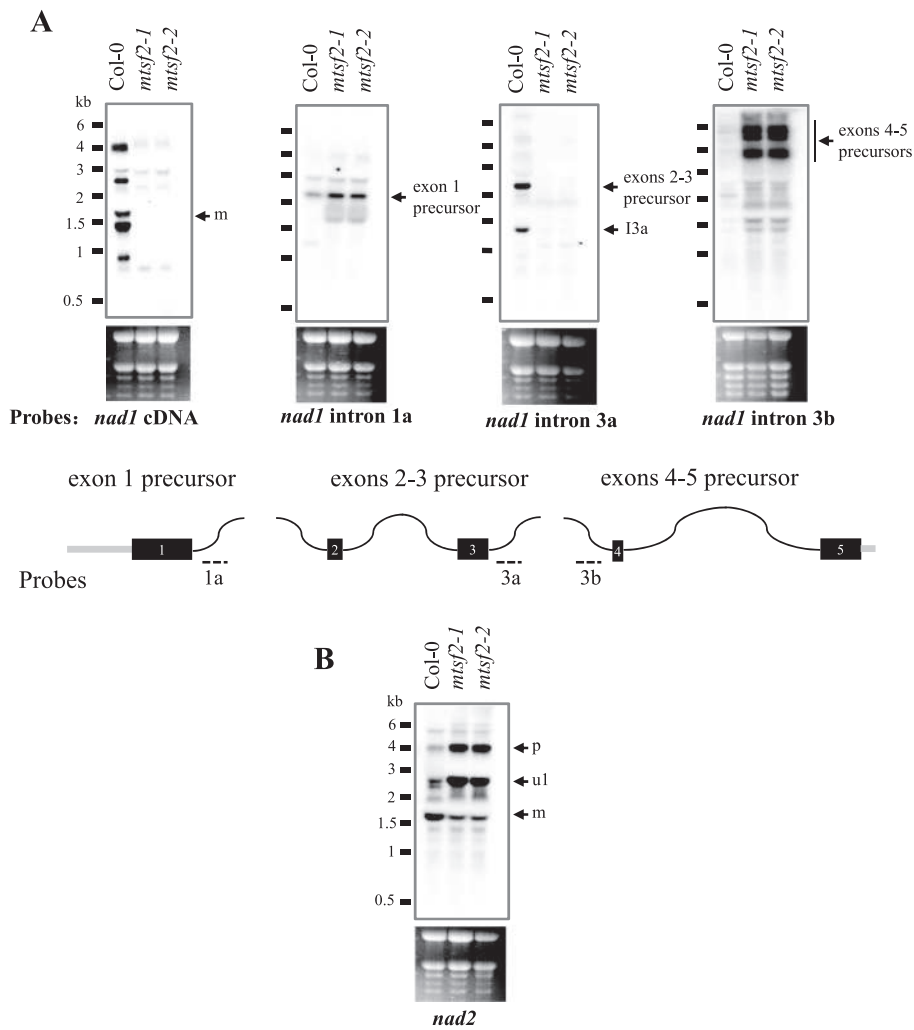
To better understand the role of MTSF2 in the stabilization of *nad1* exons 2–3 pre-mRNA, we took advantage of recent progress on the recognition of RNA by PPR proteins to pre-



**Figure 4.** Mature *nadl* mRNA strongly under-accumulate in *mts2* mutants. Quantitative RT-PCR measuring the steady state levels of mature mitochondrial mRNAs in Col-0 and *mts2* plants. The histograms show log<sub>2</sub> ratios of mutants to wild-type. A single PCR was considered for mRNAs carrying no introns, whereas the accumulation of individual exons was analyzed for intron-containing transcripts. Three biological replicates and three technical replicates were used per genotype; standard errors are indicated.



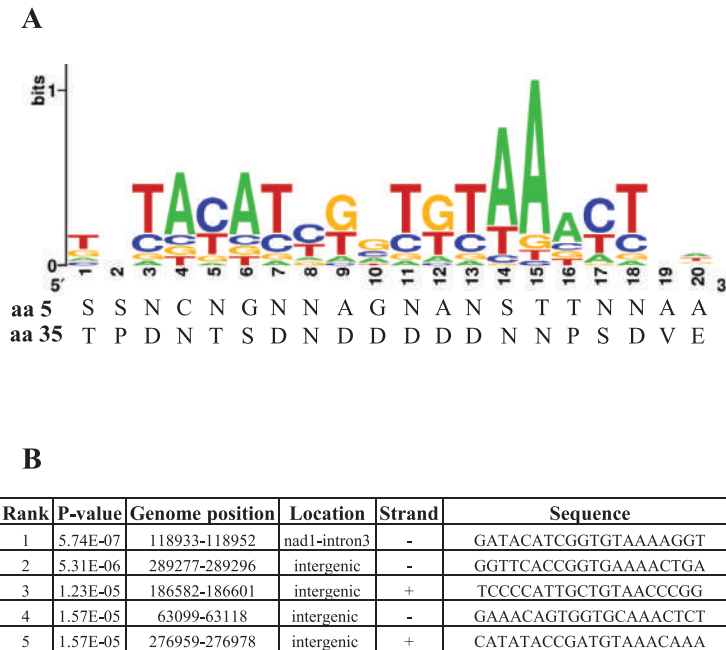
**Figure 5.** The under-accumulation of mature *nadl* mRNA results from the specific destabilization of *nadl* exons 2–3 precursor transcript in *mts2* plants. (A) Schematic representation of *nadl* exon 1, *nadl* exons 2–3 and *nadl* exons 4–5 precursor transcripts and positions of primers used for quantitative RT-PCR analysis. (B) Quantitative RT-PCR measuring the steady state levels of *nadl* exon 1, *nadl* exons 2–3 and *nadl* exons 4–5 precursor RNA in Col-0 and *mts2* plants. The histograms show log<sub>2</sub> ratios of mutants to wild-type. The PCR reactions were performed with the indicated primer pairs. Three biological replicates and three technical replicates were used per genotype; standard errors are indicated.



**Figure 6.** MTSF2 is essential to produce stable *nad1* exons 2–3 precursor RNA and mature *nad2* transcript. (A) RNA gel blot analyses detecting the mature form of *nad1* and the different *nad1* precursor transcripts (*nad1* exon 1, *nad1* exons 2–3 and *nad1* exons 4–5) in wild-type (Col-0) and *mts2* plants. The blots were performed on total RNA and hybridized with the indicated probes. A schematic representation showing the three *nad1* precursor transcripts is shown in the center with UTRs materialized as gray boxes, exons as black boxes and introns as curved lines. The probes used to detect the three different pre-mRNAs are also indicated. (B) RNA gel blot detecting the different forms of *nad2* mRNA accumulating in Col-0 and *mts2* mutants. A full-length *nad2* cDNA probe was used in this experiment. Ethidium bromide staining of ribosomal RNAs is shown below the blots and serves as a loading control. m: mature mRNAs; I3a: 5'-half of *nad1* trans-intron 3 accumulating as a linear molecule; u1: unspliced *nad2* transcript containing intron 1; p: *nad2* unspliced precursor transcript.

dict which mitochondrial sequence in Arabidopsis could be the most likely target of MTSF2. It has been recently established that each PPR motif aligns to a single nucleotide of the RNA target in modular patterns, and that the combinatorial action of amino acids 5 and 35 of each repeat are critical for base selection (26,27,29). This has been the basis of an RNA recognition code for PPR proteins that established relationships between the identity of these two amino acids and each RNA base (25–30). We applied this code to the 20 PPR repeats of MTSF2 and obtained a degenerate

RNA recognition sequence integrating all potential binding sites for MTSF2 (Figure 7A). The obtained motif was then used to scan the non-edited and fully edited Arabidopsis mitochondrial genome and the sequence showing the highest probability for a possible association with MTSF2 was found to locate 1376 nt downstream of the third exon of *nad1* (Figure 7B). Interestingly, this sequence (GAUCAUCGGUGUAAAAGGU) is found in the region encoding the first half of *nad1* intron 3 and in contrast to all other predicted binding sites was the only one that could be con-



**Figure 7.** Prediction of the MTSF2 binding site according to the PPR code. (A) The amino acid at positions 5 and 35 of each MTSF2 PPR repeat were extracted and are listed from N to C-terminus. The obtained combinations were then used to calculate the probabilities of nucleotide recognition by each individual PPR repeat according to the PPR code (27,28,30). The sequence logo depicting these probabilities was obtained with <http://weblogo.berkeley.edu/>. (B) The obtained recognition motif was then used to scan both strands of the complete non-edited and fully edited Arabidopsis mitochondrial genome from Col-0. The five most-probable MTSF2 binding sequences are shown. The *P*-values were determined with the FIMO program.

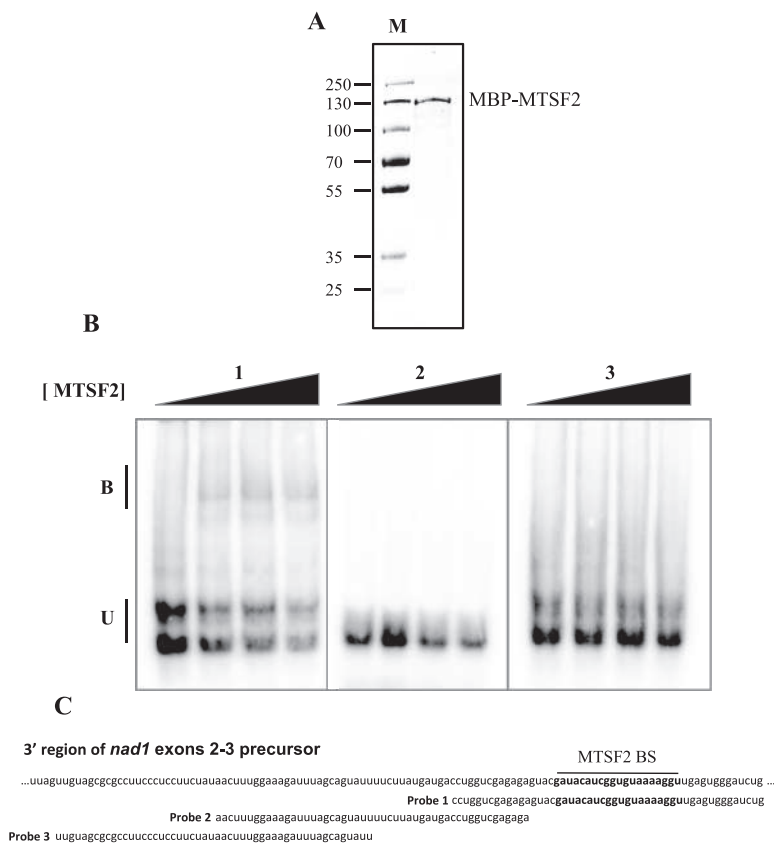
tained in the *nad1* exons 2–3 transcript (Figure 7B). To see whether MTSF2 showed significant affinity for this potential RNA target, gel shift assays were performed using a series of *in vitro*-transcribed RNA probes located around this predicted binding site. A slightly truncated version of MTSF2 lacking its mitochondrial targeting sequence but containing all PPR repeats present in the wild-type protein was expressed in fusion to the maltose binding protein in *E. coli* and purified to homogeneity (Figure 8A). Among the different RNA probes tested, MTSF2 showed specific binding affinity to the one containing the predicted binding site (Figure 8B and C). In contrast, MTSF2 displayed no binding to probes derived from the same region of *nad1* intron 3 but lacking the GAUACAUCGGUGUAAAAGGU segment. We then looked for evidence supporting an association of MTSF2 with this RNA segment *in vivo*. The binding of RNA-stabilizing factors like PPR proteins have been shown to lead to the accumulation of short RNA sequences in plant organelles corresponding to their binding sites (45,47,60). On the basis of RNA-seq data, many such RNA footprints were recently mapped to the Arabidopsis mitochondrial genome to identify potential binding sites of RNA stability factors (61). We searched this database to see if any RNA footprints mapped to the 3' region of *nad1* exons 2–3 pre-mRNA. A 35-nucleotide RNA fragment whose 3' extremity coincided with the MTSF2 binding site could be identified, strongly supporting association of MTSF2 with this RNA region *in vivo* (Supplementary Figure S4).

Overall, these observations revealed that the MTSF2 PPR protein associates *in vivo* with a 20-base RNA segment located 1376 bases downstream of *nad1* exon 3, a region that also comprises the sequences encoding the first portion of *nad1* trans-intron 3.

#### The 3' end of *nad1* exons 2–3 precursor coincides with the MTSF2 binding site

To further elucidate the origin of *nad1* mRNA destabilization in *mtsf2* plants, we also mapped the 5' and 3' extremities of the *nad1* exon 1, *nad1* exons 2–3 and *nad1* exons 4–5 precursor transcripts. We chose circular RT-PCR because it seemed to be well suited for mapping the extremities of the low abundant *nad1* precursor transcripts. The amplification profiles obtained for *nad1* exon 1 and *nad1* exons 4–5 pre-mRNAs were identical in Col-0 and *mtsf2* plants except that some of the bands were much more visible in the mutant samples on agarose gels (Figure 9A). This difference of amplification efficiency likely results from the higher accumulation of *nad1* exon 1 and *nad1* exons 4–5 pre-mRNAs in *mtsf2* plants (Figures 5 and 6), making some fragments easier to amplify from the mutant extract. Each of these amplification products were sequenced and revealed no difference between the two genotypes regarding the different 5' and 3' termini of *nad1* exon 1 and *nad1* exons 4–5 pre-mRNAs (Figure 9A). In contrast, an amplification product corresponding to *nad1* exons 2–3 could only be produced from





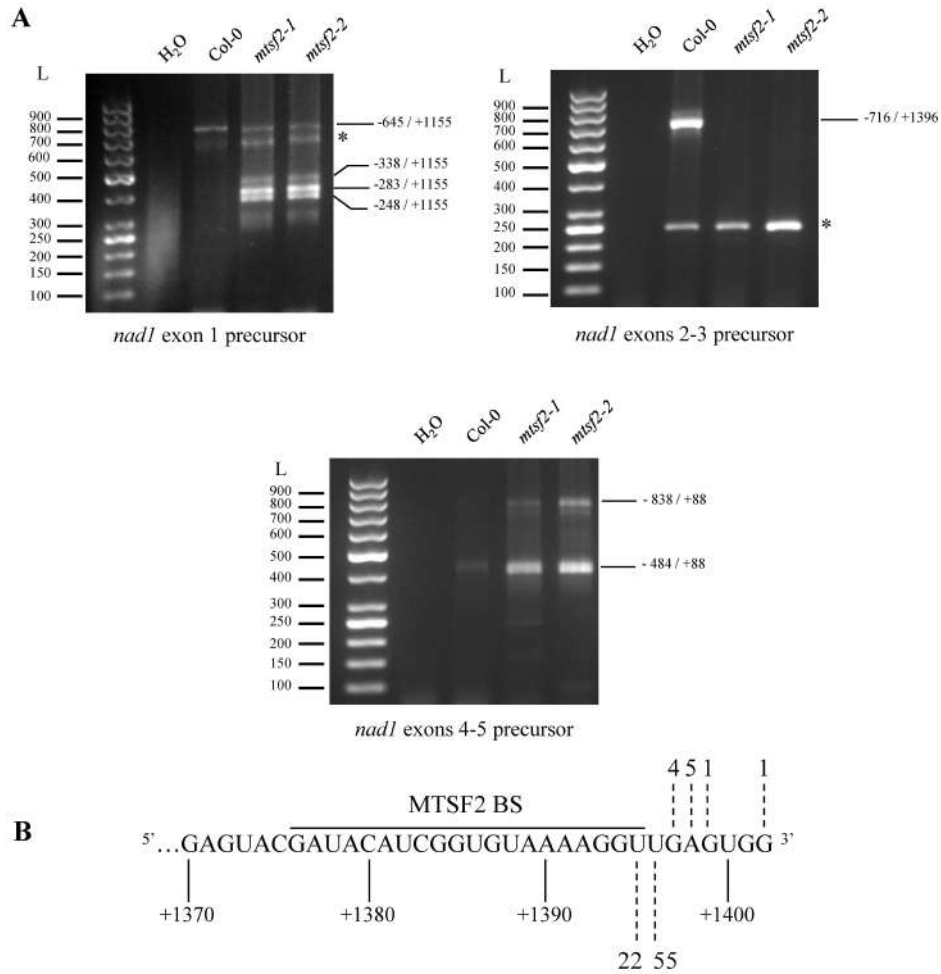
**Figure 8.** Gel mobility shift assays showing the binding of MTSF2 to a short RNA segment of the *nad1* exons 2–3 precursor 3' region and corresponding to its best-predicted binding site according to the PPR code. (A) Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis protein gel stained with Coomassie blue showing the purity of the MBP-MTSF2 fusion protein overexpressed and purified from *Escherichia coli*. Ten micrograms of the purified protein were loaded on the gel. M: protein size marker (kDa). (B) Gel mobility shift assays performed with MBP-MTSF2 and the RNA probes depicted in panel C. For each probe, the reactions contained (from left to right) 0, 50 100 and 150 nM of pure MBP-MTSF2 protein, 100 pM of gel-purified RNA probe and 2 mg/ml heparin. U: unbound probe; B: bound probe. (C) Sequences and positions of the different probes used in the gel shift reactions. The MTSF2 binding site is indicated (MTSF2 BS).

Col-0 plants (Figure 9A). The natural low abundance of *nad1* exons 2–3 precursor, along with its high instability in *mts2* plants, likely explains this lack of amplification from the mutant extract. Cloning and sequencing of the fragment generated from wild-type plants indicated that the vast majority of *nad1* exons 2–3 transcripts bears a 5' end starting 716 bases upstream of exon 2 and terminated 1395 or 1396 nt downstream of exon 3 (Figure 9B). Remarkably, these two 3' ends mapped at the end, or one base downstream, of the identified MTSF2 RNA binding site. These results therefore revealed that the MTSF2 binding site coincided with the 3' extremities of *nad1* exons 2–3 pre-mRNA and that the binding of MTSF2 to this region is required for the stabilization of *nad1* exons 2–3 precursor in Arabidopsis mitochondria.

## DISCUSSION

### MTSF2 stabilizes the mitochondrial *nad1* exons 2–3 precursor transcript in Arabidopsis

The molecular processes leading to transcript stabilization in plant mitochondria have been poorly explored up to now. However, a mechanism involving the association of RNA binding proteins to transcript extremities has been described for a few transcripts in chloroplasts and mitochondria (12,45,62–64). The underlying mechanisms propose that these proteins bind to mRNA 5' or 3' UTRs and stabilize them by blocking the progression of 5'-to-3' or 3'-to-5' exonucleases. This mechanism implies that the binding site of these stability factors coincides with the 5' or 3' extremity of their target transcript. They are thus responsible for both mRNA stabilization and transcript end processing. Among the identified factors acting this way, a single one was previously found to be essential for mRNA



**Figure 9.** The *nadl* exons 2–3 transcript 3' extremity coincides with the MTSF2 RNA binding site. (A) Agarose gel showing circular-RT PCR amplification products obtained for the *nadl* exon 1, *nadl* exons 2–3 and *nadl* exons 4–5 precursor transcripts in wild-type (Col-0) and *mts2* mutants. All visible bands were cloned and sequenced in the different genotypes. The coordinates of 5' and 3' extremities of each fragment are indicated with respect to the first and last exon contained in each precursor transcript. \*: artifact amplification products not related to *nadl*. L: DNA size ladder, H<sub>2</sub>O: negative control. (B) Partial RNA sequence showing the two major 3' ends of *nadl* exons 2–3 pre-mRNA. The indicated coordinates are numbered with respect to the last exon present in the *nadl* exons 2–3 precursor (formally *nadl* exon 3). The dotted lines indicate the positions of the *nadl* exons 2–3 transcript 3' ends found in the wild-type (Col-0). Numbers next to dotted lines represent how often a particular end was found after sub-cloning and sequencing the major band shown for *nadl* exons 2–3 in panel A. The sequence fragment corresponding to the MTSF2 binding site is also indicated (MTSF2 BS).

stabilization in plant mitochondria. It corresponded to the MTSF1 PPR protein that is required for the stability of *nad4* and whose binding site corresponded to the last nucleotides of mature *nad4* mRNA (45). Therefore, the number and more importantly the type of transcripts that are stabilized by such protein-mediated process in plant mitochondria remain largely unclear. The RNA segments corresponding to the binding sites of several of these stability factors were shown to survive degradation and to accumulate in plant organelles in the form of short RNA footprints (47,60). The mapping of a large number of such footprints in Arabidopsis mitochondria identified 14 protein-coding

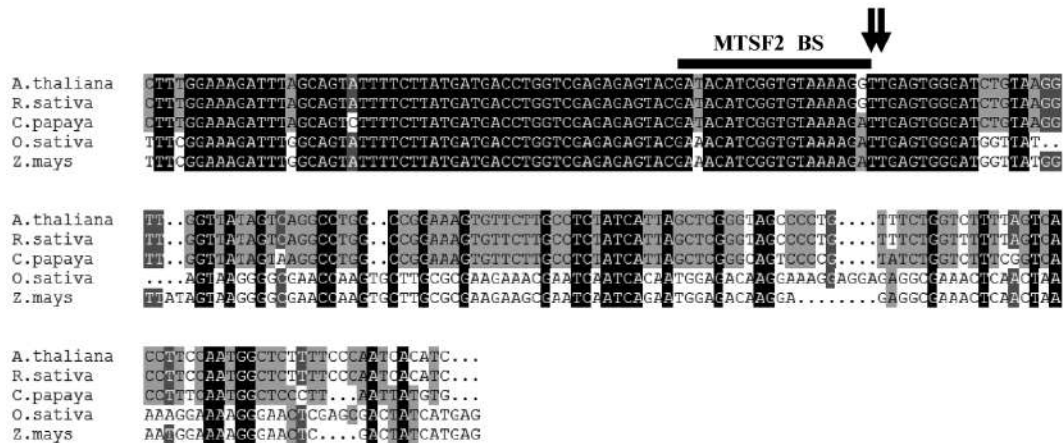
mature mRNAs that are potentially stabilized by association with protective proteins at their 3' end (61). The present study reveals for the first time that the range of transcripts stabilized by this mechanism is not limited to mature mRNAs but that precursor transcripts whose 3' extremity terminates in the first half of a trans-splicing intron are also stabilized by the association with a protective protein. We effectively revealed that the mitochondria-targeted MTSF2 PPR protein is required for both the stabilization and concomitantly the 3' end processing of the *nadl* exons 2–3 precursor transcript. *nadl* is one of the three mRNAs of mitochondria whose mature form in most seed plants results

from the fusion of three independently-transcribed precursor transcripts called *nad1* exon 1, *nad1* exons 2–3 and *nad1* exons 4–5 via two trans-splicing reactions (Figure 5). We observed that the lack of *nad1* mature mRNA in *mtsf2* mutants correlated with the specific destabilization of the central precursor *nad1* exons 2–3 (Figures 5 and 6). Moreover, the *nad1* exons 4–5 transcript, which covers the 3' region of *nad1*, slightly over-accumulated in *mtsf2* plants and therefore could not explain the general destabilization of mature *nad1* mRNA in the mutants. Additionally, we observed that *nad1* exon 1 and *nad1* exons 4–5 precursors bore 5' and 3' extremities identical to the wild-type in the absence of MTSF2, implying that these precursor RNAs were both normally stabilized and processed in *mtsf2* mutants (Figure 9). Further, by predicting candidate binding sites for MTSF2, we demonstrated that this PPR protein associates to the 3' extremity of *nad1* exons 2–3 pre-mRNA with high affinity. A low-abundance short RNA matching the MTSF2 binding site could be found in a dedicated database listing potential binding sites of organellar RNA stabilizing factors (61), providing very strong support for an effective association of MTSF2 to the 3' extremity of *nad1* exons 2–3 RNA *in vivo*. Altogether, our results strongly support the model implying an association of MTSF2 with the 3' end *nad1* exons 2–3 precursor RNA and acting as a steric block against exoribonucleolytic activity. Interestingly, this mechanism appears to be conserved in angiosperms as suggested by the almost perfect sequence conservation of the MTSF2-binding site among monocot and dicot plant species (Figure 10). The high level of sequence conservation of MTSF2 in seed plants and more importantly the amino acids involved in PPR–RNA interaction further support conserved function of MTSF2 in angiosperms (Supplementary Figure S6). Our study thus reveals that 3' extremity of 5'-half introns of mitochondrial precursors requires active stabilization to survive degradation and that the association with their cognate 3'-half is insufficient to protect them from the degrading activity of 3'-to-5' mitochondrial exonucleases. A sufficient stability of trans-precursor transcripts is therefore necessary to leave enough time for these molecules to find the precursor RNA containing their intron partner and re-assemble functional trans-introns. Cis-elements like stem loop structures present on the 3' extremities of trans-precursor RNA may also trigger a similar protective activity in some instances, but this needs to be proven.

Further, our results revealed that MTSF2 is not only essential for *nad1* exons 2–3 precursor RNA stability but also for the stable accumulation of a 1.3 kb RNA species whose size corresponds exactly to the 5'-half of *nad1* intron 3 (Figure 6). This observation supports that released 5'-half intron molecules do accumulate stably in mitochondria after splicing as recently proposed (65) and proves that PPR proteins are responsible for such stable accumulations. This also indicates that the 5'-half of *nad1* intron 3 is not fused with its 3'-half intron partner upon splicing and therefore that the *nad1* intron 3 splicing mechanism occurs mostly through the hydrolytic pathway and not via the transesterification pathway which would have released an open lariat combining both intron halves, unlike previously proposed (66).

### Upon binding to *nad1* exons 2–3 precursor, MTSF2 simultaneously defines the 3' end of the first half of *nad1* intron 3

The high recombinogenic activity of plant mitochondrial genomes has resulted in various reported examples of gene fragmentation. The generated gene fragments are expressed from separate DNA regions and the resulting transcript or protein pieces must find their appropriate partners to re-constitute the entire mRNA or protein (6,7,9). The most frequent case of gene partitioning is associated with DNA breakage occurring in mitochondrial introns. Transcript reconstruction is permitted by trans-splicing reactions in which portions of introns re-assemble in a correct structure permitting the splicing reaction to occur and subsequently the ligation of exons. With the exception of the group I intron found in the *cytochrome oxidase 1* gene, all other mitochondrial introns in plants belong to the class II (6). Although they share a common evolutionary origin, group II introns have low sequence conservation but organize themselves into a phylogenetically conserved secondary structure comprising 6 helical domains that are distributed around a central hub (67). Throughout evolution, the sequence and structural changes of group II introns have been accompanied with the appearance of a large number of protein factors facilitating the splicing reaction (68–70). While the catalysis of splicing is very likely mediated by the introns themselves, there are several lines of evidence indicating that proteinaceous factors are required to help intron folding and to stabilize the structure in their catalytically active form (68,70–72). It is still unclear how the appropriate intron fragments functionally re-associate and the relative contributions of protein chaperones and base pairing in this process remain largely unknown. Factors like maturases, RNA helicases or CRM (chloroplast RNA splicing and ribosome maturation) proteins are required for the splicing of a large panel of mitochondrial introns in plants (68–70). Other classes of site-specific RNA binding proteins, among which PPR proteins are the most frequently represented, facilitate the splicing of one or two introns in most cases (18,59,66,68,73). There are five bi-partite trans-splicing introns in Arabidopsis mitochondria and they all contain disruptions that have occurred within their domain IV (74). Our analysis unambiguously revealed an essential role of MTSF2 in the stability of *nad1* exons 2–3 precursor RNA, but this protective activity is concomitantly associated with the definition of the 3' end of the first half of *nad1* intron 3. A sequence comparison of DNA regions covering the 5' half of *nad1* intron 3 in monocot and dicot species revealed that the 3' extremity of *nad1* exons 2–3 transcript marks a clear breakpoint in DNA homology. Effectively, the DNA region located between *nad1* exon 3 and the MTSF2 binding site shows much higher sequence conservation than the one situated immediately downstream of *nad1* exons 2–3 pre-mRNA 3' end (Supplementary Figure S5). Thus, not only the binding site of MTSF2 appears to be conserved in angiosperms but also its position relatively to the end of *nad1* exon 3 shows very little variation among seed plants. This observation suggests that the splitting of *nad1* intron 3 occurred likely once prior to the separation of monocot and dicot plants and that MTSF2 has been likely selected to allow this fragmentation event by stabilizing the newly-



**Figure 10.** The MTSF2 binding site is conserved in angiosperms. Multiple sequence alignment of *nad1* exons 2–3 transcript 3′ end from a representative selection of dicot (*Arabidopsis thaliana*, *Rafanus sativa* and *Carina papaya*) and monocot (*Oryza sativa*, *Zea mays*) species. The sequence corresponding to the MTSF2 binding site is shown above the sequences and the downward arrows indicates the two 3′ ends of *nad1* exons 2–3 RNA mapped in *A. thaliana*.

created *nad1* exons 2–3 transcript and thereby permitting the trans-splicing of *nad1* intron 3. The evolutionary history of *nad1* intron 3 in land plants supports this hypothesis and suggests that the splitting of this intron occurred effectively early in the evolution of seed plants (75).

**MSTF2 may play an active role in *nad1* intron 3 trans-splicing**

The position of the MTSF2 binding site delimits the end of a conserved region comprising intron domains I–IV that are known to be essential for the splicing reaction to occur. By defining an extremity to *nad1* exons 2–3 precursor that is compatible with the progression of splicing, one can consider that MTSF2 plays an indirect role in splicing. However, MTSF2 may carry a more direct role in *nad1* intron 3 splicing. As previously proposed for the PPR4 protein in maize (76), MTSF2 may help the two halves of *nad1* intron 3 to recognize each other, either alone or through interactions with other potentially involved splicing factors. Alternatively and because its binding site lies within domain IV, MTSF2 may facilitate the splicing reaction of *nad1* intron 3 by stabilizing the structure of domains V or VI, which are part of the intron catalytic core and contain the bulged adenosine attacking the 5′ splice site junction respectively (77). However, the strong destabilization of *nad1* exons 2–3 transcript in *mtsf2* mutants makes the validation of a possible role of MTSF2 in *nad1* intron 3 intron splicing very difficult. The identification of MTSF2 protein partners or separation-of-function mutations in *MTSF2* could help to distinguish between the different roles that this protein may play in *nad1* exons 2–3 pre-mRNA processing. Nonetheless, a role of MTSF2 in intron splicing is suggested by the reduction of *nad2* intron 1 and intron 2 splicing in *mtsf2* mutants (Figure 6 and Supplementary Figure S3). Though, decreased splicing efficiency for these specific introns is frequently observed in independent *Arabidopsis* complex I

mutants (45,52,59,78) and may just result from secondary effects to the loss of respiratory complex I.

