

Université Louis Pasteur, Strasbourg I
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg
en Biologie Moléculaire et Cellulaire

par

Bénédicte Sohm

Impact de mutations pathologiques dans
les ARNt mitochondriaux humains sur les propriétés d'aminacylation et
sur le protéome mitochondrial

Soutenue le 17 décembre 2003 devant la commission d'examen :

M.	J.-M. Grienenberger	Rapporteur interne
M.	P. Plateau	Rapporteur externe
Mme.	A. Lombès	Rapporteur externe
M.	J.-F. Launay	Examineur
M.	R. Giegé	Examineur
Mme.	C. Florentz	Directeur de thèse

Sommaire

INTRODUCTION 1

I. Article n°1 : ARNt mitochondriaux humains en situations saine et pathologiques	5
II. La mitochondrie	7
A. Fonctions de la mitochondrie	7
1. Cycles biochimiques	7
2. Respiration et phosphorylation oxydative	9
3. Apoptose	11
B. Expression du génome mitochondrial	11
1. Organisation de l'ADN mitochondrial humain	11
2. Réplication et réparation	13
3. Transcription et maturation	15
4. Synthèse protéique et code génétique	17
C. Particularités du génome mitochondrial	18
1. Importation de macromolécules	18
2. Coordination de l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux	19
3. Hérité mitochondriale et hétéroplasmie	20
III. Maladies mitochondriales humaines	22
A. Description clinique des principales maladies mitochondriales	22
B. Mutations dans l'ADN mitochondrial	25
1. Réarrangements	26
2. Mutations ponctuelles	26
3. Expression variable d'une mutation dans l'ADN mitochondrial	33
C. Mutations dans l'ADN nucléaire	33
D. Autres désordres mitochondriaux	35
IV. Aminoacyl-ARNt synthétases et ARNt, partenaires clés de la synthèse protéique	37
A. Les aminoacyl-ARNt synthétases	37
1. Les enzymes de classe I	37
2. Les enzymes de classe II	39
3. Modules structuraux des aminoacyl-ARNt synthétases	39

4. Les aminoacyl-ARNt synthétases particulières	40
B. Reconnaissance spécifique des ARNt	41
1. Structure des ARNt	43
2. Identité des ARNt	43
3. Approches pratiques pour la détermination des éléments d'identité d'un ARNt	44
C. Les systèmes d'amination mitochondriaux humains	45
D. Le cas particulier du système leucine mitochondrial humain	47
1. LeuRS mitochondriale humaine	47
2. Les ARNt ^{Leu} mitochondriaux humains	51
3. Eléments d'identité leucine-spécifiques	53
4. Mutations pathologiques dans l'ARNt ^{Leu(UUR)}	55
V. Objectifs et contribution de la thèse	56

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel et techniques générales	59
A. Produits	59
B. Enzymes	59
C. Souches cellulaires et plasmides	60
1. Souches cellulaires	60
a. Souche TG1	60
b. Souche BL21(DE3)pLysS	60
c. Souche BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	60
d. Cellules cybrides H94I et H43B	61
2. Plasmides	61
a. pTFMA	61
b. pET-21c LeuRS -21	61
c. pET-24d LeuRS -39	63
D. Techniques générales	63
1. Manipulation des acides nucléiques	63
a. Détermination de la concentration d'une solution d'acides nucléiques	63
b. Extraction phénolique	63
c. Précipitation des acides nucléiques (ADN/ARN)	63

d. Electrophorèse sur gel d'agarose	64
e. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)	64
f. Elution des ARN à partir de gels de polyacrylamide	65
2. Manipulation des protéines	65
a. Détermination de la concentration d'une solution protéique	65
b. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS/PAGE)	66
c. Séquençage de la partie N-terminale d'une protéine	66
d. Western-blot	66
II. Préparation de matériel biologique spécifique	68
A. Mitochondries	68
1. Cellules cybrides	68
2. Purification de mitochondries	68
a. Extraction des mitochondries	68
b. Enrichissement par centrifugations différentielles	69
c. Purification par gradient de metrizamide	69
B. ARNt natif : purification par oligonucléotide antisens	70
1. Cellule HeLa	70
2. Préparation d'ARN totaux	70
3. Immobilisation de l'oligonucléotide antisens sur des billes d'agarose	71
4. Purification d'un ARNt spécifique	71
C. ARNt synthétique : préparation par transcription <i>in vitro</i>	71
1. Principe	71
2. Construction et clonage de gènes synthétiques d'ARNt	72
3. Séquençage	73
4. Amplification de l'ADN plasmidique	73
5. Transcription <i>in vitro</i>	73
6. Purification des transcrits	74
D. Leucyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine	74
1. Transformation et surexpression	74
2. Surproduction	75
3. Purification de la LeuRS	75
III. Aminoacylation	77
A. Principe du test d'aminoacylation	77
B. Les paramètres cinétiques étudiés	77

C. Le test d'aminacylation	78
IV. Empreinte de la LeuRS sur l'ARNt	80
A. Principe	80
B. Marquages des ARNt	81
1. Marquage en 5'	81
2. Marquage de l'extrémité 3'-CCA	81
3. Purification des ARNt marqués	82
C. Etablissement des empreintes	82
1. Sondages enzymatiques	82
2. Echelle alcaline et échelle de guanosine	82
3. Electrophorèse des fragments ARN et analyse des résultats	83
V. Protéomes comparatifs de mitochondries humaines par électrophorèse bidimensionnelle	84
A. Principe	84
B. Gel bidimensionnel (2D-PAGE)	84
C. Coloration des protéines	85
1. A l'argent	85
2. Au bleu colloïdal (G-250)	87
D. Analyse quantitative et comparative des gels (PDQuest)	87
E. Assignation des protéines par spectrométrie de masse	91
 RESULTAT ET DISCUSSION	 93
<hr/>	
Chapitre 1 : ARNt ^{Leu(UUR)} et traduction mitochondriale	93
I. Article n°2 : Vers la compréhension de l'identité du système d'aminacylation leucine mitochondrial humain	97
II. Article n°3 : Reconnaissance de l'ARNt^{Leu(UUR)} mitochondrial humain par la Leucyl-ARNt synthétase correspondante	99
III. Recherche d'un cofacteur des systèmes d'aminacylation mitochondriaux Humains	101
A. Tests fonctionnels	105
1. Aminacylation <i>in vitro</i> en présence du facteur EF1A cytoplasmique	105
2. Aminacylation en présence du facteur EF-Tu mitochondrial	105

3. Hypothèses	107
B. Localisation subcellulaire de EF1A humain	107
C. Perspectives	109
Chapitre II : ARNt et protéomes mitochondriaux	111
I. Article n°4 : Conséquences protéomiques d'une mutation dans un ARNt mitochondrial humain, en dehors du cadre de la traduction mitochondriale	115
II. Analyse protéomique comparative de mitochondries présentant ou non la mutation MELAS	117
A. Difficultés de reproductibilité des gels MELAS	117
B. Recherche des causes de la variabilité des gels MELAS	119
1. Activation de protéases	119
2. Activation des phénomènes d'apoptoses	121
3. Autres causes potentielles	121
4. Conclusions	122
C. Analyse quantitative et qualitative des zones de gels bidimensionnels	123
1. Analyse délimité à deux zones restreinte (C et E)	123
a. Zone C	123
b. Zone E	124
2. Analyse globale de zone complémentaire	129
D. Analyse des sous-unités de la pyruvate déshydrogénase	129
E. Conclusions	131
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	135

I. ARNt^{Leu(UUR)} et traduction mitochondriale	136
II. ARNt et protéomes mitochondriaux	140
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145

Abréviations

A	adénine
aa	acide aminé
aaRS	aminoacyl-ARNt synthétase
ADN	acide désoxyribonucléique
AEBSF	(4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
A.S.	activité spécifique
ATP	adénosine triphosphate
BAP	phosphatase alcaline bovine
BET	bromure d'éthidium
BSA	albumine de sérum bovin
Cam	chloramphénicol
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate)
CIP	phosphatase intestinale de veau
Ci	Curie
Da	Dalton
DO	densité optique
DTE	dithioérythritol
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
G	guanine
g	gramme
<i>g</i>	multiple de la gravitation naturelle de la terre
h	heure
HEPES	acide N-2 hydroxy éthyl pipérazine N'-2 éthane sulfonique
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
Kan	kanamycine
k_{cat}	constante catalytique
K_M	constante de Michaelis-Menten
Leu	leucine
LeuRS	leucyl-ARNt synthétase
Lys	lysine
μ	micro
M	molaire
mA	milliampère
MELAS	Mitochondrial Encephalopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
MERFF	Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
min	minute
mt	mitochondrial/mitochondriaux
nm	nanomètre
pb	paire de bases
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PM	poids moléculaire
RNAse	ribonucléase
SDS	dodécyl sulfate de sodium
T	thimidine
TBE	tris borate EDTA
TCA	acide trichloroacétique
Tet	tétracycline
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U	unité
UV	ultra-violet
V	volt
p/v	poids à volume
v/v	volume à volume

Introduction

Préambule

Les mitochondries occupent une place centrale dans le métabolisme cellulaire. D'une part, elles sont le siège de nombreuses voies de dégradation comme l'oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, le cycle de l'urée, et d'autre part elles sont considérées comme les "centrales énergétiques" des cellules eucaryotes en raison de leur contribution majeure dans la production d'ATP. Les mitochondries fonctionnent grâce à leur information génétique propre, dans le cas de l'homme un petit ADN circulaire codant pour 13 protéines, 2 ARN ribosomiques, et 22 ARN de transfert (ARNt). Cependant, leur fonctionnement dépend également de l'importation de nombreuses protéines codées par le génome nucléaire. Ces protéines sont impliquées aussi bien dans le maintien et l'expression du génome mitochondrial que dans les activités métaboliques, et dans les mécanismes d'importation eux-mêmes. Ainsi, le fonctionnement des mitochondries fait appel à l'interaction des deux génomes.

Depuis une quinzaine d'années, des corrélations de plus en plus nombreuses ont pu être établies entre des pathologies sévères et variées à hérédité maternelle et des mutations dans le génome mitochondrial. Les gènes des ARNt mitochondriaux (mt) sont particulièrement touchés. Plus de la moitié des mutations répertoriées jusqu'à présent y sont reliées alors que ces gènes ne représentent que 10% du génome mitochondrial. Depuis la première mise en évidence de l'effet pathogène d'une mutation ponctuelle dans le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)} en 1990, plus de 90 mutations dans 21 des 22 gènes d'ARNt mt ont été décrites, et de nouvelles mutations sont détectées constamment. Elles sont associées à de nombreux syndromes incluant principalement des myopathies, des encéphalopathies mais également des surdités neurosensorielles, des ophtalmoplogies, voire des diabètes. Ces maladies sont souvent très sévères (parfois fatales) et affectent aussi bien les adultes que les enfants.

Tout espoir de thérapie est nécessairement basé sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les différentes relations génotypes/phénotypes. Les recherches consacrées à de tels objectifs sont relativement limitées et avancent lentement. Une limitation principale vient du fait que les connaissances fondamentales concernant l'expression du message génétique chez la mitochondrie sont restreintes. Ceci est en particulier le cas pour ce qui concerne les mécanismes et les macromolécules de la traduction. Ainsi, les connaissances sur les ARNt mt et leurs partenaires sont actuellement en émergence, à l'opposé des connaissances sur les ARNt procaryotiques ou cytoplasmiques d'eucaryotes pour lesquels les

structures sont bien établies et les relations structure/fonction bien comprises. Ce retard s'explique en particulier par la nature du matériel d'étude humain qui est difficile d'accès et soumis à des limitations quantitatives en raison d'une localisation sub-cellulaire.

L'objectif de ce travail a été d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à un sous-groupe de pathologies liées à des mutations dans l'ARNt^{Leu(UUR)} et l'ARNt^{Lys}. Deux grands axes de travail ont été développés. D'une part, la traduction mitochondriale a été explorée par l'étude fondamentale des relations structure/fonction du couple ARNt^{Leu(UUR)}/ leucyl-ARNt synthétase mt (enzyme qui catalyse la fixation spécifique de la leucine sur l'ARNt) et par l'étude de l'impact de plusieurs mutations sur ces relations. La recherche de nouveaux partenaires potentiels pour les ARNt mitochondriaux a également été initiée. D'autre part, de possibles effets à longue distance de mutations dans l'ARNt^{Leu(UUR)} et l'ARNt^{Lys}, en dehors du cadre strict de la traduction mitochondriale, ont été recherchés. Ceci a été abordé par des études de protéomique comparative entre mitochondries saines et mitochondries porteuses de mutations ponctuelles.

L'Introduction de cette thèse est partagée en 5 parties. Tout d'abord un article de revue va présenter les connaissances à la fin de l'année 2002 sur les ARNt mt humains. Il comporte deux grandes sections, l'une concernant les relations structure/fonction des ARNt mt de séquences sauvages, et l'autre l'implication de ces mêmes ARNt mutés dans les pathologies. Dans la première section, l'importance des ARNt dans la traduction mitochondriale et une vue synthétique du cycle de vie des ARNt mt sont rappelées. La biosynthèse des ARNt mt humains, leurs structures bizarres, les modifications post-transcriptionnelles, les interactions avec les différents partenaires (aminoacyl-ARNt synthétase, facteur EF-Tu, ribosome, ARNm) sont détaillées. La deuxième section présente tout d'abord les corrélations entre les mutations dans les gènes d'ARNt et les maladies neurodégénératives ainsi que la complexité des relations génotypes/phénotypes. Un état des lieux des connaissances de l'impact moléculaire des mutations à différents niveaux de la traduction mitochondriale est établi. Enfin les premiers résultats démontrant des perturbations des mutations sur l'ensemble du protéome mitochondrial sont évoquées.

Dans une deuxième partie, des compléments d'information concernant les connaissances de base sur les mitochondries sont rapportés, avec un accent particulier sur les différentes fonctions de la mitochondrie, les particularités du génome mitochondrial, ses mécanismes d'expression et ses relations avec le génome nucléaire, ainsi que les questions d'hérédité mitochondriale et d'hétéroplasmie.

Une troisième partie est consacrée aux maladies mitochondriales. Les principales maladies répertoriées comme “pathologies mitochondriales” sont tout d’abord décrites. Ces pathologies regroupent les maladies liées à des mutations dans le génome mitochondrial et ont été récemment élargies à celles liées aux mutations dans le génome nucléaire affectant le fonctionnement de la mitochondrie.

La quatrième partie est consacrée à l’ARNt^{Leu(UUR)} et à la Leucyl-ARNt synthétase. L’état des connaissances de ces deux partenaires de l’aminacylation est établi et comparé aux connaissances plus larges pour les systèmes d’aminacylation eucaryotiques et procaryotiques. Les effets de mutations dans l’ARNt^{Leu(UUR)} déjà mis en évidence avant le début de cette thèse, sont rappelés.

La dernière partie de l’Introduction présente les objectifs détaillés de cette thèse.

I. Article de revue n°1

ARNt mitochondriaux humains en situations saine et pathologiques

C. Florentz, B. Sohm, P. Tryoen-Tóth, J. Pütz & M. Sissler

2003

Cellular and Molecular Life Sciences, 60, 1356-1375

Résumé :

Le génome mitochondrial humain code pour 13 protéines qui sont toutes des sous-unités de la chaîne respiratoire et donc impliquées dans le métabolisme énergétique. Ces gènes sont traduits par 22 ARN de transfert (ARNt) également codés par le génome mitochondrial, formant le jeu minimal d'ARNt requis pour lire l'ensemble des codons. L'intérêt porté à ces ARNt a pris de l'importance avec les récentes découvertes de corrélations entre des mutations ponctuelles dans leurs gènes et de nombreuses maladies neuromusculaires et neurodégénératives. Dans cette revue, les connaissances fondamentales émergentes concernant les relations structure/fonction de ces ARNt particuliers, ainsi qu'une vue d'ensemble sur les nombreux mécanismes de la traduction affectés par les mutations, sont résumées. De plus, les premiers résultats concernant les effets moléculaires diversifiés de mutations en dehors du cadre de la traduction mitochondriale sont mis en avant. Alors que les connaissances concernant l'implication des ARNt mitochondriaux en conditions saine et pathologiques augmentent, le décryptage des mécanismes par lesquels différents génotypes entraînent une grande variété de phénotypes nécessite une investigation plus poussée à l'aide de systèmes modèles adaptés.