**Other trans-precursor mitochondrial transcripts are also likely stabilized by association of RNA binding proteins at their 3′ extremity**

As indicated earlier, RNA binding proteins involved in transcript stabilization lead to the accumulation of short RNA footprints in mitochondria and plastids (47,60). These short sequences correspond to the binding sites of RNA stability trans-factors that are permanently protected against degradation during RNA turnover. In plant mitochondria, these short RNA footprints show typical characteristics comprising well defined 3′ ends and 5′ extremities spreading over several bases (61). A quite complete list of such footprints was recently established in *Arabidopsis* and mapped to the mitochondrial chromosome. We used this on-line available resource (<https://www.molgen.hu-berlin.de/projects-jbrowse-athaliana.php>) to identify RNA footprints in the five *Arabidopsis* 5′-half intron sequences to see whether any of the corresponding trans-precursor RNAs could be stabilized by association of a protective RNA binding protein at their 3′ end. Three of such RNA footprints were found to map to DNA regions located downstream of *nad1* exon1, *nad5* exons 1–2 and *nad5* exons 3 precursor RNAs (Supplementary Figure S4). The footprint identified downstream of *nad5* exon 3 precursor was mapped 57 bases downstream of exon 3, which is likely incompatible with the production of a functional 5′-half intron. However, the short RNAs that mapped downstream of *nad1* exon 1 and *nad5* exons 1–2 regions show accumulation levels that are similar to the short RNA mapping to the MTSF2 binding site (Supplementary Figure S4). They are 17 and 21 bp long and are located 1286 and 674 bases downstream of *nad1* exon1 and *nad5* exon 2 respectively. These distances would leave sufficient sequence space downstream of each



exon to organize intron domains I–IV, which spread over 500 bases for most group II introns (6). These observations strongly suggest that the stabilization of mitochondrial trans-precursor RNAs is not limited to *nad1* exons 2–3 pre-mRNA and MTSF2 and that *nad1* exon 1 and *nad5* exons 1–2 precursor transcripts are likely stabilized by the association of PPRs or related proteins to their 3' extremity. Future investigations are required to validate or invalidate these assumptions.

#### SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

#### FUNDING

Institut National de la Recherche Agronomique [INRA UMR 1318]; China Scholarship Council (to C. W.); French Ministère de l'Enseignement et de la Recherche; Fondation pour la Recherche Médicale [#FDT20160736470 to N.P.]. Funding for open access charge: Institut Jean-Pierre Bourgin [INRA UMR1318].

*Conflict of interest statement.* None declared.

#### REFERENCES

- Gray, M.W. (1999) Mitochondrial Evolution. *Science*, **283**, 1476–1481.
- Lang, B.F., Gray, M.W. and Burger, G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, **33**, 351–397.
- Burger, G., Gray, M.W. and Lang, B.F. (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.*, **19**, 709–716.
- Kubo, T. and Newton, K.J. (2008) Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion*, **8**, 5–14.
- Gualberto, J.M., Mileshina, D., Wallet, C., Niazi, A.K., Weber-Lotfi, F. and Dietrich, A. (2014) The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance. *Biochimie*, **100**, 107–120.
- Bonen, L. (2008) Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria. *Mitochondrion*, **8**, 26–34.
- Rayapuram, N., Hagenmuller, J., Grienenberger, J.M., Bonnard, G. and Giegé, P. (2008) The three mitochondrial encoded CcmF proteins form a complex that interacts with CCMH and c-type apocytochromes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, **283**, 25200–25208.
- Choi, B., Acero, M.M. and Bonen, L. (2012) Mapping of wheat mitochondrial mRNA termini and comparison with breakpoints in DNA homology among plants. *Plant Mol. Biol.*, **80**, 539–552.
- Grewe, F., Edger, P.P., Keren, I., Sultan, L., Pires, J.C., Ostertzer-Biran, O. and Mower, J.P. (2014) Comparative analysis of 11 Brassicales mitochondrial genomes and the mitochondrial transcriptome of *Brassica oleracea*. *Mitochondrion*, **19**, 135–143.
- Kim, B., Kim, K., Yang, T.-J. and Kim, S. (2016) Completion of the mitochondrial genome sequence of onion (*Allium cepa* L.) containing the CMS-S male-sterile cytoplasm and identification of an independent event of the *ccmF<sub>N</sub>* gene split. *Curr. Genet.*, **62**, 873–885.
- Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, C., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B. *et al.* (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, **16**, 2089–2103.
- Barkan, A. and Small, I. (2014) Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **65**, 415–442.
- O'Toole, N., Hattori, M., Andrés, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M. and Small, I. (2008) On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 1120–1128.
- Small, I.D. and Peeters, N. (2000) The PPR motif—a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 46–47.
- Cheng, S., Gutmann, B., Zhong, X., Ye, Y., Fisher, M.F., Bai, F., Castleden, I., Song, Y., Song, B., Huang, J. *et al.* (2016) Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by pentatricopeptide repeat proteins in land plants. *Plant J.*, **85**, 532–547.
- Takenaka, M., Zehrmann, A., Verbitskiy, D., Härtel, B. and Brennicke, A. (2013) RNA editing in plants and its evolution. *Annu. Rev. Genet.*, **47**, 335–352.
- Sun, T., Bentolila, S. and Hanson, M.R. (2016) The unexpected diversity of plant organelle RNA editosomes. *Trends Plant Sci.*, **21**, 962–973.
- Hammani, K. and Giegé, P. (2014) RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends Plant Sci.*, **19**, 380–389.
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y.I., Litonin, D., Cramer, P. and Temiakov, D. (2011) Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature*, **478**, 269–273.
- Howard, M.J., Lim, W.H., Fierke, C.A. and Koutmos, M. (2012) Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 16149–16154.
- Ke, J., Chen, R.-Z., Ban, T., Zhou, X.E., Gu, X., Tan, M.H.E., Chen, C., Kang, Y., Brunzelle, J.S., Zhu, J.-K. *et al.* (2013) Structural basis for RNA recognition by a dimeric PPR-protein complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1377–1382.
- Coquille, S., Filipovska, A., Chia, T., Rajappa, L., Lingford, J.P., Razif, M.F.M., Thore, S.E.P. and Rackham, O. (2014) An artificial PPR scaffold for programmable RNA recognition. *Nat. Commun.*, **5**, 1–9.
- Gully, B.S., Shah, K.R., Lee, M., Shearston, K., Smith, N.M., Sadowska, A., Blythe, A.J., Bernath-Levin, K., Stanley, W.A., Small, I.D. *et al.* (2015) The design and structural characterization of a synthetic pentatricopeptide repeat protein. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 196–208.
- Yin, P., Li, Q., Yan, C., Liu, Y., Liu, J., Yu, F., Wang, Z., Long, J., He, J., Wang, H.-W. *et al.* (2013) Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature*, **5**, 168–171.
- Shen, C., Zhang, D., Guan, Z., Liu, Y., Yang, Z., Yang, Y., Wang, X., Wang, Q., Zhang, Q., Fan, S. *et al.* (2016) Structural basis for specific single-stranded RNA recognition by designer pentatricopeptide repeat proteins. *Nat. Commun.*, **7**, 1–8.
- Fujii, S., Bond, C.S. and Small, I.D. (2011) Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 1723–1728.
- Barkan, A., Rojas, M., Fujii, S., Yap, A., Chong, Y.S., Bond, C.S. and Small, I. (2012) A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genet.*, **8**, e1002910.
- Takenaka, M., Zehrmann, A., Brennicke, A. and Graichen, K. (2013) Improved computational target site prediction for pentatricopeptide repeat RNA editing factors. *PLoS One*, **8**, e65343.
- Kindgren, P., Yap, A., Bond, C.S. and Small, I. (2015) Predictable alteration of sequence recognition by RNA editing factors from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **27**, 403–416.
- Yagi, Y., Hayashi, S., Kobayashi, K., Hirayama, T. and Nakamura, T. (2013) Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in plants. *PLoS One*, **8**, e57286.
- Lupold, D.S., Caoile, A.G. and Stern, D.B. (1999) The maize mitochondrial *cox2* gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3897–3903.
- Holec, S., Lange, H., Kühn, K., Alioua, M., Börner, T. and Gagliardi, D. (2006) Relaxed transcription in *Arabidopsis* mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2869–2876.
- Holec, S., Lange, H., Canaday, J. and Gagliardi, D. (2008) Coping with cryptic and defective transcripts in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1779**, 566–573.
- Forner, J., Weber, B., Thuss, S., Wildum, S. and Binder, S. (2007) Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: t-elements contribute to 5' and 3' end formation. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3676–3692.

35. Forner, J., Hölzle, A., Jonietz, C., Thuss, S., Schwarzländer, M., Weber, B., Meyer, R.C. and Binder, S. (2008) Mitochondrial mRNA polymorphisms in different Arabidopsis accessions. *Plant Physiol.*, **148**, 1106–1116.
36. Stoll, B., Stoll, K., Steinhilber, J., Jonietz, C. and Binder, S. (2013) Mitochondrial transcript length polymorphisms are a widespread phenomenon in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **81**, 221–233.
37. Jonietz, C., Forner, J., Hölzle, A., Thuss, S. and Binder, S. (2010) RNA PROCESSING FACTOR2 is required for 5' end processing of *nad9* and *cox3* mRNAs in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **22**, 443–453.
38. Hölzle, A., Jonietz, C., Törjek, O., Altmann, T., Binder, S. and Forner, J. (2011) A RESTORER OF FERTILITY-like PPR gene is required for 5'-end processing of the *nad4* mRNA in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **65**, 737–744.
39. Jonietz, C., Forner, J., Hildebrandt, T. and Binder, S. (2011) RNA PROCESSING FACTOR3 is crucial for the accumulation of mature *ccmC* transcripts in mitochondria of Arabidopsis accession Columbia. *Plant Physiol.*, **157**, 1430–1439.
40. Hauler, A., Jonietz, C., Stoll, B., Stoll, K., Braun, H.-P. and 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*. *Plant J.*, **74**, 593–604.
41. Stoll, B., Zendler, D. and Binder, S. (2014) RNA Processing Factor 7 and Polynucleotide Phosphorylase Are Necessary for Processing and Stability of *nad2* mRNA in Arabidopsis Mitochondria. *RNA Biol.*, **11**, 968–976.
42. Arnal, N., Quadrado, M., Simon, M. and Mireau, H. (2014) A restorer-of-fertility like pentatricopeptide repeat gene directs ribonucleolytic processing within the coding sequence of *rps3-rpl16* and *orf240a* mitochondrial transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **78**, 134–145.
43. Stoll, B., Jonietz, C. and Binder, S. (2014) In *Arabidopsis thaliana* two co-adapted cyto-nuclear systems correlate with distinct *ccmC* transcript sizes. *Plant J.*, **81**, 247–257.
44. Stoll, B. and Binder, S. (2016) Two NYN domain containing putative nucleases are involved in transcript maturation in Arabidopsis mitochondria. *Plant J.*, **85**, 278–288.
45. Haili, N., Arnal, N., Quadrado, M., Amiar, S., Tcherkez, G., Dahan, J., Briozzo, P., Colas des Francs-Small, C., Vrielynck, N. and Mireau, H. (2013) The pentatricopeptide repeat MTSF1 protein stabilizes the *nad4* mRNA in Arabidopsis mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 6650–6663.
46. Barkan, A. (2011) Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. *Plant Physiol.*, **155**, 1520–1532.
47. Zhelyazkova, P., Hammani, K., Rojas, M., Voelker, R., Vargas-Suarez, M., Borner, T. and Barkan, A. (2011) Protein-mediated protection as the predominant mechanism for defining processed mRNA termini in land plant chloroplasts. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3092–3105.
48. Hammani, K.K., Cook, W.B.W. and Barkan, A.A. (2012) RNA binding and RNA remodeling activities of the half-a-tetratricopeptide (HAT) protein HCF107 underlie its effects on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 5651–5656.
49. Li, X., Jiang, D.H., Yong, K. and Zhang, B.D. (2007) Varied transcriptional efficiencies of multiple *Arabidopsis* U6 small nuclear RNA genes. *J. Integr. Plant Biol.*, **49**, 222–229.
50. Mali, P., Esvelt, K.M. and Church, G.M. (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat. Meth.*, **10**, 957–963.
51. Fauser, F., Schiml, S. and Puchta, H. (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **79**, 348–359.
52. Haili, N., Planchard, N., Arnal, N., Quadrado, M., Vrielynck, N., Dahan, J., des Francs-Small, C.C. and 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.
53. Dahan, J., Tcherkez, G., Macherel, D., Benamar, A., Belcram, K., Quadrado, M., Arnal, N. and Mireau, H. (2014) Disruption of the *CYTOCHROME C OXIDASE DEFICIENT1* gene leads to cytochrome c oxidase depletion and reorchestrated respiratory metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **166**, 1788–1802.
54. Carrie, C., Giraud, E., Duncan, O., Xu, L., Wang, Y., Huang, S., Clifton, R., Murcha, M., Filipovska, A., Rackham, O. *et al.* (2010) Conserved and Novel Functions for Arabidopsis thaliana MIA40 in Assembly of Proteins in Mitochondria and Peroxisomes. *J. Biol. Chem.*, **285**, 36138–36148.
55. Lamattina, L., Gonzalez, D., Gualberto, J. and Grienenberger, J.M. (1993) Higher plant mitochondria encode an homologue of the nuclear-encoded 30-kDa subunit of bovine mitochondrial complex I. *Eur. J. Biochem.*, **217**, 831–838.
56. Grant, C.E., Bailey, T.L. and Noble, W.S. (2011) FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*, **27**, 1017–1018.
57. Sung, T.-Y., Tseng, C.-C. and Hsieh, M.-H. (2010) The SLO1 PPR protein is required for RNA editing at multiple sites with similar upstream sequences in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J.*, **63**, 499–511.
58. Zhu, Q., Dugardeyn, J., Zhang, C., Takenaka, M., Kühn, K., Craddock, C., Smalle, J., Karampelias, M., Denecke, J., Peters, J. *et al.* (2012) SLO2, a mitochondrial PPR protein affecting several RNA editing sites, is required for energy metabolism. *Plant J.*, **71**, 836–849.
59. Colas des Francs-Small, C., Falcon de Longevialle, A., Li, Y., Lowe, E., Tanz, S.K., Smith, C., Bevan, M.W. and Small, I. (2014) The pentatricopeptide repeat proteins TANG2 and ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING 439 are involved in the splicing of the multipartite *nad5* transcript encoding a subunit of mitochondrial complex I. *Plant Physiol.*, **165**, 1409–1416.
60. Ruwe, H. and Schmitz-Linneweber, C. (2011) Short non-coding RNA fragments accumulating in chloroplasts: footprints of RNA binding proteins? *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3106–3116.
61. Ruwe, H., Wang, G., Gusewski, S. and Schmitz-Linneweber, C. (2016) Systematic analysis of plant mitochondrial and chloroplast small RNAs suggests organelle-specific mRNA stabilization mechanisms. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 7406–7417.
62. Hattori, M. and Sugita, M. (2009) A moss pentatricopeptide repeat protein binds to the 3' end of plastid *clpP* pre-mRNA and assists with mRNA maturation. *FEBS J.*, **276**, 5860–5869.
63. Pfalz, J., Bayraktar, O.A., Prikryl, J. and Barkan, A. (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J.*, **28**, 2042–2051.
64. Hammani, K., Takenaka, M., Miranda, R. and Barkan, A. (2016) A PPR protein in the PLS subfamily stabilizes the 5'-end of processed *rpl16* mRNAs in maize chloroplasts. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4278–4288.
65. Massel, K., Silke, J.R. and Bonen, L. (2016) Multiple splicing pathways of group II trans-splicing introns in wheat mitochondria. *Mitochondrion*, **28**, 23–32.
66. Gualberto, J.M., Le Ret, M., Beator, B. and Kühn, K. (2015) The RAD52-like protein ODB1 is required for the efficient excision of two mitochondrial introns spliced via first-step hydrolysis. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 6500–6510.
67. Pyle, A.M., Fedorova, O. and Waldsich, C. (2007) Folding of group II introns: a model system for large, multidomain RNAs? *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 138–145.
68. Brown, G.G., Colas des Francs-Small, C. and Ostersetter-Biran, O. (2014) Group II intron splicing factors in plant mitochondria. *Front. Plant Sci.*, **5**, 35.
69. Schmitz-Linneweber, C., Lampe, M.-K., Sultan, L.D. and Ostersetter-Biran, O. (2015) Organellar maturases: A window into the evolution of the spliceosome. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1847**, 798–808.
70. Sultan, L.D., Mileshina, D., Grewe, F., Rolle, K., Abudraham, S., Głodowicz, P., Niazi, A.K., Keren, I., Shevtsov, S., Klipcan, L. *et al.* (2016) The reverse transcriptase/RNA maturase protein MatR is required for the splicing of various group II introns in brassicaceae mitochondria. *Plant Cell*, **28**, 2805–2829.
71. Noah, J.W. and Lambowitz, A.M. (2003) Effects of maturase binding and Mg<sup>2+</sup> concentration on group II intron RNA folding investigated by UV cross-linking. *Biochemistry*, **42**, 12466–12480.
72. Qu, G., Kaushal, P.S., Wang, J., Shigematsu, H., Piazza, C.L., Agrawal, R.K., Belfort, M. and Wang, H.-W. (2016) Structure of a group II intron in complex with its reverse transcriptase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 549–557.
73. Hsu, Y.-W., Wang, H.-J., Hsieh, M.-H., Hsieh, H.-L. and Jauh, G.-Y. (2014) Arabidopsis mTERF15 is required for mitochondrial *nad2*

6134 *Nucleic Acids Research*, 2017, Vol. 45, No. 10

- intron 3 splicing and functional complex I activity. *PLoS One*, **9**, e112360.
74. Glanz,S. and Kück,U. (2009) Trans-splicing of organelle introns—a detour to continuous RNAs. *Bioessays*, **31**, 921–934.
75. Malek,O. and 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*, **4**, 1599–1609.
76. Schmitz-Linneweber,C., Williams-Carrier,R.E., Williams-Voelker,P.M., Kroeger,T.S., Vichas,A. and Barkan,A. (2006) A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *Plant Cell*, **18**, 2650–2663.
77. Bonen,L. and Vogel,J. (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet.*, **17**, 322–331.
78. Koprivova,A., des Fracs-Small,C.C., Calder,G., Mugford,S.T., Tanz,S., Lee,B.-R., Zechmann,B., Small,I. and Kopriva,S. (2010) Identification of a pentatricopeptide repeat protein implicated in splicing of intron 1 of mitochondrial *nad7* transcripts. *J. Biol. Chem.*, **285**, 32192–32199.





# Matériel et Méthodes



## 7. Matériel et méthodes

### 7.1. Matériel

#### 7.1.1. Matériel végétal

J'ai travaillé avec l'accèsion Columbia (Col-0) d'*Arabidopsis thaliana*, originaire des Etats-Unis. Les génotypes suivants ont été utilisés pour mener les études présentées dans ce manuscrit :

- la référence sauvage, appelé ici Col-0
- le mutant *rfl22* du gène At1g62720 (lignée N515489)
- le mutant *rfl23* du gène At5g16640 (lignée N541636)
- le mutant *mtl1* du gène At5g64320 (lignée N539066)
- le mutant *mtsf1* du gène At1g06710 (lignée N654650)
- le mutant *mtsf2-1* du gène At1g52620 (lignée N067239)

#### 7.1.2. Souches bactériennes

J'ai utilisé au cours de ma thèse, plusieurs types de souches bactériennes, répertoriées dans le Tableau 14.

Souche (Espèce)	Génotype	Utilisation
<b>Rosetta De3 pLysS</b> ( <i>E. coli</i> )	B F- ompT gal dcm lon? hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL orip15A](CmR)	Production de protéines recombinantes
<b>BL21 De3 pLysS</b> ( <i>E.coli</i> )	B F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysS[T7p20 orip15A](CmR)	Production de protéines recombinantes
<b>DH10B</b> ( <i>E. coli</i> )	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ-	Criblage et amplification de plasmides

DH5 $\alpha$ ( <i>E. coli</i> )	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), $\lambda$ -	Criblage et amplification de plasmides
DB3.1 ( <i>E. coli</i> )	F- gyrA462 endA1 glnV44 $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 $\Delta$ leu mtl1	Amplification de plasmides comprenant une cassette ccdB

Tableau 14 – Souches bactériennes utilisées

### 7.1.3. Plasmides

Plusieurs plasmides ont été utilisés :

- pDONR207 (Invitrogen) pour la première étape (BP) des clonages Gateway™ (Invitrogen).
- pDEST17 (Invitrogen) pour la seconde étape (LR) des clonages Gateway pour produire des protéines portant une étiquette histidine du côté N-terminal de la protéine d'intérêt (His)
- pMalTev pour la seconde étape (LR) des clonages Gateway pour produire des protéines portant une étiquette Maltose Binding Protein côté N-terminal de la protéine d'intérêt (MBP).
- pGWB1 (Nakagawa, 2007) pour la seconde étape (LR) des clonages Gateway pour la transformation dans *Agrobacterium*.
- pTOPO-A (Invitrogen) pour cloner des produits de PCR issus d'une Taq ADN polymérase (enzyme « maison » ou Dream Taq (Thermo Fisher Scientific)).
- pTOPT-Blunt (Invitrogen) pour cloner des produits de PCR issus de l'ADN polymérase Phusion® (Thermo Fisher Scientific).

### 7.1.4. Oligonucléotides

Ci-après sont listés les oligonucléotides utilisés pour construire les plasmides ayant permis de réaliser la complémentation fonctionnelle du mutant *rfl22* par les homologues les plus proches identifiés chez *A. lyrata* et *B. rapa*.

Nom	Séquence
RFL22Lyr-GW2	CAAGAAAGCTGGGTTTATAACGGAAGAAGCCCATCTTC
RFL22Rapa-GW2	CAAGAAAGCTGGGTCTATAGTAGAAGTAGCCCATCTTCA
RFL22Lyr-GW3	CGAGGTTAATAATTCAAATGCAGAGATCGATCACGATC
RFL22Rapa-GW3	CGAGGTTAATAATTCAAATGAAGAGATCGATTTCGAC
RFL22Lyr-GW4	GATCGTGATCGATCTCTGCATTTGAATTATTAACCTCG
RFL22Rapa-GW4	GTCGAAATCGATCTCTTCATTTGAATTATTAACCTCG
RFL22Lyr/RapaGW5	GTACAAAAAAGCAGGCTTATTATACCGATGTAATTTTAACG
mut dirigée L92F	CTGGTGCTATTCGAGAGTATG
mut dirigée L92R	CATACTCTCGAATAGCACCAG

Tableau 15 - Oligonucléotides utilisés pour construire les plasmides ayant permis de faire la complémentation fonctionnelle du mutant *rfl22* par les homologues les plus proches identifiés chez *A. lyrata* et *B. rapa*.

Ci-dessous sont listés les oligonucléotides ayant permis de réaliser les q-RT-PCR « exon » permettant de connaître l'abondance de chaque exon mitochondrial.

Nom	Séquence
CcmFC exon 1 F	ATCTTTTTGCGGTGTGCTCT
CcmFC exon 1 R	ATTCGTCGTTGCTCATTCC
CcmFC exon 2 F	AATCACTTCATGCCGACCTC
CcmFC exon 2 R	GCGATTCTTCATCCACCAAT
Cox2 exon1 F	GATTCTTCGGACCATCTTTCC
Cox2 exon1 R	TCCGATACCATTGATGTCCA
Cox2 exon2 F	TCGTCGTAGAAGCTGTTCCCT
Cox2 exon2 R	TTGGGGGATTAATTGATTGG
Nad1a_exon1_F	TGATGTAGTGGGATCGTTCCG
Nad1a_exon1_R	AGCCACTGGAGCCATTCTAA
Nad1b exon2 F	ATGCCTTTCTAGGAGCATTACG
Nad1b exon2 R	ACTTCATAAGAGACCATTTGAGCTG
Nad1b exon3 F	TGGTTTGGTATTCCCCTGTT
Nad1b exon3 R	TAATTCAGCTTCCGCTTCTG

*Matériel et Méthodes*

Nad1c exon4 F	TCTTCAATGGGGTCTGCTCT
Nad1c exon4 R	CATTAAGATCATATTGCATACTCTCC
Nad1c exon5 F	TTAATGGGACTTGGCTGGAA
Nad1c exon5 R	AGGAAGCCATTGAAAGGTGA
Nad2a exon1 F	TTTAGCGGTTTTCCAGAGA
Nad2a exon1 R	TAATCCAAGCCAACCCACAT
Nad2a exon2 F	GGCTGGTACCATTTTCGATGT
Nad2a exon2 R	TGAGCCGAGATCATAAAGAGC
Nad2b exon3 F	CTGGAGCTACCCACTTCGAT
Nad2b exon3 R	CGAAAAGGAACTGCAGTGAT
Nad2b exon4 F	GGATGCATTGCCATAGTTT
Nad2b exon4 R	GGGGTATTCCTGCGTATGAG
Nad2b exon5 F	TTTTTGATACACCTAGGACATGGAT
Nad2b exon5 R	ATGAACTGAGTGCCATTTGATG
Nad4 exon1 F	TTGCATTTTAGTGGGTTGGTC
Nad4 exon1 R	TAGGGATTAGCACGCTTTCCG
Nad4 exon2 F	GGAGTATGGGGTTCGAGACA
Nad4 exon2 R	AAATCGGTGGTTCCTGTTTG
Nad4 exon3 F	CCATGCCGAATTTTTCTACC
Nad4 exon3 R	GCGCTGCTAATGTGGCTACT
Nad4 exon4 F	GATGGGTGTTTACCCCAAAG
Nad4 exon4 R	TGAAATTTGCCATGTTGCAC
Nad5a exon1 F	GCTCGGTAGTTCGCTAGCAG
Nad5a exon1 R	AGCGCGACTTCATAAAAAGC
Nad5a exon2 F	ATTGGTGCTGTTGGGAAATC
Nad5a exon2 R	AAAGGGGAGCACCTTGCTAT
Nad5c exon4 F	GCCTTTGCAATGTTACTTGG
Nad5c exon4 R	TCAAAATGAAAGACGATCGATTA
Nad7 exon1 F	GACCTCAACATCCTGCTGCT
Nad7 exon1 R	CCACCACTTCTCCGTTTCATT
Nad7 exon2 F	GAGGGACTGAGAAATTAATAGAGTACA
Nad7 exon2 R	GATCAAAAATAAGGTAAAGCTTGAAGA
Nad7 exon3 F	GCTATGGATGTGGGAGCATT
Nad7 exon3 R	AGGCAGATCTTGTGCCACTC
Nad7 exon4 F	GTATGCTGGGATTTGCGAAG
Nad7 exon4 R	CATTGCACAATGATCCGAAG
Nad7 exon5 F	ATACCGCAGTTGAAGCACCT
Nad7 exon5 R	TCCTTGTAATGGGCAAAGC
QMR26SF	GACGAGACTTTTCGCCTTTTG
QMR26SR	CTTGGAGCGAATTGGATGAT
Rpl2 exon1 F	TGATGGCCGCTTATGTAGTG
Rpl2 exon1 R	TTTGGAGAGGAGAAGGCAGA
Rpl2 exon2 F	GAAGCAGGCAAAATGGTGAT
Rpl2 exon2 R	ACACAGTGAATAAGGGCTTAGGA
Rps3 exon1 F	CCGATTTCCGGTAAGACTTGG
Rps3 exon1 R	CACTGAACCGACTTGAATCTGA

## Matériel et Méthodes

Rps3 exon2 F	AGGTTGACCCACTTCATTCG
Rps3 exon2 R	GTTCCCGAGCATCAAGGTTA

**Tableau 16 - Oligonucléotides utilisés pour réaliser les q-RT-PCR "exon"**

Ci-dessous sont listés les oligonucléotides utilisés pour analyser le transcriptome mitochondrial ainsi que le niveau d'épissage de chaque intron mitochondrial.