II. La mitochondrie

A l'heure actuelle, la recherche sur la mitochondrie rencontre une renaissance impressionnante, stimulée par l'implication de ces organelles dans des problématiques comme le cancer, le vieillissement, l'apoptose (Ferri & Kroemer, 2001; Singh, 1998) et par le grand nombre de maladies mitochondriales, incluant des pathologies relativement répandues comme certains diabètes (*Diabetis mellitus*) et la maladie d'Alzheimer (Wallace, 1999).

La mitochondrie est largement connue pour sa fonction principale, la synthèse de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP. Elle contient un génome propre, circulaire, évidence d'un ancêtre bactérien ayant vécu en symbiose avec la cellule eucaryote (Emelyanov, 2003; Gray et coll., 1999). L'organelle est délimitée par deux membranes, une membrane externe, régulière, et une membrane interne, très repliée sur elle-même formant de nombreuses invaginations, les crêtes mitochondriales (Fig. 1A, 1B). Ainsi, les membranes donnent lieu à deux compartiments, l'espace inter-membranaire, qui est délimité du cytosol par la membrane extérieure relativement perméable aux petites molécules, et le compartiment interne, appelé matrice, séparé de l'espace inter-membranaire par la membrane interne non-perméable. La notion de mitochondrie isolée est aujourd'hui ébranlée par la mise en évidence de mitochondries liées par une dynamique membranaire se scindant et se réassociant activement, conduisant à des fusions/fissions (Nunnari et coll., 1997; Rizzuto et coll., 1998).

L'ensemble des connaissances fondamentales biologiques, biochimiques et moléculaires concernant la mitochondrie, peuvent être trouvées dans l'ouvrage "Mitochondria" (Scheffler, 1999). Nous reprendrons ici, quelques points importants pour la compréhension de notre problématique.

A. Fonctions de la mitochondrie

1. Cycles biochimiques

La mitochondrie est le siège d'un grand nombre de réactions de dégradation comme celles du pyruvate formé lors de la glycolyse cytosolique, des acides gras et de certains acides aminés. L'énergie chimique est "extraite" de ces molécules grâce à une oxydation (respiration) coordonnée à la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative de l'ADP. La mitochondrie prend également part à la néoglucogenèse, au cycle de l'urée, et est impliquée dans de nombreuses voies anaboliques comme la synthèse des pyrimidines (vertébrés), d'acides aminés, de lipides, d'hèmes. Elle participe aussi à l'homéostasie intracellulaire d'ions inorganiques, en particulier le calcium.

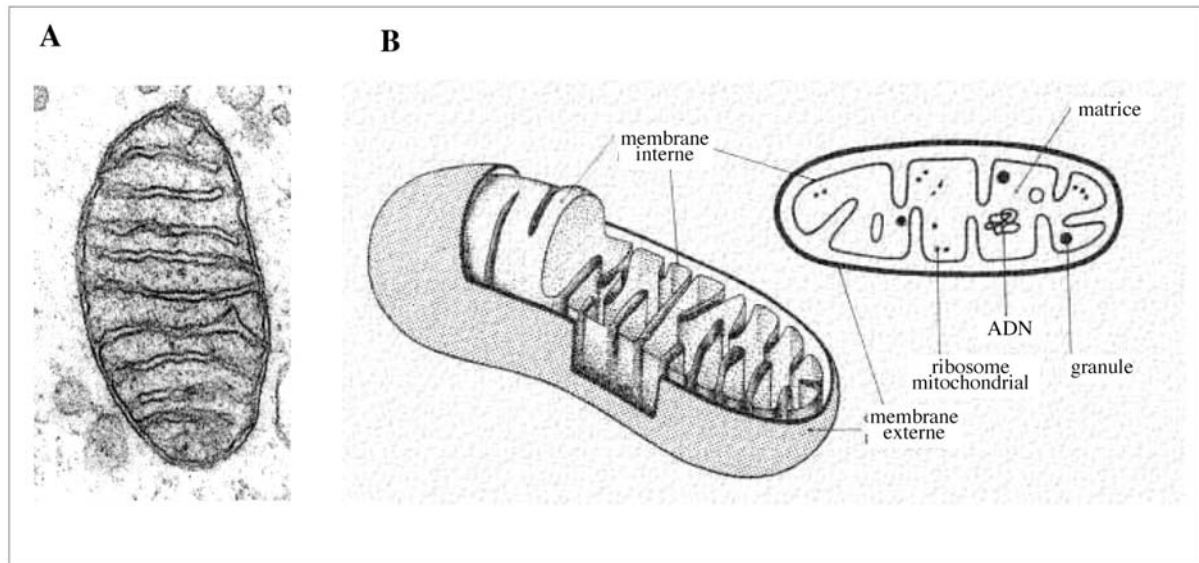


Figure 1. Représentation de la mitochondrie. A. Image en microscopie électronique B. Vue schématique de la compartimentalisation de la mitochondrie.

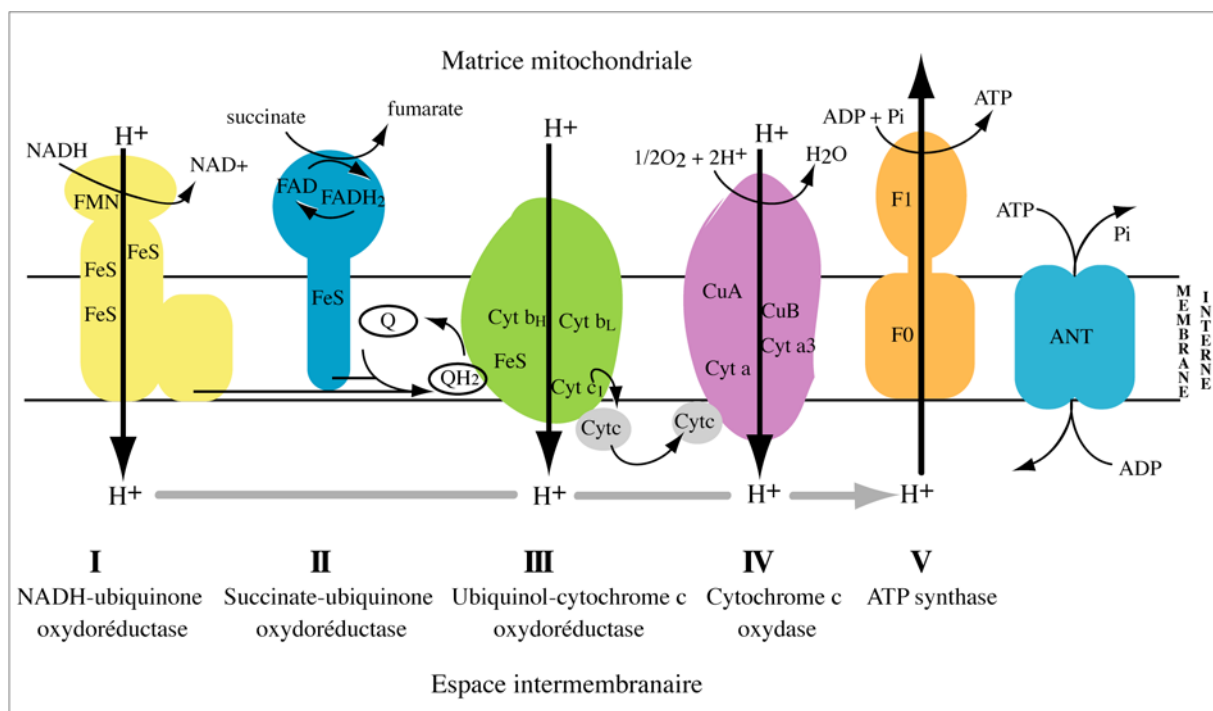


Figure 2. Représentation schématique de la chaîne respiratoire et mécanisme de la phosphorylation oxydative. Les électrons du $\text{NADH} + \text{H}^+$ et du FADH_2 sont transmis aux complexes I et II respectivement. Ils suivent alors un cheminement qui les mène à l'oxygène moléculaire au niveau du complexe IV. Ce déplacement d'électrons est accompagné de pompage de protons de la matrice mitochondriale vers le cytosol. Le retour du flux de protons au niveau de l'ATP synthase permet la conversion de l'ADP en ATP. L'échange cytosol/ mitochondrie de l'ADP et de l'ATP est réalisé par un transporteur spécifique, l'Adénine Nucléotidyl Translocase. NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduite ; FADH_2 : Flavine Adénine Dinucléotide réduite ; ANT : adénine nucléotide translocase ; FMN : flavine mononucléotide ; FeS : complexe fer soufre ; Q : ubiquinone ; cyt : cytochrome ; Cu : cuivre ; F1, F0 : oligomères formant l'ATP synthase.

2. Respiration et phosphorylation oxydative

La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane mitochondriale interne (Fig. 2). Elle est formée de quatre complexes multienzymatiques : le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase), le complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase), le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase), le complexe IV (cytochrome c oxydase) et deux transporteurs d'électrons, l'un lipophile dissous dans la membrane interne (ubiquinone ou coenzyme Q₁₀), l'autre hydrophile localisé dans l'espace inter-membranaire (cytochrome c). La synthèse d'ATP est réalisée au niveau du complexe V, l'ATP synthase, par phosphorylation de l'ADP. Une particularité de ces complexes concerne l'origine des sous-unités qui les composent. En effet, quatre de ces cinq complexes sont formés à la fois de sous-unités codées par le génome mitochondrial et de sous-unités codées par le génome nucléaire (Tableau 1).

Complexe	I	II	III	IV	V
Sous-unités codées par l'ADN mt	7	0	1	3	2
Sous-unités codées par l'ADN nucléaire	36	4	10	10	14
Total	43	4	11	13	16

Tableau 1. Origine des sous-unités des complexes respiratoires chez l'homme. Les chiffres indiquent le nombre de sous-unités.

L'acétyl-CoA provenant du pyruvate ou de la β -oxydation des acides gras activés subit des décarboxylations oxydatives au niveau du cycle de Krebs avec production de CO₂, de NADH+H⁺ et de FADH₂ qui seront ré-oxydés en transmettant leurs électrons et protons au niveau des complexes I et II respectivement. Les électrons transitent alors jusqu'au complexe IV qui catalyse la formation d'eau grâce à l'oxygène moléculaire. Ce transfert des électrons aux différents accepteurs est accompagné au niveau de chaque complexe (sauf le II) par l'expulsion de protons dans l'espace inter-membranaire, créant ainsi une différence de pH et de potentiel au niveau de la membrane interne (Mitchell, 1961). Le retour de ces protons dans la matrice mitochondriale au niveau de l'ATP synthase permet la synthèse d'ATP. Un transporteur spécifique, l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT), échange l'ATP néo-synthétisé contre l'ADP.

La synthèse d'ATP et la respiration peuvent devenir insignifiantes lorsque la cellule eucaryote vit en anaérobiose (Schatz, 1995). Cependant, la présence des mitochondries dans la cellule eucaryote est essentielle. Des cellules dépourvues d'ADN mt ne peuvent exister que pour une durée illimitée (King, 1996; King & Attardi, 1996b).

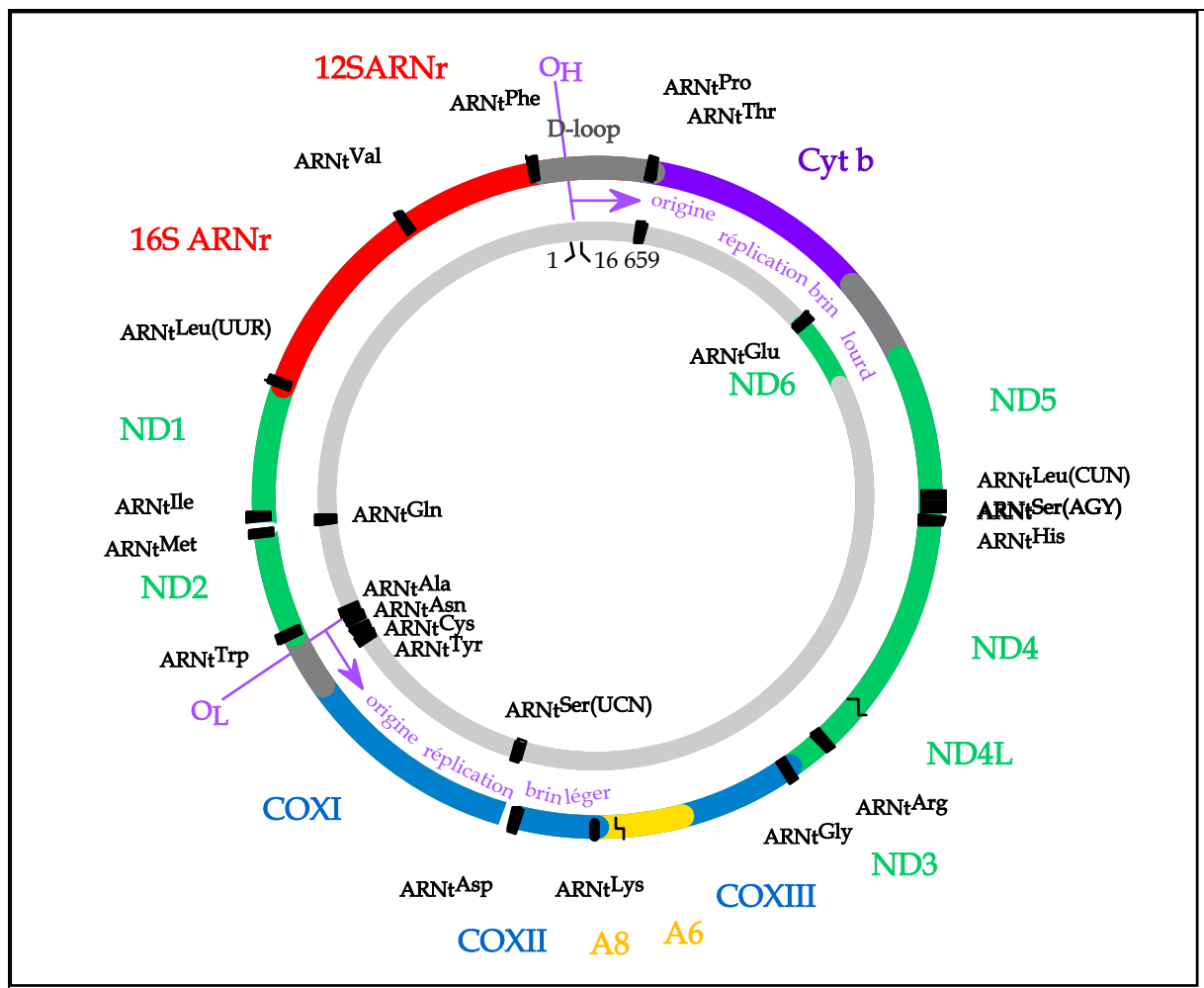


Figure 3. Organisation du génome mitochondrial humain. Le brin lourd (H) est représenté par le cercle extérieur riche en couleurs, le brin léger (L) par le cercle intérieur gris. O_H et O_L indiquent les origines de réplication du brin lourd et du brin léger respectivement. Les gènes d'ARNt sont représentés par des traits épais noirs, les deux gènes d'ARNr sont représentés en rouge, les gènes des sous-unités de la chaîne respiratoire sont représentés en vert pour le complexe I (ND 1-6), en violet pour le complexe III (Cyt b), en bleu pour le complexe IV (COI à COIII), et en jaune pour le complexe V (ATPase 6 et 8). La région non codante "D-Loop" est en gris intense. Le génome est numéroté à partir de l'origine de réplication O_H, dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.

Il est cependant possible de cultiver des cellules dépourvues d'ADN mitochondriaux sur des milieux supplémentés en pyrimidine et en pyruvate.

3. Apoptose

L'apoptose correspond à une mort cellulaire programmée. Récemment, il a été mis en évidence que l'induction de ce processus pouvait se faire selon deux voies distinctes en fonction du type de signal émis. La "voie des récepteurs" est activée en réponse à un signal externe à la cellule, tandis que la "voie mitochondriale" est enclenchée en réponse à un stimulus interne (Kroemer & Reed, 2000; Parone et coll., 2002). Ces deux voies convergent ensuite vers une voie commune. La mitochondrie renferme plusieurs facteurs protéiques promouvant la mort cellulaire comme le cytochrome c, l'AIF ("Apoptose-Inducing Factor") et des protéases particulières, les caspases. L'ouverture d'un mégapore ("Transition Pore") non-spécifique dans la membrane interne relarguerait ces facteurs et détruirait le potentiel de membrane mitochondrial. L'implication réelle de l'ouverture de ce "mégapore" dans l'induction de l'apoptose reste controversée (Revue par Mayer & Oberbauer, 2003; Zamzami & Kroemer, 2001). Par la suite, une cascade de réactions est déclenchée dans le cytosol, dans laquelle les caspases sont activées par le cytochrome c, et l'AIF entre dans le noyau et y induit la destruction de la chromatine (Joza et coll., 2001; Wallace, 1999). La voie de l'apoptose peut être induite par une accumulation de plusieurs événements comme une concentration excessive de calcium, une diminution du potentiel de membrane, ou encore une augmentation du stress oxydatif (Green & Reed, 1998). Ceci contribue à expliquer que certaines pathologies mitochondriales, entraînant une diminution de la phosphorylation oxydative et une augmentation du stress oxydatif, présentent des taux élevés d'apoptose (Mirabella et coll., 2000; Umaki et coll., 2002). Cependant, il a aussi été montré qu'une étape tardive dans la cascade d'induction de l'apoptose pouvait être inhibée, bloquant l'apoptose dans son ensemble (Ikezoe et coll., 2002; Sciacco et coll., 2001).

B. Expression du génome mitochondrial

1. Organisation de l'ADN mitochondrial humain

L'ADN mt humain est un génome bicaténaire circulaire de 16 569 pb, dont la séquence complète a été déterminée dès 1981 (Anderson et coll., 1981) et révisée récemment (Andrews et coll., 1999). La composition en bases n'est pas équivalente sur les deux brins.

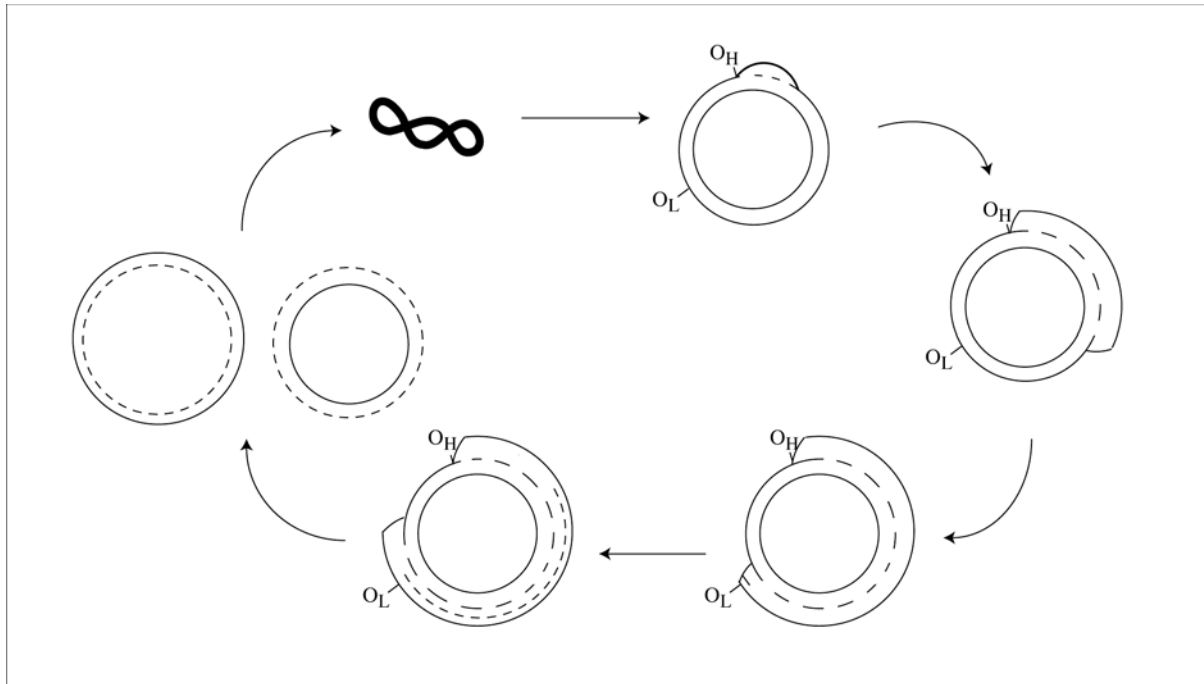


Figure 4. Cycle de réplication asymétrique de l'ADN mt selon (Clayton, 1982). La réplication démarre en O_H et se poursuit jusqu'au site O_L . L'ouverture de la double hélice à ce niveau rend possible l'initiation de la réplication du 2^{ème} brin.

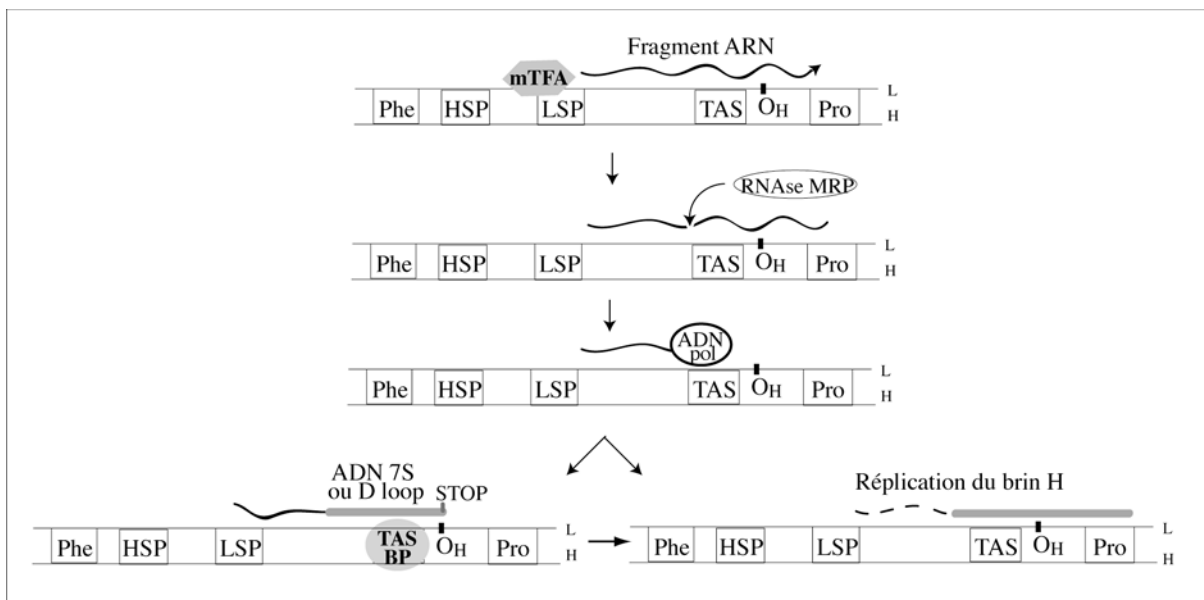


Figure 5. Initiation de la réplication du brin lourd de l'ADN mt. Un fragment ARN est transcrit à partir du LSP en présence d'une faible quantité de facteur mTFA, puis est clivé par la RNase MRP. Ce fragment est ensuite allongé par l'ADN polymérase jusqu'à la séquence TAS où, en présence de la protéine TAS-BP il y a arrêt de la réplication. En l'absence de cette protéine, le brin lourd continue d'être répliqué. Phe : $ARNt^{Phe}$; TAS : séquence de terminaison; Pro : $ARNt^{Pro}$; O_H : site d'initiation de la réplication du brin lourd de l'ADN mt; mTFA : facteur d'activation de la transcription; TAS-BP : protéine liant la séquence de terminaison.

L'un des brins possède une forte teneur en G (et dans une moindre mesure en T), alors que l'autre possède une forte teneur en A et C. Cette différence de composition entraîne un comportement différent en centrifugation à l'équilibre. Le brin riche en G et T, plus dense, a été appelé brin lourd ("heavy strand" ou H) tandis que l'autre est devenu le brin léger ("light strand" ou L). L'ADN mt présente une variabilité de séquence beaucoup plus importante (environ 10 fois) que l'ADN nucléaire. Une telle mutabilité de l'ADN mt s'explique par l'action des radicaux libres oxygénés générés en parallèle de la respiration sur un ADN non protégé par des histones, et par le faible nombre de mécanismes réparateurs efficaces. Ces variations, mises à profit pour suivre les déplacements de population humaine et établir l'histoire évolutive de l'homme (Ingman et coll., 2000; Krings et coll., 1997), compliquent la distinction de mutations liées à des pathologies, de celles distinguant simplement deux individus, les polymorphismes.

L'ADN mt humain code pour 13 protéines, toutes des sous-unités de la chaîne respiratoire, 2 ARN ribosomiques et 22 ARN de transfert (Fig. 3). La séquence de ce génome montre une extrême économie dans l'organisation des parties codantes, car il n'existe pas ou très peu de bases non codantes séparant deux gènes adjacents. Les gènes codant pour les protéines sont ainsi "ponctués" par des gènes d'ARNt (Ojala et coll., 1981). Le brin lourd code pour 15 ARNt, les 2 ARNr et 12 protéines, tandis que le brin léger code pour 7 ARNt et une protéine. Il existe également deux régions non codantes, la région régulatrice appelée D-loop (Displacement loop), et l'origine de réplication du brin léger (O_L). La région D-loop, très variable en séquence, contient l'origine de réplication du brin lourd (O_H) et trois promoteurs de transcription dont 2 pour le brin H (HSP_1 et HSP_2) et un pour le brin L (LSP).

2. Réplication et réparation

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la réplication de l'ADN mt ne sont pas encore complètement élucidés. Pendant longtemps on pensait que la réplication se faisait de manière bidirectionnelle et asynchrone, un concept remis en cause très récemment. Selon le modèle ancien (Clayton, 1982), les principales étapes clés sont les suivantes (Fig. 4). La réplication débute par la synthèse du brin H au niveau de l'origine de réplication spécifique (O_H). Cette synthèse nécessite une amorce ARN (Fig. 5), qui est transcrite à partir du LSP, promoteur transcriptionnel du brin léger. La fixation d'un facteur de transcription mTFA à faible concentration sur le promoteur du brin léger LSP permet la transcription de l'amorce ARN pour la réplication, la présence de cette protéine à plus forte concentration induisant la

transcription des deux brins. L'amorce est ensuite coupée par la ribonucléase MRP (Mitochondrial RNA-Processing enzyme) puis allongée par l'ADN polymérase γ , une polymérase spécifique de la mitochondrie. Cet allongement peut se faire de deux façons. Premièrement, l'allongement est effectué jusqu'à une séquence TAS (Termination Associated Sequence) reconnue par une protéine spécifique (TAS binding protein). Une copie du brin H (ARN-ADN) d'environ 680 nucléotides appelée ADN 7S est obtenue. Ce fragment hybridé à sa matrice forme une structure en triple brin, la D-loop. Une réinitiation de la synthèse du brin H permet l'élongation de la boucle D et la réplication totale du brin H. Deuxièmement, l'allongement de l'amorce va se faire de façon continue. La synthèse du brin L débute à l'origine de réplication O_L seulement lorsque cette région est rendue simple brin par la progression de la polymérase synthétisant le brin H. O_L adopte alors une structure en épingle à cheveux. Cette structure est reconnue par une ADN primase associée à un ARNr 5,8 S qui initie la synthèse d'une amorce ARN. Cette amorce est ensuite allongée par l'ADN polymérase γ qui progresse dans le sens opposé à celle du brin H (Shadel & Clayton, 1997).

Des travaux récents ont montré que la réplication de l'ADN mt de mammifères se faisait de manière synchrone (Holt et coll., 2000; Yang et coll., 2002a). Le modèle de réplication asynchrone de Clayton était basé sur des analyses d'échantillons d'ADN mt qui contenaient des molécules avec apparemment de substantielles parties en simple brin et ne tenait pas compte d'une donnée plus ancienne : l'ADN mt contient des ribonucléotides. En effet, des brins d'ADN riches en ribonucléotides apparaissent pendant la réplication du brin L. Holt et coll. ont montré que ces molécules étaient absentes de préparations de mitochondries hautement purifiées de différents tissus de mammifères, mais pouvaient aisément être générées lors de l'extraction à partir de mitochondries beaucoup moins propres. La perte de ces régions pendant l'extraction de l'ADN (dégradation par les ribonucléases) va générer des molécules similaires en structure à celles proposées par le modèle de réplication asynchrone. Les auteurs proposent alors que la réplication de l'ADN mt de mammifères se fait principalement (et peut-être même exclusivement) par un mécanisme couplant les deux brins, qui incorpore un nombre significatif de ribonucléotides pendant la synthèse.

L'ADN polymérase γ , responsable de la réplication de l'ADN mt, est un hétérodimère formé d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité accessoire. Il est intéressant de noter que cette dernière présente des similarités de séquence et de structure avec des aminoacyl-ARNt synthétases, en particulier la Glycyl-ARNt synthétase et la Prolyl-ARNt synthétase (Fan et coll., 1999).

On pensait longtemps que le fort taux de mutation du génome mitochondrial était dû à l'absence de système de réparation. Cependant, l'existence de tels systèmes a pu être mise en évidence (Mandavilli et coll., 2002). Ainsi, l'ensemble des enzymes nécessaires au mécanisme de réparation des bases par excision (BER : Bases Excision Repair) est présent et ce processus est très proche de celui présent pour l'ADN nucléaire.

3. Transcription et maturation

La transcription est effectuée par une ARN polymérase du type T3/T7 (Gray et coll., 1999), le gène de l'enzyme mitochondriale humaine (h-mtRPOL) a été identifié (Tiranti et coll., 1997). Les mécanismes de transcription mitochondriale ont été largement décrits (*e.g.* Bogenhagen, 1996; Clayton, 1991).

Les deux brins de l'ADN mt sont transcrits en ARN de manière bidirectionnelle et indépendante. Il existe trois origines de transcription, situées dans la D-loop, deux pour le brin lourd (HSP₁, HSP₂) et une pour le brin léger (LSP), conduisant à deux transcrits longs et à un transcrit court (Fig. 6). La transcription nécessite à la fois une ARN-polymérase ADN-dépendante et des facteurs de transcription (mtTFA, mtTFB). Le brin L qui code pour 1 protéine (ND6) et 7 ARNt est transcrit intégralement à partir du promoteur L. Le brin H est transcrit à partir des promoteurs HSP₁ et HSP₂. L'origine de transcription HSP₁, située en amont de HSP₂, est la seule unité qui conduise à la transcription de l'ARNt^{Phe}. Elle transcrit également l'ARNt^{Val} et les deux ARNr et est arrêtée par l'action de la protéine mTERF, un terminateur de transcription qui se lie à une séquence de 13 pb présente au sein du gène de l'ARNt^{Leu(UUR)}. La fixation de mTERF sur la séquence de 13 pb permet la synthèse préférentielle des ARNr en quantité 25 fois supérieure aux autres produits de transcription du brin H/L. L'unité de transcription HSP₂ produit également les deux ARNr, mais n'est pas arrêtée par le terminateur et permet la transcription de l'ensemble du brin lourd, en particulier, les 15 gènes d'ARNt. Elle est la seule à transcrire le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)}.