Nom	Gene	Séquence
ccb452exon1F	ccmf <sub>c</sub>	CACATGGAGGAGTGTGCATC
ccb452exon2R	ccmf <sub>c</sub>	GTGGGTCCATGTAAATGATCG
mito037R	cox2	AGCAGTACGAGCTGAAAGGC
mito091R	nad2	CCCATTCCTAACCAGTGGAG
mito124F	nad7	ACCTCAACATCCTGCTGCTC
mito128F	nad7	AGTGGGAGAGCCGTGTTATG
mito131F	nad7	TAAAGTGAAGTGGTGGCCT
mito135F	nad7	CGGCCAAATGACTACAGGAT
mito170F	rpl2	TTAGGAAGAGCCGTACGAGG
mito186F	nad4	CCGTATGATGCGGAAGTCTC
mito211F	nad5	GTGAGTCCCATGCGTCAGT
mito337F	nad2	CTTATTCGTGGCAACCTTCC
mito338F	nad2	GCGCAATAGAAAGGAATGCT
mito338F	nad2	GCGCAATAGAAAGGAATGCT
mito338F	nad2	GCGCAATAGAAAGGAATGCT
NAD1_exon4_F	nad1	TCTTCAATGGGTCTGCTC
NAD1_exon4_R	nad1	AAAAGAGCAGACCCATTGA
NAD1exon2_R	nad1	GACCAATAGATACTTCATAAGAGACCA
nad2exon3F	nad2	CTATGGGTCTACTGGAGCTACCC
nad2exon3R	nad2	AAAGGAACTGCAGTGATCTTGA
nad4exon4R	nad4	TGAAATTTGCCATGTTGCAC
nad7exon2F	nad7	GAGGGACTGAGAAATTAATAGAGTACA
nad7exon2R	nad7	AAGGTAAAGCTTGAAGATAAGTTTTGT

*Matériel et Méthodes*

nuc18S_F	arn 18s nuc	AAACGGCTACCACATCCAAG
nuc18S_R	arn 18s nuc	ACTCGAAAGAGCCCGGTATT
QM0060F	nad5	AACATTGCAAAGGCATAATGA
QM0060R	nad5	GTTCTGCGTTTTCGGATAT
QM0070F	nad9	GGATGACCCTCGAAACCATA
QM0070R	nad9	CACGCATTTCGTGTACAAACC
QM0080F	rpl16	GAGCATTGCCAAACTCACA
QM0080R	rpl16	CGGACACTTTCATCGTGCTA
QM0090F	rps3	CCGATTTCCGGTAAGACTTGG
QM0090R	rps3	AGCCGAAGGTGAGTCTCGTA
QM0110F	ccmB	TCTTGGAATCACATCCAGCA
QM0110R	ccmB	CGAGACCGAAATTGGAAAAA
QM0160F	cox2	TGATGCTGTACCTGGTCGTT
QM0160R	cox2	TGGGGGATTAATTGATTGGA
QM0210F	rpl5	AAGGGGTTTCGACAGGAAAGT
QM0210R	rpl5	CGTATTTTCGACCGGAAAATC
QM0220F	cob	TGCCGAATGGTATTTCCCTA
QM0220R	cob	GCCAAAAGCAACCAAAACAT
QM0270F	nad6	TCGTCGGAATACATCCTGTCT
QM0270R	nad6	GTGAGTGGGTCAGTCGCCT
QM0285F	nad2	GGATCCTCCCACACATGTTC
QM0285R	nad2	GCGAGCAGAAGCAAGGTTAT
QM0290F	rps4	ACCCATCACAGATGCACA
QM0290R	rps4	TCACACAAACCCTTCGATGA
QM0410F	atp6-1	TCTTTTGCAGTCAATGCAC
QM0410R	atp6-1	TCTCGGTATCTCACATTGC
QM0480F	orfB	CCGTCGACTTATTGGGAAAA
QM0480R	orfB	TTCCTTGCCATGTACAACA
QM0510F	nad7	ACTGTCACTGCACAGCAAGC
QM0510R	nad7	CATTGCACAATGATCCGAAG
QM0520F	matR	AATTTTTGCGAGAGCTGGAA
QM0520R	matR	TTGAACCCCGTCCTGTAGAC
QM0560	rpl2	CGCAATTCATCACCATTTTG
QM0560F	rpl2	CCGAAGACGGATCAAGGTAA
QM0560R	rpl2	CGCAATTCATCACCATTTTG
QM0570F	orfX	GGGGTCTTTCTTTGGAAACC
QM0570R	orfX	TCTCCCTCATTCCACTCGTC
QM0580F	nad4	AATACCCATGTTTCCCGAAG
QM0580R	nad4	TGCTACCTCCAATTCCTGT
QM0640F	atpB	GGATCAGCTTGCGAATTTGT
QM0640R	atpB	GCAAATTGCTTCCCCACTAA
QM0650F	nad4L	GGGGAATCCTCCTTAATAGACG
QM0650R	nad4L	AACGAAAATGGCTAACCCAATA



*Matériel et Méthodes*

QM0730F	cox3	CCGTAACCTGGGCTCATCAT
QM0730R	cox3	AAACCATGAAAGCCTGTTGC
QM0830F	ccmF <sub>N1</sub>	AGCTCTTGGCATTGCTTTGT
QM0830R	ccmF <sub>N1</sub>	AGTGCCACAATCCCATTTCAT
QM0900F	ccmC	AGCTACGCGCAAATTCTCAT
QM0900R	ccmC	GCCGTGGCGATATAAACAAT
QM0960F	ccmF <sub>N2</sub>	CGTGTCGTTTCGTAATGGAAA
QM0960R	ccmF <sub>N2</sub>	TGATAAGCCCACCAACTTCC
QM0980F	rps12	AGCCAAAGTACGGTTGAGCA
QM0980R	rps12	TTTGGGTTTTTCTGCACCAT
QM0990F	nad3	CGAATGTGGTTTTCGATCCTT
QM0990R	nad3	GCACCCCTTTTCCATTTCATA
QM1080F	atp9	GGAGCTGCTATCGGTATTGG
QM1080R	atp9	TAGAGCAAAGCCCAAATGG
QM1120F	nad1	TCTGCAGCTCAAATGGTCTC
QM1120R	nad1	ATTCAGCTTCCGCTTCTGG
QM1170F	atp6-2	GCTTGGCAATCCTTGGTAGA
QM1170R	atp6-2	GACCAAGATGCAAGGGAAAA
QM1190F	atp1	TCACTTCGACACGTCTTTGC
QM1190R	atp1	GGAATGGCCTTGAATCTTGA
QM1270F	rps7	CTCGAACTGAACGCGATGTA
QM1270R	rps7	AAGCTGCTCAAGGATCCAA
QM1320F	nad2	TATTTGTTCTTCGCCGCTTT
QM1320R	nad2	CAAAGGAGAGGGGTATAGCAA
QM1360F	cox1	GTAGCTGCGGTGAAGTAGGC
QM1360R	cox1	CTGCCTGGATTTCGGTATCAT
QMccb452intronF	ccmF <sub>C</sub>	CCCGGATCGAATCAGAGTT
QMnad1exon1R	nad1	TTGCCATATCTTCGCTAGGTG
QMnad1exon3R	nad1	TCCGTTTGATCTCCCAGAAG
QMnad1exon3R	nad1	TCCGTTTGATCTCCCAGAAG
QMnad1exon3R	nad5	TCCGTTTGATCTCCCAGAAG
QMnad1exon5F	nad1	AGCCCGGGATCTTCTTGA
Qmnad1intron1R	nad1	CGTGCTCGTACGGTTCATAG
QMnad1intron2F	nad1	GGTTGGGTTAGGGGAACATC
QMnad1intron3R	nad1	GGGAGCTGTATGAGCGGTAA
QMnad1intron4R	nad1	ACGGAGCTGCATCCCTACT
QMnad2exon2R	nad2	AATATTTGATCTTAGGTGCATTTTC
QMnad2exon2R	nad2	AATATTTGATCTTAGGTGCATTTTC
QMnad2exon2R	nad5	AATATTTGATCTTAGGTGCATTTTC
QMnad2intron2F	nad2	CCCATCCGATAGTTTACAA
QMnad2intron3R	nad2	GGCGAATTTCAAACCTTGTGG
QMnad4exon1F	nad4	ATTCTATGTTTTTCCCGAAAGC
QMnad4exon2R	nad4	GAAAAACTGATATGCTGCCTTG

## Matériel et Méthodes

QMnad4exon3F	nad4	TTCCTCCATAAATTCTCCGATT
QMnad4intron2F	nad4	GCGGAACGACCAGAAAAATA
QMnad4intron3F	nad4	TCTAGCTTGGTTCGGAGAGC
QMnad5exon1R	nad5	CCATGGATCTCATCGGAAAT
QMnad5exon2F	nad5	TGGACCAAGCTACTTATGGATG
QMnad5exon2R	nad5	CTGGCTCTCGGGAGTCTCTT
QMnad5exon4F	nad5	AACTCGGATTCGGAAGAA
QMnad5intron1R	nad5	TTCGCAAATAGGTCCGACT
QMnad5intron2F	nad5	GTACGATCGTGTCGGGTGA
QMnad5intron2R	nad5	GTTTTGAAGCCGAGCCTTT
QMnad5intron3R	nad5	GCCGTGTAATAGGCGACCA
QMnad5intron4R	nad5	CCTGTAAACCCCATGATGT
QMnad7exon3R	nad7	TGGTACCTCGCAATTCAAAA
QMnad7exon4F	nad7	GATCAAAGCCGATGATCGTAA
QMnad7exon5R	nad7	AGGTGCTTCAACTGCGGTAT
QMnad7intron1F	nad7	ACGGTTTTTAGGGGGATCTG
QMR18SF	arn18s	CGTCACCTGGGTCAAAAAC
QMR18SR	ARN 18S	GCTTGAAAACCGAAGTGAGC
QMR26SF	ARN 26S	GACGAGACTTTCGCCTTTTG
QMR26SF	arn 26s	GACGAGACTTTCGCCTTTTG
QMR26SR	ARN 26S	CTTGGAGCGAATTGGATGAT
QMrps3intronR	rps3	TCTACGGCGGGTCACTAT

**Tableau 17 - Oligonucléotides utilisés pour l'analyse du transcriptome mitochondrial par q-RT-PCR**

Ci-dessous sont listés les oligonucléotides utilisés pour cartographier les extrémités 5' et 3' des ARNm mitochondriaux par c-RT-PCR :

Nom	Séquence
ccmF <sub>C</sub> M3	GTGGGAACATCTCTACTGAC
ccmF <sub>C</sub> M4	AGGATAAGTTGCGTTGGAAT
ccmF <sub>N1</sub> M3	ACGAAAAGACCCGAAATAA
ccmF <sub>N1</sub> M4	TGGAAAATGGACCGAGAAAA
ccmF <sub>N2</sub> M1	AAACCACCAACATGTCAAGAT
ccmF <sub>N2</sub> M2	CGCGAAGTACTCTTGT
ccmF <sub>N2</sub> M1	TCCTGATCAGAGACCACTGTGTTCCG
ccmF <sub>N2</sub> M2	AGCAGGCATCGGTCTGAGAACG
ccmF <sub>N2</sub> M3	ACCAACATGTCAAGATCCAA
ccmF <sub>N2</sub> M4	GAATTGAACTTCTTGCTGGG
cRT Nad1-Intron3	CCAACGCAATTCACAGAAATCCAC
cRT Nad1-Intron4	GACTCAGCAGCAGTGCGGAATTGAGT
cRT Nad1-Intron5	AATCCAGAGTGGATCAGGACGAG

## Matériel et Méthodes

cRT Nad1-Intron6	GAATCCAGGGCATACTCATCCTGGA
cRT Nad1-Intron1	GTTCTTGCCGGGAGAGTAGC
cRT Nad1-Intron2	GTCGACCACCACATAAGCCA
Nad1 E5 a CRT	CGTGCAGCATTTCACGATA
Nad1 E5 b CRT	CAATTAATGGGACTTGCCG
nad1 mat F	TTTAGTCACCTTTCAATGGC
nad1 mat R	CCAAGTATTTTCAGCTGGAAC
Nad1a-M1	CAGCTGGAACAGCTATGTACGT
Nad1a-M2	GGGTGGTCTAGTAATTAGGGG
Nad1b-M1	GCTCCTAGAAAGGCATATTTTCG
Nad1b-M2	CGGAAGCTGAATTAGTTGCA
Nad1c-M1	GATCATATTGGCATACTCTCCC
Nad1c-M2	GTCACCTTTCAATGGCTTCC
nad2 mat F	TTACTCATCAAATGGCACTC
nad2 mat R	AGGATCCGAACGAATTCTG
nad3-rps12 M3	AAAGAAAGAAGCAAAAGCCC
nad3 rps12 M4	AGATTGCCAGGTGTAAAT
nad4 mat F	CATCCGTAAGTAAGTACTAGTGC
nad4 mat R	AAGACCACTTAGATTAGAATAGC
nad4L-atp4 M3	GAACACCTGAAGTCCTTGAT
nad4L-atp4 M4	CGTTTTTCAGGACGATCTAGT
nad5 mat F	GAGTAGTTTTTATACAAAGTCAAGTC
nad5 mat R	AGGGGCAAAAATACGATAAG
nad6 M3	ATGGGAAACAAAACGGAATG
nad6 M4	GAAAGGTACGAAGTTGGACT
nad7 mat F	TCACCATCATAGGTAAGTCAAG
nad7 mat R	GATTTGCCTTTTCCTAGTCG
nad9 mat F	TTCGATTTTGCTAGTCCTTG
nad9 mat R	GTCTCCCAACTATATTTGAAAATG

**Tableau 18 - Oligonucléotides utilisés pour cartographier les extrémités 5' et 3' des ARNm mitochondriaux par c-RT-PCR**

Ci-dessous sont listés les oligonucléotides utilisés pour l'amplification par PCR de sondes à rétro-transcrire (*in vitro*) pour les expériences de gels-retard :

Nom	Séquence
CCMFN2-GS10	ATTCGCCGAAGGATGAGAT
CCMFN2-GS12	GCCTATGCAGTAGGATTAAGGAAAGTTATCC
CCMFN2-GS14	CGAAAAAACCCAACAATGTGAAAAG
CCMFN2-GS16	GATTCTAGAAGATGAGCTTGC
CCMFN2-GS18	GTTAACCAAAAAGATGCTGACACG
CCMFN2-GS2	CCACGTCGTCGAAGAAAGGGT
CCMFN2-GS20	GCAAAGCAAAGATCTGGACG

## Matériel et Méthodes

<b>CCMFN2-GS22</b>	GACTCGAACTTTCTCATTTATG
<b>CCMFN2-GS24</b>	AGGGCTATTTCTGATTCATTC
<b>CCMFN2-GS26</b>	GATTAAGGAAAGTTATCC
<b>CCMFN2-GS28</b>	GATGAGATCTTGCCATGCAG
<b>CCMFN2-GS30</b>	GATTCGCCGAAGGATGAGATC
<b>CCMFN2-GS32</b>	GTTATCCGAACAGTGAGACCC
<b>CCMFN2-GS34</b>	GGGAAGACTACTACTTCTGTAT
<b>CCMFN2-GS4</b>	CCAACAAAGAGGCGAAGTA
<b>CCMFN2-GS6</b>	TGCAGGACGAAATCCGGCAGC
<b>CCMFN2-GS8</b>	CCTTGACCATCTTCCGAAGTT
<b>nad1b-GS2</b>	CAGATCCCACTCAACCTTTT
<b>nad1b-GS4</b>	TCTCTCGACCAGGTCATCAT
<b>nad1b-GS6</b>	AATACTGCTAAATCTTTCCA
<b>nad4L-GS10</b>	GGCATTGACATAATAGGAATA
<b>nad4L-GS2</b>	CTGCGCAAGGCGGGCAGCCC
<b>nad4L-GS4</b>	GATAATCCAGGCAAGCTTCCC
<b>nad4L-GS4</b>	GGCTTGC GGGAAGCTTGCC
<b>nad4L-GS4-BIS</b>	CAACAGGCACGGGCGATAATCC
<b>nad4L-GS6</b>	GACAAGCTCGACCGAACACC
<b>nad4L-GS8</b>	GAAATATTTGATAAGATCCAT
<b>T7-CCMFN2-GS1</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGCTTCGGCGAATCATGT
<b>T7-CCMFN2-GS11</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGCAAAAATACAGAAGTAGTAGTCTTCCC
<b>T7-CCMFN2-GS13</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGGGCTTTCTTTGAAGAATTTGCG
<b>T7-CCMFN2-GS15</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGCTTTTCACATTGTTGGGTTTTTTCG
<b>T7-CCMFN2-GS17</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGGCAAGCTCATCTTCTAGAATC
<b>T7-CCMFN2-GS19</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGCGTGTCAGCATCTTTTGGTTAAC
<b>T7-CCMFN2-GS21</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGCGTCCAGATCTTTGCTTTGC
<b>T7-CCMFN2-GS23</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGCATAAATGAGAAAGTTCGAGTC
<b>T7-CCMFN2-GS25</b>	TAATACGACTCACTATAGGGTAGCCTTTGATTTATCAAAAAT
<b>T7-CCMFN2-GS27</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGTAGTAGTCTTCCCGGGTCTC
<b>T7-CCMFN2-GS29</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGGTCTCACTGTTCCGATAAC
<b>T7-CCMFN2-GS3</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGGTGCTCCCTACGACGGTAAAT
<b>T7-CCMFN2-GS31</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGATAACTTTCTTTTAATCCT
<b>T7-CCMFN2-GS5</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGCGCAACCCCGCCCGTTATGT
<b>T7-CCMFN2-GS7</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGCTTGCTGGGCTGGTTATT
<b>T7-CCMFN2-GS9</b>	ATGCTAATACGACTCACTATAGGGGAATGAATCAGGAAATAGCCCT
<b>T7-nad1b-GS1</b>	TAATACGACTCACTATAGGGCCTGGTCGAGAGAGTACGAT
<b>T7-nad1b-GS3</b>	TAATACGACTCACTATAGGGAACCTTTGGAAAGATTTAGCA
<b>T7-nad1b-GS5</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGTTGTAGCGCGCCTTCCCTC
<b>T7-nad4L-GS1</b>	TAATACGACTCACTATAGGGCTAGATCCCTCATGGGATCAA
<b>T7-nad4L-GS3</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGGGAAGCTTTTTTCGCAGGG
<b>T7-nad4L-GS3-BIS</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGGTGCCTGAACCGACGGGAAG
<b>T7-nad4L-GS5</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGGACGTGTCTGTTGTGAGGC
<b>T7-nad4L-GS7</b>	TAATACGACTCACTATAGGGCCCTAACCTAAATATCAAGGAC
<b>T7-nad4L-GS9</b>	TAATACGACTCACTATAGGGGATCCACGTTCCCGAAATGG

**Tableau 19 - Oligonucléotides utilisés pour l'amplification par PCR de sondes à rétro-transcrire pour les expériences de gels-retard**

Ci-dessous sont listés les oligonucléotides utilisés pour amplifier par PCR les sondes ADN ayant servi pour les expériences de northern-blot :

Nom	Séquence
mNad1-E1	AGTAAATAAAAAATCGAAAA
mNad1-E2	GGGGACCTACACATATTAG
mNad2-E1	GCAGAATTCGTTCCGGATC
mNad2-E2	TTTTGATGCTGCGATTACA
mNad3-E5	AAAGTGGGCTGTAATGATG
mNad3-E6	TCTTGTTGGGAGGTACTGC
mNad4-E1	AGAACATTTCTGTGAATGC
mNad4-E2	TACTCTTTCCATAACTTC
mNad4L-E3	AAATGGATCTTATCAAATA
mNad4L-E4	TTCTACAGCAATAGTACCT
mNad5-E1	CATGGCATGAATCACCGAAC
mNad5-E2	TTTTCGGACGTTTTCTAGGA
mNad6-E3	ACCATGATACTTTCTGTTTTG
mNad6-E4	TCGTCCTCCTCATTATAGTC
mNad7-E5	TCCACCTCTCCAAACACAAT
mNad7-E6	ACGAGCTCAATATATACGAGT
mNad9-E1	TTTCAAATATAGTTGGGAGAC
mNad9-E2	GCAAAATCGAAATAGCG
mccb6c-E1	TGGTCCAACCTACATAACTTTT
mccb6c-E2	CCTCATCTTGTCATTTTCGT
mccb6n1-E3	AAATCCTCTGGACGCT
mccb6n1-E4	ATGTTTGAATTTTAGGGTAAA
mccb6n2-E3	GAAGCGTGTCGTTTCGTAAT
mccb6n2-E4	GAGCCGAGTGACGTAGA
mccb2-E1	CTGTGCACCGAAAGGTAC
mccb2-E2	CGAGAAACGGTTAGGG
mccb3-E1	GGTTGTTCTTAACAGCGATG
mccb3-E2	AGCTTTTGAAAACGCAGTG

**Tableau 20 - Oligonucléotides utilisés pour l'amplification par PCR de sondes ADN pour les expériences de northern-blot**

Ci-dessous sont listés les oligonucléotides utilisés pour déterminer le taux d'édition de quelques ARNm mitochondriaux :

Nom	Séquence
édition atp4 F	ATGAGATTGAGTTCGACGAATATG
édition atp4 R	AAGAGAAACCCCCCCCCGAAC
édition ccmB F	ATGAGACGACTTTTTCTTGAAC
édition ccmB R	TTAATCTTGTAATAACTAATCGAG
édition cob F	ATGACTATAAGGAACCAACGATTC
édition cob R	TCAGGTGTGATCAGTCTCATCC
édition rps4 F	ATGTGGCTGCTTAAAAAACTG
édition rps4 R	TTATATGTTTTGGCCACGTCCG

Tableau 21 - Oligonucléotides utilisés pour déterminer le taux d'édition de quelques ARNm mitochondriaux

### 7.1.5. Outils informatiques

Durant ma thèse, les outils informatiques suivants ont été utilisés :

- Pubmed : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Serveurs Galaxy : <http://galaxy.sb-roscoff.fr> et <http://galaxy.igmors.u-psud.fr/root>
- Blast : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Expasy protparam : <http://web.expasy.org/protparam/>
- Clustal omega : <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- Mendeley : <https://www.mendeley.com/>
- IGV : <http://igv.org>
- Serial Cloner : [http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)
- Suite microsoft office : <https://www.microsoftstore.com/>
- TPR pred : <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/tprpred>

## 7.2. Méthodes

### 7.2.1. Protocoles de biologie végétale

#### 7.2.1.1. Stérilisation de graines

Les graines incubent 10 min dans un premier tampon comprenant 70 % d'éthanol et 0,05 % de SDS puis 10 minutes dans un second tampon comprenant 95 % d'éthanol. Le surnageant est retiré à la pipette et les graines sont mises à sécher sous une hotte. Les graines ainsi stérilisées sont prêtes à être semées *in vitro*, ou peuvent être conservées environ 2 mois.

#### 7.2.1.2. Sauvetage de mutants embryon-létaux d'Arabidopsis

Les homozygotes mutants issus de la lignée 515489 et n'exprimant pas la protéine RFL22 présente un phénotype embryon-létal. De façon à pouvoir l'étudier malgré tout, il a été mis au point au laboratoire un protocole de sauvetage *in vitro* permettant sa survie (Dahan et al., 2014). Des graines blanches immatures contenant les embryons mutants et issues de plantes hétérozygotes sont sorties de leur silique préalablement stérilisée puis cultivées pendant 10 jours sur le milieu de culture MRP. Elles sont repiquées 10 jours plus tard sur le milieu de culture MRPlant où elles poursuivent leur croissance, durant 6 mois environ. Les plantules sont repiquées toutes les 3-4 semaines sur un nouveau milieu MRPlant de façon à toujours pousser sur un milieu riche en nutriments.

**Protocole de stérilisation** : Les siliques incubent 1 min dans une solution d'éthanol 96%, puis 4 min dans une solution à 1% d'eau de javel et 1% de Tee-pol, puis sont lavées 3 fois 1 min dans de l'eau stérile.

#### Composition des milieux MRP et MRPlant :

Composants	Milieu MRP	Milieu MRPlant
Macroéléments de Monnier	1X	1X
Microéléments de Monnier	1X	1X
Saccharose	80 g/L	20 g/L
Inositol	0,55 mM	0,55 mM
Thiamine HCl	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
Pyridoxine HCl	2,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ M
Biotine	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M

## Matériel et Méthodes

Nicotinamide	5 µM	5 µM
Panthothénate Ca	0,5 µM	0,5 µM
Choline Chloride	5 µM	5 µM
Acide Malique	500 µM	500 µM
Acide citrique	500 µM	500 µM
Hydrolat de caséine	400 mg/L	400 mg/L
Fe-EDTA 100 X	3 mL	10 mL
Gelrite	2 g/L	2 g/L

**Tableau 22 - Composition des milieux de cultures MRP et MRPlant**

### Macroéléments de Monnier :

Eléments	Concentration dans une solution 1X
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	880 mg/L
KCl	350 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/L
KNO <sub>3</sub>	1900 mg/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370 mg/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825 mg/L

**Tableau 23 - Composition de la solution Macroéléments de Monnier**

### Microéléments de Monnier :

Eléments	Concentration dans une solution 1X
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,05 mg/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12,4 mg/L
KI	1,66 mg/L
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	33,6 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,5 mg/L
ZnSO <sub>4</sub>	21 mg/L

**Tableau 24 - Composition de la solution Microéléments de Monnier**



### 7.2.1.3. Complémentation fonctionnelle de mutants

Nous avons procédé à la complémentation fonctionnelle de mutants hétérozygotes d'*Arabidopsis* par transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens*, selon la procédure décrite ci-après.

#### Obtention d'un gène chimère portant le promoteur d'une espèce et la séquence codante d'une autre

Nous avons complétement le mutant *rfl22* avec les gènes homologues les plus proches en séquence chez *A. lyrata* et *B. rapa*. Pour ce faire, nous avons choisi de fusionner le promoteur d'*A. thaliana* avec les gènes orthologues putatifs chez *A. lyrata* (code du gène : XM\_021035114.1) ou *B. rapa* (code du gène : XM\_009114453.1), respectivement. Dans chaque cas, le promoteur et la séquence codante ont été amplifiés séparément, par la PCR#1 et la PCR#2 respectivement avec des oligonucléotides créant une zone de chevauchement de 40 bases entre les produits de PCR obtenus, permettant de procéder à la PCR#3, qui a pour but de joindre le promoteur d'*A. thaliana* et le gène de l'espèce souhaitée (Figure 70).

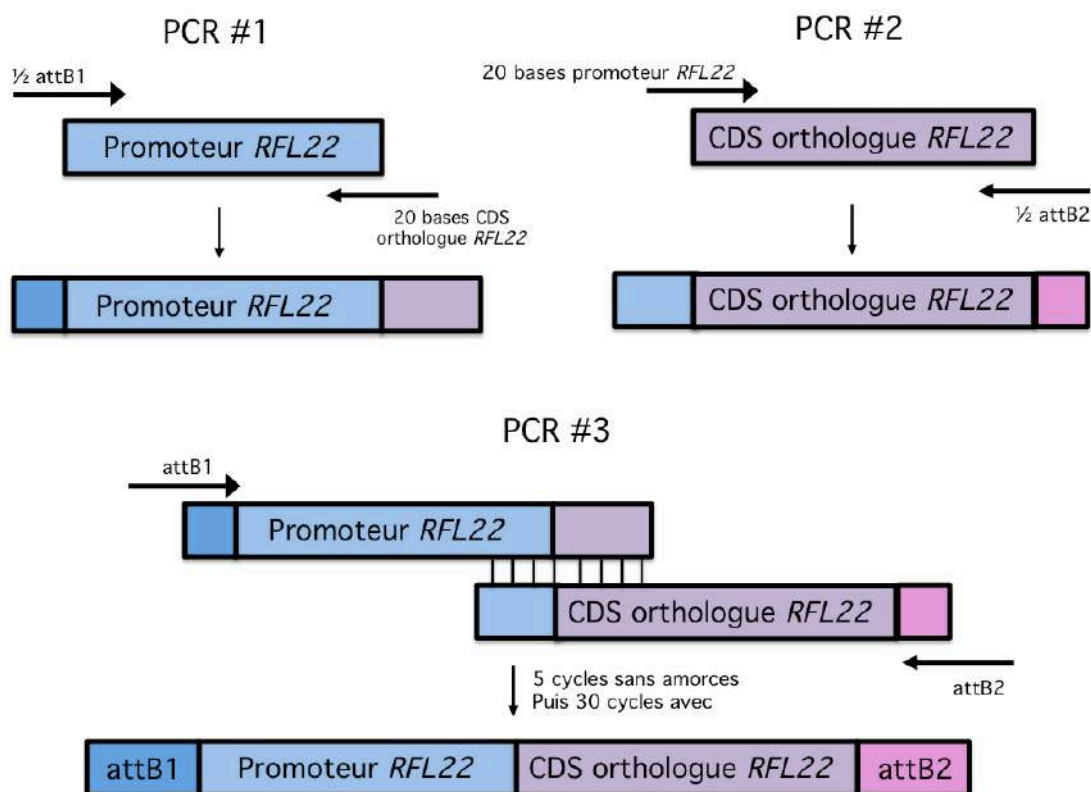


Figure 70 - Schéma représentant les différentes étapes de la création de gènes chimères comportant le promoteur du gène *RFL22* d'*Arabidopsis thaliana* et la séquence codante des orthologues les plus proches chez *Arabidopsis lyrata* et *Brassica rapa*.

### Clonage du gène

Une fois les gènes chimères obtenus, ils ont été clonés grâce à la méthode Gateway® (Thermo Fisher Scientific). Le protocole du clonage Gateway® est expliqué au point 7.2.2.6. Une fois le gène chimère cloné dans le plasmide pGWB1, ce dernier a été transformé par électroporation dans la souche C58C1 d'*Agrobacterium*.

### Culture d'*Agrobacterium* et transformation d'*Arabidopsis*

Les clones obtenus ont été criblés par PCR, puis six d'entre eux ont été mis en pré-culture dans 50 mL de milieu LB-RGK une nuit à 28°C puis en culture dans 500 mL de milieu LB-RGK pour une autre nuit. Le jour de la transformation, la culture bactérienne (dont la  $DO_{600nm}$  doit être comprise entre 0,8 et 1) est centrifugée 15 min à 7 000 g et à 4°C. Le culot est repris dans 500 mL d'un tampon comprenant 5 % de saccharose et 100  $\mu$ L de

silwet. Pour procéder à la transformation, les plantes d'*Arabidopsis* (âgées d'environ 5-6 semaines) sont retournées et les fleurs sont trempées pendant 2 min dans la solution d'*Agrobacterium* obtenue puis sont placées en chambre de culture. Environ 4 à 6 semaines après la transformation, les graines de plantes infiltrées sont récupérées. Après battage et stérilisation, elles sont semées *in vitro* dans un milieu de culture comprenant 40 µg/mL d'hygromycine, permettant de sélectionner les graines portant la construction désirée. Les plantes résistantes ont ensuite été génotypées par PCR.

LB-RGK : milieu LB auquel sont ajoutés 50 µg/mL de rifampicine, 25 µg/mL de gentamycine et 50 µg/mL de kanamycine

## **7.2.2. Protocoles de biologie moléculaire**

### **7.2.2.1. Extraction d'ADN génomique en plaque 96 puits**

Cette technique permet d'obtenir de l'ADN de 96 échantillons en parallèle et de qualité suffisante pour réaliser des génotypages par amplification PCR.

Après avoir mis une bille métallique, 150 µL de tampon « Rapido » et une petite feuille à génotyper dans chaque tube d'une plaque 96 puits, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur (Retsch) 2 fois 1 min 30 à 30 Hz. Les tubes sont ensuite vortexés et les plaques centrifugées 10 min à 3 200 g et à température ambiante. Une fois les débris cellulaires culotés, le surnageant de chaque tube est transféré dans une plaque 96 puits, puis 100 µL d'isopropanol sont ajoutés pour permettre la précipitation de l'ADN. Les plaques sont centrifugées 10 min à 3 200 g et à température ambiante, puis l'isopropanol est retiré tandis que 100 µL d'éthanol 70 % froid (-20°C) sont ajoutés à chaque puits, permettant de laver le culot obtenu. Les plaques sont de nouveau centrifugées 5 min à 3 200 g et à température ambiante, puis l'éthanol est retiré. Les culots sont mis à sécher 30 min à 37°C, puis sont repris dans 40 µL d'eau. Il est préférable de laisser l'eau au contact du culot pendant une nuit à 4°C avant de procéder à la PCR..

**Tampon Rapido** : 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS.

### **7.2.2.2. Extraction d'ADN génomique en tubes individuels**

Cette technique permet d'obtenir de l'ADN plus propre que l'extraction en plaque 96 puits. De plus, elle permet de génotyper des plantes en partant d'une plus petite quantité de matériel.

Après avoir prélevé 20 à 200 mg de matériel frais dans un tube eppendorf, 150  $\mu$ L de tampon « Rapido » et un peu de sable de Fontainebleau sont ajoutés au tube. La feuille est ensuite broyée pendant 45 secondes à l'aide d'un pilon associé à un broyeur (Bioblock Scientific), puis après avoir rajouté 150  $\mu$ L de tampon Rapido, le tube est vortexé 5 secondes. Lorsque tous les échantillons sont broyés, les tubes sont centrifugés 10 min à 13 000 g et à température ambiante, puis le surnageant (200  $\mu$ L) est transféré dans de nouveaux tubes contenant 200  $\mu$ L d'isopropanol. Après agitation, les tubes incubent 2 min à température ambiante et sont centrifugés 5 min à 13 000 g et à température ambiante, puis le surnageant est éliminé et les culots mis à sécher pendant 15 min à 55°C. Les culots secs sont repris dans 40  $\mu$ L d'eau. Il est préférable de laisser l'eau au contact du culot pendant une nuit à 4°C avant de procéder à la PCR.

**Tampon Rapido** : 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS.

### **7.2.2.1. Extraction d'ARN total**

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Un gel d'agarose a systématiquement été réalisé pour vérifier l'intégrité des ARN purifiés.

### **7.2.2.2. Migration d'ADN ou ARN sur gel d'agarose**

L'analyse de produits de PCR et les contrôles qualité d'ARN totaux ont été réalisés par migration au travers de gels d'agarose comprenant 1 à 3 % d'agarose et 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ou 1X TAE (Tris-Acétate-EDTA), et 0,5  $\mu$ g/mL de BEt (Bromure d'éthidium).

**10X TBE** : 1 M Tris-Base, 1 M acide borique, 20 mM EDTA

**10X TAE** : 400 mM Tris, 200 mM Acétate, 10 mM EDTA

### 7.2.2.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne : PCR

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR permet d'amplifier un fragment d'ADN spécifique à l'aide de deux oligonucléotides convergents et d'une ADN polymérase. Durant ma thèse j'ai utilisé deux types d'ADN polymérase ; la Taq et la phusion (NEB). La polymérase phusion a été utilisée lorsqu'il était nécessaire d'obtenir une séquence sans mutation, ce qui est par exemple le cas pour les clonages de gènes, tandis que la Taq polymérase a été utilisée pour tous les autres types de PCR.

Les PCR m'ont notamment servi à :

- génotyper des plantes
- cloner des gènes
- cribler des bactéries après un clonage (p-TOPO, BP ou LR)
- produire des sondes ADN pour les northern-blot
- produire des sondes ADN à transcrire *in vitro* pour les expériences de gels-retard

Lorsque cela était nécessaire, les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Ci-dessous sont présentés les programmes d'amplification utilisés pour chaque polymérase :

Etape	Température	Durée	
Dénaturation initiale	94°C	5'	x1
Dénaturation	94°C	30''	
Hybridation	52-60°C	30''	x25-35
Polymérisation	72°C	1' par kb	
Extension finale	72°C	10'	x1

Tableau 25 - Programme d'amplification utilisé avec l'ADN polymérase Taq

Etape	Température	Durée	
Dénaturation initiale	98°C	30''	x1
Dénaturation	98°C	10''	
Hybridation	45-72°C	30''	x25-35
Polymérisation	72°C	30'' par kb	
Extension finale	72°C	10'	x1

Tableau 26 - Programme d'amplification utilisée avec l'ADN polymérase Phusion

#### 7.2.2.4. PCR sur de l'ADN complémentaire issu d'ARN circularisé : C-RT-PCR

Les ARN totaux de fleurs ou d'individus entiers ont été extraits à l'aide du kit RNeasy® Plant Mini Kit (Quiagen) selon les recommandations du fournisseur, puis circularisés et enfin rétro-transcrits avant qu'une PCR ne soit réalisée sur les ADN complémentaires ainsi obtenus. 5 µg d'ARN total sont circularisés à l'aide de la T4 RNA ligase (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN circularisés obtenus sont dilués au quart, extraits avec 1 volume d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (125:24:1) (Fluka Analytical) puis précipités une nuit dans au moins 50 % final d'isopropanol froid.

L'ARN total précipité est alors centrifugé pendant 30 min à 13 000 g et à 4°C, puis le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 70 % et l'ARN est de nouveau centrifugé 15 min à 13 000 g et à 4°C. Le culot est ensuite mis à sécher puis repris dans 14,5 µL d'eau avant de procéder à la réverse transcription en ADN complémentaire avec la reverse transcriptase M-MLV (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc obtenus sont dilués au quart puis aliquotés et stockés à -20°C. Les PCR sont réalisées à partir de 5 µL des ADNc ainsi obtenus. Les produits de PCR ont été analysés soit par séquençage après purification sur gel, soit en les clonant dans le vecteur pCR2.1®-TOPO® TA (ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. Les plasmides issus du clonage ont été transformés par électroporation dans des bactéries *E. coli* (souche DH10B ou DH5alpha), les bactéries ont été criblées par amplification PCR et les inserts ont été séquencés.

### 7.2.2.5. RT-PCR quantitative : q-RT-PCR

La q-RT-PCR est une expérience permettant de quantifier l'abondance des ARN. En fonction de la position relative des oligonucléotides, nous avons pu quantifier l'abondance d'un exon particulier, d'un intron, ou encore deux exons adjacents (et donc en déduire le taux d'épissage d'un intron donné).

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 mg de fleurs à l'aide du kit RNeasy® Plant Mini Kit (Quiagen), puis ont subi un traitement DNase à l'aide du kit RTS DNase (Ozyme) avant d'être rétro-transcrits par la RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific), selon les recommandations des fournisseurs respectifs. Les ADNc ainsi produits ont été dilués au 150<sup>ème</sup> avant de procéder à la réaction de q-RT-PCR. La réaction a lieu dans un volume total de 10 µL répartis comme suit :

- 5 µL de mix q-PCR 2X Bio-Rad SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix
- 2 µL du mélange des 2 oligonucléotides à 2,5 mM chacun
- 3 µL d'ADNc dilués au 150<sup>ème</sup>

Le programme appliqué était le suivant :

Etape	Température	Durée	
Dénaturation initiale	95°C	60''	x1
Dénaturation	95°C	5''	
Hybridation/Polymérisation	60°C	20''	x40
Extension finale	72°C	10'	x1
Melt curve	65 -> 95°C (pas de 0,5°C)	5'' par pas	x1

**Tableau 27 - Programme utilisé pour les q-RT-PCR**

Chaque réaction de q-RT-PCR a été réalisée en 2 ou 3 réplicats biologiques et 3 réplicats techniques, répartis sur 24 à 48 plaques 96 puits. Les résultats ont été analysés à la main grâce à un tableur Excel.

Les résultats de chaque réplicat biologique ont été normalisés avec l'ARN nucléaire 18S et sont donc exprimés en proportion de l'ARN nucléaire 18S, ceux obtenus sur des jours consécutifs ont été normalisés avec l'ARN26S. Les résultats finaux sont exprimés pour

chaque transcrit en  $\log_2$  de l'abondance de ce transcrit chez le mutant divisé par l'abondance du même transcrit chez le sauvage.

Les expériences de q-RT-PCR nous ont également permis de mesurer le taux d'épissage de chaque intron. Pour cela, nous avons mesuré l'abondance de chaque intron épissé et non épissé et avons, pour chaque génotype, nous avons divisé ces valeurs l'une par l'autre pour obtenir une efficacité d'épissage spécifique de chaque intron. Les résultats finaux sont exprimés en  $\log_2$  de l'efficacité d'épissage d'un intron donné chez le mutant divisé par l'efficacité d'épissage du même intron chez le sauvage.

#### **7.2.2.6. Clonage Gateway®**

Le clonage Gateway® permet de cloner en deux étapes un fragment d'ADN dans un plasmide receveur. Dans mon cas, il a s'agit dans un premier temps de cloner un produit de PCR doté de séquences flanquantes attB1 et attB2 dans un plasmide dit « donneur » (réaction BP) puis d'amplifier ce plasmide afin de sous-cloner le gène d'intérêt dans un plasmide pGWB1 (Nakagawa, 2007) dit « destinataire» (réaction LR). Les réactions BP et LR ont été réalisées respectivement avec les mix Gateway BP Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) et Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur.

**Séquence attB1** : GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T

**Séquence attB2** : GGGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG T



### 7.2.2.7. Amplification de plasmides dans *E. coli* (souches DH10B ou DH5 $\alpha$ )

#### Jour 1 : Transformation de bactéries compétentes

Les amplifications de plasmides ont été réalisées à l'aide des souches DH10B d'*E. coli*. Après transformation par électroporation des bactéries et ajout d'1 mL de milieu LB, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri comprenant un milieu LB gélosé à 100  $\mu$ g/mL de carbénicilline. Les boîtes sont mises à incubées une nuit à 37°C.

#### Jour 2 : Culture sur la nuit

Le lendemain, un clone est mis en pré-culture une nuit à 37°C dans 100 mL de LB à 100  $\mu$ g/mL de carbénicilline.

#### Jour 3 : Purification de plasmides

Après centrifugation de 2 x 5 mL de la culture à 13 800 g pendant 1 min à 4°C, les culots sont repris dans 500  $\mu$ L d'eau et transférés dans des tubes eppendorf, qui sont quant à eux centrifugés à 17 000 g pendant 1 min à 4°C. Les plasmides sont extraits du culot avec le kit NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

### 7.2.2.1. Northern-blot

#### Séparation des ARNs et transfert sur membrane de nylon

Après dénaturation 10 min à 65°C, les ARNs sont chargés sur un gel à 1,5 % d'agarose, comprenant 5 % de formaldéhyde et du MOPS 1X. La migration se fait dans un tampon MOPS 1X sous une tension de 100 V, durant 5 heures. Après la migration, le gel est lavé 4 fois 5 min dans de l'eau, puis les ARN sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon (GeneScreen Hybridization Transfer Membrane) selon le montage représenté en Figure 71. Après 20 à 24h de transfert, les ARNs sont fixés à la membrane par irradiation aux ultra-violets (1200 J) avec l'appareil UltraLum (Serlabo), puis elle est mise à sécher pour au moins 2h.

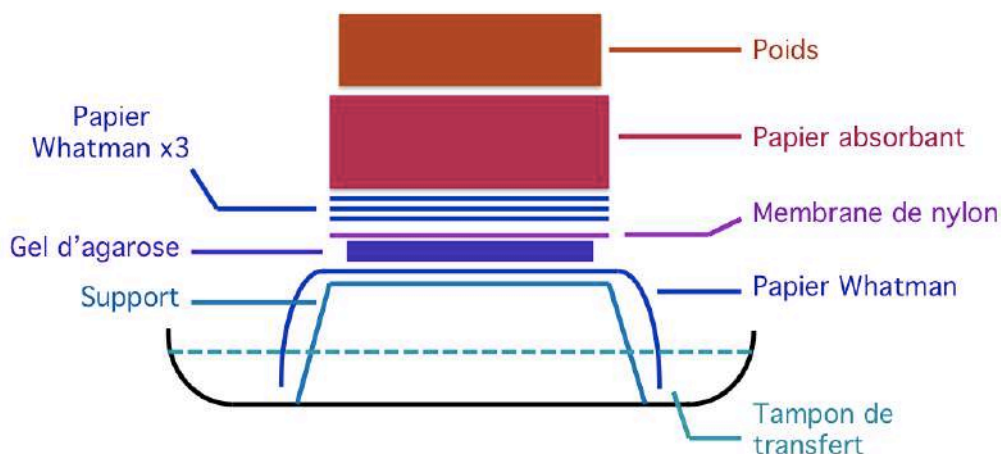


Figure 71 - Schéma représentant le transfert d'ARN d'un gel d'agarose sur une membrane de nylon

#### Hybridation et révélation des signaux

La membrane est pré-hybridée au moins 1h dans un four à hybridation chauffé à 65°C dans 20 mL de tampon Perfect Hyb™ Plus Hybridization Buffer (Sigma) auquel on ajoute 1 mg d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 3 min à 100°C, puis hybridée une nuit par ajout au tampon de pré-hybridation d'une sonde marquée au <sup>32</sup>P. Le marquage de la sonde ADN est réalisé avec le kit Prime a gene Labelling System (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La sonde marquée a été séparée des nucléotides libres par centrifugation pendant 4 min à 600 g à travers une colonne permettant de réaliser une chromatographie d'exclusion de taille : Micro Bio-Spin® P-30 Chromatography Columns (Bio-Rad). La sonde marquée est dénaturée 3 min à 100°C puis refroidie sur glace pendant 1 min avant d'être ajoutée au tampon d'hybridation. La membrane hybride sur la nuit dans un four à hybridation chauffé à 65°C.

Le lendemain, la membrane est lavée 2 fois 15 minutes à 65°C dans un tampon 2X SSC, 0,1 % SDS, puis 1 fois 15 min à 65°C dans un tampon 0,1X SSC, 0,1 X SDS. La membrane est ensuite mise à exposer sur un écran de phosphoimager (Fujifilm) pendant une nuit, puis la visualisation des signaux se fait avec l'appareil Typhoon FLA9500 (GE Healthcare) et le logiciel associé.

**Tampon MOPS 10X** : 200 mM MOPS, 50 mM Sodium Acétate, 10 mM EDTA. Ajuster à pH 7 avec de la soude.

**Tampon MOPS 1X** : 100 mL de MOPS 1 %, 20 mL de formaldéhyde 37 %, qsp 1L d'H<sub>2</sub>O.  
**Tampon SSC 20X** : 3 M NaCl, 300 mM Citrate de Sodium.

### 7.2.3. Protocoles de biochimie

#### 7.2.3.1. Western-blot

##### Migration & Transfert

Après avoir été dénaturés 10 min à 100°C, les extraits protéiques ou protéines purifiées (diluées dans une solution de Laemmli 5X) sont chargées sur un gel SDS-PAGE et migrent pendant environ 1h. La membrane de PVDF (PolyVinylidene Fluoride) d'une porosité de 0,22  $\mu$ m est activée dans une solution d'éthanol 96 % pendant 1 min avant toute utilisation, puis est équilibrée 15 min dans le tampon de transfert pré-refroidit (4°C). Le papier whatman et le(s) gel(s) à transférer sont également équilibrés 15 min dans le tampon de transfert pré-refroidit. Les protéines sont transférées sur la membrane PVDF à l'aide de l'appareil Trans-Blot® Turbo™ Transfert System (Bio-Rad), permettant de faire un transfert en conditions semi-sèches en 30 minutes.

##### Blocage de la membrane, hybridation et détection des signaux

A la suite du transfert, la membrane est pré-hybridée une nuit à 4°C dans une solution de TBS-T comprenant 5 % de lait (ou 3% de BSA). Le lendemain, la membrane incube 3h à température ambiante dans la même solution à laquelle est ajoutée l'anticorps primaire (1/4000). Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS-T, la membrane incube 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (1/5000 à 1/10000) dans une solution de TBS-T comprenant 5 % de lait (ou 3% de BSA), puis est de nouveau lavée 3 fois 10 minutes avec du TBS-T avant que les signaux ne soient révélés à l'aide des solutions Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate (PerkinElmer) selon les instructions du fournisseur.

**Laemmli 5X** : 120 mM Tris base, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,02 % Bleu de bromophénol  
**Tampon de transfert** : 250 mM Tris, 1,9 M Glycine, 20 % éthanol, pH 8,3.  
**Tampon TBS 10 X** : 24 g de Tris-Base, 88 g NaCl dans 1 L final, pH ajusté à 7,6.  
**Tampon TBS-T 1 X** : 100 mL TBS 10X, 900 mL d'eau, 0,1 % Tween 20.

### **7.2.3.2. Profilage de ribosomes**

Le protocole de profilage de ribosomes utilisé dans ce manuscrit est adapté de ceux publiés par les équipes d'Oliver Namy (Baudin-Baillieu et al., 2016) et d'Alice Barkan (Zoschke et al., 2013). Un schéma simplifié du protocole est représenté en Figure 72.

#### Jour 1 : Broyage des bourgeons floraux et extraction de l'ARN total

Environ 2,5 g de fleurs sont broyées dans l'azote liquide puis repris dans 15 mL de tampon d'extraction de polysomes. Le broyat est clarifié par trois centrifugations successives de 10 min à 15 000 g et à 4°C, puis plongé dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'au lendemain. L'ARN total est extrait d'un aliquot de 300 µL, puis quantifié afin d'estimer l'absorbance à 260 nm du broyat de fleurs initial. L'ARN a été extrait au Tri-Reagent (Sigma) selon les recommandations du fournisseur puis précipité avec 1 à 2 volume(s) d'isopropanol, à -20°C pendant une nuit.

#### Jour 2 : Digestion des polysomes par la RNase I (Ambion) et sédimentation des ribosomes

L'ARN total précipité la veille est centrifugé pendant 30 min à 13 000 g et à 4°C, puis le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 70 % par tube, puis l'ARN est de nouveau centrifugé, 15 min à 13 000 g et à 4°C. Le culot d'ARN est mis à sécher puis repris dans 100 µL d'eau et quantifié au Nanodrop. La quantification permet de connaître l'absorbance de l'ARN dans le broyat initial et d'adapter la quantité de RNase à chaque échantillon. Les polysomes sont ensuite décongelés à température ambiante puis digérés par 10 U/DO/mL de RNase I (Ambion) pendant 1h à 25°C, et ensuite ultra-centrifugés au travers d'un coussin de saccharose 1M, pendant 3 h à 24 000 rpm (Rotor FT 65-13). Le culot obtenu est repris dans 600 µL de tampon d'extraction d'ARN I, puis les ARNs digérés sont extraits au Tri-Reagent® (Sigma) selon les recommandations du fournisseur.

#### Jour 3 : Purification sur gel des empreintes de ribosomes

L'ARN précipité est centrifugé pendant 30 min à 13 000 g et à 4°C, puis le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 70 % par tube et centrifugé 15 min à 13 000 g et à 4°C. Le culot est mis à sécher puis est repris dans 100 à 200 µL d'eau et quantifié au Nanodrop. Les empreintes ribosomiques sont purifiées sur un gel dénaturant comprenant 7 M d'urée et 17

% d'acrylamide. Environ 600  $\mu$ g d'ARN digérés par la RNase I (Ambion) sont purifiés pour chaque réplicat. Les gels pré-migrent environ 1 h à 90 V et à 50°C puis après chargement des échantillons, ils migrent pendant environ 16 h à 90 V et à 50°C.

Jour 4 : Découpe des bandes d'acrylamide et élution des empreintes ribosomiques

Les gels sont colorés dans une solution 1X de TAE comprenant 1/10 000 d'une solution de SybrGold (Thermo Fisher Scientific) pendant 30 minutes à l'obscurité. A l'aide des marqueurs de taille ARN à 27 et 33 nucléotides, les bandes correspondantes sont découpées sur une plaque UV et « pulvérisées » par centrifugation à travers un tube de 0,5 mL troué mis à l'intérieur d'un tube de 2 mL. Les fragments de gel pulvérisés incubent toute la nuit à 4°C dans le tampon d'extraction d'ARN II pour resuspendre les ARN par diffusion.

Jour 5 : Extraction au Tri-Reagent des empreintes ribosomiques

Le mélange comprenant les fragments de gel et le tampon d'extraction d'ARN II est passé à travers un filtre Spin-X® Centrifuge Tube Filter (Costar) par centrifugation de façon à éliminer les morceaux de gel. Une extraction des ARN au Tri-Reagent® (Sigma) est réalisée sur la solution d'ARN récupérée selon les recommandations du fournisseur.

Jour 6 : Récupération et quantification des empreintes ribosomiques

L'ARN précipité la veille est centrifugé pendant 30 min à 13 000 g et à 4°C, puis rincé avec 500  $\mu$ L d'éthanol 70 %, et centrifugé 15 min à 13 000 g et à 4°C. Le culot est mis à sécher, repris dans 20  $\mu$ L d'eau puis l'ARN est quantifié avec un Nanodrop. Les empreintes de ribosomes sont stockées à -80°C.

Jour 7 : Digestion de l'ADN et déplétion des ARN ribosomiques contaminants.

De façon à éliminer l'ADN contaminant, l'échantillon est traité à la DNase I (Fermentas) selon les recommandations du fournisseur. Par la suite, pour retirer les ARNs ribosomiques contaminants, l'échantillon est traité avec le kit Ribo-Zero™ rRNA Removal Kit (Plant Leaf) (Epicentre) selon les recommandations du fournisseur. Les empreintes ribosomiques sont stockées à -80°C.

## *Matériel et Méthodes*

La préparation des banques d'ADNc à partir des empreintes de ribosomes a été réalisée par la plateforme imagif (CNRS) avec le kit Small RNA Truseq d'Illumina (Trouver le nom exact). Le séquençage haut débit a été réalisé par la société Beckman avec un séquenceur Hi-seq. Les analyses bio-informatiques ont été réalisées par nos collaborateurs Pierre Bertin et Olivier Namy (I2BC – Institut de Biologie Intégrative de la Cellule de l'Université Paris-Saclay).

**Tampon d'extraction des polysomes** : 200 mM Saccharose, 200mM KCl, 40 mM Tris-acétate pH 8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercaptoéthanol, 2 % Polyoxyethylene (10) tridecyl ether, 1% Triton, 100 μg/mL Chloramphénicol, 100 μg/mL Cycloheximide.

**Coussin de saccharose** : 1 M Saccharose, 100 mM KCl, 40 mM Tris-acétate pH 8, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoéthanol, 100 μg/mL Chloramphénicol, 100 μg/mL Cycloheximide.

**Tampon d'extraction d'ARN I** : 100 mM EGTA pH 8, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 10 mM Tris-acétate pH 8, 1 mM EDTA

**Tampon d'extraction d'ARN II** : 10 mM Tris-acétate pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,2 % SDS

**Gel dénaturant** : 17 % acrylamide, 7 M Urée, 1X TAE

**Tampon de migration** : 1X TAE

**Tampon 1X TAE** : 40 mM Tris, 20 mM Acétate, 1mM EDTA

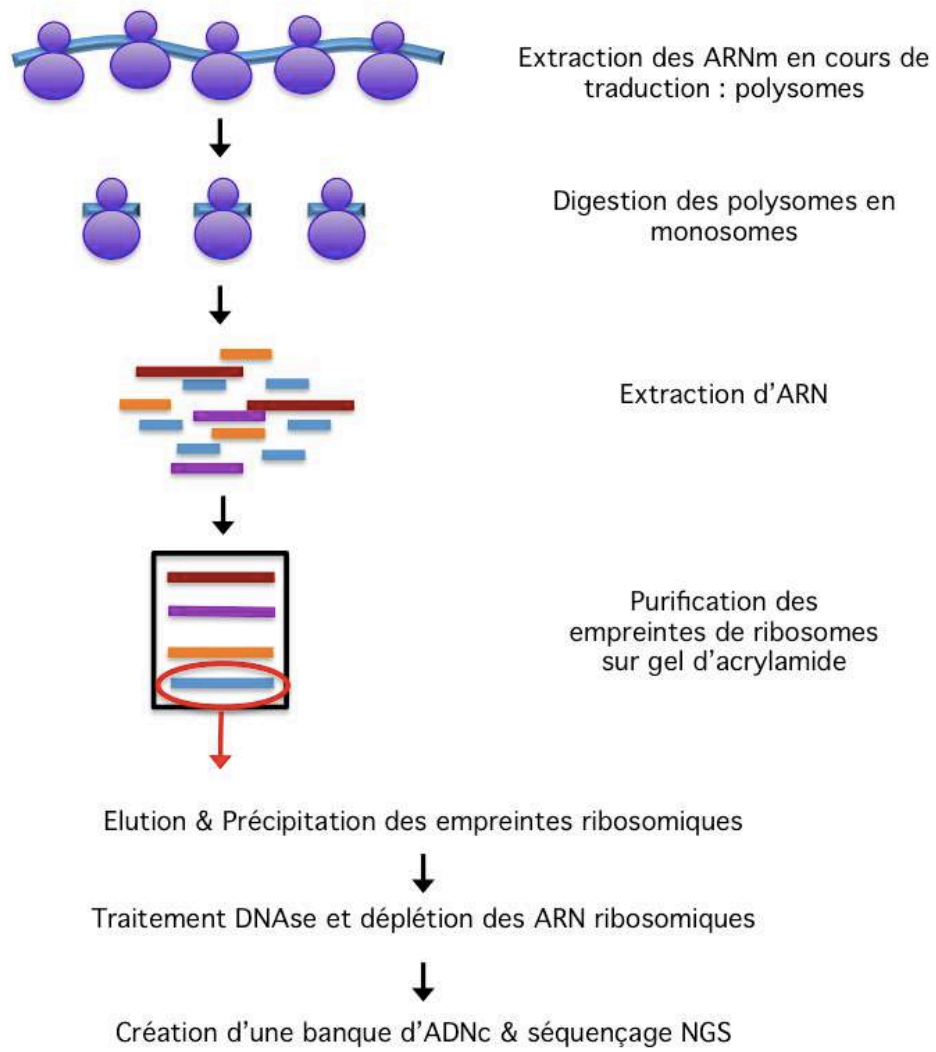


Figure 72 - Schéma simplifié du protocole de profilage de ribosomes à partir de fleurs d'Arabidopsis

### 7.2.3.3. Production de protéines recombinantes

#### Jour 1 : Pré-culture

Des bactéries de la souche Rosetta (de3) d'*E. coli* sont mises en pré-culture une nuit à 37°C dans 3 mL de LB + 20 µg/mL chloramphénicol.

#### Jour 2 : Culture & Transformation par choc thermique

Les bactéries issues de la pré-culture sont mises en culture dans 250 mL de LB + 20 µg/mL chloramphénicol jusqu'à obtenir une  $DO_{600nm}$  de 0,6. Les bactéries incubent ensuite 30 min sur glace, puis sont centrifugées pendant 10 min à 3 000 g et à 4°C. Le culot obtenu est repris dans 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM stérile froid (4°C), puis après une nouvelle incubation sur glace de 30 min, elles sont centrifugées 10 min à 4 000 rpm et à 4°C. Le culot obtenu est repris dans 4 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM stérile froid. La transformation chimique des bactéries est réalisée de la façon suivante : environ 500 ng de plasmide sont ajoutés à 200 µL de bactéries pour une incubation de 30 min sur glace. A la suite de cela, les bactéries incubent 2 min à 42°C puis 1 min sur glace de façon à procéder au choc thermique. Après avoir ajouté au mélange 1 mL de LB sans antibiotique, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri comprenant du milieu LB contenant 20 µg/mL de chloramphénicol et 100 µg/mL de carbénicilline. Dans le cas d'un plasmide conférant la résistance à la carbénicilline, une incubation préalable des bactéries pendant 1 h à 37°C sans antibiotique n'est pas nécessaire. Les boîtes de Pétri incubent une nuit à 37°C.

#### Jour 3 : Pré-culture

Un clone issu de la transformation est mis en pré-culture une nuit à 37°C dans 100 mL de milieu LB avec 20 µg/mL de chloramphénicol et 100 µg/mL de carbénicilline.

#### Jour 4 : Culture & Induction de la production de protéines

40 mL de la pré-culture sont mis en culture dans 1L de milieu LB avec 20 µg/mL de chloramphénicol et 100 µg/mL de carbénicilline jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm de 0,6. A ce stade, 1 mL de culture de bactérie a été mis de côté à 4°C pour des analyses ultérieures et correspondra aux bactéries non induites. L'induction de la production de



protéines recombinantes est réalisée en ajoutant à la culture 1 mM d'IPTG et 100 µg/mL de carbénicilline. Après une induction de 3h à 37°C, 1 mL de culture de bactérie a été mis de côté à 4°C pour des analyses ultérieures et correspondra aux bactéries induites. Le reste de la culture est centrifugé 15 min à 3 000 g et à 4°C. Le culot est repris dans 80 mL d'eau stérile froide puis les bactéries sont de nouveau centrifugées 15 min à 3 000 g et à 4°C, puis le dernier culot obtenu est congelé à -20°C.

#### Jour 5 : Vérification de l'induction

Les aliquots de 1 mL de bactéries non induites et induites préalablement mis de côté sont centrifugés 1 min à 12 000 g puis les culots sont repris dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 2 % N-Lauroylsarcosine, 5 mM DTT. Les bactéries sont soniquées puis les protéines sont quantifiées à l'aide d'un spectrophotomètre par absorbance à 280 nm. Un gel de polyacrylamide de 10 ou 12 % (selon la taille de la protéine recombinante analysée) est réalisé avec 30 µg de protéines, de façon à vérifier que l'induction a bien eu lieu.