Les vitesses de transcription à partir des 3 promoteurs sont inégales (King & Attardi, 1993) et pourraient conduire à des quantités très différentes des 22 ARNt. La vitesse de transcription à partir du promoteur HSP₁ est supérieure de 25 fois à celle dépendant du promoteur HSP₂ et la vitesse de transcription à partir du promoteur LSP est 10 à 16 fois supérieure à celle partant de HSP₂. Cependant, il a été montré que les quantités finales de chacun des ARNt sont toutes du même niveau. Seuls les ARNt^{Phe} et l'ARNt^{Val} sont 2 à 4 fois plus représentés que les 20 autres ARNt. Ceci suggère qu'il existe des mécanismes de

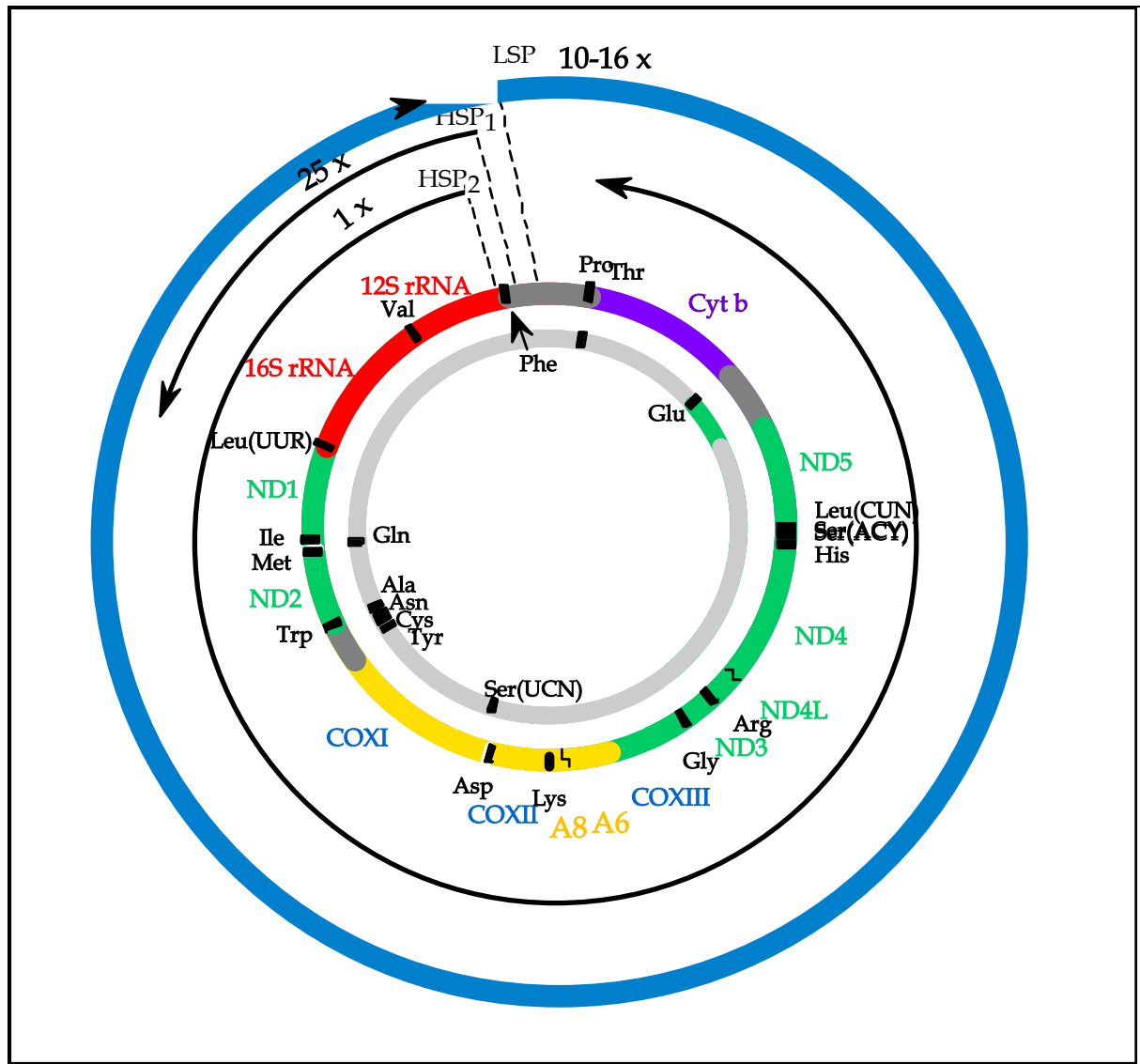


Figure 6. Carte transcriptionnelle simplifiée du génome mitochondrial humain. Trois transcrits sont synthétisés respectivement à partir des deux promoteurs de transcription du brin lourd HSP₁ et HSP₂ et du promoteur de transcription du brin léger LSP. Les vitesses relatives de transcription à partir de chaque promoteur, estimées sur des cellules HeLa, sont indiquées (King & Attardi, 1993). Les gènes d'ARNt sont représentés par des traits épais noirs et par l'abréviation correspondant à l'acide aminé qu'ils spécifient. Les deux gènes d'ARNr sont représentés en rouge, les gènes des sous-unités de la chaîne respiratoire sont représentés en vert pour le complexe I (ND 1-6), en violet pour le complexe III (Cyt b), en bleu pour le complexe IV (COI à COIII), et en jaune pour le complexe V (ATPase 6 et 8).

régulation post-transcriptionnels conduisant à la dégradation de certains ARNt (King & Attardi, 1993). Les différents transcrits polycistroniques produits à partir des trois promoteurs sont ensuite maturés afin de libérer les ARNm, ARNt et ARNr. Le clivage est réalisé au niveau des structures des ARNt présents dans les transcrits par la RNase P mitochondriale en 5' et une 3'-ARNt endonucléase (Reichert et coll., 1998). Toutefois, certains gènes de protéines ne sont pas séparés de leur voisin par des gènes d'ARNt (cas de ND4/ND4L et de COIII/ATPase 6/ATPase 8), et donc leur maturation doit faire intervenir d'autres enzymes (Masucci & Schon, 1996). Une analyse des transcrits détectables a identifié 18 espèces différentes (nommés RNA 1 à 18) qui correspondent soit à des transcrits totalement débités et maturés, soit à des polycistrons plus stables (Attardi & Montoya, 1983).

La maturation des ARNm implique une polyadénylation en 3', qui permet parfois de créer le codon stop. Les ARNm ne portent pas de coiffe en 5' (Attardi & Montoya, 1983). La maturation des ARNt impliquant la RNase P, la 3'-ARNt nucléase et la "tRNA nucleotidyl transferase" ainsi que les enzymes de modifications post-transcriptionnelles ont été décrites dans l'article de revue de la partie I de cette Introduction.

4. Synthèse protéique et code génétique

Les différents partenaires de la synthèse protéique (aminoacyl-ARNt synthétases, EF-Tu, ribosome) de même que les particularités du code génétique ont déjà été rappelés dans la revue (partie I de l'Introduction). En complément, notons que la traduction mitochondriale comporte deux similitudes avec la traduction bactérienne de par l'origine endosymbiotique de la mitochondrie, similitudes qui la distinguent de la traduction cytosolique. En effet, elle est (i) initiée par un N-formyl méthionyl-ARNt, et (ii) peut être inhibée par le chloramphénicol. Cependant, la traduction des ARNm mt est particulière car ceux-ci sont dépourvus des sites de fixation au ribosome habituellement rencontrés chez les bactéries (séquence de Shine & Dalgarno) ou chez les eucaryotes (coiffe m⁷Gppp en 5'). En fait, les ARNm mt débutent directement par le codon d'initiation avec éventuellement quelques nucléotides en amont (Montoya et coll., 1981). La traduction des ARNm a été montrée associée à la membrane interne de la mitochondrie (Liu & Spremulli, 2000). Nous reviendrons plus en détails sur les ARNt et les aminoacyl-ARNt synthétases dans la partie IV de cette Introduction.

C. Particularités du génome mitochondrial

1. Importation de macromolécules

De nombreuses protéines codées par le génome nucléaire sont traduites dans le cytosol et importées dans la mitochondrie pour participer au bon fonctionnement de celle-ci. Ces protéines sont estimées à plus d'un millier et sont impliquées aussi bien dans le maintien et l'expression du génome mitochondrial, que dans les activités métaboliques et dans les mécanismes d'importation eux-mêmes. A l'heure actuelle, plus de 350 gènes nucléaires codant pour des protéines à localisation mitochondriale ont été répertoriés (MITOP : www.mips.biochem.mpg.de/pro/medgen/mitop) et les études pour identifier l'ensemble des protéines importées dans la mitochondrie sont de plus en plus nombreuses. Ces études visant à définir le "protéome" mitochondrial sont par exemple basées sur des séparations bidimensionnelles de l'ensemble des protéines d'un extrait cellulaire (ou sub-cellulaire), et à leur identification spécifique par des techniques basées sur la spectrométrie de masse. Ceci combine les avancées récentes des séquençages (en particulier du génome humain) et leur disponibilité dans des banques de données. Ainsi, progressivement au cours des 3 dernières années, des connaissances de plus en plus poussées sur les contenus protéiques des mitochondries ont émergé. Ces données concernent en particulier des lignées cellulaires neuroblastiques (Scheffler et coll., 2001), le foie de rat (Fountoulakis et coll., 2002), le placenta humain (Lescuyer et coll., 2003), et le cœur humain (Taylor et coll., 2003).

Les connaissances actuelles des mécanismes d'importation sont décrites dans plusieurs revues récentes (Bauer et coll., 2000; Hoogenraad et coll., 2002; Koehler, 2000). La plupart des protéines importées dans les mitochondries présentent une pré-séquence à l'extrémité N-terminale (revues Hammen & Weiner, 1998; Omura, 1998), qui porte plusieurs charges positives, et dont un certain nombre est capable de former des hélices amphiphiles. Les charges positives sont essentielles pour l'importation. La protéine est prise en charge par des molécules chaperonnes pour être conduite jusqu'à un complexe de translocation dans la membrane externe, le complexe TOM ("Translocase of the Outer Membrane"). L'importation est initiée par la reconnaissance de la pré-séquence par différentes protéines du complexe TOM (Abe et coll., 2000; Muto et coll., 2001). Les protéines sont ensuite réceptionnées par un des deux complexes, TIM 22 ou TIM 23 (TIM pour "Translocase of the Inner Membrane") qui servent de navettes et de chaperonnes pour traverser l'espace inter-membranaire et qui permettent l'insertion de la protéine dans la membrane interne ou la traversée de cette dernière (Bauer et coll., 2000; Koehler, 2000). TIM 23 importe les protéines solubles dans la matrice

alors que TIM 22 permet l'importation et l'insertion dans la membrane interne de protéines membranaires, formées de multiples hélices transmembranaires. Après la traversée, la pré-séquence est clivée par des protéases spécifiques et les protéines vont alors se replier correctement à l'aide de nouvelles molécules chaperonnes. Le potentiel de la membrane interne, établi par les complexes responsables de la phosphorylation oxydative (OXPHOS), est indispensable à l'importation des protéines mitochondriales. Un certain nombre de protéines lipophiles de la membrane interne sont synthétisées sans pré-séquence, et leur signal d'importation reste inconnu. Les études des systèmes d'importation TOM et TIM ont surtout été faites dans la levure, mais des homologues de ces protéines existent chez les mammifères (Hoogenraad et coll., 2002).

Parallèlement à l'importation des protéines, la mitochondrie importe également des ARN. Cependant, leurs mécanismes d'importation n'ont pas été beaucoup étudiés, par opposition à ceux des protéines, et restent donc majoritairement inconnus. Chez les mammifères, les ARN des RNases P et MRP ainsi que les ARNr 5S et 5,8S sont importés (Entelis et coll., 2001; Schneider, 1994). L'importation d'ARNt a lieu dans certains organismes et ceci dans des proportions variables. Ainsi, tous les ARNt mt des parasites *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* et *Leishmania tarantolae* sont codés dans le noyau et importés dans la mitochondrie (Lima & Simpson, 1996, Schneider, 1994). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, seul un ARNt^{Lys} est importé, ceci malgré l'existence d'un ARNt^{Lys} mt suffisant à la traduction mitochondriale (Tarassov & Martin, 1996). Pour les mammifères, il est généralement admis qu'il n'y a pas d'importation d'ARNt. Cependant, un cas a été décrit récemment. Il s'agit de l'importation d'un ARNt^{Lys} chez le marsupial. Le génome mitochondrial correspondant n'a pas de séquence codant pour un ARNt^{Lys} (Dörner et coll., 2001).

2. Coordination de l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux

Le fonctionnement de la mitochondrie dépend d'une bonne coordination entre son génome et le génome nucléaire. Ceci sous-entend l'existence de mécanismes de régulation de l'expression coordonnée des gènes de ces deux génomes. A l'heure actuelle, très peu d'éléments sont connus en ce qui concerne la régulation des gènes mitochondriaux. Récemment, le facteur de transcription NF- κ B et son répresseur I κ B α ont été trouvés dans la mitochondrie (vertébré) et il a été montré que l'activation de NF- κ B entraîne une diminution de l'expression des ARNm mt de la sous-unité III de la cytochrome c oxydase et du

cytochrome b (Cogswell et coll., 2003). Ceci montre l'existence d'une voie de régulation de l'expression des gènes dans la mitochondrie par un facteur de transcription qui était considéré comme exclusivement nucléaire.

Concernant la régulation des gènes nucléaires de protéines mitochondriales, les mécanismes ne sont pas entièrement compris, mais des éléments ont déjà été mis en évidence (revue par (Scarpulla, 2002). Ainsi, des sites de reconnaissance des facteurs NRF-1 et NRF-2 ("Nuclear Respiratory Factor") sont présents dans de nombreux gènes nucléaires codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire, pour des facteurs de réplication et de transcription, ou encore pour des protéines impliquées dans l'importation mitochondriale (Scarpulla, 2002). Récemment, il a été montré chez les mammifères que les CaMK ("calcium/calmodulin-dependent protein kinase") induisent l'expression d'une protéine PGC-1 ("proliferator-activated receptor gamma coactivator 1"), un activateur fort de la biogénèse des mitochondries, entraînant donc une augmentation du nombre de mitochondries (Wu et coll., 2002).

3. Hérité mitochondriale et hétéroplasmie

Les mitochondries d'un individu sont à hérité maternelle. Ceci est lié au fait que les ovules sont riches en mitochondries, que la pièce intermédiaire du spermatozoïde contenant les mitochondries pénètre peu dans l'ovule, et que les mitochondries des spermatozoïdes éventuellement introduits dans l'ovule sont dégradées par ubiquitination (Sutovsky et coll., 1999).

Chez la mère, les cellules souches germinales (les ovogonies) contiennent un nombre restreint de copies d'ADN mt (environ 200). Entre deux générations d'ovogonies, il y a formation d'ovules, fécondation, division cellulaire, différenciation en cellules germinales (ou somatiques), puis production de nouvelles ovogonies. Ainsi, le nombre de mitochondries par cellule subit des changements importants et parfois rapides. Notamment dans la phase de division cellulaire de l'ovule fécondé, le nombre de molécules d'ADN mt diminue drastiquement, ce qui conduit à un "goulot d'étranglement" qui a des conséquences importantes pour la perpétuation des mutations dans le génome mitochondrial (revue par (Shoubridge, 2000). Etant donné qu'une cellule typique contient quelques centaines de mitochondries avec chacune de 2 à 10 molécules d'ADN mt, une mutation dans l'une de ces molécules confère un état d'hétéroplasmie à la cellule. Lors de la division de la cellule, les molécules d'ADN mt seront réparties entre les cellules filles. Dans cette répartition, certaines

cellules filles vont emporter une portion plus grande d'ADN mt muté, alors que d'autres vont posséder une portion plus petite. L'ensemble des molécules d'ADN mt de la cellule mère sont appelées "unités ségréantes", et leur partage inégal "ségréation". Une ségréation méiotique chez l'homme entraîne des tissus à différents taux d'ADN mt muté, et les tissus de l'individu présentent une "mosaïque". Par ailleurs, une ségréation mitotique donne des individus qui possèdent des proportions d'ADN mt muté différentes de leur mère. Ainsi, leurs unités ségréantes sont changées, ce qui s'appelle une dérive génique.

III. Maladies mitochondriales humaines

Le concept de “maladie mitochondriale” a été introduit dans les années 60 en référence à des affections liées à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, engendrant un déficit dans le couplage oxydation-phosphorylation et ainsi dans la production d’ATP cellulaire (Desnuelle, 2003). Pendant près de 25 ans de nombreuses maladies, principalement des myopathies ou encéphalo-myopathies, ont été rassemblées sous ce terme. En 1988, la première mise en évidence d’une délétion de l’ADN mitochondrial a imposé le concept de maladie mitochondriale à transmission maternelle (Holt et coll., 1988; Lestienne & Ponsot, 1988). Pendant les années 1990 et jusqu’à aujourd’hui, de nombreuses mutations du génome mitochondrial ne cessent d’être mises en évidence. Ainsi, de maladies “biochimiques” les maladies mitochondriales devenaient des maladies liées au génome mitochondrial. Plus récemment, un grand nombre de gènes nucléaires ont également été mis en cause. De nombreux exemples d’altérations génétiques touchant les protéines de structure des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mais également touchant des protéines impliquées dans l’importation mitochondriale, ont été rapportés. Ainsi, le concept de pathologie mitochondriale n’a cessé d’évoluer et de prendre de l’importance. Ces maladies mitochondriales restent des maladies rares et la prévalence a été estimée à 12,5/100 000, tous âges confondus (Desnuelle, 2003).

Les maladies mitochondriales peuvent être classées en fonction du défaut biochimique qui les caractérise (revues par Schmiedel et coll., 2003; Shanske & DiMauro, 1994). Ces défauts correspondent à des déficiences dans l’importation de substrats, dans l’utilisation de ces substrats, dans le cycle de Krebs, dans les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire et de l’ATP-synthase ou encore dans le couplage entre oxydation et phosphorylation. Les maladies mitochondriales peuvent également être classées en fonction de la localisation de la mutation dans l’ADN nucléaire ou mitochondrial, classement que nous allons adopter.

A. Description clinique des principales maladies mitochondriales

Ces maladies sont souvent des syndromes, entités définies par l’association fréquente de plusieurs symptômes cliniques, d’anomalies biochimiques et anatomo-pathologiques. Elles sont nombreuses et diversifiées. Les maladies peuvent débuter à tous âges. Les maladies infantiles (avant 2 ans) sont souvent multi-systémiques et d’emblée graves. Elles présentent des hypotonies importantes, des insuffisances rénales (tubulopathies), des défaillances de

l'équilibre acido-basique, des cardiomyopathies fatales, des faiblesses musculaires et des encéphalopathies. Chez l'adolescent et l'adulte, les signes neuromusculaires deviennent prépondérants et différents syndromes assez bien individualisés ont été décrits. Les organes les plus touchés sont les muscles striés (squelettiques et cardiaques) et le système nerveux (système nerveux central, organes des sens, en particulier yeux et oreilles).

L'anomalie biologique la plus évocatrice est la présence d'un taux élevé d'acide lactique dans le sang (lactate/pyruvate ≥ 20). L'examen au microscope d'échantillons musculaires colorés par le trichrome de Gomori révèle souvent un nombre élevé de fibres rouges déchiquetées ("ragged red fibres", RRF). La coloration rouge intense de ces fibres provient des nombreuses mitochondries présentes. La transformation de fibres musculaires en RRF est due à une accumulation de ces mitochondries dans ces fibres. Une autre caractéristique fréquemment associée est la présence d'un grand nombre de fibres qui ne sont pas réactives à la coloration histochimique spécifique de la cytochrome oxydase (cytochrome c oxydase négatives). La majorité des maladies mitochondriales ont un déficit enzymatique impliquant majoritairement les complexes I (NADH ubiquinone oxydoréductase) et IV (cytochrome c oxydase). Les principaux syndromes ont été décrits dans plusieurs revues (Schmiedel et coll., 2003; Schon & DiMauro, 2003). Les syndromes les mieux définis sont brièvement décrits ci-dessous.

-> Le syndrome MELAS

"Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes". Comme son nom l'indique, ce syndrome associe une encéphalomyopathie mitochondriale avec acidose lactique à des pseudo-accidents vasculaires cérébraux (pseudo-AVC, hémorragies cérébrales). C'est un des syndromes les plus fréquents. La maladie débute entre 5 et 15 ans. Elle est principalement caractérisée par des pseudo-AVC. Ceux-ci seraient plutôt dus aux défauts du métabolisme énergétique de la mitochondrie qu'à des hémorragies cérébrales. On parle de pseudo-AVC car les anomalies observées au scanner cérébral ne correspondent pas à la localisation des principales artères. Ces pseudo-AVC entraînent l'hémi-parésie ou hémiplégie, c'est-à-dire la paralysie légère ou complète d'un côté du corps, ou encore l'hémianopsie, c'est-à-dire la perte de la moitié du champ visuel d'un ou des deux yeux. Elle présente également une encéphalopathie, une perte de l'audition, un diabète, des migraines intermittentes, des vomissements, des faiblesses musculaires des membres. Les examens biochimiques révèlent une acidose lactique et l'existence de fibres rouges déchiquetées (RRF) dans le muscle.

-> Le syndrome MERRF

“Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers”. Le syndrome MERRF est également un des syndromes les plus représentés. Il débute généralement entre 20 et 30 ans. C'est une maladie neurodégénérative chronique. Elle associe une épilepsie myoclonique (convulsions) progressive, une ataxie (mauvaise coordination des mouvements) et une surdité, à une myopathie. De nombreuses fibres rouges déchiquetées (RRF) sont observées. Il peut aussi s'y ajouter une démence, une cardiomyopathie, une atrophie du nerf optique. La dégradation intellectuelle est plus ou moins rapide. Dans certains cas, des pseudo-accidents vasculaires cérébraux rapprochent le tableau clinique de celui du MELAS.

-> Les syndromes de Kearns-Sayre (KSS), PEO et CPEO

“Progressive External Ophthalmoplegia” (PEO) et Chronic PEO. Le syndrome de Kearns-Sayre et les myopathies avec ophtalmoplégie externe progressive ont des symptômes communs ce qui rend le diagnostic discriminatoire difficile. Le KSS débute avant l'âge de 20 ans. Le symptôme principal de ces trois syndromes consiste en une paralysie des muscles oculaires externes ainsi que du muscle releveur de la paupière, entraînant l'impossibilité de bouger les globes oculaires et une chute des paupières. Si seul le symptôme principal est présent, le syndrome est le PEO (progressif) ou le CPEO (chronique). Les patients présentant le KSS sont plus sévèrement atteints. Le syndrome consiste en des affections rétinienne, des arythmies cardiaques et une ataxie. De nombreux autres symptômes peuvent être associés (démence, petite taille, surdité, diabète, néphropathie, troubles du transit intestinal, etc....) donnant lieu aux “ophtalmoplégies plus...”. La biopsie musculaire montre presque toujours des fibres cytochrome c oxydase négatives et des RRF.

-> Le syndrome de Leigh

Encore appelé encéphalomyopathie nécrosante. La maladie débute vers 1 an. Elle présente des anomalies et des retards du développement. Les signes cliniques sont des atteintes des nerfs crâniens, surtout oculomoteurs (chute de la paupière, ophtalmoplégie), des ataxies, des anomalies respiratoires (apnée, polypnée: respiration rapide et superficielle), des faiblesses musculaires et une acidose lactique. Les anomalies respiratoires sont responsables du décès, qui a souvent lieu dans la première année. L'acidose lactique est fréquente. Les anomalies cérébrales sont très caractéristiques au scanner et à la RMN.

-> Le syndrome NARP

“Neurogenic Ataxia-Retinitis Pigmentosa”. Les symptômes commencent habituellement après 5 ans, et comprennent une rétinite pigmentaire (processus dégénératif de la rétine, bilatéral), un déficit moteur dû à une neuropathie sensitivo-motrice axonale

(faiblesse musculaire des nerfs), une ataxie (mauvaise coordination des mouvements), des épilepsies (convulsions), un retard mental et une démence progressive. Il n'y a pas d'acidose lactique ni de déficit des complexes de la chaîne respiratoire.

-> **Le syndrome de Pearson**

Il débute dès la première année de la vie et comprend une insuffisance de production, par la moelle osseuse, de cellules sanguines (anémie, diminution des leucocytes, diminution du nombre de plaquettes). Une insuffisance pancréatique externe et parfois une acidose lactique sont observées. Les patients nécessitent des transfusions de sang à répétition et la plupart des enfants atteints meurent durant les premières années de leur vie. Parmi les survivants, quelques-uns ont développé plus tard un KSS. D'ailleurs, le syndrome de Pearson peut être considéré comme la forme néonatale du syndrome de Kearns-Sayre.

-> **Le syndrome LHON**

“Leber's Hereditary Optic Neuropathy”. Atrophie optique de Leber (décrite par Leber en 1871). Il s'agit d'une maladie cliniquement bien définie, caractérisée par une perte aiguë ou subaiguë de la vision bilatérale à un âge jeune (27 ans en moyenne) due à une dégénérescence des nerfs optiques. Il s'y associe parfois des anomalies du rythme cardiaque et des symptômes psychiatriques, toujours mineurs par rapport aux signes oculaires. Il n'y a pas d'atteinte musculaire.

-> **Le syndrome MNGIE**

“Myo-Neuro-Gastro Intestinal Encephalopathy”. Cette maladie multi-systémique se déclare entre 20 et 50 ans. Elle présente une myopathie mitochondriale, une PEO, une neuropathie périphérique, une encéphalopathie et une maladie gastro-intestinale. Cette dernière se manifeste par des diarrhées intermittentes, une pseudo-obstruction intestinale et des problèmes d'absorption entraînant souvent une malnutrition chronique.

B. Mutations dans l'ADN mitochondrial

C'est l'ADN mt qui est atteint, a priori sans aucune mutation associée dans le génome nucléaire. On distingue deux groupes selon le type de lésion moléculaire : les réarrangements de l'ADN mt et les mutations ponctuelles. Les différentes anomalies de l'ADN mt et les maladies qui y sont associées ont été décrites en détail dans un certain nombre de revues (Dimauro & Schon, 2001; Goto, 2001; Schmiedel et coll., 2003; Smeitink et coll., 2001; Wallace, 2001).

1. Réarrangements

Ce sont les premières mutations à avoir été mises en évidence. Les réarrangements de l'ADN mt sont toujours hétéroplasmiques. La portion du génome perdu est variable d'un patient à l'autre, mais est la même dans toutes les cellules affectées d'un même patient. Ce type de molécules délétées ne se retrouve pas chez la mère, aussi on suppose que la délétion apparaît dans l'ovule fécondé, ou au cours des premières divisions de l'œuf. Ceci explique le mode d'apparition sporadique de ces maladies. Ces délétions ne se produisent pas tout à fait au hasard, et sont dues à des recombinaisons illégitimes entre simples brins d'ADN au niveau de séquences homologues ou répétées. En effet, des types particuliers de délétions (appelées délétions communes) sont souvent retrouvées. Les délétions emportent de grands fragments d'ADN mt comprenant des gènes de structure et des gènes d'ARNt (Ballinger et coll., 1994; Larsson & Clayton, 1995; Lestienne & Ponsot, 1988), et sont précédées parfois par des duplications de l'ADN mt (Poulton & Holt, 1994). Ainsi l'impact sur la mitochondrie varie en fonction de l'identité des gènes délétés ou affectés. Les principaux syndromes associés aux réarrangements sont Kearns-Sayre, diabète et surdités, Pearson, CPEO.

2. Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles affectent les trois classes de gènes que contient l'ADN mt. Ces anomalies de l'ADN mt vont avoir un impact, soit directement sur la structure/fonction des sous-unités de la chaîne respiratoire (mutation dans les gènes des protéines), soit de manière indirecte sur la synthèse de ces sous-unités. Au cours des 15 dernières années, plus de 140 mutations ponctuelles et de nombreux réarrangements ont été répertoriés. Ils sont consignés dans la base de données MITOMAP (<http://www.mitomap.org/>), régulièrement mise à jour. Les mutations ponctuelles correspondent le plus souvent au remplacement d'une paire de base par une autre. On peut alors avoir une transition (lorsqu'une purine est remplacée par l'autre purine, et une pyrimidine par l'autre pyrimidine) ou une transversion (dans les autres cas). Plus rarement, l'insertion ou la délétion d'une paire de base ont été rapportées. Des exemples de mutations sont présentés dans le Tableau 2.

Gènes mutés	Mutations	Syndromes liés
ATP6 complexe V	T8993G/C	NARP (Holt et coll., 1990) Syndrome de Leigh à hérédité maternelle (de Vries et coll., 1993)
ND1 } ND4 } complexe I ND6 }	G3460A G11778A T14484C	LHON (Huoponen et coll., 1991; Johns et coll., 1992; Wallace et coll., 1988a)
ARN ribosomique 12S	A1555G	Aminoglycoside-induced non syndromic deafness (Casano et coll., 1998)
ARNt ^{Leu(UUR)}	A3243G	MELAS ou MIDM (Kobayashi et coll., 1990; van den Ouweland et coll., 1994)
ARNt ^{Lys}	A8344G	MERRF (Wallace et coll., 1988b)
ARNt ^{Ser(CUN)}	A7445G	Non syndromic sensorineural deafness (Reid et coll., 1994)

Tableau 2. Exemples de quelques mutations dans les différents gènes de l'ADN mt et des maladies auxquelles elles sont reliées. La position des mutations dans l'ADN mt est indiquée par la numérotation du génome selon (Anderson et coll., 1981).

Gènes codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire. Les mutations affectent tous les complexes de la phosphorylation oxydative sauf le complexe II qui n'est formé que de sous-unités codées par des gènes nucléaires. Douze des 13 gènes des sous-unités codées par le génome mitochondrial présentent de nombreuses mutations, l'exception concerne le gène de l'ATPase 8. Les 3 mutations dans les gènes codant pour ND1, ND4, et ND6 du complexe I, répertoriées dans le Tableau 2, représentent 70% des mutations retrouvées dans les cas de syndrome de LHON.

Gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr). Les deux ARNr codés par le génome mitochondrial présentent des mutations qui ont principalement un impact sur la synthèse des sous-unités respiratoires. Les individus présentant la mutation A1555G dans l'ARNr 12S sont particulièrement sensibles aux aminoglycosides. La prise de ces antibiotiques provoque une surdité (Estivill et coll., 1998).

Gènes codant pour les ARNt. La grande majorité des mutations de l'ADN mt se trouve dans les gènes des ARNt. Ces mutations ainsi que les maladies qu'elles engendrent sont énumérées dans le Tableau 3, et leurs localisations sur des structures en feuille de trèfle des ARNt sont indiquées dans la Figure 5 de l'article de revue (partie I). Les mutations décrites dans les gènes d'ARNt sont le plus fréquemment des transitions. Les mutations les plus fréquentes sont la mutation A3243G dans l'ARNt^{Leu(UUR)}, corrélée au syndrome MELAS, et la mutation A8344G dans l'ARNt^{Lys}, corrélée au syndrome MERRF. Le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)} est considéré comme un "point chaud" de mutations avec 20 mutations ponctuelles et 1 délétion répertoriées.

Gène d'ARNt affecté	Mutation	Pathologies reliées	Séquence sauvage	Séquence mutée	Région mutée dans la structure en feuille de trèfle	Position dans l'ARNt selon la numérotation classique
Ala	A5628G	CPEO	A	G	bras anticodon	31
Ala	C5650T	MERRF	C	T	bras accepteur	6
Asn	A5692G	CPEO	A	G	boucle anticodon	38
Asn	C5698T	PEO	C	T	boucle anticodon	32
Asn	C5703T	CPEO, MM	C-G	T•G	bras anticodon	27
Asp	A7543G	MS	A-T	G•T	bras anticodon	29
Cys	A5814G	EM, MELAS, PEO	A-T	G•T	bras D	13
Gln	C4332T	EM, D	G-C	G•T	bras accepteur	70
Gln	A4336G	ADPD	G•A	G•G	bras accepteur	66
Gln	insT4370	MM, CD		insT	boucle anticodon	après 31
Glu	T14687C	MM, LA, PR, PRF	T	C	boucle T	60
Glu	A14709G	MM, EM, D	A	G	boucle anticodon	37
Gly	T9997C	MHCM	T-A	C•A	bras accepteur	7
Gly	A10006G	CIPO	A	G	boucle D	18
Gly	T10010C	EM	A-T	A•C	bras D	23
Gly	A10044G	EM	A	G	boucle T	59
His	G12183A	PR, SNHL	G-C	A•C	bras T	50
His	G12192A	CM	G	A	boucle T	59
Ile	A4267G	MM, SNHL	A	G	bras accepteur	5
Ile	A4269G	FICP, EM	A-T	G•T	bras accepteur	7
Ile	T4274C	CPEO	T-A	C•A	bras D	13
Ile	G4284A	AMDF, DM	G	A	bras anticodon	26
Ile	T4285C	PEO	T-A	C•A	bras anticodon	27
Ile	G4298A	CPEO	C-G	C•A	bras anticodon	40
Ile	A4300G	MICM, HCM	T-A	T•G	bras anticodon	42
Ile	G4309A	CPEO	G-C	A•C	bras T	51
Ile	A4317G	FICP	A	G	boucle T	59
Ile	C4320T	ECM	A•C	A-T	bras T	62
Leu(CUN)	T12297C	DCM	T	C	boucle anticodon	33
Leu(CUN)	G12301A	AISA	G	A	boucle anticodon	37
Leu(CUN)	G12315A	CPEO	G-C	A•C	bras T	52
Leu(CUN)	A12320G	MM	A	G	boucle T	57
Leu(CUN)	G12334A	EI, MERRF	G	A	bras accepteur	71
Leu(UUR)	A3243G	MELAS, DMDF	A	G	boucle D	14
Leu(UUR)	A3243T	PEM, MM	A	T	boucle D	14
Leu(UUR)	G3249A	KS	G	A	boucle D	19
Leu(UUR)	T3250C	MM	T	C	boucle D	20
Leu(UUR)	A3251G	MM	A	G	boucle D	20:01
Leu(UUR)	A3252G	MELAS	A	G	boucle D	21
Leu(UUR)	C3254G	MM	A•C	A•G	bras D	23
Leu(UUR)	G3255A	MERRK, KS	C-G	C•A	bras D	24
Leu(UUR)	C3256T	MERRF-like, MELAS	G-C	G•T	bras D	25
Leu(UUR)	T3258C	LA, EI	T-A	C•A	bras anticodon	27
Leu(UUR)	A3260G	MMC	A-T	G•T	bras anticodon	29

Tableau 3. Mutations dans les gènes des ARNt (voir page suivante pour les abréviations des pathologies. Les informations reportées ici proviennent de la base de données MITOMAP (<http://www.mitomap.org/>).