### **7.2.3.4. Purification de protéines recombinantes ayant une étiquette histidine**

#### Jour 1 : Resuspension des protéines recombinantes

Les culots bactériens sont décongelés puis repris dans 20 mL de tampon de lyse. Les bactéries sont ensuite lysées au One Shot (Constant Systems), puis le lysat obtenu est centrifugé 5 min à 20 000 g et à 4°C. Dans la mesure où les protéines recombinantes portant une étiquette histidine sont produites sous forme de corps d'inclusion, elles seront extraites à partir du culot ainsi obtenu. Ce dernier est lavé 3 fois avec le tampon de lyse, puis 3 fois avec le tampon de lavage. Entre chaque lavage, le lysat est centrifugé 5 min à 20 000 g et à 4°C. Le dernier culot obtenu est resuspendu dans 20 mL de tampon de solubilisation pendant une nuit sur une roue à 4°C.

#### Jour 2 : Mise en contact des protéines recombinantes avec la résine de Nickel

Le lysat est centrifugé pendant 5 min à 20 000 g et à 4°C de façon à culoter les débris insolubles, puis le surnageant est récupéré et est chargé sur une résine Ni Sepharose™

6 Fast Flow (GE Healthcare). Préparation préalable de la résine : 4 mL de résine sont équilibrés avec 2 CV (volumes de colonne) de tampon d'équilibration. Après cela, la solution de protéine précédemment obtenue est mise au contact de la résine pendant une nuit.

### Jour 3 : Purification des protéines recombinantes & dialyse

Après avoir récupéré ce qui ne s'est pas accroché à la colonne (le flow-through ou FT), 20 CV de tampon de rinçage sont chargés sur la colonne. L'éluion est faite en chargeant 6 fois 1 mL de tampon d'éluion. Un gel SDS-PAGE est réalisé pour à la fois vérifier la pureté de la protéine et savoir dans quelles fractions d'éluion elle se trouve. Les fractions concernées sont réunies puis dialysées contre 2 fois 500 mL de tampon de dialyse.

**Tampon de lyse** : 50 mM Tris-HCl pH 8 (peut varier en fonction du Pi de la protéine), 150 mM NaCl, 1 % Tween 20, 1 % Triton X-100.

**Tampon de lavage** : 50 mM Tris-HCl pH 8 (peut varier en fonction du Pi de la protéine), 150 mM NaCl.

**Tampon de solubilisation** : 50 mM Tris-HCl pH 8 (varie en fonction du Pi de la protéine), 150 mM NaCl, 2 % N-Lauroylsarcosine, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol.

**Tampon de rinçage** : 50 mM Tris-HCl pH 8 (varie en fonction du Pi de la protéine), 150 mM NaCl, 2 % N-Lauroylsarcosine, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol.

**Tampon de dialyse** : 50 mM Tris-HCl pH 8 (varie en fonction du Pi de la protéine), 150 mM NaCl, 0,05 % N-Lauroylsarcosine (peut varier en fonction de la solubilité de la protéine), 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol.

#### **7.2.3.5. Purification de protéines recombinantes ayant une étiquette MBP**

Les culots bactériens sont décongelés puis repris dans 20 mL de tampon de lyse. Les bactéries sont ensuite lysées au One Shot, puis le lysat obtenu est centrifugé 20 min à 20 000 g et à 4°C. Dans la mesure où les protéines recombinantes portant une étiquette MBP sont souvent produites sous forme soluble, elles seront extraites à partir du surnageant ainsi obtenu. Afin de s'assurer de la solubilité de chaque protéine recombinante au cas par cas, il convient de faire des tests sur de petits volumes de culture.

Un volume de résine d'amylose (New England Biolabs) est équilibré dans 20 volumes de tampon de lyse. Le surnageant issu de la lyse des bactéries est ensuite mis au contact de la résine pendant 1h à 4°C, sur une roue. Suite à cette incubation, la colonne est mise à sédimenter puis la fraction non liée est récupérée. Après une incubation de 15 min, la résine

est lavée 2 fois 15 min (sur une roue) avec 5 CV de tampon de lyse. Après une nouvelle sédimentation de la résine et le passage des tampons de rinçage au travers de cette dernière, la protéine recombinante est éluée avec 5 fois 1 mL de tampon d'éluion. Un gel SDS-PAGE est réalisé pour à la fois vérifier la pureté de la protéine et savoir dans quelles fractions d'éluion elle se trouve.

**Tampon de lyse** : 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % glycérol, 0,01 % CHAPS, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol.

**Tampon d'éluion** : 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % glycérol, 0,01 % CHAPS, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 15 mM Maltose.

### 7.2.3.6. Gels-retard

La protéine purifiée est mise en présence de la sonde ARN pour laquelle on veut tester son affinité, ainsi que d'un éventuel compétiteur : l'héparine. Chaque tube réactionnel est préalablement préparé sans sonde ni protéine. La sonde est dénaturée 2 min à 100°C avant d'être ajoutée dans chaque tube. La protéine à tester est le dernier élément à ajouter dans le tube réactionnel, de façon à ce qu'elle se retrouve dans un environnement moléculaire où sont présents à la fois la sonde et l'héparine. Le tampon de migration est pré-refroidit à 4°C.

La réaction de liaison se fait dans un volume de 10  $\mu$ L, comprenant :

- 5  $\mu$ L de tampon de liaison 2X
- 0,1  $\mu$ L de RiboLock RI (Thermo Scientific)
- 2,9  $\mu$ L d'eau
- 1  $\mu$ L de sonde 10 X (400 pM)
- 1  $\mu$ L de la solution de protéine 10 X (de 0 à 8 000 nM)

La réaction incube 30 min à température ambiante, puis les gels de polyacrylamide sont chargés (sans bleu de charge), et migrent à 170 V pendant 30 à 40 min. Après la migration, les gels sont séchés à l'aide d'un sécheur de gels (Scie-Plas) pendant 30 min et sont mis à exposer contre un écran (Fujifilm) pour une nuit. La lecture des signaux se fait avec l'appareil FLA9500 (GE Healthcare) et le logiciel associé.

**Tampon de liaison 2X** : 300 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 0,2 mg/mL BSA, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 8 mM DTT, 20% Glycérol, 1 mg/mL héparine. Les concentrations de N-

Lauroylsarcosine et d'héparine sont données à titre indicatif. Elles doivent être adaptées pour chaque protéine.

**Gels de polyacrylamide** : 5 % acrylamide (19:1), 1X THE, APS, temed.

**Tampon de migration** : 1X THE

**Tampon THE 10 X** : 340 mM Tris, 660 mM Hepès, 1 mM EDTA

### **7.2.3.7. Co-immunoprécipitation de complexes PPR/ARN**

#### Préparation des billes

150  $\mu$ L de billes de sépharose liées à la protéine G sont nécessaires pour chaque immunoprécipitation. Les billes sont lavées 3 fois 3 minutes à 4°C (sur une roue) dans 1 mL de tampon de co-immunoprécipitation, puis récupérées par centrifugation 1 minute à 2 500 g. Le dernier culot de billes obtenu est resuspendu dans 150  $\mu$ L tampon de co-immunoprécipitation par réaction. Les billes lavées sont conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

#### Extraction des protéines mitochondriales et pré-clearing

Quatre culots de mitochondries obtenus selon le protocole présenté ci-arpès sont repris dans 200  $\mu$ L de tampon Chaps supplémenté d'inhibiteurs de RNases et de protéases. Les mitochondries incubent 30 minutes à 4°C avec un refoulement régulier à la pipette, puis sont centrifugées 20 minutes à 17 000 g et à 4°C. Les protéines du surnageant sont quantifiées à l'aide du kit RC DCT™ Protein Assay (Bio-Rad) selon les recommandations du fournisseur. 500  $\mu$ g à 1 mg de protéines sont nécessaires pour chaque co-immunoprécipitation. Le volume nécessaire de surnageant est ajouté à 50  $\mu$ L de billes lavées (préalablement centrifugées et desquelles le surnageant à été retiré). La solution incube 10 minutes à 4°C puis est centrifugée 1 min à 2 500 g et à 4°C de façon à récupérer le surnageant.

#### Immunoprécipitation

10  $\mu$ L d'anticorps monoclonaux sont ajoutés au surnageant, puis la solution incube 3 à 4 h à 4°C avec une agitation douce. Puis le surnageant est ajouté à 100  $\mu$ L de billes lavées (préalablement centrifugées et desquelles le surnageant à été retiré) avant d'incuber 1 h à 4°C avec la même agitation. Suite à ces incubations, la solution est centrifugée 1 min à 2 500 g de façon à récupérer le culot de billes de sépharose ainsi que la protéine immunoprécipitée. Le culot est lavée avec 3 fois 500  $\mu$ L de tampon de co-

immunoprécipitation et est récupéré par centrifugation 1 min à 2 500 g et à 4°C. Le dernier culot obtenu est resuspendu dans 250  $\mu$ L de tampon de co-immunoprécipitation sans MgCl<sub>2</sub>, puis les ARN co-immunoprécipités sont extraits avec une solution de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (125:24:1) (Fluka Analytical) selon des recommandations du fournisseur puis précipités une nuit dans au moins 50 % d'isopropanol froid. Le lendemain, l'ARN précipité est centrifugé pendant 30 min à 13 000 g et à 4°C, puis le culot est lavé avec 500  $\mu$ L d'éthanol 70 % et l'ARN est de nouveau centrifugé 15 min à 13 000 g et à 4°C. Le culot est ensuite mis à sécher puis repris dans 20  $\mu$ L d'eau.

**Tampon de co-immunoprécipitation** : 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,5 % NP40.

**Tampon Chaps** : 30 mM Hepès pH 7,5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Chaps, 10 % glycérol, 1 mM DTT.

## 7.2.4. Autres protocoles

### 7.2.4.1. Purification de mitochondries

Des fleurs fraîches issues d'environ 50 plantes d'*Arabidopsis* sont broyées dans 250 mL de tampon de broyage froid, puis le broyat est filtré à travers une double couche de Miracloth (Calbiochem). La solution obtenue est centrifugée 3 fois 10 min, successivement à 3000, 4000 et 4500 rpm (rotor GSA de chez Sorvall) de façon à éliminer les débris. La solution débarrassée de ces débris, elle est centrifugée 30 min à 12000 rpm (rotor GSA de chez Sorvall), puis le culot obtenu est repris dans 500  $\mu$ L de tampon 1X et est déposé en haut d'un gradient discontinu de percoll contenant 3 mL de Percoll 50 %, 6 mL de Percoll 30 % et 2,5 mL de Percoll 16 %. Une fois chargé, le gradient est centrifugé 15 min à 12 000 rpm (rotor GSA de chez Sorvall) en inactivant le frein de la centrifugeuse. Après cette étape, les mitochondries se trouvent à l'interface entre les solutions de Percoll à 30 et 50 %. Il convient d'aspirer le liquide présent au dessus de cette interface, puis de récupérer à la pipette les mitochondries purifiées. Le volume de mitochondrie est dilué 5 fois dans du tampon 1X puis centrifugé 15 min à 12000 rpm (rotor SM24), le culot obtenu est lavé à deux reprises dans des tubes de 13 mL, puis une fois en tube Eppendorf. Le dernier culot obtenu est congelé dans l'azote liquide puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

Optionnel : Cross-linking – Cette étape permet de stabiliser la liaison entre les protéines PPR et leur ARN cible.

## *Matériel et Méthodes*

Le dernier culot de mitochondries obtenu incube 10 min dans 200  $\mu$ L de tampon 1X contenant 1% de formaldéhyde, puis 1 min dans le même tampon auxquels sont ajoutés 125 mM de Glycine. Les mitochondries sont ensuite centrifugées 15 min à 12000 rpm puis le culot est congelé et conservé à -80°C.

**Tampon de broyage** : 300 mM Saccharose, 25 mM Tétrasyodium Pyrophosphate, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,8% (p/v) PVP-40, 0,3% (p/v) BSA, 20 mM acide ascorbique, pH 7,5.

**Tampon de lavage 1X** : 300 mM Saccharose, 10 mM Hepès, pH 7,5.

**Tampon de lavage 2X** : 600 mM Saccharose, 20 mM Hepès, 0,2 % BSA pH 7,5.

**Solution Percoll 50 %** : 50 % de Percoll, 50 % de tampon de lavage 2X

**Solution Percoll 30 %** : 30 % de Percoll, 50 % de tampon de lavage 2X, 20 % d'eau

**Solution Percoll 16 %** : 16 % de Percoll, 50 % de tampon de lavage 2X, 34 % d'eau

# Références bibliographiques

*Références bibliographiques*



## 8. Références bibliographiques

- Ackerman, S.H., Gatti, D.L., Gellefors, P., Douglas, M.G. & Tzagoloff, A. (1991). ATP13, a nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase. *FEBS Letters*. 278 (2). p.pp. 234–238.
- Adams, K.L. & Palmer, J.D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: Gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29 (3). p.pp. 380–395.
- Affourtit, C., Albury, M.S., Crichton, P.G. & Moore, A.L. (2002). Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Letters*. 510 (3). p.pp. 121–126.
- Ahmadikhah, A. & Karlov, G.I. (2006). Molecular mapping of the fertility-restoration gene Rf4 for WA-cytoplasmic male sterility in rice. *Plant Breeding*. 125 (4). p.pp. 363–367.
- Ahuja, U. & Thöny-Meyer, L. (2005). CcmD is involved in complex formation between CcmC and the heme chaperone CcmE during cytochrome c maturation. *Journal of Biological Chemistry*. 280 (1). p.pp. 236–243.
- Akabane, S., Ueda, T., Nierhaus, K.H. & Takeuchi, N. (2014). Ribosome Rescue and Translation Termination at Non-Standard Stop Codons by ICT1 in Mammalian Mitochondria. *PLoS Genetics*. 10 (9). p.p. e1004616.
- Akagi, H., Nakamura, A., Yokozeki-Misono, Y., Inagaki, A., Takahashi, H., Mori, K. & Fujimura, T. (2004). Positional cloning of the rice Rf-1 gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theoretical and Applied Genetics*. 108 (8). p.pp. 1449–1457.
- Akagi, H., Sakamoto, M., Shinjyo, C., Shimada, H. & Fujimura, T. (1994). A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial atp6 may cause male sterility. *Current Genetics*. 25 (1). p.pp. 52–58.
- Allen, J.W.A., Barker, P.D. & Ferguson, S.J. (2003). A Cytochrome b562 Variant with a c-Type Cytochrome CXXCH: Heme-binding Motif as a Probe of the Escherichia coli Cytochrome c Maturation System. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (52). p.pp. 52075–52083.
- Allen, J.W.A., Ginger, M.L. & Ferguson, S.J. (2004). Maturation of the unusual single-cysteine (XXXCH) mitochondrial c-type cytochromes found in trypanosomatids must occur through a novel biogenesis pathway. *The Biochemical journal*. 383. p.pp. 537–542.
- Amunts, A., Brown, A., Bai, X.-C., Llacer, J.L., Hussain, T., Emsley, P., Long, F., Murshudov, G., Scheres, S.H.W. & Ramakrishnan, V. (2014). *Structure of the Yeast Mitochondrial Large Ribosomal Subunit*. 1440. p.pp. 1485–1489.
- Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S.H.W. & Ramakrishnan, V. (2015). The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science (New York, N.Y.)*. 348 (6230). p.pp. 95–8.
- Anderson, S., Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG., B.A.T., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. & Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial

## Références bibliographiques

- genome. *Nature*. 290 (5806) p.pp. 457–465.
- Andersson, S.G.E. & Kurland, C.G. (1998a). Ancient and recent horizontal transfer events: the origins of mitochondria. *APMIS Suppl.* 84 (106). p.pp. 5–14.
- Andersson, S.G.E. & Kurland, C.G. (1998b). Reductive evolution of resident genomes. *Trends in Microbiology*. 6 (7). p.pp. 263–268.
- Andrés, C., Lurin, C. & Small, I.D. (2007). The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. In: *Physiologia Plantarum*. 2007, pp. 14–22.
- Antonicka, H. & Shoubridge, E.A. (2015). Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis. *Cell Reports*. 10 (6). p.pp. 920–932.
- Aphasizhev, R. & Aphasizheva, I. (2013). Emerging roles of PPR proteins in trypanosomes: switches, blocks, and triggers. *RNA biology*. 10 (9). p.pp. 1495–500.
- Arenas-M, A., Takenaka, M., Moreno, S., Gómez, I. & Jordana, X. (2013). Contiguous RNA editing sites in the mitochondrial nad1 transcript of *Arabidopsis thaliana* are recognized by different proteins. *FEBS Letters*. 587 (7). p.pp. 887–891.
- Arenas-M, A., Zehrmann, A., Moreno, S., Takenaka, M. & Jordana, X. (2014). The pentatricopeptide repeat protein MEF26 participates in RNA editing in mitochondrial cox3 and nad4 transcripts. *Mitochondrion*. 19 (PB). p.pp. 126–134.
- Arnal, N., Quadrado, M., Simon, M. & Mireau, H. (2014). A restorer-of-fertility like pentatricopeptide repeat gene directs ribonucleolytic processing within the coding sequence of rps3 - Rpl16 and orf240a mitochondrial transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 78 (1). p.pp. 134–145.
- Arnold, I., Fölsch, H., Neupert, W. & Stuart, R.A. (1998). Two distinct and independent mitochondrial targeting signals function in the sorting of an inner membrane protein, cytochrome c1. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (3). p.pp. 1469–1476.
- Baggio, F., Bratic, A., Mourier, A., Kauppila, T.E.S., Tain, L.S., Kukat, C., Habermann, B., Partridge, L. & Larsson, N.G. (2014). *Drosophila melanogaster* LRPPRC2 is involved in coordination of mitochondrial translation. *Nucleic Acids Research*. 42 (22). p.pp. 13920–13938.
- Baldet, P., Alban, C., Axiotis, S. & Douce, R. (1993). *Localization of Free and Bound Biotin in Cells from Green Pea Leaves*. p.pp. 67–73.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4° resolution. *Science*. 289 (5481). p.pp. 905–920.
- 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).
- Barkan, A. & Small, I. (2014). Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annual review of plant biology*. 65 (January). p.pp. 415–42.
- Barr, C.M. & Fishman, L. (2010). The nuclear component of a cytonuclear hybrid incompatibility in *mimulus* maps to a cluster of pentatricopeptide repeat genes. *Genetics*. 184 (2). p.pp. 455–465.
- Bartoli, C.G., Pastori, G.M. & Foyer, C.H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant physiology*. 123 (1). p.pp. 335–344.
- Baudin-Baillieu, A., Hatin, I., Legendre, R. & Namy, O. (2016). Translation analysis at the genome scale

## Références bibliographiques

- by ribosome profiling. In: *Methods in Molecular Biology*. pp. 105–124.
- Bellance, N., Lestienne, P. & Rossignol, R. (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 14 (complex V). p.pp. 4015–34.
- Bentolila, S., Alfonso, A.A. & Hanson, M.R. (2002). A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (16). p.pp. 10887–92.
- Bentolila, S., Babina, A.M., Germain, A. & Hanson, M.R. (2013a). Quantitative trait locus mapping identifies REME2, a PPR-DYW protein required for editing of specific C targets in Arabidopsis mitochondria. *RNA Biology*. 10 (9). p.pp. 1520–1525.
- Bentolila, S., Chateigner-Boutin, A.-L. & Hanson, M.R. (2005). Ecotype allelic variation in C-to-U editing extent of a mitochondrial transcript identifies RNA-editing quantitative trait loci in Arabidopsis. *Plant physiology*. 139 (4). p.pp. 2006–16.
- Bentolila, S., Elliott, L.E. & Hanson, M.R. (2008). Genetic architecture of mitochondrial editing in Arabidopsis thaliana. *Genetics*. 178 (3). p.pp. 1693–1708.
- Bentolila, S., Knight, W. & Hanson, M. (2010). Natural Variation in Arabidopsis Leads to the Identification of REME1, a Pentatricopeptide Repeat-DYW Protein Controlling the Editing of Mitochondrial Transcripts. *Plant Physiology*. 154 (4). p.pp. 1966–1982.
- Bentolila, S., Oh, J., Hanson, M.R. & Bukowski, R. (2013b). Comprehensive High-Resolution Analysis of the Role of an Arabidopsis Gene Family in RNA Editing. *PLoS Genetics*. 9 (6).
- Beringer, M. & Rodnina, M. V. (2007). The Ribosomal Peptidyl Transferase. *Molecular Cell*. 26 (3). p.pp. 311–321.
- Binder, S. & Brennicke, A. (2003). Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 358 (1429). p.pp. 181–189.
- Blanchi, C., Genova, M.L., Castelli, G.P. & Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: Kinetic evidence using flux control analysis. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (35). p.pp. 36562–36569.
- Bogenhagen, D.F., Martin, D.W. & Koller, A. (2014). Initial steps in RNA processing and ribosome assembly occur at mitochondrial DNA nucleoids. *Cell Metabolism*. 19 (4). p.pp. 618–629.
- Bonen, L. (2008). Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria. *Mitochondrion*. 8 (1). p.pp. 26–34.
- Bonen, L. (2004). Translational machinery in plant organelles. *Molecular biology and biotechnology of plant organelles*. p.pp. 323–345.
- Bonen, L. & Calixte, S. (2006). Comparative analysis of bacterial-origin genes for plant mitochondrial ribosomal proteins. *Molecular Biology and Evolution*. 23 (3). p.pp. 701–712.
- Bonen, L. & Vogel, J. (2001). The ins and outs of group II introns. *Trends in Genetics*. 17 (6). p.pp. 322–331.
- Bonhomme, S., Budar, F., Lancelin, D., Small, I., Defrance, M.C. & Pelletier, G. (1992). Sequence and transcript analysis of the Nco2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in Brassica hybrids. *Molecular and General Genetics*. 235 (2-3). p.pp. 340–348.

## Références bibliographiques

- Boussardon, C., Avon, A., Kindgren, P., Bond, C.S., Challenor, M., Lurin, C. & Small, I. (2014). The cytidine deaminase signature HxE(x)nCxxC of DYW1 binds zinc and is necessary for RNA editing of ndhD-1. *New Phytologist*. 203 (4).
- Boussardon, C., Salone, V., Avon, A., Berthome, R., Hammani, K., Okuda, K., Shikanai, T., Small, I. & Lurin, C. (2012). Two Interacting Proteins Are Necessary for the Editing of the NdhD-1 Site in Arabidopsis Plastids. *The Plant Cell*. 24 (9). p.pp. 3684–3694.
- Brar, G. a & Weissman, J.S. (2015). Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 16 (11). p.pp. 651–664.
- Braun, H.-P., Binder, S., Brennicke, A., Eubel, H., Fernie, A.R., Finkemeier, I., Klodmann, J., König, A.-C., Kühn, K., Meyer, E., Obata, T., Schwarzländer, M., Takenaka, M. & Zehrmann, A. (2014). The life of plant mitochondrial complex I. *Mitochondrion*. 19 Pt B. p.pp. 295–313.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V. & Schmitz, U.K. (1992). The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *The EMBO journal*. 11 (9). p.pp. 3219–3227.
- Braun, H.P. & Schmitz, U.K. (1995). The bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 27 (4). p.pp. 423–436.
- Braun, H.P. & Schmitz, U.K. (1999). The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta*. 209 (3). p.pp. 267–274.
- Brehme, N., Bayer-Császár, E., Glass, F. & Takenaka, M. (2015). The DYW subgroup PPR protein MEF35 targets RNA editing sites in the mitochondrial rpl16, nad4 and cob mRNAs in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*. 10 (10). p.pp. 1–12.
- Brown, A., Amunts, A., Bai, X., Sugimoto, Y., Edwards, P.C., Murshudov, G., Scheres, S.H.W. & Ramakrishnan, V. (2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science*. 346 (6210). p.pp. 718–722.
- Brown, G.G., Formanová, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., Laforest, M., Zhang, J., Cheung, W.Y. & Landry, B.S. (2003). The radish Rfo restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant Journal*. 35 (2). p.pp. 262–272.
- Brown, N.G., Costanzo, M.C. & Fox, T.D. (1994). Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 14 (2). p.pp. 1045–53.
- Budar, F. & Pelletier, G. (2001). Male sterility in plants: Occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III*. 324 (6). p.pp. 543–550.
- Budar, F., Touzet, P. & De Paepe, R. (2003). The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica*. 117 (1). p.pp. 3–16.
- Burger, G., Gray, M.W. & Lang, B.F. (2003). Mitochondrial genomes: Anything goes. *Trends in Genetics*. 19 (12). p.pp. 709–716.
- Caballero, A., Ugidos, A., Liu, B., Öling, D., Kvint, K., Hao, X., Mignat, C., Nachin, L., Molin, M. & Nyström, T. (2011). Absence of Mitochondrial Translation Control Proteins Extends Life Span by Activating Sirtuin-Dependent Silencing. *Molecular Cell*. 42 (3). p.pp. 390–400.
- Cai, M., Li, S., Sun, F., Sun, Q., Zhao, H., Ren, X., Zhao, Y., Tan, B.-C., Zhang, Z. & Qiu, F. (2017). Emp10

## Références bibliographiques

- encodes a mitochondrial PPR protein that affects the cis-splicing of nad2 intron 1 and seed development in maize. *The Plant Journal*. 1. p.pp. 1–13.
- Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R.F. & Remacle, C. (2004). Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 Conserved components among eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1658 (3). p.pp. 212–224.
- Carrie, C., Murcha, M.W., Kuehn, K., Duncan, O., Barthelet, M., Smith, P.M., Eubel, H., Meyer, E., Day, D.A., Millar, A.H. & Whelan, J. (2008). Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 582 (20). p.pp. 3073–3079.
- Carrie, C., Weissenberger, S. & Soll, J. (2016). Plant mitochondria contain the protein translocase subunits TatB and TatC. *The compangy of Biologists*. p.pp. 3935–3947.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell*. 138 (4). p.pp. 628–644.
- Chase, C.D. (2007). Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends in Genetics*. 23 (2). p.pp. 81–90.
- Chateigner-Boutin, A.L., Colas Des Francs-Small, C., Fujii, S., Okuda, K., Tanz, S.K. & Small, I. (2013). The E domains of pentatricopeptide repeat proteins from different organelles are not functionally equivalent for RNA editing. *Plant Journal*. 74 (6).
- Chen, L. & Liu, Y. (2014). *Male sterility and fertility restoration in crops*. p.pp. 65:579–606.
- Chen, X., Feng, F., Qi, W., Xu, L., Yao, D., Wang, Q. & Song, R. (2017). Dek35 Encodes a PPR Protein that Affects cis-Splicing of Mitochondrial nad4 Intron 1 and Seed Development in Maize. *Molecular Plant*. 10 (3). p.pp. 427–441.
- 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 Journal*. 85 (4). p.pp. 532–547.
- 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). p.pp. 14244–14249.
- Choi, B., Acero, M.M. & Bonen, L. (2012). Mapping of wheat mitochondrial mRNA termini and comparison with breakpoints in DNA homology among plants. *Plant Molecular Biology*. 80 (4-5). p.pp. 539–552.
- Chotewutmontri, P. & Barkan, A. (2016). Dynamics of Chloroplast Translation during Chloroplast Differentiation in Maize. *PLoS Genetics*. 12 (7). p.pp. 1–28.
- Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A., Pajak, A. & Lightowlers, R.N. (2011). Termination of protein synthesis in mammalian mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (40). p.pp. 34479–34485.
- Clifton, R., Millar, A.H. & Whelan, J. (2006). Alternative oxidases in *Arabidopsis*: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1757 (7). p.pp. 730–741.

## Références bibliographiques

- Coffin, J.W., Dhillon, R., Ritzel, R.G. & Nargang, F.E. (1997). The *Neurospora crassa* *cya-5* nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COXI protein. *Current Genetics*. 32 (4). p.pp. 273–280.
- Cohen, S., Zmudjak, M., Francs-small, C.C., Malik, S., Shaya, F., Keren, I., Belausov, E., Many, Y., Brown, G.G., Small, I. & Ostersetzer-biran, O. (2014). nMAT4 , a maturase factor required for nad1 pre-mRNA processing and maturation , is essential for holocomplex I biogenesis in Arabidopsis mitochondria. *The Plant Journal*. 78. p.pp. 253–268.
- Colas des Francs-Small, C., Falcon de Longevialle, A., Li, Y., Lowe, E., Tanz, S.K., Smith, C., Bevan, M.W. & Small, I. (2014). The Pentatricopeptide Repeat Proteins TANG2 and ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING439 Are Involved in the Splicing of the Multipartite nad5 Transcript Encoding a Subunit of Mitochondrial Complex I. *Plant Physiology*. 165 (4). p.pp. 1409–1416.
- Colcombet, J., Lopez-Obando, M., Heurtevin, L., Bernard, C., Martin, K., Berthomé, R. & Lurin, C. (2013). Systematic study of subcellular localization of Arabidopsis PPR proteins confirms a massive targeting to organelles. *RNA biology*. 10 (February 2015). p.pp. 1557–1575.
- Costanzo, M.C. & Fox, T.D. (1988). Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85 (8). p.pp. 2677–81.
- Cui, X., Wise, R.P. & Schnable, P.S. (1996). The rf2 Nuclear Restorer Gene of Male-Sterile T-Cytoplasm Maize. *Science*. 272 (5266). p.pp. 1334–1336.
- Dahan, J. & Mireau, H. (2013). The Rf and Rf-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes. *RNA biology*. 10 (9). p.pp. 1469–1476.
- Dahan, J., Tcherkez, G., Macherel, D., Benamar, A., Belcram, K., Quadrado, M., Arnal, N. & Mireau, H. (2014). Disruption of the CYTOCHROME C OXIDASE DEFICIENT1 gene leads to cytochrome c oxidase depletion and reorchestrated respiratory metabolism in Arabidopsis. *Plant physiology*. 166 (4). p.pp. 1788–802.
- Dalla Rosa, I., Durigon, R., Pearce, S.F., Rorbach, J., Hirst, E.M.A., Vidoni, S., Reyes, A., Brea-Calvo, G., Minczuk, M., Woellhaf, M.W., Herrmann, J.M., Huynen, M.A., Holt, I.J. & Spinazzola, A. (2014). MPV17L2 is required for ribosome assembly in mitochondria. *Nucleic Acids Research*. 42 (13). p.pp. 8500–8515.
- Davies, S.M.K., Lopez Sanchez, M.I.G., Narsai, R., Shearwood, A.M.J., Razif, M.F.M., Small, I.D., Whelan, J., Rackham, O. & Filipovska, A. (2012). MRPS27 is a pentatricopeptide repeat domain protein required for the translation of mitochondrially encoded proteins. *FEBS Letters*. 586 (20). p.pp. 3555–3561.
- Davies, S.M.K., Rackham, O., Shearwood, A.M.J., Hamilton, K.L., Narsai, R., Whelan, J. & Filipovska, A. (2009). Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. *FEBS Letters*. 583 (12). p.pp. 1853–1858.
- Decoster, E., Simon, M., Hatat, D. & Faye, G. (1990). The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. *MGG Molecular & General Genetics*. 224 (1). p.pp. 111–118.
- Desai, N., Brown, A., Amunts, A. & Ramakrishnan, V. (2017). The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science*. 355. p.pp. 528–531.

## Références bibliographiques

- Desloire, S., Gherbi, H., Laloui, W., Marhadour, S., Clouet, V., Cattolico, L., Falentin, C., Giancola, S., Renard, M., Budar, F., Small, I., Caboche, M., Delourme, R. & Bendahmane, A. (2003). Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO reports*. 4 (6). p.pp. 588–94.
- Desmond, E., Brochier-Armanet, C., Forterre, P. & Gribaldo, S. (2011). On the last common ancestor and early evolution of eukaryotes: Reconstructing the history of mitochondrial ribosomes. *Research in Microbiology*. 162 (1). p.pp. 53–70.
- Diekert, K., De Kroon, A.I.P.M., Ahting, U., Niggemeyer, B., Neupert, W., De Kruijff, B. & Lill, R. (2001). Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO Journal*. 20 (20). p.pp. 5626–5635.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. & Lithgow, T. (2006). Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science*. 313 (5785). p.pp. 314–318.
- Doniwa, Y., Ueda, M., Ueta, M., Wada, A., Kadowaki, K.I. & Tsutsumi, N. (2010). The involvement of a PPR protein of the P subfamily in partial RNA editing of an Arabidopsis mitochondrial transcript. *Gene*. 454 (1-2). p.pp. 39–46.
- Duchêne, A.M., Pujol, C. & Maréchal-Drouard, L. (2009). Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria. *Current Genetics*. 55 (1). p.pp. 1–18.
- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E.J. & Braun, H.P. (2006). Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends in Plant Science*. 11 (5). p.pp. 232–240.
- Dudkina, N. V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H.P. & Boekema, E.J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1797 (6-7). p.pp. 664–670.
- Duroc, Y., Gaillard, C., Hiard, S., Defrance, M.C., Pelletier, G. & Budar, F. (2005). Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for Ogura cytoplasmic male sterility in Brassiceae. *Biochimie*. 87 (12). p.pp. 1089–1100.
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C.H. & Paepe, R. De (2003). *Leaf Mitochondria Modulate Whole Cell Redox Homeostasis, Set Antioxidant Capacity, and Determine Stress Resistance through Altered Signaling and Diurnal Regulation*. 15 (May). p.pp. 1212–1226.
- Efremov, R.G. & Sazanov, L.A. (2011). Structure of the membrane domain of respiratory complex I. *Nature*. 476 (7361). p.pp. 414–20.
- Elhafez, D., Murcha, M.W., Clifton, R., Soole, K.L., Day, D.A. & Whelan, J. (2006). Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: Intraorganelle location and expression. *Plant and Cell Physiology*. 47 (1). p.pp. 43–54.
- Elthon, T.E., Nickels, R.L. & McIntosh, L. (1989). Mitochondrial events during development of thermogenesis in *Sauromatum guttatum* (Schott). *Planta*. 180 (1). p.pp. 82–89.
- Eubel, H., Heinemeyer, J. & Braun, H. (2004a). Identification and Characterization of Respirasomes. *Plant Physiology*. 134 (April). p.pp. 1450–1459.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S. & Braun, H.P. (2004b). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42 (12) p.pp. 937–942.
- Eubel, H., Jansch, L. & Braun, H.-P. (2003). New Insights into the Respiratory Chain of Plant

## Références bibliographiques

- Mitochondria. Supercomplexes and a Unique Composition of Complex II. *Analytical Biochemistry*. 133. p.pp. 274–286.
- Fabianek, R.A., Hennecke, H. & Thöny-Meyer, L. (2000). Periplasmic protein thiol: disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*. 24 (3). p.pp. 303–16.
- Farre, J.-C., Leon, G., Jordana, X. & Araya, A. (2001). cis Recognition Elements in Plant Mitochondrion RNA Editing. *Molecular and Cellular Biology*. 21 (20). p.pp. 6731–6737.
- Feaga, H.A., Quickel, M.D., Hankey-Giblin, P.A. & Keiler, K.C. (2016). Human Cells Require Non-stop Ribosome Rescue Activity in Mitochondria. *PLoS Genetics*. 12 (3). p.pp. 1–14.
- Fiedorczuk, K., Letts, J.A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M. & Sazanov, L.A. (2016). Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. *Nature*. 538 (7625). p.pp. 406–410.
- Fisk, D.G., Walker, M.B. & Barkan, A. (1999). Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO Journal*. 18 (9). p.pp. 2621–2630.
- Forner, J., Weber, B., Thuss, 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). p.pp. 3676–3692.
- Frey, T.G. & Mannella, C.A. (2000). *The Internal Structure of Mitochondria*. 0004 (July). p.pp. 1–6.
- Fujii, S., Bond, C.S. & Small, I.D. (2011). Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (4). p.pp. 1723–1728.
- Fujii, S. & Small, I. (2011). The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. *New Phytologist*. 191 (1). p.pp. 37–47.
- Fujii, S., Suzuki, T., Giegé, P., Higashiyama, T., Koizuka, N. & Shikanai, T. (2016). The Restorer-of-fertility-like 2 pentatricopeptide repeat protein and RNase P are required for the processing of mitochondrial *orf291* RNA in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 86 (6). p.pp. 504–513.
- Gabaldon, T., Rainey, D. & Huynen, M.A. (2005). Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Journal of Molecular Biology*. 348 (4). p.pp. 857–870.
- Gaborieau, L., Brown, G.G. & Mireau, H. (2016). The Propensity of Pentatricopeptide Repeat Genes to Evolve into Restorers of Cytoplasmic Male Sterility. *Frontiers in Plant Science*. 7 (December).
- Gan, X., Kitakawa, M., Yoshino, K.I., Oshiro, N., Yonezawa, K. & Isono, K. (2002). Tag-mediated isolation of yeast mitochondrial ribosome and mass spectrometric identification of its new components. *European Journal of Biochemistry*. 269 (21). p.pp. 5203–5214.
- Gapper, C. & Dolan, L. (2006). Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species 1. *Plant Physiology*. [Online]. 141 (June). p.pp. 341–345. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/141/2/341>.
- Geddy, R. & Brown, G.G. (2007). Genes encoding pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are not conserved in location in plant genomes and may be subject to diversifying selection. *BMC genomics*. 8. p.p. 130.
- Giegé, P. & Brennicke, A. (1999). RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes



## Références bibliographiques

- in ORFs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (26). p.pp. 15324–9.
- Giegé, P., Grienenberger, J.M. & Bonnard, G. (2008). Cytochrome c biogenesis in mitochondria. *Mitochondrion*. 8 (1). p.pp. 61–73.
- Giegé, P., Hoffmann, M., Binder, S., Brennicke, A., Giegé, P., Hoffmann, M., Binder, S. & Brennicke, A. (2000). RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria. *EMBO Reports*. 1 (1469-221X). p.pp. 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. *The Plant Cell*. 17 (May). p.pp. 1497–1512.
- Gillman, J.D., Bentolila, S. & Hanson, M.R. (2007). The petunia restorer of fertility protein is part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated locus. *Plant Journal*. 49 (2). p.pp. 217–227.
- Glass, F., Hartel, B., Zehrmann, A., Verbitskiy, D. & Takenaka, M. (2015). MEF13 requires MORF3 and MORF8 for RNA editing at eight targets in mitochondrial mRNAs in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant*. 8 (10). p.pp. 1466–1477.
- Gobron, N., Waszczak, C., Simon, M., Hiard, S., Boivin, S., Charif, D., Ducamp, A., Wenes, E. & Budar, F. (2013). A Cryptic Cytoplasmic Male Sterility Unveils a Possible Gynodioecious Past for Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*. 8 (4).
- Godard, F., Tetaud, E., Duvezin-Caubet, S. & Di Rago, J.P. (2011). A genetic screen targeted on the FO component of mitochondrial ATP synthase in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (20). p.pp. 18181–18189.
- Gottlieb, R.A. (2000). Mitochondria: Execution central. *FEBS Letters*. 482 (1-2). p.pp. 6–12.
- Graack, H.R. & Wittmann-Liebold, B. (1998). Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *The Biochemical journal*. 329 ( Pt 3. p.pp. 433–448.
- Gray, M.W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Current Opinion in Genetics and Development*. 9 (6). p.pp. 678–687.
- Gray, M.W. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4 (9).
- Gray, M.W., Burger, G. & Lang, B.F. (1999). *Mitochondrial Evolution*. 283. p.pp. 1476–1481.
- Greber, B.J. & Ban, N. (2016). Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annual review of biochemistry*. 85 (March). p.pp. 103–32.
- 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. *Nature*. 348 (6232). p.pp. 303–308.
- Greber, B.J., Boehringer, D., Leibundgut, M., Bieri, P., Leitner, A., Schmitz, N., Aebersold, R. & Ban, N. (2014a). The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*. 515. p.pp. 283–288.
- Greber, B.J., Boehringer, D., Leitner, A., Bieri, P., Voigts-hoffmann, F., Erzberger, J.P., Leibundgut, M., Aebersold, R. & Ban, N. (2014b). Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*. 505 (7484). p.pp. 515–9.

## Références bibliographiques

- Grelon, M., Budar, F., Bonhomme, S. & Pelletier, G. (1994). Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile Brassica cybrids. *Molecular and General Genetics*. 243 (5). p.pp. 540–547.
- Grigorieff, N. (1998). Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *Journal of Molecular Biology*. 277 (5). p.pp. 1033–1046.
- Gruschke, S., Kehrein, K., Römler, K., Gröne, K., Israel, L., Imhof, A., Herrmann, J.M. & Ott, M. (2011). Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *Journal of Cell Biology*. 193 (6). p.pp. 1101–1114.
- Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N. & Yang, M. (2016). The architecture of the mammalian respirasome. *Nature*. 537 (7622). p.pp. 639–643.
- Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, M., Douce, R. & Bourguignon, J. (2000). Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 275 (7). p.pp. 5016–5025.
- Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K. & Friedrich, T. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Molecular Biology*. 276 (1). p.pp. 105–112.
- Guénebaut, V., Vincentelli, R., Mills, D., Weiss, H. & Leonard, K.R. (1997). Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *Journal of molecular biology*. 265 (4). p.pp. 409–18.
- Gully, B.S., Shah, K.R., Lee, M., Shearston, K., Smith, N.M., Sadowska, A., Blythe, A.J., Bernath-Levin, K., Stanley, W.A., Small, I.D. & Bond, C.S. (2015). The design and structural characterization of a synthetic pentatricopeptide repeat protein. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 71. p.pp. 196–208.
- Haag, S., Schindler, M., Berndt, L., Brennicke, A., Takenaka, M. & Weber, G. (2017). Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* organellar RNA editing factors MORF1 and MORF9. *Nucleic Acids Research*. 45 (8). p.pp. 4915–4928.
- Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *Journal of Cell Biology*. 30 (2). p.pp. 269–297.
- Haffter, P., McMullin, T.W. & Fox, T.D. (1990). A genetic link between an mRNA-specific translational activator and the translation system in yeast mitochondria. *Genetics*. 125 (3). p.pp. 495–503.
- Haili, 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). p.pp. 6650–6663.
- 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 physiology*. 170 (1). p.pp. 354–366.
- Hamel, P., Corvest, V., Giegé, P. & Bonnard, G. (2009). Biochemical requirements for the maturation of mitochondrial c-type cytochromes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1793 (1). p.pp. 125–138.

## Références bibliographiques

- Hammani, K., Cook, W.B. & Barkan, A. (2012). RNA binding and RNA remodeling activities of the half-a-tetratricopeptide (HAT) protein HCF107 underlie its effects on gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (15). p.pp. 5651–5656.
- Hammani, K., Des Francs-Small, C.C., Takenaka, M., Tanz, S.K., Okuda, K., Shikanai, T., Brennicke, A. & Small, I. (2011a). The pentatricopeptide repeat protein OTP87 is essential for RNA editing of nad7 and atp1 transcripts in Arabidopsis mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (24). p.pp. 21361–21371.
- Hammani, K. & Giegé, P. (2014). RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends in Plant Science*. 19 (6). p.pp. 380–389.
- Hammani, K., Gobert, A., Hleibieh, K., Choulier, L., Small, I. & Giegé, P. (2011b). An Arabidopsis dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation. *Plant*. 23 (2). p.pp. 730–40.
- Handa, H. (2003). The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): Comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*. 31 (20). p.pp. 5907–5916.
- Handa, N., Kishishita, S., Morita, S., Akasaka, R., Jin, Z., Chrzas, J., Chen, L., Liu, Z.J., Wang, B.C., Sugano, S., Tanaka, A., Terada, T., Shirouzu, M. & Yokoyama, S. (2007). Structure of the human Tim44 C-terminal domain in complex with pentaethylene glycol: Ligand-bound form. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 63 (12). p.pp. 1225–1234.
- Haque, M.E., Elmore, K.B., Tripathy, A., Koc, H., Koc, E.C. & Spremulli, L.L. (2010). Properties of the C-terminal tail of human mitochondrial inner membrane protein Oxa1L and its interactions with mammalian mitochondrial ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*. 285 (36). p.pp. 28353–28362.
- Härtel, B., Zehrmann, A., Verbitskiy, D., van der Merwe, J.A., Brennicke, A. & Takenaka, M. (2013a). MEF10 is required for RNA editing at nad2-842 in mitochondria of Arabidopsis thaliana and interacts with MORF8. *Plant Molecular Biology*. 81 (4-5). p.pp. 337–346.
- Härtel, B., Zehrmann, A., Verbitskiy, D. & Takenaka, M. (2013b). The longest mitochondrial RNA editing PPR protein MEF12 in Arabidopsis thaliana requires the full-length E domain. *RNA biology*. 10 (9). p.pp. 1543–8.
- 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. *Plant Journal*. 74 (4). p.pp. 593–604.
- Hayes, M.L., Dang, K.N., Diaz, M.F. & Mulligan, R.M. (2015). A conserved glutamate residue in the C-terminal deaminase domain of pentatricopeptide repeat proteins is required for RNA editing activity. *Journal of Biological Chemistry*. 290 (16). p.pp. 10136–10142.
- Hayes, M.L., Giang, K., Berhane, B. & Mulligan, R.M. (2013). Identification of two pentatricopeptide repeat genes required for rna editing and zinc binding by c-terminal cytidine deaminase-like domains. *Journal of Biological Chemistry*. 288 (51). p.pp. 36519–36529.
- Hazle, T. & Bonen, L. (2007). Comparative analysis of sequences preceding protein-coding mitochondrial genes in flowering plants. *Molecular Biology and Evolution*. 24 (5). p.pp. 1101–1112.
- Heazlewood, J.L., Howell, K.A. & Millar, A.H. (2003a). Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice:

## Références bibliographiques

- Orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1604 (3). p.pp. 159–169.
- Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J.S., Gout, A.M., Day, D.A., Whelan, J. & Harvey Millar, A. (2004). Experimental Analysis of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components, Provides Assessment of Targeting Prediction Programs, and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins. *The Plant Cell*. 16 (January). p.pp. 241–256.
- Heazlewood, J.L., Whelan, J. & Millar, A.H. (2003b). The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are FO components in the plant F1FO ATP synthase. *FEBS Letters*. 540 (1-3). p.pp. 201–205.
- Hecht, J., Grewe, F. & Knoop, V. (2011). Extreme RNA editing in coding islands and abundant microsatellites in repeat sequences of *Selaginella moellendorffii* mitochondria: The root of frequent plant mtDNA recombination in early tracheophytes. *Genome Biology and Evolution*. 3 (1). p.pp. 344–358.
- Helfenbein, K.G., Ellis, T.P., Dieckmann, C.L. & Tzagoloff, A. (2003). ATP22, a nuclear gene required for expression of the FO sector of mitochondrial ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (22). p.pp. 19751–19756.
- Hell, K., Neupert, W. & Stuart, R.A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO Journal*. 20 (6). p.pp. 1281–1288.
- Hennon, S.W., Soman, R., Zhu, L. & Dalbey, R.E. (2015). YidC/Alb3/Oxa1 family of insertases. *Journal of Biological Chemistry*. 290 (24). p.pp. 14866–14874.
- Herbert, C.J., Golik, P. & Bonnefoy, N. (2013). Yeast PPR proteins, watchdogs of mitochondrial gene expression. *RNA biology*. 10 (9). p.pp. 1477–94.
- Herrmann, J.M., Woellhaf, M.W. & Bonnefoy, N. (2013). Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1833 (2). p.pp. 286–294.
- Holec, S., Lange, H., Kuhn, K., Alioua, M., Borner, T. & Gagliardi, D. (2006). Relaxed transcription in Arabidopsis mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. *Mol Cell Biol*. 26 (7). p.pp. 2869–2876.
- Hölzle, A., Jonietz, C., Törjek, O., Altmann, T., Binder, S. & Forner, J. (2011). A Restorer of Fertility-like PPR gene is required for 5a'-end processing of the nad4 mRNA in mitochondria of arabidopsis thaliana. *Plant Journal*. 65 (5). p.pp. 737–744.
- Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K.L., Gerner, C. & Rossmannith, W. (2008). RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme. *Cell*. 135 (3). p.pp. 462–474.
- Howard, M.J., Lim, W.H., Fierke, C.A. & Koutmos, M. (2012). Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (40). p.pp. 16149–16154.
- Howe, G. & Merchant, S. (1994). The biosynthesis of bacterial and plastidic c-type cytochromes. *Photosynthesis Research*. 40 (2). p.pp. 147–165.
- Hsieh, W.-Y., Liao, J.-C., Chang, C.-Y., Harrison, T., Boucher, C. & Hsieh, M.-H. (2015). The SLOW GROWTH3 Pentatricopeptide Repeat Protein Is Required for the Splicing of Mitochondrial NADH

## Références bibliographiques

- Dehydrogenase Subunit7 Intron 2 in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 168 (2). p.pp. 490–501.
- Hu, J., Wang, K., Huang, W., Liu, G., Gao, Y., Wang, J., Huang, Q., Ji, Y., Qin, X., Wan, L., Zhu, R., Li, S., Yang, D. & Zhu, Y. (2012). The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *The Plant Cell*. 24 (1). p.pp. 109–122.
- Hu, Z., Vanderhaeghen, R., Cools, T., Wang, Y., De Clercq, I., Leroux, O., Nguyen, L., Belt, K., Millar, A.H., Audenaert, D., Hilson, P., Small, I., Mouille, G., Vernhettes, S., Van Breusegem, F., Whelan, J., Höfte, H. & De Veylder, L. (2016). Mitochondrial Defects Confer Tolerance against Cellulose Deficiency. *The Plant Cell*. 28 (9). p.pp. 2276–2290.
- Huang, J., Struck, F. & Dale, F. (1994). *Flower-Enhanced Expression of a Nuclear-Encoded Mitochondrial Respiratory Protein 1 s Associated with Changes in Mitochondrion Number*. 6 (March). p.pp. 439–448.
- Ichinose, M., Sugita, C., Yagi, Y., Nakamura, T. & Sugita, M. (2013). Two DYW subclass PPR proteins are Involved in RNA editing of *ccmF*c and *atp9* transcripts in the moss *Physcomitrella patens*: First complete set of PPR editing factors in plant mitochondria. *Plant and Cell Physiology*. 54 (11). p.pp. 1907–1916.
- Ichinose, M. & Sugita, M. (2017). RNA editing and its molecular mechanism in plant organelles. *Genes*. 8 (1).
- Ichinose, M., Tasaki, E., Sugita, C. & Sugita, M. (2012). A PPR-DYW protein is required for splicing of a group II intron of *cox1* pre-mRNA in *Physcomitrella patens*. *Plant Journal*. 70 (2). p.pp. 271–278.
- Ikeda, T.M. & Gray, M.W. (1999). Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Molecular and cellular biology*. 19 (12). p.pp. 8113–22.
- Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R. & Weissman, J.S. (2009). Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science*. 324 (5924). p.pp. 218–223.
- Islas-Osuna, M.A., Ellis, T.P., Marnell, L.L., Mittelmeier, T.M. & Dieckmann, C.L. (2002). Cbp1 is required for translation of the mitochondrial cytochrome b mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (41). p.pp. 37987–37990.
- Janska, H. & Kwasniak, M. (2014). Mitochondrial regulation of OXPHOS biogenesis in plants. *Frontiers in plant science*. 5 (March). p.p. 79.
- 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. *EMBO Journal*. 22 (24). p.pp. 6438–6447.
- Jonietz, C., Forner, J., Hildebrandt, T. & Binder, S. (2011). RNA PROCESSING FACTOR3 is crucial for the accumulation of mature *ccmC* transcripts in mitochondria of Arabidopsis accession Columbia. *Plant physiology*. 157 (3). p.pp. 1430–9.
- Jonietz, C., Forner, J., Hölzle, A., Thuss, S. & Binder, S. (2010). RNA PROCESSING FACTOR2 is required for 5' end processing of *nad9* and *cox3* mRNAs in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*. 22 (2). p.pp. 443–53.
- Jordan, D.R., Klein, R.R., Sakrewski, K.G., Henzell, R.G., Klein, P.E. & Mace, E.S. (2011). Mapping and characterization of Rf 5: A new gene conditioning pollen fertility restoration in A 1 and A 2

## Références bibliographiques

- cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theoretical and Applied Genetics*. 123 (3). p.pp. 383–396.
- Jordan, D.R., Mace, E.S., Henzell, R.G., Klein, P.E. & Klein, R.R. (2010). Molecular mapping and candidate gene identification of the Rf2 gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical and Applied Genetics*. 120 (7). p.pp. 1279–1287.
- Kadowaki, K. ichi, Suzuki, T. & Kazama, S. (1990). A chimeric gene containing the 5' portion of atp6 is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. *MGG Molecular & General Genetics*. 224 (1). p.pp. 10–16.
- Kazama, T., Nakamura, T., Watanabe, M., Sugita, M. & Toriyama, K. (2008). Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant Journal*. 55 (4). p.pp. 619–628.
- Kazama, T. & Toriyama, K. (2003). A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Letters*. 544 (1-3). p.pp. 99–102.
- Keren, I., Tal, L., Des Francs-Small, C.C., Ara??jo, W.L., Shevtsov, S., Shaya, F., Fernie, A.R., Small, I. & Ostersetzer-Biran, O. (2012). NMAT1, a nuclear-encoded maturase involved in the trans-splicing of nad1 intron 1, is essential for mitochondrial complex i assembly and function. *Plant Journal*. 71 (3). p.pp. 413–426.
- Kim, B., Kim, K., Yang, T.J. & Kim, S. (2016). Completion of the mitochondrial genome sequence of onion (*Allium cepa* L.) containing the CMS-S male-sterile cytoplasm and identification of an independent event of the ccmF N gene split. *Current Genetics*. 62 (4). p.pp. 873–885.
- Kim, S.R., Yang, J. Il, Moon, S., Ryu, C.H., An, K., Kim, K.M., Yim, J. & An, G. (2009). Rice OGR1 encodes a pentatricopeptide repeat-DYW protein and is essential for RNA editing in mitochondria. *Plant Journal*. 59 (5). p.pp. 738–749.
- Kissil, J.L., Cohen, O., Raveh, T. & Kimchi, A. (1999). Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death. *The European Molecular Biology Organization journal*. 18 (2). p.pp. 353–362.
- Klein, R.R., Klein, P.E., Chhabra, A.K., Dong, J., Pammi, S., Childs, K.L., Mullet, J.E., Rooney, W.L. & Schertz, K.F. (2001). Molecular mapping of the rf1 gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 102 (8). p.pp. 1206–1212.
- Klein, R.R., Klein, P.E., Mullet, J.E., Minx, P., Rooney, W.L. & Schertz, K.F. (2005). Fertility restorer locus Rf1 of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theoretical and Applied Genetics*. 111 (6). p.pp. 994–1012.
- Klodmann, J. & Braun, H.-P. (2011). Proteomic approach to characterize mitochondrial complex I from plants. *Phytochemistry*. 72 (10). p.pp. 1071–80.
- Klodmann, J., Senkler, M., Rode, C. & Braun, H.-P. (2011). Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. *Plant physiology*. 157 (2). p.pp. 587–98.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., Jansch, L. & Braun, H.P. (2010). Internal Architecture of Mitochondrial Complex I from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 22 (3). p.pp. 797–810.
- Knie, N., Grewe, F., Fischer, S. & Knoop, V. (2016). Reverse U-to-C editing exceeds C-to-U RNA editing

## Références bibliographiques

- in some ferns – a monilophyte-wide comparison of chloroplast and mitochondrial RNA editing suggests independent evolution of the two processes in both organelles. *BMC Evolutionary Biology*. 16 (1). p.p. 134.
- Koc, E.C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moseley, A. & Spremulli, L.L. (2001a). The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome: Identification of the full complement of ribosomal proteins present. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (22). p.pp. 19363–19374.
- Koc, E.C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moyer, M.B., Schlatzer, D.M., Moseley, A. & Spremulli, L.L. (2001b). The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome: Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (47). p.pp. 43958–43969.
- Koc, E.C., Haque, M.E. & Spremulli, L.L. (2010). Current views of the structure of the mammalian mitochondrial ribosome. *Israel Journal of Chemistry*. 50 (1). p.pp. 45–59.
- Koc, E.C., Ranasinghe, A., Burkhart, W., Blackburn, K., Koc, H., Moseley, A. & Spremulli, L.L. (2001c). A new face on apoptosis: Death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins. *FEBS Letters*. 492 (1-2). p.pp. 166–170.
- Koizuka, N., Imai, R., Fujimoto, H., Hayakawa, T., Kimura, Y., Kohno-Murase, J., Sakai, T., Kawasaki, S. & Imamura, J. (2003). Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosen radish. *Plant Journal*. 34 (4). p.pp. 407–415.
- Komori, T., Ohta, S., Murai, N., Takakura, Y., Kuraya, Y., Suzuki, S., Hiei, Y., Imaseki, H. & Nitta, N. (2004). Map-based cloning of a fertility restorer gene, Rf-1, in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Journal*. 37 (3). p.pp. 315–325.
- Koonin, E. V (2010). The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biology*. 11 (5). p.p. 209.
- Koprivova, A., Francs-Small, C.C. Des, Calder, G., Mugford, S.T., Tanz, S., Lee, B.R., Zechmann, B., Small, I. & Kopriva, S. (2010). Identification of a pentatricopeptide repeat protein implicated in splicing of intron 1 of mitochondrial nad7 transcripts. *Journal of Biological Chemistry*. 285 (42). p.pp. 32192–32199.
- Köster, J. & Rahmann, S. (2012). Snakemake-a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics*. 28 (19). p.pp. 2520–2522.
- Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G. & Merchant, S. (1998). Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. *Molecular Microbiology*. 29 (2). p.pp. 383–396.
- Krishnasamy, S. & Makaroff, C. a (1994). Organ-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. *Plant molecular biology*. 26 (3). p.pp. 935–46.
- Kruft, V., Eubel, H., Jänsch, L., Werhahn, W. & Braun, H.P. (2001). Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. *Plant physiology*. 127 (4). p.pp. 1694–710.
- Kühl, I., Dujeancourt, L., Gaisne, M., Herbert, C.J. & Bonnefoy, N. (2011). A genome wide study in fission yeast reveals nine PPR proteins that regulate mitochondrial gene expression. *Nucleic Acids Research*. 39 (18). p.pp. 8029–8041.
- Kühn, K., Carrie, C., Giraud, E., Wang, Y., Meyer, E.H., Narsai, R., Des Francs-Small, C.C., Zhang, B.,

## Références bibliographiques

- Murcha, M.W. & Whelan, J. (2011). The RCC1 family protein RUG3 is required for splicing of nad2 and complex I biogenesis in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*. 67 (6). p.pp. 1067–1080.
- Kuhn, K., Obata, T., Feher, K., Bock, R., Fernie, A.R. & Meyer, E.H. (2015). Complete Mitochondrial Complex I Deficiency Induces an Up-Regulation of Respiratory Fluxes That Is Abolished by Traces of Functional Complex I. *Plant Physiology*. 168 (4). p.pp. 1537–1549.
- Kühn, K., Richter, U., Meyer, E.H., Delannoy, E., de Longevialle, A.F., O'Toole, N., Börner, T., Millar, a H., Small, I.D. & Whelan, J. (2009). Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*. 21 (9). p.pp. 2762–2779.
- Kühn, K., Weihe, A. & Börner, T. (2005). Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*. 33 (1). p.pp. 337–346.
- Kuras, R., Saint-Marcoux, D., Wollman, F. & de Vitry, C. (2007). A specific c-type cytochrome maturation system is required for oxygenic photosynthesis. *PNAS*. 104 (23). p.pp. 9906–9910.
- Kuras, R., Vitry, C. De, Girard-bascou, J., Büschlen, S., Merchant, S., Wollman, F., Choquet, Y., Culler, D. & Bu, S. (1997). *Molecular Genetic Identification of a Pathway for Heme Binding to Cytochrome b 6* *Molecular Genetic Identification of a Pathway for Heme Binding to Cytochrome b 6* \*. 272 (51). p.pp. 32427–32435.
- Kuzmenko, A., Atkinson, G.C., Levitskii, S., Zenkin, N., Tenson, T., Hauryliuk, V. & Kamenski, P. (2014). Mitochondrial translation initiation machinery: Conservation and diversification. *Biochimie*. 100 (1) p.pp. 132–140.
- Kwasniak, M., Majewski, P., Skibior, R., Adamowicz, A., Czarna, M., Sliwinska, E. & Janska, H. (2013). Silencing of the nuclear RPS10 gene encoding mitochondrial ribosomal protein alters translation in arabidopsis mitochondria. *The Plant cell*. 25 (5). p.pp. 1855–67.
- Laloi, M. (1999). Plant mitochondrial carriers: An overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 56 (11-12). p.pp. 918–944.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*. 10 (3). p.p. R25.
- Lechary, A., Boudet, N., Gy, I., Aubourg, S. & Kreis, M. (2003). Introns in, introns out in plant gene families: A genomic approach of the dynamics of gene structure. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 3 (1-4). p.pp. 111–116.
- Lee, K., Han, J.H., Park, Y. Il, Colas des Francs-Small, C., Small, I. & Kang, H. (2017). The mitochondrial pentatricopeptide repeat protein PPR19 is involved in the stabilization of NADH dehydrogenase 1 transcripts and is crucial for mitochondrial function and Arabidopsis thaliana development. *New Phytologist*.
- Leino, M., Landgren, M. & Glimelius, K. (2005). Alloplasmic effects on mitochondrial transcriptional activity and RNA turnover result in accumulated transcripts of Arabidopsis orfs in cytoplasmic male-sterile Brassica napus. *Plant Journal*. 42 (4). p.pp. 469–480.
- León, G., Holuigue, L. & Jordana, X. (2007). Mitochondrial complex II Is essential for gametophyte development in Arabidopsis. *Plant physiology*. 143 (4). p.pp. 1534–1546.
- Letts, J.A., Fiedorczuk, K. & Sazanov, L.A. (2016). The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*. 537 (7622). p.pp. 644–648.