Gène d'ARNt affecté	Mutation	Pathologies reliées	Séquence sauvage	Séquence mutée	Région mutée dans la structure en feuille de trèfle	Position dans l'ARNt selon la numérotation classique
Leu(UUR)	T3264C	DM, MTMD	T	C	boucle anticodon	33
Leu(UUR)	T3271C	MELAS, DM	A-T	A•C	bras anticodon	40
Leu(UUR)	delT3272	PEM	A-T	delT	bras anticodon	41
Leu(UUR)	T3273C	O, EI	A-T	A•C	bras anticodon	42
Leu(UUR)	C3275A	LHON	C	A	variable region	44
Leu(UUR)	A3280G	MM	A-T	G•T	bras T	49
Leu(UUR)	A3288G	MM	A	G	boucle T	57
Leu(UUR)	T3291C	MELAS	T	C	boucle T	60
Leu(UUR)	A3302G	MM	T-A	T•G	bras accepteur	71
Leu(UUR)	C3303T	MMC	G-C	G•T	bras accepteur	72
Lys	A8344G	MERRF	A	G	boucle T	55
Lys	T8355C	PEO, SM	A-T	A•C	bras T	64
Lys	T8356C	MERRF	A-T	A•C	bras T	65
Lys	T8362G	SM	A-T	A•G	bras accepteur	71
Lys	G8363A	MICM, DEAF, MERRF, LS	C-G	C•A	bras accepteur	72
Met	T4409C	MM	T	C	bras accepteur/D	8
Met	G4450A	MM	G-C	A•C	bras T	53
Phe	G583A	MELAS	G-C	A•C	bras accepteur	7
Phe	A606G	M	A-T	G•T	bras anticodon	29
Phe	T618C	MM	A-T	A•C	bras anticodon	41
Pro	T15965C	ADPD	G•T	G-C	bras T	64
Pro	G15990A	MM, O	G	A	boucle anticodon	36
Pro	C15995T	cytopathy	C-G	T•G	bras anticodon	31
Ser(AGY)	C12246A	CIPO	C	A	boucle T	55
Ser(AGY)	C12258A	DMDF	G-C	G•A	bras accepteur	66
Ser(UCN)	insG7472	PEM		insG	region variable	46
Ser(UCN)	C7497T	MM, PEM, RRF, LA	G-C	G•T	bras D	22
Ser(UCN)	A7511G	DEAF, SNHL	A-T	G•T	bras accepteur	4
Ser(UCN)	A7512G	PEM	A-T	G•T	bras accepteur	3
Thr	G15915A	MM	G-C	A•C	bras anticodon	30
Thr	A15923G	LIMM	A	G	anticodon loop	38
Thr	delT15940	MM	delT		boucle T	60
Thr	G15950A	ADPD	C-G	C•A	bras accepteur	70
Trp	G5521A	MM	G-C	A•C	bras D	10
Trp	insT5537	MILS, LS		insT	bras anticodon	après 27
Trp	G5540A	PEM, CD	G-C	A•C	bras anticodon	30
Trp	G5549A	DEMCHO, D, A	C-G	C•A	bras anticodon	39
Tyr	delT5885	CPEO	delT		bras accepteur/D	8
Tyr	G5877A	CPEO	G	A	boucle D	15
Tyr	A5874G	EI, LW, CD	G•A	G•G	bras D	22
Val	G1606A	AMDF	G-C	A•C	bras accepteur	5
Val	G1642A	MELAS	C-G	C•A	bras anticodon	43
Val	G1644T	LS	G	T	region variable	45

Tableau 3. (Suite)

Abréviations	Pathologies
A	Ataxia
ADPD	Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease
AISA	Acquired Idiopathic Sideroblastic Anemia
AMDF	Ataxia, Mental deterioration, Deafness
CD	Cox Deficiency
CIPO	Chronic Intestinal PseudoObstruction with myopathy
CPEO	Chronic Progressive External Ophthalmoplegia
D	Diabete
DCM	Dilated CardioMyopathy
DEAF	Maternally inherited DEAFness or aminoglycoside-induced DEAFness
DEMCHO	DEMENTia, CHORea
DM	Diabetes Mellitus
DMDF	Diabetes Mellitus, Deafness
ECM	EncephaloCardioMyopathy
EI	Exercise Intolerance
EM	EncephaloMyopathy
FICP	Fatal Infantile Cardiomyopathy Plus a Melas-associated cardiomyopathy
HCM	Hypertrophic CardioMyopathy
KS	Kearns-Sayre syndrom
LA	Lactis Acidose
LHON	Leber Hereditary Optic Neuropathy
LIMM	Lethal Infantile Mitochondrial Myopathy
LS	Leigh Syndrome
LW	Limb Weakness
M	Myoglobinuria
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactis Acidose, Stroke-like episodes
MERRF	Myoclonic Epilepsy and Ragged Red muscle Fibers
MHCM	Maternally inherited Hypertrophic CardioMyopathy
MICM	Maternal Inherited CardioMyopathy
MILS	Maternal Inherited Leigh Syndrome
MM	Mitochondrial Myopathy
MMC	Maternal Myopathy and Cardiomyopathy
MNGIE	Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy
MS	Myoclonic Seizures
MTMD	Multiple Tumor in Mitochondrial Diabetes
O	Ophthalmoplegia
PEM	Progressive EncephaloMyopathy
PEO	Progressive External Ophthalmoplegia
PR	Pigmentary Retinopathy
PRF	Progressive Respiratory Failure
SM	Skeletal Myopathy
SNHL	SensoriNeural Hearing Loss

Il faut noter qu'une même mutation peut entraîner différents syndromes. Par exemple, la mutation A3243G dans l'ARNt^{Leu(UUR)} entraîne généralement un syndrome MELAS mais également dans certains cas un diabète (MIDM). Par ailleurs, un même syndrome peut être lié à différentes mutations comme le syndrome MERRF liée à la mutation A8344G dans l'ARNt^{Lys} et à la mutation G12334A dans l'ARNt^{Leu(CUN)}. La superposition de l'ensemble des mutations sur une même structure en feuille de trèfle de l'ARNt montre que pratiquement toutes les positions sont affectées et qu'aucun concept général ne peut-être établi (Fig. 7).

La diversité des maladies et la répartition aléatoire des mutations révèlent la difficulté de compréhension de l'impact de ces mutations et soulèvent l'hypothèse de l'absence d'un mécanisme moléculaire commun à l'ensemble des mutations. Les mutations dans un gène d'ARNt peuvent avoir *a priori* un impact sur l'ensemble des étapes de la vie de l'ARNt (Fig. 8). Ainsi, une mutation peut interférer au niveau transcriptionnel (ceci est tout particulièrement possible dans le cas de l'ARNt^{Leu(UUR)} en raison de la présence d'un signal de terminaison transcriptionnel interne à ce gène), au niveau de la maturation de l'ARNt (clivage des extrémités 5' et 3', mise en place de la séquence 3'-terminale CCA non codée, modifications post-transcriptionnelles, repliement secondaire, repliement tertiaire), ou encore au niveau des interactions avec les partenaires de la synthèse protéique tels que l'aminacyl-ARNt synthétase (aaRS), enzyme qui catalyse la fixation spécifique d'un acide aminé sur l'ARNt, les facteurs d'élongation, le ribosome ou l'ARN messenger (ARNm). Les premières études réalisées ont déjà mis en évidence un impact sur chaque étape par au moins une mutation dans un gène d'ARNt (tableau récapitulatif de l'impact des mutations sur les étapes de la vie de l'ARNt dans l'article de revue). Les mutations affectent les différentes étapes plus ou moins fortement. Certaines mutations altèrent plusieurs de ces étapes et peuvent donc avoir des effets cumulatifs. L'étape d'aminacylation, qui permet la fixation de l'acide aminé correct sur l'ARNt par son aaRS spécifique, est une étape clé de la synthèse protéique. Ainsi, une mutation affectant l'aminacylation aura un effet direct sur la synthèse protéique. Cette étape étant primordiale, nous y reviendrons plus tard.

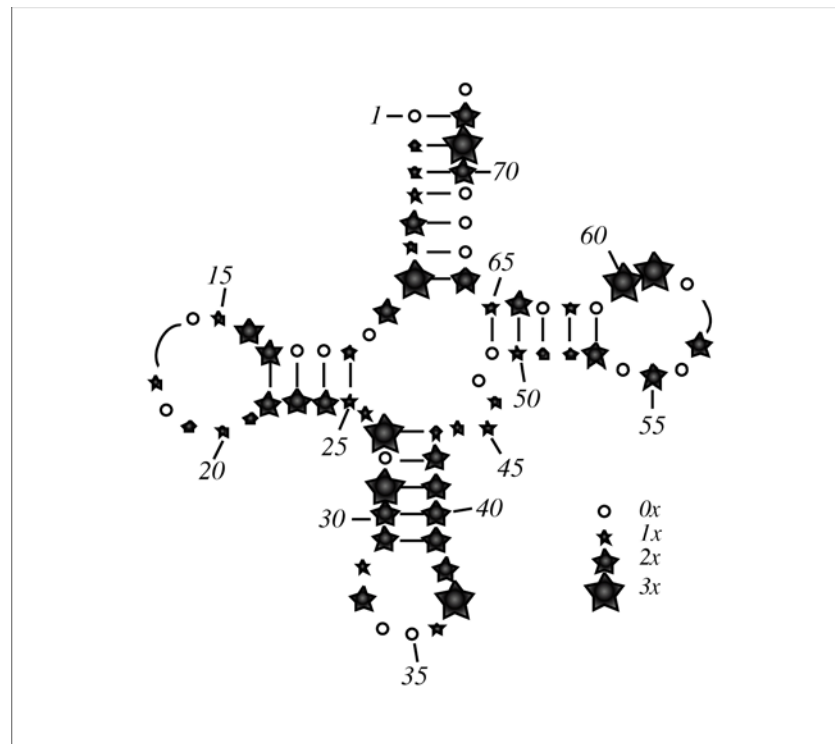


Figure 7. Distribution des mutations pathologiques sur la structure secondaire en feuille de trèfle d'un ARNt. La taille des étoiles est proportionnelle à l'occupation des sites (code de correspondance dans la Figure). Les informations reportées ici proviennent du Tableau 3.

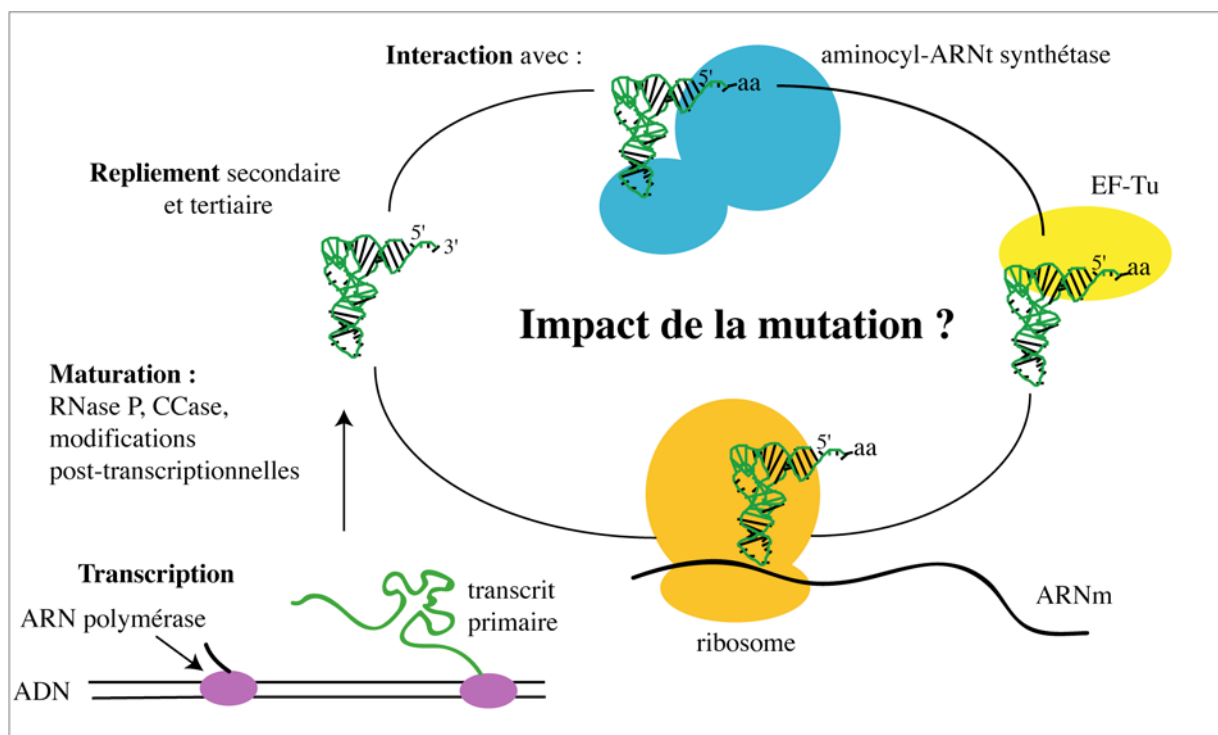


Figure 8. Schéma résumant les différents niveaux d'impact potentiel d'une mutation dans un gène d'ARNt mt au cours des différentes étapes de sa vie.

3. Expression variable d'une mutation dans l'ADN mitochondrial

Plusieurs phénomènes participent à la variabilité de l'expression d'une mutation : l'hétéroplasmie, la ségrégation mitotique et le type tissulaire affecté. Tout d'abord, les molécules d'ADN mt saines et mutées peuvent coexister dans une cellule sans affecter le fonctionnement de la mitochondrie tant que le nombre de copies d'ADN mt sain présent est suffisant pour compenser les effets négatifs induits par l'ADN mt mutant. Si le nombre de copies d'ADN mutant dépasse le seuil de tolérance de la cellule, les dysfonctionnements apparaissent. Cependant, le seuil de tolérance à ne pas dépasser pour l'expression de la maladie varie en fonction du type cellulaire et du tissu. Les cellules qui ont des besoins importants en énergie comme les cellules musculaires, les cellules nerveuses, et les cellules cardiaques, ont un seuil de tolérance apparemment plus faible. Ceci explique le fait que de nombreuses maladies mitochondriales soient des encéphalo-myopathies. La ségrégation mitotique entraîne une répartition aléatoire des mitochondries mutées dans les différents tissus. Ainsi seul un tissu particulier peut contenir des molécules d'ADN mt muté, ou alternativement différents tissus peuvent être affectés. Il semble cependant prévisible que les différents phénotypes des malades ne s'expliquent pas uniquement par les variations dans les taux d'ADN muté dans chaque cellule et par la répartition des mitochondries dans les tissus. D'autres facteurs doivent être impliqués.

C. Mutations dans l'ADN nucléaire

Les mutations dans l'ADN nucléaire sont responsables de maladies mitochondriales dont l'hérédité est régie par la loi de Mendel. Ce sont majoritairement des mutations ponctuelles. Les maladies sont dominantes ou récessives, autosomales ou liées aux chromosomes sexuels. Elles sont reconnues comme mitochondriales car elles affectent le fonctionnement de la mitochondrie. Toutefois, la localisation de la mutation ou le mécanisme d'impact sur la mitochondrie est parfois encore inconnu. Ainsi, la maladie de Luft, la première maladie mitochondriale décrite au niveau biochimique, n'est toujours pas corrélée à une mutation, tout comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Orth & Schapira, 2001). Les mutations répertoriées sont classées en fonction du niveau d'impact de la protéine mutée correspondante (Tableau 4).

Gène muté	Syndromes liées
Impact structural sur les complexes de l'OXPPOS	
NDUFS4 } NDUFS7 } NDUFS8 }	Complexe I Syndrome de Leigh (Ahlers et coll., 2000; van den Heuvel et coll., 1998)
Flavoprotéin	Complexe II Syndrome de Leigh (Bourgeron et coll., 1995)
SURF1 } SCO2 }	Protéine de l'assemblage du complexe I Syndrome de Leigh (Tiranti et coll., 1998; Zhu et coll., 1998) Cardio-encéphalomyopathie (Dickinson et coll., 2000; Papadopoulou et coll., 1999)
SCO1	IV Encéphalopathie avec hépatopathie (Valnot et coll., 2000a)
COX10]	Encéphalopathie avec néphropathie (Valnot et coll., 2000b)
Autres impacts	
Frataxine	Ataxie de Friedreich (Di Donato, 2000)
Paraplegin	Paraplégie spastique avec RRF (Di Donato, 2000; DiMauro & Schon, 1998)
DDP	Surdité/ Dystonie (Koehler et coll., 1999)
OPA1	Atrophie optique dominante (Delettre et coll., 2000)
ANT1	PEO autosomale dominante (Kaukonen et coll., 2000)
Thimidine phosphorylase	MNGIE (Nishino et coll., 1999)

Tableau 4. Exemples de quelques mutations dans différents gènes de l'ADN nucléaire et des maladies auxquelles elles sont reliées.

Impact structural sur les complexes de la phosphorylation oxydative. Il y a deux groupes de mutations ayant un impact structural sur les complexes de la phosphorylation oxydative. Le premier comprend les mutations localisées dans des gènes nucléaires codant pour des sous-unités des complexes respiratoires. La première mutation de ce type a été trouvée dans le gène codant pour une flavoprotéine, sous-unité du complexe II. Cependant, les mutations affectant des protéines du complexe I sont les plus fréquentes. Le deuxième groupe rassemble les protéines mutées ne faisant pas partie des complexes respiratoires en tant que tels mais intervenant dans l'assemblage de ces complexes. Leur rôle exact dans cet assemblage est souvent inconnu. La première mutation identifiée de ce groupe était dans le gène de la protéine SURF1.

Autres impacts. Certaines mutations affectent des protéines à localisation mitochondriale mais ne faisant pas partie de la chaîne respiratoire. Ainsi une mutation dans le gène codant pour le frataxine interfère avec l'homéostasie du fer. Comme autre exemple, notons une mutation dans le gène codant pour la protéine DDP, homologue humain de Tim8 chez la levure. La mutation interfère dans les mécanismes d'importation de protéines dans la mitochondrie. Dans d'autres cas, les mutations sont localisées dans des gènes nucléaires impliqués dans la biogenèse des mitochondries et essentiellement dans la réplication et la

maintenance de l'ADN mt. Par effet de cascade, l'ADN mt accumule des anomalies (qui sont dites secondaires, la mutation de l'ADN nucléaire étant l'anomalie primitive). Sur le plan moléculaire, l'ADN mt peut présenter deux types d'anomalies. Dans les anomalies qualitatives, on observe la présence de délétions multiples. Il y a plusieurs sortes de molécules délétées chez un même patient, coexistant avec la molécule normale (pléioplasmie). Dans les anomalies quantitatives, l'ADN mt est normal en taille, mais le nombre de copies par cellule est réduit. Il s'agit des déplétions. Il a été mis en évidence que la mutation du gène nucléaire de l'adénine nucléotide translocase (ANT1) entraînait des délétions de l'ADN mt (Kaukonen et coll., 2000), le mécanisme d'action reste cependant inconnu. L'ANT1 était connue jusque-là uniquement pour son rôle d'échange de l'ATP avec l'ADP du cytosol.

D. Autres désordres mitochondriaux

Si la plupart des maladies mitochondriales sont d'origine génétique, des syndromes similaires peuvent être causés par des toxiques ou des médicaments agissant sur la mitochondrie, par exemple, l'antiviral AZT (Hayes, 1994; Lewis & Dalakas, 1995). Un rôle des mitochondries dans le processus du vieillissement normal a été suggéré en rapport avec les théories impliquant les radicaux libres (Lestienne, 1995). L'apparition de larges délétions de l'ADN mt a été rapportée chez différents individus au cours du vieillissement (Zhang et coll., 1997). Une accumulation de mutations ponctuelles, en particulier dans la zone de contrôle de la réplication, a également été observée chez certaines personnes âgées dans les fibroblastes et les muscles squelettiques. L'hypothèse selon laquelle ces mutations ponctuelles pourraient apporter un avantage réplcatif aux mitochondries de cellules nécessitant beaucoup d'énergie a été émise (Chomyn & Attardi, 2003; Michikawa et coll., 1999).

Dès les années 1930, Otto Warburg avait observé la présence de déficiences respiratoires dans les mitochondries de cellules tumorales par opposition à des cellules saines. Aujourd'hui, l'implication de la mitochondrie dans les cancers n'est plus à démontrer et est de plus en plus étudiée. Ainsi, au cours de ces dernières années, de nombreuses mutations de l'ADN mt ont été identifiées dans des cellules cancéreuses de différents tissus. Elles sont présentes à l'état hétéroplasmique mais également parfois à l'état homoplasmique (revue par Carew & Huang, 2002). Des mutations à l'état homoplasmique dans l'ARNt^{Asp} et l'ARNt^{Leu(UUR)} ont été mises en évidence dans des cancers de la thyroïde. De même, des mutations homoplasmiques dans les deux gènes des ARN ribosomiques ont été mises en évidence dans des cancers des ovaires, du pancréas, du sein. Ces mutations sont présentes à

des stades précoces du développement de la maladie. La présence de la mutation à l'état homoplasmique conduit à penser à un avantage prolifératif de la mutation. Connaissant le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose, la présence de ces mutations a pu/pourrait contribuer à altérer la réponse cellulaire aux agents anti-cancer. Plusieurs revues répertorient les nombreuses mutations détectées aux cours de ces dernières années (Carew & Huang, 2002; Copeland et coll., 2002; Penta et coll., 2001).

IV. Aminoacyl-ARNt synthétases et ARNt, partenaires clés de la synthèse protéique

La synthèse protéique consiste en la conversion d'un langage nucléique (alphabet de 4 lettres) en langage protéique (alphabet de 20 lettres). Dans ce processus, les réactions d'aminacylation des ARNt par les aminoacyl-ARNt synthétases ont une position déterminante et doivent être hautement spécifiques. En effet, la nature de l'acide aminé incorporé dans la chaîne polypeptidique en cours de synthèse dépend fondamentalement de la précision de la réaction d'aminacylation ainsi que de la précision de la reconnaissance entre l'ARNt et l'ARNm au niveau des interactions codon-anticodon. Les ARNt sont de petites molécules (76 nucléotides en moyenne) qui ont été très largement étudiées. Des milliers de séquences individuelles sont connues et une structure secondaire en feuille de trèfle et tertiaire en forme de "L" leur est commune. Cependant comme déjà décrit dans l'article de revue, des exceptions existent. C'est le cas pour les ARNt mt. Les synthétases sont des enzymes modulaires, avec un domaine catalytique, un domaine de fixation de l'anticodon. Là aussi, des variantes existent avec soit des domaines additionnels soit des domaines manquants.

La réaction d'aminacylation des ARNt se déroule en deux étapes. La première est ARNt-indépendante (sauf pour les systèmes glutamate, glutamine et arginine), et consiste à activer spécifiquement l'acide aminé (aa) sous forme d'aminacyl-adénylate (aa-AMP) en présence d'ions Mg^{2+} .



Lors de la seconde étape, l'acide aminé activé est transféré sur l'extrémité 3' de l'ARNt (ARNt-aa).



Nous décrirons ci-dessous plus en détail les caractéristiques principales des synthétases et des ARNt.

A. Les aminoacyl-ARNt synthétases

Les aminoacyl-ARNt synthétases constituent une famille d'enzymes très largement étudiée (e.g. Francklyn et coll., 2002; Ibba et coll., 2003; Martinis et coll., 1999a; Martinis et

coll., 1999b; Meinnel et coll., 1995). Hétérogènes par leurs tailles et par leurs structures oligomériques, ces enzymes sont d'une grande originalité car elles se distinguent également par leurs sites catalytiques. Ainsi, une même fonction, la fixation d'un acide aminé spécifique sur le ribose terminal d'un ARNt, peut-être catalysée de deux manières différentes. En effet, sur la base de critères structuraux et biochimiques, les synthétases ont pu être divisées en deux classes de 10 membres chacune (Cusack et coll., 1990; Eriani et coll., 1990), comme illustré dans le Tableau ci-dessous.

CLASSE I			CLASSE II		
Séquences HIGH + KMSKS			Motifs 1, 2, et 3		
Sous-classe Ia			Sous-classe IIa		
ValRS	α	2'OH	SerRS	$\alpha 2$	3'OH
IleRS	α	2'OH	ThrRS	$\alpha 2$	3'OH
LeuRS*	α	2'OH	ProRS	$\alpha 2$	3'OH
MetRS*	$\alpha 2$	2'OH	GlyRS*	$\alpha 2\beta 2$	3'OH
CysRS	α	2'OH et 3'OH	HisRS	$\alpha 2$	3'OH
Sous-classe Ib			Sous-classe IIb		
TyrRS	$\alpha 2$	2'OH et 3'OH	AspRS	$\alpha 2$	3'OH
TrpRS	$\alpha 2$	2'OH	LysRS [§]	$\alpha 2$	3'OH
Sous-classe Ic			AsnRS	$\alpha 2$	3'OH
GluRS	α	2'OH	Sous-classe IIc		
GlnRS	α	2'OH	PheRS*	$\alpha 2\beta 2$	2'OH
ArgRS	α	2'OH	AlaRS*	$\alpha 4$	3'OH

Tableau 5. Répartition des aminoacyl-ARNt synthétases en deux classes. La structure oligomérique est donnée pour *Escherichia coli*, ainsi que le groupement hydroxyle du nucléotide 3'-terminal de l'ARNt sur lequel l'acide aminé est initialement fixé. *Synthétases pour lesquelles la structure oligomérique n'est pas conservée au cours de l'évolution. [§]Des LysRS de classe I ont été mises en évidence dans certains organismes (Ibba et coll., 1997b).

1. Les enzymes de classe I

Ces enzymes ont un site actif typiquement replié en domaine de Rossmann. Le domaine de Rossmann a été identifié la première fois comme un motif de liaison de l'ATP, du NAD, et du NADP dans les kinases et les deshydrogénases (Rossmann et coll., 1974). Par ailleurs, les enzymes de ce groupe sont reconnaissables par leurs séquences signatures en acides aminés HIGH et KMSKS. Elles fixent préférentiellement l'acide aminé sur l'hydroxyle 2'-OH terminal de l'ARNt. Les enzymes de classe I ont en commun d'interagir avec leur ARNt substrat au niveau du petit sillon de l'hélice acceptrice (Arnez & Moras, 1997). Cependant, des exceptions existent. Ainsi, les TyrRS de *Thermus thermophilus* et de *Bacillus stearothermophilus* ont récemment été décrites comme ayant un mode de reconnaissance de

l'ARNt identique aux synthétases de classe II, c'est-à-dire par le grand sillon de l'hélice acceptrice (Fechter et coll., 2000; Yaremchuk et coll., 2002).

Depuis la répartition des synthétases en deux classes, trois sous-classes ont été caractérisées. La première, Ia, regroupe des synthétases généralement monomériques activant les acides aminés aliphatiques ou soufrés. La sous-classe Ib regroupe les synthétases dimériques activant des acides aminés aromatiques. La sous-classe Ic regroupe les enzymes activant des acides aminés hydrophiles. Ces dernières sont monomériques et nécessitent l'ARNt pour l'activation de l'acide aminé.

2. Les enzymes de classe II

Les synthétases de la classe II ont un site actif formé de 3 motifs plus ou moins dégénérés. Le motif 1 est impliqué dans la dimérisation des synthétases et possède une proline très conservée. Les motifs 2 et 3, incluant les résidus chargés de l'activation de l'acide aminé et du transfert de celui-ci sur l'ARNt, sont caractérisés par la présence d'une arginine conservée dans un contexte bien précis. Elles attachent préférentiellement l'acide aminé sur l'hydroxyle 3' de l'ARNt homologue. Ces enzymes approchent leur ARNt sur la face opposée de celle reconnue par les synthétases de classe I, interagissant avec le grand sillon de l'hélice acceptrice de l'ARNt.

Tout comme dans le cas des enzymes de classe I, trois sous-classes permettent de distinguer les synthétases de la classe II. Celles appartenant à la sous-classe IIa sont le plus souvent dimériques et possèdent des homologies de séquences fortes au niveau du site catalytique et du domaine C-terminal fixant l'anticodon (sauf dans le cas de la SerRS). La sous-classe IIb comprend les synthétases dimériques possédant le domaine de liaison de l'anticodon dans la partie N-terminale. Enfin la sous-classe IIc comprend les enzymes tétramériques. Ces enzymes sont très particulières, car leur structure oligomérique n'est pas conservée au cours de l'évolution, et elles présentent une dégénération plus importante des motifs conservés.

3. Modules structuraux des aminoacyl-ARNt synthétases

De nombreuses argumentations ont permis de penser que les synthétases primitives ne comprenaient que le domaine catalytique, et qu'au cours de l'évolution d'autres domaines se sont ajoutés permettant d'affiner la réaction d'aminacylation (revues par Ibba & Söll, 2001; Schimmel et coll., 1993; Schimmel & Ribas de Pouplana, 1995). Ces modules additionnels

ont des origines diverses, c'est la raison pour laquelle ils présentent beaucoup moins d'homologies entre eux que les domaines catalytiques. Parmi ces modules figurent les motifs de liaison à l'anticodon, les extensions aux extrémités N-terminale ou C-terminale, ainsi que des domaines additionnels, insérés entre les motifs conservés.

Le domaine de fixation de l'anticodon est un module que l'on retrouve dans beaucoup de synthétases. La topologie de ce domaine est très variable, allant d'une structure entièrement constituée d'hélices α à une structure entièrement constituée de feuillets β , en passant par les situations intermédiaires (revue par Francklyn et coll., 1997). Un domaine d'“editing” est également présent dans certaines synthétases. Il apporte à ces enzymes la possibilité d'un mécanisme de correction (ou “editing”) des acides aminés activés par erreur (Chen et coll., 2000). Ce mécanisme d'“editing” a d'abord été mis en évidence pour les enzymes de classe I (ValRS, IleRS, LeuRS) puis plus tard pour les enzymes de classe II (ThrRS, AlaRS, ProRS, PheRS). Les synthétases eucaryotiques sont caractérisées par la présence d'une extension N-terminale constituée d'acides aminés basiques qui sont des motifs de liaison à l'ARN (Francin et coll., 2002; Frugier et coll., 2000) ou des motifs permettant la constitution du complexe multienzymatique chez les eucaryotes supérieurs (Agou & Mirande, 1997).

Les synthétases présentent également des modules à leur extrémité N- ou C-terminale qui peuvent apporter des fonctions non reliées à la réaction d'aminacylation (Elizarov et coll., 1997; Ko et coll., 2002). Ainsi, les TrpRS et TyrRS cytoplasmiques humaines possèdent un extra-domaine, N-terminal ou C-terminal respectivement, qui leur confère une activité cytokine dans la voie de signalisation des cytokines (Wakasugi & Schimmel, 1999; Wakasugi et coll., 2002; Yang et coll., 2002b). Certaines synthétases peuvent en tant que telles, également présenter des fonctions additionnelles à l'aminacylation. Ainsi, la LeuRS mt de *S. cerevisiae* comme la TyrRS mt de *Neurospora crassa* et de *Podospora anserina* facilitent l'épissage des introns de groupe I dans la mitochondrie (Akins & Lambowitz, 1987; Kämper et coll., 1992; Rho et coll., 2002).

4. Les aminoacyl-ARNt synthétases particulières

Les études effectuées sur *E. coli* ou la levure ont permis de démontrer l'existence d'une seule aminoacyl-ARNt synthétase spécifique d'un acide aminé et de la famille d'ARNt correspondante. Le concept a été largement élargi à d'autres organismes et la relation 1 aaRS /1 aa a été admise. En conséquence, chaque organisme devrait contenir un jeu unique de 20 synthétases. Ce concept a été ébranlé lors du séquençage des génomes archaebactériens. En

effet, le génome de *Methanococcus jannaschii* ne possède que 16 des 20 gènes de synthétases attendus (Bult et coll., 1996). Les 4 gènes de synthétases *a priori* manquants correspondent à l'AsnRS, la GlnRS, la CysRS et la LysRS. La purification de la protéine responsable de l'activité de lysylation, et le séquençage de son gène a permis de montrer que *M. jannaschii* possède une LysRS de classe I, et non de classe II comme attendu (Ibba et coll., 1997a). Cette particularité se retrouve dans de nombreuses autres archaebactéries. Ainsi, les LysRS constituent le seul exemple de non-conservation de la classe d'une synthétase au cours de l'évolution. D'autres études ont mis à jour la capacité de certaines AspRS à charger de l'acide aspartique non seulement sur l'ARNt^{Asp} mais encore sur l'ARNt^{Asn} (Becker & Kern, 1998; Curnow et coll., 1996) ainsi que de certaines GluRS à charger de l'acide glutamique aussi bien sur l'ARNt^{Glu} que sur l'ARNt^{Gln} (Curnow et coll., 1996; Schön & Söll, 1988). Ces synthétases, aminoacylant 2 ARNt différents par un seul acide aminé, font parties de systèmes 1 aaRS / 1 aa / 2 ARNt de spécificité différente. Par ailleurs, certains organismes possèdent plusieurs gènes différents codant pour une synthétase. Ainsi, le procaryote *Thermus thermophilus* possède deux AspRS. L'AspRS qui provient d'un transfert horizontal de gène d'origine archeobactérienne est capable d'aminoacyler l'ARNt^{Asp} et l'ARNt^{Asn} alors que l'autre, d'origine eubactérienne, n'est capable d'aminoacyler que l'ARNt^{Asp} (Becker et coll., 2000). L'archae *Methanosarcina barkeri* possède deux LysRS, une de classe I et l'autre de classe II. De récents travaux ont montré que ces deux enzymes forment un complexe ternaire avec un ARNt particulier, l'ARNt^{Pyl}, spécifique de la pyrolysine (22^{ième} acide aminé), mais que l'activité d'aminoacylation est contenue uniquement dans l'enzyme de classe II (Polycarpo et coll., 2003).