## Références bibliographiques

- Leu, K.-C., Hsieh, M.-H., Wang, H.-J., Hsieh, H.-L. & Jauh, G.-Y. (2016). Distinct role of Arabidopsis mitochondrial P-type pentatricopeptide repeat protein-modulating editing protein, PPME, in nad1 RNA editing. *RNA biology*. 13 (6). p.pp. 593–604.
- Levshenkova, E. V, Ukraintsev, K.E., Orlova, V. V, Alibaeva, R.A., Kovriga, I.E., Zhugdernamzhilyn, O. & Frolova, E.I. (2004). The Structure and Specific Features of the cDNA Expression of the Human Gene MRPL37. *Journal of Bioorganic Chemistry*. 30 (5). p.pp. 499–506.
- Li, G.-W., Oh, E. & Weissman, J.S. (2012). The anti-Shine–Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature*. 484 (7395). p.pp. 538–541.
- Li, G.W., Burkhardt, D., Gross, C. & Weissman, J.S. (2014a). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*. 157 (3). p.pp. 624–635.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25 (16). p.pp. 2078–2079.
- Li, X.J., Zhang, Y.F., Hou, M., Sun, F., Shen, Y., Xiu, Z.H., Wang, X., Chen, Z.L., Sun, S.S.M., Small, I. & Tan, B.C. (2014b). Small kernel 1 encodes a pentatricopeptide repeat protein required for mitochondrial nad7 transcript editing and seed development in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant Journal*. 79 (5). p.pp. 797–809.
- Liao, Y., Smyth, G.K. & Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 30 (7). p.pp. 923–930.
- Lightowlers, R.N. & Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2013). Human pentatricopeptide proteins: only a few and what do they do? *RNA Biol*. 10 (9). p.pp. 1433–1438.
- Lightowlers, R.N., Rozanska, A. & Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2014). Mitochondrial protein synthesis: Figuring the fundamentals, complexities and complications, of mammalian mitochondrial translation. *FEBS Letters*. 588 (15) p.pp. 2496–2503.
- Liu, M. & Spremulli, L. (2000). Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (38). p.pp. 29400–29406.
- Liu, Q. & Fredrick, K. (2016). Intersubunit Bridges of the Bacterial Ribosome. *Journal of Molecular Biology*. 428 (10). p.pp. 2146–2164.
- Liu, X.Q., Xu, X., Tan, Y.P., Li, S.Q., Hu, J., Huang, J.Y., Yang, D.C., Li, Y.S. & Zhu, Y.G. (2004). Inheritance and molecular mapping of two fertility-restoring loci for Honglian gametophytic cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics*. 271 (5). p.pp. 586–594.
- Liu, Y., He, J., Chen, Z., Ren, X., Hong, X. & Gong, Z. (2010). ABA overly-sensitive 5 (ABO5), encoding a pentatricopeptide repeat protein required for cis-splicing of mitochondrial nad2 intron 3, is involved in the abscisic acid response in Arabidopsis. *Plant Journal*. 63 (5). p.pp. 749–765.
- Liu, Y.-J., Xiu, Z.-H., Meeley, R. & Tan, B.-C. (2013). Empty pericarp5 encodes a pentatricopeptide repeat protein that is required for mitochondrial RNA editing and seed development in maize. *The Plant cell*. 25 (March). p.pp. 868–83.
- de Longevialle, A.F., Meyer, E.H., Andrés, C., Taylor, N.L., Lurin, C., Millar, A.H. & Small, I.D. (2007). The pentatricopeptide repeat gene OTP43 is required for trans-splicing of the mitochondrial nad1 Intron 1 in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*. 19 (10). p.pp. 3256–65.

## Références bibliographiques

- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 15 (12). p.p. 550.
- Lupo, D., Vollmer, C., Deckers, M., Mick, D.U., Tews, I., Sinning, I. & Rehling, P. (2011). Mdm38 is a 14-3-3-like receptor and associates with the protein synthesis machinery at the inner mitochondrial membrane. *Traffic*. 12 (10). p.pp. 1457–1466.
- Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.-L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.-P., Szurek, B., Taconnat, L. & Small, I. (2004). Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis. *The Plant Cell*. 16 (8). p.pp. 2089–2103.
- Lyska, D., Paradies, S., Meierhoff, K. & Westhoff, P. (2007). HCF208, a homolog of Chlamydomonas CCB2, is required for accumulation of native cytochrome b6 in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*. 48 (12). p.pp. 1737–1746.
- Mackenzie, S. & McIntosh, L. (1999). Higher plant mitochondria. *Plant Cell*. 11 (4). p.pp. 571–586.
- Mai, N., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A. & Lightowlers, R.N. (2016). The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell and Tissue Research*. p.pp. 1–16.
- 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. p.p. 36.
- Manavski, N., Guyon, V., Meurer, J., Wienand, U. & Brettschneider, R. (2012). An Essential Pentatricopeptide Repeat Protein Facilitates 5' Maturation and Translation Initiation of rps3 mRNA in Maize Mitochondria. *The Plant Cell*. 24 (7). p.pp. 3087–3105.
- Mannella, C.A. (2008). Structural Diversity of Mitochondria: Functional Implications. *Ann N Y Acad Sci*. 1147. p.pp. 171–179.
- Mannella, C.A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763. p.pp. 542–548.
- Manthey, G.M. & McEwen, J.E. (1995). The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of Saccharomyces cerevisiae. *The EMBO journal*. 14 (16). p.pp. 4031–4043.
- Manthey, G.M., Przybyla-Zawislak, B.D. & McEwen, J.E. (1998). The Saccharomyces cerevisiae Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. *FEBS Journal*. 255 (1). p.pp. 156–61.
- Margulis, L. (1976). Genetic and evolutionary consequences of symbiosis. *Experimental Parasitology*. 39 (2). p.pp. 277–349.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 17 (1). p.p. 10.
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *Journal of Molecular Biology*. 288 (5). p.pp. 911–940.
- Mayer, A., Neupert, W. & Lill, R. (1995). Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 270 (21) p.pp. 12390–12397.

## Références bibliographiques

- Mcculloch, V., Seidel-rogol, B.L. & Shadel, G.S. (2002). A Human Mitochondrial Transcription Factor Is Related to RNA Adenine Methyltransferases and Binds S<sup>-</sup>-Adenosylmethionine. *Molecular and Cellular Biology*. 22 (4). p.pp. 1116–1125.
- McDonald, A.E. (2009). Alternative oxidase: What information can protein sequence comparisons give us? *Physiologia Plantarum*. 137 (4). p.pp. 328–341.
- McDonald, A.E. & Vanlerberghe, G.C. (2006). Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*. 1 (3). p.pp. 357–364.
- Meeuse, B.J.D. (1975). Thermogenic respiration. *Annual review of plant physiology*. 26 (83). p.pp. 117–126.
- Mercer, T.R., Neph, S., Dinger, M.E., Crawford, J., Smith, M.A., Shearwood, A.M.J., Haugen, E., Bracken, C.P., Rackham, O., Stamatoyannopoulos, J.A., Filipovska, A. & Mattick, J.S. (2011). The human mitochondrial transcriptome. *Cell*. 146 (4). p.pp. 645–658.
- Meyer, E.H., Giegé, P., Gelhaye, E., Rayapuram, N., Ahuja, U., Thöny-Meyer, L., Grienenberger, J.-M. & Bonnard, G. (2005). AtCCMH, an essential component of the c-type cytochrome maturation pathway in Arabidopsis mitochondria, interacts with apocytochrome c. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 102 (44). p.pp. 16113–16118.
- Meyer, E.H., Solheim, C., Tanz, S.K., Bonnard, G. & Millar, A.H. (2011). Insights into the composition and assembly of the membrane arm of plant complex I through analysis of subcomplexes in Arabidopsis mutant lines. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (29). p.pp. 26081–26092.
- Meyer, E.H., Taylor, N.L. & Millar, A.H. (2008). Resolving and identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis. *Journal of Proteome Research*. 7 (2). p.pp. 786–794.
- Michalecka, A.M., Agius, S.C., Müller, I.M. & Rasmusson, A.G. (2004). Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant Journal*. 37 (3). p.pp. 415–425.
- Michalecka, A.M., Svensson, A.S., Johansson, F.I., Agius, S.C., Johanson, U., Brennicke, A., Binder, S. & Rasmusson, A.G. (2003). Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant physiology*. 133 (2). p.pp. 642–52.
- Mick, D.U., Dennerlein, S., Wiese, H., Reinhold, R., Pacheu-Grau, D., Lorenzi, I., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Shoubridge, E.A., Warscheid, B. & Rehling, P. (2012). MITRAC links mitochondrial protein translocation to respiratory-chain assembly and translational regulation. *Cell*. 151 (7). p.pp. 1528–1541.
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giege, P. & Leaver, C.J. (2001a). Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. *Plant Physiology*. 127 (4). p.pp. 1711–1727.
- Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L. & Day, D.A. (2011). Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 62 (1). p.pp. 79–104.
- Millar, H., Considine, M.J., Day, D. & Whelan, J. (2001b). Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants. *IUBMB life*. 51 (4). p.pp. 201–205.
- Millar, H., Eubel, H., Jänsch, L., Kruff, V., Heazlewood, J.L. & Braun, H.P. (2004). Mitochondrial

## Références bibliographiques

- cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Molecular Biology*. 56 (1). p.pp. 77–90.
- Millar, H., Heazlewood, J.L., Kristensen, B.K., Braun, H.P. & Møller, I.M. (2005). The plant mitochondrial proteome. *Trends in Plant Science*. 10 (1). p.pp. 36–43.
- Millar, H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L. & Foyer, C.H. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant physiology*. 133 (2). p.pp. 443–447.
- Mingler, M.K., Hingst, A.M., Clement, S.L., Yu, L.E., Reifur, L. & Koslowsky, D.J. (2006). Identification of pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 150 (1). p.pp. 37–45.
- Mittelmeier, T.M. & Dieckmann, C.L. (1995). In vivo analysis of sequences required for translation of cytochrome b transcripts in yeast mitochondria. *Molecular and cellular biology*. 15 (2). p.pp. 780–9.
- Moller, I.M. (2001). Plant Mitochondria and Oxydative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52. p.pp. 561–591.
- Montoya, J., Ojala, D. & Attardi, G. (1981). Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*. 290 (5806). p.pp. 465–470.
- Moore, C.S., Cook-Johnson, R.J., Rudhe, C., Whelan, J., Day, D.A., Wiskich, J.T. & Soole, K.L. (2003). Identification of AtNDI1, an internal non-phosphorylating NAD(P)H dehydrogenase in Arabidopsis mitochondria. *Plant Physiol*. 133 (4). p.pp. 1968–1978.
- Morgan, D.J. & Sazanov, L.A. (2008). Three-dimensional structure of respiratory complex I from *Escherichia coli* in ice in the presence of nucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1777 (7-8). p.pp. 711–718.
- Mulero, J.J. & Fox, T.D. (1993). Alteration of the *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111. *Molecular biology of the cell*. 4 (12). p.pp. 1327–1335.
- Murayama, M., Hayashi, S., Nishimura, N., Ishide, M., Kobayashi, K., Yagi, Y., Asami, T., Nakamura, T., Shinozaki, K. & Hirayama, T. (2012). Isolation of Arabidopsis ahg11, a weak ABA hypersensitive mutant defective in nad4 RNA editing. *Journal of Experimental Botany*. 63 (14). p.pp. 5301–5310.
- Murcha, M.W., Kmiec, B., Kubiszewski-Jakubiak, S., Teixeira, P.F., Glaser, E. & Whelan, J. (2014). Protein import into plant mitochondria: Signals, machinery, processing, and regulation. *Journal of Experimental Botany*. 65 (22). p.pp. 6301–6335.
- Naithani, S., Saracco, S.A., Butler, C.A. & Fox, T.D. (2003). Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific Translational Activator Proteins on the Inner Surface of the Mitochondrial Inner Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 14 (January). p.pp. 2372–2384.
- Nakagawa, T. (2007). *pGWB Vectors*.
- Nakamoto, R.K., Baylis Scanlon, J.A. & Al-Shawi, M.K. (2009). The Rotary Mechanism of the ATP Synthase. *Arch biochem Biophys*. 476 (1). p.pp. 43–50.

## Références bibliographiques

- Nakamoto, S.S., Hamel, P. & Merchant, S. (2000). Assembly of chloroplast cytochromes b and c. *Biochimie*. 82 (6-7). p.pp. 603-614.
- Nierman, W.C., Feldblyum, T. V., Laub, M.T., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Alley, M.R., Ohta, N., Maddock, J.R., Potocka, I., Nelson, W.C., Newton, A., Stephens, C., Phadke, N.D., Ely, B., DeBoy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M.L., Haft, D.H., Kolonay, J.F., Smit, J., Craven, M.B., Khouri, H., Shetty, J., Berry, K., Utterback, T., Tran, K., Wolf, A., Vamathevan, J., Ermolaeva, M., White, O., Salzberg, S.L., Venter, J.C., Shapiro, L., Fraser, C.M. & Eisen, J. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (7). p.pp. 4136-41.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2000). The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science*. 289 (5481). p.pp. 920-930.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakazono, M., Hirai, A. & Kadowaki, K. (2002). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: Frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Molecular Genetics and Genomics*. 268 (4). p.pp. 434-445.
- Nouws, J., Goswami, A. V., Bestwick, M., McCann, B.J., Surovtseva, Y. V. & Shadel, G.S. (2016). Mitochondrial ribosomal protein L12 is required for POLRMT stability and exists as two forms generated by alternative proteolysis during import. *Journal of Biological Chemistry*. 291 (2). p.pp. 989-997.
- O'Brien, T.W. (1971). The General in Mammalian Occurrence of 55 S Ribosomes Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 246 (10). p.pp. 3409-3417.
- O'Brien, T.W., Fiesler, S.E., Denslow, N.D., Thiede, B., Wittmann-liebold, B., Mougey, E.B., Sylvester, J.E. & Graack, H.R. (1999). *Mammalian Mitochondrial Ribosomal Proteins ( 2 )*. 274 (51). p.pp. 36043-36051.
- O'Brien, T.W., Liu, J., Sylvester, J.E., Mougey, E.B., Fischel-Ghodsian, N., Thiede, B., Wittmann-Liebold, B. & Graack, H.R. (2000). Mammalian mitochondrial ribosomal proteins (4): Amino acid sequencing, characterization, and identification of corresponding gene sequences. *Journal of Biological Chemistry*. 275 (24). p.pp. 18153-18159.
- O'Connor, P.B.F., Li, G.W., Weissman, J.S., Atkins, J.F. & Baranov, P. V. (2013). RRNA:mRNA pairing alters the length and the symmetry of mRNA-protected fragments in ribosome profiling experiments. *Bioinformatics*. 29 (12). p.pp. 1488-1491.
- 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). p.pp. 1120-1128.
- Oda, K., Kohchi, T. & Ohyama, K. (1992). Mitochondrial DNA of *Marchantia polymorpha* as a single circular form with no incorporation of foreign DNA. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 56 (1). p.pp. 132-5.
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Jr, W.M.C., Tarry, M.J., Carter, A.P. & Ramakrishnan, V. (2009). *Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30 S Ribosomal Subunit*. 897 (2001). p.pp. 897-903.
- Ohtani, S., Ichinose, M., Tasaki, E., Aoki, Y., Komura, Y. & Sugita, M. (2010). Targeted gene disruption identifies three PPR-DYW proteins involved in RNA editing for five editing sites of the moss mitochondrial transcripts. *Plant and Cell Physiology*. 51 (11). p.pp. 1942-1949.

## Références bibliographiques

- Ojala, D., Montoya, J. & Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*. 290 (5806). p.pp. 470–474.
- Okuda, K. & Shikanai, T. (2012). A pentatricopeptide repeat protein acts as a site-specificity factor at multiple RNA editing sites with unrelated cis-acting elements in plastids. *Nucleic Acids Research*. 40 (11). p.pp. 5052–5064.
- Oldenkott, B., Yamaguchi, K., Tsuji-Tsukinoki, S., Knie, N. & Knoop, V. (2014). Chloroplast RNA editing going extreme: more than 3400 events of C-to-U editing in the chloroplast transcriptome of the lycophyte *Selaginella uncinata*. *Rna*. 20 (10). p.pp. 1499–1506.
- Ott, M., Amunts, A. & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis\*. *Annual Review of Biochemistry*. 85 (1). p.pp. 77–101.
- Ott, M. & Herrmann, J.M. (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1803 (6). p.pp. 767–775.
- Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N. & Herrmann, J.M. (2006). Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *{Embo} J*. 25 (8). p.pp. 1603–1610.
- Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *The Anatomical Record*. 114 (3). p.pp. 427–451.
- Park, J.Y., Lee, Y.-P., Lee, J., Choi, B.-S., Kim, S. & Yang, T.-J. (2013). Complete mitochondrial genome sequence and identification of a candidate gene responsible for cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.) containing DCGMS cytoplasm. *Theoretical and Applied Genetics*. 126 (7). p.pp. 1763–1774.
- Payne, M.J., Finnegan, P.M., Smooker, P.M. & Lukins, H.B. (1993). Characterization of a second nuclear gene, AEP1, required for expression of the mitochondrial OLI1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*. 24 (1-2). p.pp. 126–135.
- Payne, M.J., Schweizer, E. & Lukins, H.B. (1991). Properties of two nuclear pet mutants affecting expression of the mitochondrial oli1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*. 19 (5). p.pp. 343–51.
- Pelletier, G., Primard, C., Vedel, F., Chetrit, P., Remy, R., Rousselle & Renard, M. (1983). Intergenic cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *MGG Molecular & General Genetics*. 191 (2). p.pp. 244–250.
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M. & Frey, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol*. 119 (3). p.pp. 260–272.
- Pfalz, J., Bayraktar, O.A., Prikryl, J. & Barkan, A. (2009). Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *The EMBO journal*. 28 (14). p.pp. 2042–52.
- Pfeffer, S., Brandt, F., Hrabe, T., Lang, S., Eibauer, M., Zimmermann, R. & Förster, F. (2012). Structure and 3D arrangement of endoplasmic reticulum membrane-associated ribosomes. *Structure*. 20 (9). p.pp. 1508–1518.
- 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. p.p. 6019.
- Piao, L., Li, Y., Kim, S.J., Byun, H.S., Huang, S.M., Hwang, S.K., Yang, K.J., Park, K.A., Won, M., Hong, J.,

## Références bibliographiques

- Hur, G.M., Seok, J.H., Shong, M., Cho, M.H., Brazil, D.P., Hemmings, B.A. & Park, J. (2009). Association of LETM1 and mrpl36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. *Cancer Research*. 69 (8). p.pp. 3397–3404.
- Polidoros, A.N., Mylona, P. V. & Arnholdt-Schmitt, B. (2009). Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiologia Plantarum*. 137 (4). p.pp. 342–353.
- Polikanov, Y.S., Steitz, T.A. & Innis, C.A. (2014). A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide-bond formation on the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*. 21 (9). p.pp. 787–793.
- Poutre, C.G. & Fox, T.D. (1987). PET111, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics*. 115 (4). p.pp. 637–647.
- Preuss, M., Leonhard, K., Hell, K., Stuart, R. a, Neupert, W. & Herrmann, J.M. (2001). Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*. 153 (5). p.pp. 1085–96.
- 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). p.pp. 415–20.
- Pring, D.R., Mullen, J.A. & Kempken, F. (1992). Conserved sequence blocks 5' to start codons of plant mitochondrial genes. *Plant Molecular Biology*. 19 (2). p.pp. 313–317.
- Pruitt, K.D. & Hanson, M.R. (1991). Splicing of the *Petunia* Cytochrome Oxidase Subunit-II Intron. *Current Genetics*. 19 (3). p.pp. 191–197.
- Qi, W., Tian, Z., Lu, L., Chen, X., Chen, X., Zhang, W. & Song, R. (2017a). Editing of Mitochondrial Transcripts nad3 and cox2 by Dek10 Is Essential for Mitochondrial Function and Maize Plant Development. *Genetics*. 205 (4). p.pp. 1489–1501.
- Qi, W., Yang, Y., Feng, X., Zhang, M. & Song, R. (2017b). Mitochondrial function and maize kernel development requires dek2, a pentatricopeptide repeat protein involved in nad1 mRNA splicing. *Genetics*. 205 (1). p.pp. 239–249.
- Raczynska, D.K., Le, M., Rurek, M., Gualberto, M. & Augustyniak, H. (2006). *Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons*. 580. p.pp. 5641–5646.
- Raghavendra, A.S., Reumann, S. & Heldt, H.W. (1998). Participation of Mitochondrial Metabolism in Photorespiration. *Plant physiology*. 116 (4). p.pp. 1333–1337.
- Rak, M., Su, C.H., Xu, J.T., Azpiroz, R., Singh, A.M. & Tzagoloff, A. (2016). Regulation of mitochondrial translation of the ATP8/ATP6 mRNA by Smt1p. *Molecular Biology of the Cell*. 27 (6). p.pp. 919–929.
- Rao, R.S.P., Salvato, F., Thal, B., Eubel, H., Thelen, J.J. & Müller, I.M. (2017). The proteome of higher plant mitochondria. *Mitochondrion*. 33. p.pp. 22–37.
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L. & Elthon, T.E. (2004). Alternative Nad(P)H Dehydrogenases of Plant Mitochondria. *Annual Review of Plant Biology*. 55 (1). p.pp. 23–39.
- Rasmusson, A.G., Svensson, Å.S., Knoop, V., Grohmann, L. & Brennicke, A. (1999). Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: Two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant Journal*. 20 (1). p.pp. 79–87.

## Références bibliographiques

- Rayapuram, N., Hagenmuller, J., Grienenberger, J.M., Bonnard, G. & Giegé, P. (2008). The three mitochondrial encoded CcmF proteins form a complex that interacts with CCMH and c-type apocytochromes in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*. 283 (37). p.pp. 25200–25208.
- Rayapuram, N., Hagenmuller, J., Grienenberger, J.M., Giegé, P. & Bonnard, G. (2007). AtCCMA interacts with AtCcmB to form a novel mitochondrial ABC transporter involved in cytochrome C maturation in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*. 282 (29). p.pp. 21015–21023.
- Rébeillé, F., Macherel, D., Mouillon, J., Garin, J. & Douce, R. (1997). Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional. *The EMBO Journal*. 16 (5). p.pp. 947–957.
- Reed, M.L., Peeters, N.M. & Hanson, M.R. (2001). A single alteration 20 nt 5' to an editing target inhibits chloroplast RNA editing in vivo. *Nucleic Acids Research*. 29 (7). p.pp. 1507–1513.
- Ren, Q., Ahuja, U. & Thöny-Meyer, L. (2002). A bacterial cytochrome c heme lyase: CcmF forms a complex with the heme chaperone CcmE and CcmH but not with apocytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (10). p.pp. 7657–7663.
- Ren, Q. & Thöny-Meyer, L. (2001). Physical Interaction of CcmC with Heme and the Heme Chaperone CcmE during Cytochrome c Maturation. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (35). p.pp. 32591–32596.
- Rich, P.R. & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in biochemistry*. 47. p.pp. 1–23.
- Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P.M., Wessels, H.J., Huynen, M. a, Smeitink, J. a, Lightowers, R.N. & Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2010). A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *The EMBO journal*. 29 (6). p.pp. 1116–25.
- Richter-Dennerlein, R., Dennerlein, S. & Rehling, P. (2015). Integrating mitochondrial translation into the cellular context. *Nature Publishing Group*. 16 (10). p.pp. 586–592.
- Richter-Dennerlein, R., Oeljeklaus, S., Lorenzi, I., Rons??r, C., Bareth, B., Schendzielorz, A.B., Wang, C., Warscheid, B., Rehling, P. & Dennerlein, S. (2016). Mitochondrial Protein Synthesis Adapts to Influx of Nuclear-Encoded Protein. *Cell*. 167 (2). p.pp. 471–483.e10.
- Rodel, G. (1986). Two yeast nuclear genes cbs-1 and cbs-2 are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated cob leader. *Curr Genet*. 11 (1). p.pp. 41–46.
- Roloff, G.A. & Henry, M.F. (2015). Mam33 promotes cytochrome c oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Molecular biology of the cell*. 26 (16). p.pp. 2885–94.
- Rooijers, K., Loayza-Puch, F., Nijtmans, L.G. & Agami, R. (2013). Ribosome profiling reveals features of normal and disease-associated mitochondrial translation. *Nature Communications*. 4 (1). p.p. 2886.
- Rorbach, J., Richter, R., Wessels, H.J., Wydro, M., Pekalski, M., Farhoud, M., Kühl, I., Gaisne, M., Bonnefoy, N., Smeitink, J.A., Lightowers, R.N. & Chrzanowska-Lightowers, Z.M.A. (2008). The human mitochondrial ribosome recycling factor is essential for cell viability. *Nucleic Acids Research*. 36 (18). p.pp. 5787–5799.
- Rossmann, W. (2011). Localization of human RNase Z isoforms: Dual nuclear/mitochondrial targeting of the ELAC2 gene product by alternative translation initiation. *PLoS ONE*. 6 (4).
- Saisho, D., Nakazono, M., Lee, K.H., Tsutsumi, N., Akita, S. & Hirai, A. (2001a). The gene for alternative oxidase-2 (AOX2) from Arabidopsis thaliana consists of five exons unlike other AOX genes and is



## Références bibliographiques

- transcribed at an early stage during germination. *Genes & genetic systems*. 76 (2). p.pp. 89–97.
- Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N. & Hirai, A. (2001b). ATP synthesis inhibitors as well as respiratory inhibitors increase steady-state level of alternative oxidase mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*. 158 (2). p.pp. 241–245.
- Saisho, D., Nambara, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A. & Nakazono, M. (1997). Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 35 (5). p.pp. 585–596.
- Salinas-Giegé, T., Giegé, R. & Giegé, P. (2015). tRNA biology in mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (3). p.pp. 4518–4559.
- Salone, V., Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I., Knoop, V. & Lurin, C. (2007). A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Letters*. 581 (22). p.pp. 4132–4138.
- Salvato, F., Havelund, J.F., Chen, M., Rao, R.S.P., Rogowska-Wrzesinska, A., Jensen, O.N., Gang, D.R., Thelen, J.J. & Moller, I.M. (2014). The Potato Tuber Mitochondrial Proteome. *Plant Physiology*. 164 (2). p.pp. 637–653.
- Sanders, C., Turkarslan, S., Lee, D.W. & Daldal, F. (2010). Cytochrome c biogenesis: The Ccm system. *Trends in Microbiology*. 18 (6). p.pp. 266–274.
- Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO journal*. 19 (8). p.pp. 1777–1783.
- Schmeing, T.M. & Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 461 (7268). p.pp. 1234–1242.
- Schmitz-Linneweber, C. & Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Science*. 13 (12) p.pp. 663–670.
- Schulz, H., Fabianek, R.A., Pelliccioli, E.C., Hennecke, H. & Thöny-Meyer, L. (1999). Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome c maturation requires the CcmC protein, which may function independently of the ABC-transporter CcmAB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (11). p.pp. 6462–7.
- Schulz, H., Hennecke, H. & Thöny-Meyer, L. (1998). *Prototype of a Heme Chaperone Essential for Cytochrome c Maturation*. 281. p.pp. 1197–1201.
- Schuster, W., Hiesel, R., Isaac, P., Leaver, C. & Brennicke, A. (1986). *Transcript termini of messenger RNAs in higher plant mitochondria*. 14 (4). p.pp. 5943–5954.
- Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M. & Douna Cate, J.H. (2005). Structure of the Bacterial Ribosome at 3,5 Å Resolution. *Distribution*. (July). p.pp. 446–451.
- Sechet, J., Roux, C., Plessis, A., Effroy, D., Frey, A., Perreau, F., Biniek, C., Krieger-Liszkay, A., Macherel, D., North, H.M., Mireau, H. & Marion-Poll, A. (2015). The ABA-deficiency suppressor locus HAS2 encodes the PPR protein LOI1/MEF11 involved in mitochondrial RNA editing. *Molecular Plant*. 8 (4). p.pp. 644–656.
- Selinski, J., Hartmann, A., Kordes, A., Deckers-Hebestreit, G., Whelan, J. & Scheibe, R. (2017). Analysis of post-translational activation of alternative oxidase isoforms. *Plant Physiology*. [Online]. 61 (0). p.p. pp.00681.2017. Available from:

## Références bibliographiques

<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.17.00681>.

- Shadel, G.S. (2004). Coupling the mitochondrial transcription machinery to human disease. *Trends in Genetics*. 20 (10). p.pp. 513–519.
- Shah, P., Ding, Y., Niemczyk, M., Kudla, G. & Plotkin, J.B. (2013). Rate-limiting steps in yeast protein translation. *Cell*. 153 (7). p.pp. 1589–1601.
- 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). p.pp. 97–108.
- Shen, C., Zhang, D., Guan, Z., Liu, Y., Yang, Z., Yang, Y., Wang, X., Wang, Q., Zhang, Q., Fan, S., Zou, T. & Yin, P. (2016). Structural basis for specific single-stranded RNA recognition by designer pentatricopeptide repeat proteins. *Nat Commun*. 7. p.pp. 1–8.
- Shikanai, T. (2015). RNA editing in plants: Machinery and flexibility of site recognition. *Biochimica et biophysica acta*. 1847 (9). p.pp. 779–785.
- 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*. 71 (4). p.pp. 1342–1346.
- Sicheritz-Pontén, T., Kurland, C.G. & Andersson, S.G.E. (1998). A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1365 (3). p.pp. 545–551.
- Simon, M., Durand, S., Pluta, N., Gobron, N., Botran, L., Ricou, A., Camilleri, C. & Budar, F. (2016). Genomic conflicts that cause pollen mortality and raise reproductive barriers in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 203 (3). p.pp. 1353–1367.
- Skubatz, H. (2014). Thermoregulation in the appendix of the sauromatum guttatum (Schott) inflorescence. *Botanical Studies*. 55 (1). p.pp. 1–13.
- Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D. & Schuster, G. (2005). Polyadenylation and Degradation of Human Mitochondrial RNA: the Prokaryotic Past Leaves Its Mark. *Molecular and cellular biology*. 25 (15). p.pp. 6427–35.
- 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). p.pp. 1235–1251.
- Small, I.D. & Peeters, N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends in biochemical sciences*. 25 (2). p.pp. 46–47.
- 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 and Development*. 25 (12). p.pp. 1289–1305.
- 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). p.pp. 4686–4703.
- Soleimanpour-Lichaei, H.R., Kühl, I., Gaisne, M., Passos, J.F., Wydro, M., Rorbach, J., Temperley, R., Bonnefoy, N., Tate, W., Lightowlers, R. & Chrzanowska-Lightowlers, Z. (2007). mtRF1a Is a Human Mitochondrial Translation Release Factor Decoding the Major Termination Codons UAA and UAG.

## Références bibliographiques

- Molecular Cell*. 27 (5). p.pp. 745–757.
- Sonenberg, N. & Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*. 136 (4). p.pp. 731–745.
- Sosso, D., Mbelo, S., Vernoud, V., Gendrot, G., Dedieu, A., Chambrier, P., Dauzat, M., Heurtevin, L., Guyon, V., Takenaka, M. & Rogowsky, P.M. (2012). PPR2263, a DYW-Subgroup Pentatricopeptide Repeat Protein, Is Required for Mitochondrial nad5 and cob Transcript Editing, Mitochondrion Biogenesis, and Maize Growth. *the Plant Cell Online*. 24 (2). p.pp. 676–691.
- Spielwoy, N., Schulz, H., Grienberger, J.M., Thöny-Meyer, L. & Bonnard, G. (2001). CCME, a Nuclear-encoded Heme-binding Protein Involved in Cytochrome c Maturation in Plant Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (8). p.pp. 5491–5497.
- Stevens, J.M., Uchida, T., Daltrop, O. & Ferguson, S.J. (2005). Covalent cofactor attachment to proteins: cytochrome c biogenesis. *Biochemical Society Transactions*. 33 (4). p.pp. 792–795.
- Stoll, B. & Binder, S. (2016). Two NYN domain containing putative nucleases are involved in transcript maturation in Arabidopsis mitochondria. *Plant Journal*. 85 (2). p.pp. 278–288.
- Stoll, B., Zandler, 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). p.pp. 968–76.
- Stoll, K., Jonietz, C. & Binder, S. (2015). In Arabidopsis thaliana two co-adapted cyto-nuclear systems correlate with distinct ccmC transcript sizes. *Plant Journal*. 81 (2). p.pp. 247–257.
- Stoll, K., Jonietz, C., Schleicher, S., des Francs-Small, C.C., Small, I. & Binder, S. (2017). In Arabidopsis thaliana distinct alleles encoding mitochondrial RNA PROCESSING FACTOR 4 support the generation of additional 5' termini of ccmB transcripts. *Plant Molecular Biology*. 93 (6). p.pp. 659–668.
- Sultan, L.D., Milesheina, D., Grewe, F., Rolle, K., Abudraham, S., Głodowicz, P., Niazi, A.K., Keren, I., Shevtsov, S., Klipcan, L., Barciszewski, J., Mower, J.P., Dietrich, A. & Ostersetzer-Biran, O. (2016). The Reverse Transcriptase/RNA Maturase Protein MatR Is Required for the Splicing of Various Group II Introns in Brassicaceae Mitochondria. *The Plant Cell*. 28 (11). p.pp. 2805–2829.
- Sun, F., Wang, X., Bonnard, G., Shen, Y., Xiu, Z., Li, X., Gao, D., Zhang, Z. & Tan, B.C. (2015). Empty pericarp7 encodes a mitochondrial E-subgroup pentatricopeptide repeat protein that is required for ccmFN editing, mitochondrial function and seed development in maize. *Plant Journal*. 84 (2). p.pp. 283–295.
- Sun, T., Bentolila, S. & Hanson, M.R. (2016). The Unexpected Diversity of Plant Organelle RNA Editosomes. *Trends in Plant Science*. 21 (11). p.pp. 962–973.
- Sunderhaus, S., Dudkina, N. V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E.J. & Braun, H.P. (2006). Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (10). p.pp. 6482–6488.
- Sung, T.Y., Tseng, C.C. & Hsieh, M.H. (2010). The SLO1 PPR protein is required for RNA editing at multiple sites with similar upstream sequences in Arabidopsis mitochondria. *Plant Journal*. 63 (3). p.pp. 499–511.
- Surovtseva, Y. V., Shutt, T.E., Cotney, J., Cimen, H., Chen, S.Y., Koc, E.C. & Shadel, G.S. (2011).

## Références bibliographiques

- Mitochondrial ribosomal protein L12 selectively associates with human mitochondrial RNA polymerase to activate transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (44). p.pp. 17921–6.
- Suzuki, T., Terasaki, M., Takemoto-Hori, C., Hanada, T., Ueda, T., Wada, A. & Watanabe, K. (2001a). Proteomic Analysis of the Mammalian Mitochondrial Ribosome: Identification of protein components in the 28S small subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (35). p.pp. 33181–33195.
- Suzuki, T., Terasaki, M., Takemoto-Hori, C., Hanada, T., Ueda, T., Wada, A. & Watanabe, K. (2001b). Structural compensation for the deficit of rRNA with proteins in the mammalian mitochondrial ribosome. Systematic analysis of protein components of the large ribosomal subunit from mammalian mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (24). p.pp. 21724–21736.
- Suzuki, T.T., Nagao, A. & Suzuki, T.T. (2011). Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annual review of genetics*. 45. p.pp. 299–329.
- Sweetlove, L.J., Heazlewood, J.L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D.A., Leaver, C.J. & Millar, A.H. (2002). The impact of oxidative stress on *A. thaliana* mitochondria. *The Plant Journal*. 32. p.pp. 891–904.
- Szklarczyk, R., Wanschers, B.F., Cuypers, T.D., Esseling, J.J., Riemersma, M., van den Brand, M.A., Gloerich, J., Lasonder, E., van den Heuvel, L.P., Nijtmans, L.G. & Huynen, M.A. (2012). Iterative orthology prediction uncovers new mitochondrial proteins and identifies C12orf62 as the human ortholog of COX14, a protein involved in the assembly of cytochrome c oxidase. *Genome biology*. 13 (2). p.p. R12.
- Takenaka, M., Neuwirt, J. & Brennicke, A. (2004). Complex cis-elements determine an RNA editing site in pea mitochondria. *Nucleic Acids Research*. 32 (14). p.pp. 4137–4144.
- Takenaka, M., Verbitskiy, D., Zehrmann, A. & Brennicke, A. (2010). Reverse genetic screening identifies five E-class PPR proteins involved in RNA editing in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 285 (35). p.pp. 27122–27129.
- Takenaka, M., Verbitskiy, D., Zehrmann, A., Härtel, B., Bayer-Császár, E., Glass, F. & Brennicke, A. (2014). RNA editing in plant mitochondria -Connecting RNA target sequences and acting proteins. *Mitochondrion*. 19 (PB).
- Takenaka, M., Zehrmann, A., Brennicke, A. & Graichen, K. (2013). Improved Computational Target Site Prediction for Pentatricopeptide Repeat RNA Editing Factors. *PLoS ONE*. 8 (6). p.pp. 1–12.
- Tasaki, E., Hattori, M. & Sugita, M. (2010). The moss pentatricopeptide repeat protein with a DYW domain is responsible for RNA editing of mitochondrial ccmF<sub>c</sub> transcript. *Plant Journal*. 62 (4). p.pp. 560–570.
- Tavares-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingú-Vázquez, M., Torres-Larios, A. & Pérez-Martínez, X. (2008). The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial COX1 mRNA in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 283 (3). p.pp. 1472–1479.
- Taylor, N.L., Heazlewood, J.L. & Millar, A.H. (2011). The *Arabidopsis thaliana* 2-D gel mitochondrial proteome: Refining the value of reference maps for assessing protein abundance, contaminants and post-translational modifications. *Proteomics*. 11 (9). p.pp. 1720–1733.
- Taylor, R.W. & Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 6 (5). p.pp. 389–402.

## Références bibliographiques

- Temperley, R.J., Wydro, M., Lightowers, R.N. & Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2010). Human mitochondrial mRNAs-like members of all families, similar but different. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1797 (6-7). p.pp. 1081–1085.
- Theissen, U. & Martin, W. (2006). The difference between organelles and Response to Theissen and Martin. *Current Biology*. 16 (24). p.pp. 1016–1017.
- Thöny-Meyer, L. (2002). Cytochrome c maturation: a complex pathway for a simple task? *Biochemical Society*. p.pp. 633–638.
- Toda, T., Fujii, S., Noguchi, K., Kazama, T. & Toriyama, K. (2012). Rice MPR25 encodes a pentatricopeptide repeat protein and is essential for RNA editing of nad5 transcripts in mitochondria. *Plant Journal*. 72 (3). p.pp. 450–460.
- Tomecki, R., Dmochowska, A., Gewartowski, K., Dziembowski, A. & Stepień, P.P. (2004). Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Research*. 32 (20). p.pp. 6001–6014.
- Tourasse, N.J., Choquet, Y. & Vallon, O. (2013). PPR proteins of green algae. *RNA biology*. 10 (9). p.pp. 1526–42.
- Tsuboi, M., Morita, H., Nozaki, Y., Akama, K., Ueda, T., Ito, K., Nierhaus, K.H. & Takeuchi, N. (2009). EF-G2mt Is an Exclusive Recycling Factor in Mammalian Mitochondrial Protein Synthesis. *Molecular Cell*. 35 (4). p.pp. 502–510.
- Tucker, E.J., Wanschers, B.F.J., Szklarczyk, R., Mountford, H.S., Wijeyeratne, X.W., van den Brand, M.A.M., Leenders, A.M., Rodenburg, R.J., Reljić, B., Compton, A.G., Frazier, A.E., Bruno, D.L., Christodoulou, J., Endo, H., Ryan, M.T., Nijtmans, L.G., Huynen, M.A. & Thorburn, D.R. (2013). Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. *PLoS Genetics*. 9 (12).
- Uchida, M., Ohtani, S., Ichinose, M., Sugita, C. & Sugita, M. (2011). The PPR-DYW proteins are required for RNA editing of rps14, cox1 and nad5 transcripts in *Physcomitrella patens* mitochondria. *FEBS Letters*. 585 (14). p.pp. 2367–2371.
- Ui, H., Sameri, M., Pourkheirandish, M., Chang, M.C., Shimada, H., Stein, N., Komatsuda, T. & Handa, H. (2014). High-resolution genetic mapping and physical map construction for the fertility restorer Rfm1 locus in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 128 (2). p.pp. 283–290.
- 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. p.pp. 57–61.
- Uyttewaal, M., Arnal, N., Quadrado, M., Martin-Canadell, A., Vrielynck, N., Hiard, S., Gherbi, H., Bendahmane, A., Budar, F. & Mireau, H. (2008a). Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for *Ogura* cytoplasmic male sterility. *The Plant cell*. 20 (12). p.pp. 3331–3345.
- Uyttewaal, M., Mireau, H., Rurek, M., Hammani, K., Arnal, N., Quadrado, M. & Giegé, P. (2008b). PPR336 is Associated with Polysomes in Plant Mitochondria. *Journal of Molecular Biology*. 375 (3). p.pp. 626–636.
- Vanlerberghe, G.C., Robson, C.A. & Yip, J.Y.H. (2002). Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant physiology*. 129 (4). p.pp. 1829–1842.

## Références bibliographiques

- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.Y. & Dillies, M.A. (2016). SARTools: A DESeq2- and edgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. *PLoS ONE*. 11 (6). p.pp. 1–9.
- Verbitskiy, D., Härtel, B., Zehrmann, A., Brennicke, A. & Takenaka, M. (2011). The DYW-E-PPR protein MEF14 is required for RNA editing at site matR-1895 in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 585 (4). p.pp. 700–704.
- Verbitskiy, D., Merwe, J.A. Van Der, Zehrmann, A., Härtel, B. & Takenaka, M. (2012a). The E-class PPR protein MEF3 of *Arabidopsis thaliana* can also function in mitochondrial RNA editing with an additional DYW domain. *Plant and Cell Physiology*. 53 (2). p.pp. 358–367.
- Verbitskiy, D., Zehrmann, A., Brennicke, A. & Takenaka, M. (2010). A truncated MEF11 protein shows site-specific effects on mitochondrial RNA editing. *Plant signaling & behavior*. 5 (5). p.pp. 558–560.
- Verbitskiy, D., Zehrmann, A., Härtel, B., Brennicke, A. & Takenaka, M. (2012b). Two related RNA-editing proteins target the same sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 287 (45). p.pp. 38064–38072.
- Verissimo, A.F. & Daldal, F. (2014). Cytochrome c biogenesis system I: An intricate process catalyzed by a maturase supercomplex? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. [Online]. 1837 (7). p.pp. 989–998. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.03.003>.
- Wagoner, J.A., Sun, T., Lin, L. & Hanson, M.R. (2015). Cytidine deaminase motifs within the DYW domain of two pentatricopeptide repeat-containing proteins are required for site-specific chloroplast RNA editing. *Journal of Biological Chemistry*. 290 (5). p.pp. 2957–2968.
- Wang, C., Aubé, F., Planchard, N., Quadrado, M., Dargel-Graffin, C., Nogué, F. & Mireau, H. (2017a). The pentatricopeptide repeat protein MTSF2 stabilizes a nad1 precursor transcript and defines the 3' end of its 5'-half intron. *Nucleic Acids Research*. p.pp. 1–16.
- Wang, G., Zhong, M., Shuai, B., Song, J., Zhang, J., Han, L., Ling, H., Tang, Y., Wang, G. & Song, R. (2017b). E+ subgroup PPR protein defective kernel 36 is required for multiple mitochondrial transcripts editing and seed development in maize and *Arabidopsis*. *New Phytologist*. p.pp. 1563–1578.
- Wang, Z., Zou, Y., Li, X., Zhang, Q., Chen, L., Wu, H., Su, D., Chen, Y., Guo, J., Long, Y., Zhong, Y. & Liu, Y. (2006). Cytoplasmic Male Sterility of Rice with Boro II Cytoplasm Is Caused by a Cytotoxic Peptide and Is Restored by Two Related PPR Motif Genes via Distinct Modes of mRNA Silencing. *The Plant Cell*. 18 (March). p.pp. 676–687.
- Weienberger, S., Soll, J. & Carrie, C. (2017). The PPR protein SLOW GROWTH 4 is involved in editing of nad4 and affects the splicing of nad2 intron 1. *Plant Molecular Biology*. 93 (4-5). p.pp. 355–368.
- Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J.E., Lochmüller, H., Chevrette, M., Kaufman, B. a, Horvath, R. & Shoubridge, E. a (2009). Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nature Genetics*. 41 (7). p.pp. 833–7.
- Weraarpachai, W., Sasarman, F., Nishimura, T., Antonicka, H., Auré, K., Rötig, A., Lombs, A. & Shoubridge, E.A. (2012). Mutations in C12orf62, a factor that couples COX i synthesis with cytochrome c oxidase assembly, cause fatal neonatal lactic acidosis. *American Journal of Human Genetics*. 90 (1). p.pp. 142–151.

## Références bibliographiques

- Wiedemann, N., Frazier, A.E. & Pfanner, N. (2004). The Protein Import Machinery of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (15). p.pp. 14473–14476.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Prinz, T., Ryan, M.T., Meisinger, C., Pfanner, N. & Truscott, K.N. (2003). Biogenesis of yeast mitochondrial cytochrome c: A unique relationship to the TOM machinery. *Journal of Molecular Biology*. 327 (2). p.pp. 465–474.
- Wolf, A.R. & Mootha, V.K. (2014). Functional Genomic Analysis of Human Mitochondrial RNA Processing. *Cell Reports*. 7 (3). p.pp. 918–931.
- Xie, T., Chen, D., Wu, J., Huang, X., Wang, Y., Tang, K., Li, J., Sun, M. & Peng, X. (2016). Growing Slowly 1 locus encodes a PLS-type PPR protein required for RNA editing and plant development in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 67 (19). p.pp. 5687–5698.
- Xiu, Z., Sun, F., Shen, Y., Zhang, X., Jiang, R., Bonnard, G., Zhang, J. & Tan, B.C. (2016). EMPTY PERICARP16 is required for mitochondrial nad2 intron 4 cis-splicing, complex i assembly and seed development in maize. *Plant Journal*. 85 (4). p.pp. 507–519.
- 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).
- Yan, J., Zhang, Q., Guan, Z., Wang, Q., Li, L., Ruan, F., Lin, R., Zou, T. & Yin, P. (2017). MORF9 increases the RNA-binding activity of PLS-type pentatricopeptide repeat protein in plastid RNA editing. *Nature Plants*. 3 (April). p.p. 17037.
- Yang, L., Zhang, J., He, J., Qin, Y., Hua, D., Duan, Y., Chen, Z. & Gong, Z. (2014). ABA-Mediated ROS in Mitochondria Regulate Root Meristem Activity by Controlling PLETHORA Expression in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*. 10 (12).
- Yang, Y.Z., Ding, S., Wang, H.C., Sun, F., Huang, W.L., Song, S., Xu, C. & Tan, B.C. (2017). The pentatricopeptide repeat protein EMP9 is required for mitochondrial ccmB and rps4 transcript editing, mitochondrial complex biogenesis and seed development in maize. *New Phytologist*. 214 (2). p.pp. 782–795.
- Yin, P., Li, Q., Yan, C., Liu, J., Yu, F., Wang, Z., Long, J., He, J., Wang, H.-W., Wang, J., Zhu, J.-K., Shi, Y. & Yan, N. (2013). *Structural basis for the modular recognition of single-strand RNA by PPR protein*. p.pp. 504:168–171.
- Yoo, Y. a, Kim, M.J., Park, J.K., Min, Y., Lee, J.H., Chi, S., Kim, J.S. & Yoo, Y. Do (2005). Mitochondrial Ribosomal Protein L41 Suppresses Cell Growth in Association with p53 and p27 Kip1 Mitochondrial Ribosomal Protein L41 Suppresses Cell Growth in Association with p53 and p27 Kip1. *Society*. 25 (15). p.pp. 6603–6616.
- Young, E.G. & Hanson, M.R. (1987). A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell*. 50 (1). p.pp. 41–9.
- Yu, W. & Schuster, W. (1995). Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C to U RNA editing of plant mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 270 (31) p.pp. 18227–18233.
- Yuan, H. & Liu, D. (2012). Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA editing, plant development, and responses to abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 70 (3). p.pp. 432–444.

## Références bibliographiques

- Yusupova, G. & Yusupov, M. (2014). High-Resolution Structure of the Eukaryotic 80S Ribosome. *Annual Review of Biochemistry*. 83 (1). p.pp. 467–486.
- Zehrmann, A., van der Merwe, J. a., Verbitskiy, D., Härtel, B., Brennicke, A. & Takenaka, M. (2012). The DYW-class PPR protein MEF7 is required for RNA editing at four sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *RNA biology*. 9 (1555-8584 (Electronic)). p.pp. 155–61.
- Zehrmann, A., Verbitskiy, D., van der Merwe, J.A., Brennicke, A. & Takenaka, M. (2009). A DYW Domain-Containing Pentatricopeptide Repeat Protein Is Required for RNA Editing at Multiple Sites in Mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *the Plant Cell Online*. 21 (2). p.pp. 558–567.
- Zeng, X., Hourset, A. & Tzagoloff, A. (2007). The *Saccharomyces cerevisiae* ATP22 gene codes for the mitochondrial ATPase subunit 6-specific translation factor. *Genetics*. 175 (1). p.pp. 55–63.
- Zhang, G., Bharaj, T.S., Lu, Y., Virmani, S.S. & Huang, N. (1997). Mapping of the Rf-3 nuclear fertility-restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 94 (1). p.pp. 27–33.
- Zhang, X., Gao, X., Coots, R.A., Conn, C.S., Liu, B. & Qian, S.-B. (2015). Translational control of the cytosolic stress response by mitochondrial ribosomal protein L18. *Nature structural & molecular biology*. 22 (5). p.pp. 404–10.
- Zhang, X., Zuo, X., Yang, B., Li, Z., Xue, Y., Zhou, Y., Huang, J., Zhao, X., Zhou, J., Yan, Y., Zhang, H., Guo, P., Sun, H., Guo, L., Zhang, Y. & Fu, X.D. (2014). MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell*. 158 (3). p.pp. 607–619.
- Zhu, J., Vinothkumar, K.R. & Hirst, J. (2016). Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*. 536 (7616). p.pp. 354–358.
- Zhu, Q., Dugardeyn, J., Zhang, C., Takenaka, M., Kühn, K., Craddock, C., Smalle, J., Karampelias, M., Denecke, J., Peters, J., Gerats, T., Brennicke, A., Eastmond, P., Meyer, E.H. & Van Der Straeten, D. (2012a). SLO2, a mitochondrial pentatricopeptide repeat protein affecting several RNA editing sites, is required for energy metabolism. *Plant Journal*. 71 (5). p.pp. 836–849.
- Zhu, Q., H. Meyer, E. & Van Der Straeten, D. (2012b). Functional analysis of SLO2 provides new insight into the role of plant PPR proteins. *Plant Signaling & Behavior*. 7 (10). p.pp. 1209–1211.
- Ziaja, K., Michaelis, G. & Lisowsky, T. (1993). Nuclear control of the messenger RNA expression for mitochondrial ATPase subunit 9 in a new yeast mutant. *Journal of molecular biology*. 229 (4) p.pp. 909–16.
- Zollner, A., Rodel, G. & HAID, A. (1992). *Molecular cloning and characterization of the Saccharomyces cerevisiae CYT2 gene encoding cytochrome-c1-heme-lyase*. p.pp. 1093–1100.
- Zoschke, R., Watkins, K.P. & Barkan, A. (2013). A Rapid Ribosome Profiling Method Elucidates Chloroplast Ribosome Behavior in Vivo. *The Plant Cell*. 25 (6). p.pp. 2265–2275.



**Titre :** Caractérisation biochimique de deux protéines PPR mitochondriales de la sous-famille Rf-like chez *Arabidopsis thaliana*.

**Mots clés :** Mitochondries, Protéines PPR, Traduction, *Arabidopsis thaliana*

**Résumé :**

Les mitochondries sont le siège de la respiration cellulaire et possèdent un petit nombre de gènes essentiels dont l'expression est dirigée presque exclusivement par des protéines d'origine nucléaire. Les protéines de la famille PPR (Pentatricopeptide Repeat) font partie de ces acteurs et interviennent à toutes les étapes de l'expression des ARNs des organites, allant de la transcription à la traduction.

De manière intéressante, les végétaux codent de nombreuses protéines PPR (environ 500 chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*), et sont de fait des modèles idéaux pour comprendre le rôle et le fonctionnement de ces protéines. Elles correspondent à des protéines de liaison aux ARNs très spécifiques, caractérisées par la présence de répétitions en tandem d'environ 35 acides aminés.

Au sein de la famille PPR, le sous-groupe de gènes appelé « Restorer of Fertility Like » (ou RFL) s'oppose aux autres PPR car ils subissent une sélection diversifiante, et non purifiante, comme c'est le cas pour les PPR classiques. Certaines protéines RFL décrites chez d'autres espèces modèles telles que le riz ou encore le radis, appelées restauratrices de fertilité, inhibent l'expression de gènes mitochondriaux inducteurs de stérilité mâle.

La famille RFL comporte 26 membres chez *Arabidopsis thaliana*. Afin de mieux comprendre la diversité fonctionnelle des gènes *RFL*, notre équipe a procédé à la caractérisation de l'ensemble des mutants *rfl* chez *Arabidopsis*, et seules les lignées affectées dans les gènes *RFL22* et *RFL23* affichent des altérations phénotypiques remarquables.

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé les protéines RFL22 et RFL23 pour comprendre leur rôle et leur mécanisme d'action moléculaire. L'étude des mutants *rfl22* et *rfl23* a montré que ces gènes sont essentiels pour la mise en place de la chaîne respiratoire.

Le mutant *rfl22* ne produit plus de cytochromes de type c matures (ce qui affecte l'activité des complexes respiratoires III et IV), tandis que le mutant *rfl23* n'accumule plus de complexe I de la chaîne respiratoire. Après avoir adapté le protocole de profilage de ribosomes aux mitochondries de plantes, j'ai pu découvrir que les protéines RFL22 et RFL23 étaient indispensables à la traduction d'ARNm mitochondriaux spécifiques : *ccmF<sub>N2</sub>* codant une sous-unité du complexe hème lyase et *nad4L* codant une sous-unité du complexe I, respectivement. D'autre part, j'ai pu cartographier *in vivo* et *in vitro* une région pouvant correspondre au site de liaison de la protéine RFL22 sur l'ARNm *ccmF<sub>N2</sub>*.

Mes résultats révèlent que quelques rares gènes *RFL* remplissent des fonctions essentielles chez les *Arabidopsis*. Contrairement aux autres gènes *PPR*, la conservation fonctionnelle des gènes *RFL22* et *RFL23* apparaît toutefois limitée aux *Brassicaceae*. Des modifications particulières dans l'organisation ou l'expression des génomes mitochondriaux de cette famille de plantes pourraient être à l'origine du recrutement de gènes *RFL* à évolution rapide pour maintenir une expression appropriée de certains gènes mitochondriaux.

**Title :** Biochemical characterization of two PPR proteins of the Rf-like subfamily in *Arabidopsis thaliana*

**Keywords :** Mitochondria, PPR proteins, Translation, *Arabidopsis thaliana*

**Abstract :**

Mitochondria are the siege of cellular respiration and code a small number of essential genes whose expression is governed almost exclusively by nuclear-encoded proteins. The proteins PPR family (Pentatricopeptide Repeat) belong to these actors and intervene at all stages of RNAs expression in organelles, from transcription to translation.

Interestingly, plants encode numerous PPR proteins (about 500 in the model specie *Arabidopsis thaliana*), and are therefore ideal models for understanding the role and function of these proteins. They correspond to very specific RNA binding proteins, characterized by the presence of tandem repeats of about 35 amino acids.

Within the PPR family, a subgroup of genes called Restorer of Fertility Like (RFL) is opposed to other PPR because they undergo a diversifying, non-purifying selection, as is the case for classical PPR. Some RFL proteins described in other model species such as rice or radish, are known as fertility restorers, and inhibit the expression of mitochondrial genes inducing male sterility.

The RFL family consists in 26 members in *Arabidopsis thaliana*. In order to better understand the functional diversity of *RFL* genes, our team has characterized all *rfl* mutants in *Arabidopsis*, and only two of them, affected in *RFL22* and *RFL23* genes display remarkable phenotypic alterations.

During my thesis, I characterized *RFL22* and *RFL23* proteins to understand their role and molecular mode of action. The study of the mutants *rfl22* and *rfl23* showed that these genes are essential for the establishment of the respiratory chain.

The mutant *rfl22* no longer produces mature c-type cytochromes (which affects the activity of respiratory complexes III and IV), whereas the mutant *rfl23* no longer accumulates complex I of the respiratory chain. After adjusting the ribosome profiling protocol to plant mitochondria, I discovered that *RFL22* and *RL23* proteins were essential for specific mitochondrial mRNAs translation : *ccmF<sub>N2</sub>* mRNA encoding a subunit of heme lyase complex and *nad4L* transcript encoding a subunit of complex I. Furthermore, I was able to map a region *in vivo* and *in vitro* that could correspond to the binding site of the *RFL22* protein on the *ccmF<sub>N2</sub>* mRNA.

My results show that a few rare *RFL* genes perform essential functions in *Arabidopsis*. By opposition to other *PPR* genes, the functional conservation of *RFL22* and *RFL23* genes appears limited to *Brassicaceae*. Specific modifications in organization or expression of the mitochondrial genomes of this family of plants could be at the origin of the recruitment of rapidly changing *RFL* genes to maintain proper expression of certain mitochondrial genes.