B. Reconnaissance spécifique des ARNt

La spécificité de la réaction d'aminoacylation des ARNt par les aaRS est d'une grande importance pour permettre une traduction fidèle de l'information génétique et éviter les erreurs dans la protéine en voie de synthèse. C'est pourquoi, la précision de la réaction d'aminoacylation exige l'existence de stratégies permettant d'augmenter la réactivité entre complexes homologues, et d'abaisser la réactivité entre complexes hétérologues. De ces observations ont émergé les notions de déterminants d'identité et d'antidéterminants au niveau des ARNt.

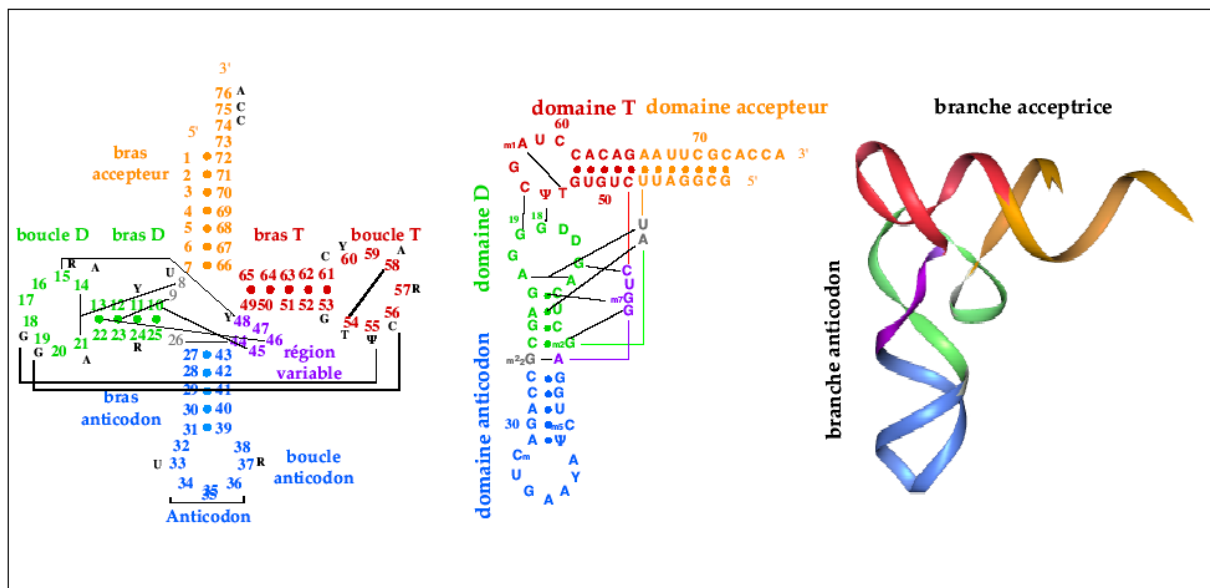


Figure 9. Structure primaire, secondaire, et tertiaire d'ARNt classiques. Les différents domaines structuraux sont indiqués. Les interactions à longue distance conduisant à la structure tridimensionnelle sont représentées par des traits. La numérotation ainsi que la nomenclature des bases modifiées correspondent à celles établies par (Sprinzl et coll., 1998). R et Y représentent respectivement des purines et des pyrimidines.

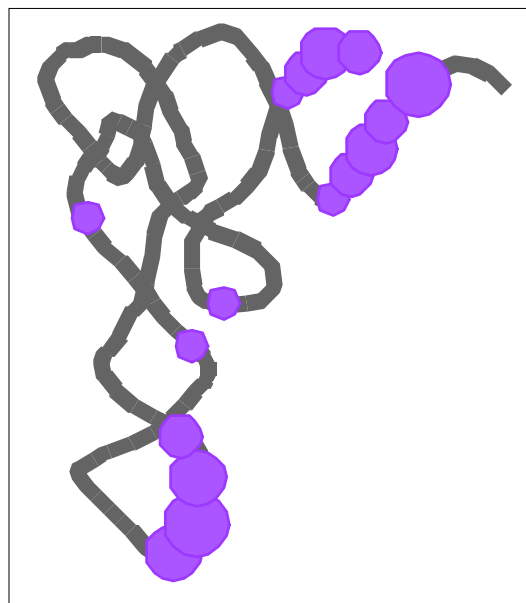


Figure 10. Récapitulatif des positions d'identités des ARNt chez *E. coli*. Les sphères représentent les positions impliquées dans les différentes identités des ARNt. La taille des sphères est proportionnelle à la fréquence d'utilisation de la position dans les identités.

1. Structure des ARNt

Les ARNt se replient en structure secondaire sous la forme d'une feuille de trèfle et en structure tridimensionnelle sous la forme d'un "L". Le passage d'un niveau structural au suivant dépend d'un réseau d'interactions à longue distance, les interactions tertiaires, que l'on retrouve dans la vaste majorité des ARNt (Giegé et coll., 1993). La Figure 9 illustre les différents niveaux de structure.

2. Identité des ARNt

La reconnaissance productive entre les ARNt et les synthétases homologues est gérée au niveau de l'ARNt par des éléments spécifiques, ou déterminants, alors que la présence sur les ARNt d'éléments négatifs ou antidéterminants empêche toute interaction productive avec les synthétases hétérologues. Ces déterminants ou antidéterminants, appelés éléments d'identité, peuvent être des éléments structuraux, des nucléotides isolés, des paires de bases, des modifications de bases et des groupements chimiques de bases. Ils sont limités en nombre et spécifiques à chaque ARNt (revue par Giegé & Frugier, 2003; Giegé et coll., 1998; McClain, 1995). Chaque synthétase doit reconnaître de manière spécifique un élément ou une combinaison d'éléments uniques présents sur l'ARNt homologue. L'anticodon, spécifique à chaque ARNt, est de ce fait souvent impliqué dans les jeux d'identité. De même la présence d'une grande région variable dans uniquement 4 ARNt procaryotiques (et 3 eucaryotiques) correspond à un site de discrimination par la synthétase correspondante. Enfin, l'interaction directe entre l'extrémité acceptrice de l'ARNt et le coeur catalytique de la synthétase a conduit à suggérer l'implication de cette extrémité dans la discrimination entre ARNt (Crothers et coll., 1972), ce qui a été vérifié expérimentalement dans un très grand nombre de cas. Ainsi, les signaux positifs sont le plus souvent les nucléotides situés aux deux extrémités de la structure tridimensionnelle de l'ARNt, c'est-à-dire au niveau de l'anticodon et à l'extrémité de la branche acceptrice (Fig. 10).

Les études menées jusqu'à présent ont montré que l'importance de chaque élément d'identité d'un ARNt varie. Le jeu d'identité peut être constitué d'éléments majeurs dont la mutation entraînera une perte d'efficacité de l'aminacylation importante par rapport à l'ARNt sauvage, et d'éléments mineurs, dont la mutation conduira à une perte d'efficacité faible. Les 20 jeux d'identité ont été déterminés dans l'organisme modèle procaryotique *E. coli*, et la plupart des systèmes ont été analysés chez la levure, le modèle eucaryotique. Par ailleurs, d'autres identités d'ARNt ont été étudiées chez *Bacillus subtilis*, *T. thermophilus*, *Homo*

sapiens etc... Ces études montrent que les éléments d'identités sont globalement conservés au sein d'un même règne du vivant et aussi, mais d'une manière moins prononcée, à travers toute l'échelle évolutive. Il existe cependant quelques exceptions notables qui se traduisent par l'existence de barrières d'espèces, notamment entre procaryotes et eucaryotes. Par exemple, la GlyRS d'*E. coli* ne peut charger l'ARNt^{Gly} humain et *vice versa* (Shiba et coll., 1994). Il en est de même pour les systèmes tyrosine d'*E. coli* et de la levure (Edwards et coll., 1991; Lee & RajBhandary, 1991) ou pour les synthétases d'*E. coli* qui ne peuvent pas charger les ARNt mt humains (Brulé, 1998; Kumazawa et coll., 1991). Certaines exceptions ne s'expliquent pas par la barrière d'espèce comme par exemple pour les systèmes mitochondriaux et cytosoliques humains qui n'acceptent pas l'aminacylation réciproque (seules les synthétases mitochondriales peuvent aminoacyler les ARNt cytosoliques).

3. Approches pratiques pour la détermination des éléments d'identité d'un ARNt

La recherche du jeu d'identité d'un ARNt peut être effectuée *in vitro* ou *in vivo*. L'approche *in vitro* est basée sur la production par une ARN polymérase de transcrits non modifiés d'ARNt de séquence sauvage ou mutée (Dreher et coll., 1984; Sambrook et coll., 1989; Sampson & Uhlenbeck, 1988), suivie de la mesure des constantes cinétiques d'aminacylation de ces transcrits. Les nucléotides d'identité sont ceux dont la mutation ponctuelle, tout en conservant la structure globale tridimensionnelle de l'ARNt, conduit à une diminution de l'efficacité d'aminacylation. Cette méthode permet de tester potentiellement toutes les positions et de détecter des effets faibles. Cependant, elle n'est applicable que si les modifications post-transcriptionnelles ne jouent pas de rôle primordial dans l'identité de l'ARNt. Bien entendu, cette approche ne tient pas compte de possibles compétitions entre différents systèmes d'aminacylation, compétitions potentiellement présentes dans un contexte cellulaire.

L'approche *in vivo* est basée sur l'utilisation d'ARNt supresseurs capables de décoder un codon stop inséré dans un gène rapporteur (Normanly et coll., 1990; Normanly et coll., 1986). L'efficacité de suppression d'un variant comparée à celle de l'ARNt initial va permettre d'estimer l'efficacité de la réaction d'aminacylation et de conclure quant à l'importance du nucléotide testé dans l'identité de l'ARNt. Cette méthode permet d'étudier l'effet de mutations dans un contexte cellulaire et s'applique à des ARNt matures. Par contre, l'effet observé peut être dû, non seulement à une baisse de l'efficacité d'aminacylation, mais

aussi à l'implication de la position mutée dans l'une et/ou l'autre étape(s) clé(s) de la synthèse protéique, voir même dans la structure et la maturation de l'ARNt. De plus, pour être observé, l'effet doit être suffisamment fort pour perturber la traduction du gène rapporteur. Enfin, cette méthode ne permet souvent pas de tester l'influence des 3 nucléotides de l'anticodon.

C. Les systèmes d'aminacylation mitochondriaux humains

Les systèmes mitochondriaux humains ont été très peu étudiés. Les principales connaissances sur ces systèmes ont été décrites dans l'article de revue et nous ne rappellerons ici que les points principaux. La mitochondrie possédant une machinerie de traduction propre, elle doit disposer des 20 systèmes d'aminacylation formés des ARNt et des synthétases correspondantes. En ce qui concerne ces dernières rappelons qu'elles sont toutes codées par le génome nucléaire. Elles peuvent être codées par un gène différent de leur équivalent cytoplasmique ou par le même gène. Dans le cas d'un gène unique, les formes cytoplasmique et mitochondriale sont obtenues soit (i) par un épissage alternatif qui permettra d'obtenir des extrémités N-terminales différentes (cas de la LysRS (Tolkunova et coll., 2000)), soit (ii) par la présence de deux sites d'initiation de la traduction (cas de la GlyRS (Mudge et coll., 1998)). Dans les deux cas, la forme mitochondriale diffère de la forme cytoplasmique par la présence d'une séquence d'adressage vers la mitochondrie. Lorsque nous avons commencé nos travaux, seuls les gènes codant pour 8 synthétases mitochondriales étaient connus (Sissler et coll., 2003). Dans 6 cas, les gènes étaient totalement différents des gènes codant pour les enzymes cytoplasmiques correspondantes, et dans deux cas (GlyRS et LysRS) le gène était le même. Au cours d'un travail récent mené au laboratoire en vue de rechercher les 12 gènes de synthétases mitochondriales manquantes, il est apparu que toutes étaient codées par un gène différent des enzymes cytoplasmiques (M. Sissler, communication personnelle). En ce qui concerne les ARNt mitochondriaux, rappelons leur taille généralement plus courte que les ARNt classiques, leur composition en nucléotide particulière (très riche en A, C et U) et en conséquence leurs structures secondaires et tertiaires relativement déviantes des structures classiques. A noter en particulier la grande variabilité des tailles des boucles D et T, l'absence dans presque tous les ARNt d'un certain nombre des nucléotides invariants et la forte présence de paires de bases de faible stabilité (AU, GU mésappariements). Ainsi, ces ARNt apparaissent (au moins d'un point de vue théorique) globalement moins structurés et des conformations moins stables que les ARNt classiques.

Par opposition aux systèmes classiques bien documentés, les jeux d'identité mitochondriaux de mammifère sont très peu connus. En particulier, aucun système mitochondrial humain n'a été étudié dans le but d'identifier son jeu d'identité. Seuls quelques éléments d'identité sont connus pour l'ARNt^{Ser} mt bovin et l'ARNt^{Asp} et l'ARNt^{Gly} mt de marsupial (voir revues par Börner et coll., 1996; Ueda et coll., 1992). Suivant (i) l'hypothèse de l'origine endosymbiotique de la mitochondrie (Emelyanov, 2003; Gray et coll., 1999), (ii) la quasi-conservation des jeux d'identité au cours de l'évolution et (iii) la capacité des aminoacyl-ARNt synthétases mt humaines à charger les ARNt d'*E. coli* (Kumazawa et coll., 1991), il est possible que les éléments d'identité d'*E. coli* soient présents dans les ARNt mt de mammifère (Helm et coll., 2000). Ceux effectivement conservés sont consignés dans le Tableau 6. Deux systèmes d'amination possèdent l'ensemble des nucléotides constituant le jeu d'identité d'*E. coli* : les systèmes tyrosine et asparagine.

ARNt	Bras accepteur	Boucle anti-codon	Autres domaines
Ala	A73, G2:C71, G3 :U70, G4:C69	-	G20
Arg	-	C35, C36	A20
Asn	G73	G34, U35, U36	-
Asp	G73, G2:C71	G34, U35, C36, C38	G10
Cys	U73 , G2:C71, C3:G70	G34, C35, A36	G15:G48, A13:A22
Gln	G73, U1:A72 , G2:C71, G3:C70	Y34, U35, G36, A37, U38	G10
Glu	G1:C72, U2:A71	U34, U35, A37	U11-A24 , U13:G22:A46, Δ47
Gly	U73, G1:C72, C2:G71, G3:C70	C35, C36	-
His	G1, C73	-	-
Ile	A73, C4 :G69	G34, A35, U36, A37, A38	U12:A23, C29-G41
Leu	A73	G18, G19	U8- A14 , A15-U48
Lys	A73	U34, U35, U36	-
Met	A73 , U4:A69, A5 :U68	C34, A35, U36 ,	-
Phe	A73	G34, A35, A36	G27:C43, G28:C42, U20, G44, U45, U59, U60
Pro	A73, G72	G35, G36	G15:C48
Ser	G73, C72, G2:C71, A3:U70, R4-Y69	-	C11:G24, boucle variable
Thr	G1:C72 , C2:G71,	G34, G35, U36	-
Trp	G73, A1:U72 , G2:C71, G3:C70	C34, C35, A36	-
Tyr	A73	U35	-
Val	A73 , G3:C70, U4:A69	A35, C36	-

Tableau 6. Présentation des éléments d'identité des ARNt d'*E. coli* et de ceux conservés dans les ARNt mt de mammifère. Les nucléotides en gras sont les éléments majeurs d'identité. Tableau adapté de (Helm et coll., 2000).

D. Le cas particulier du système leucine mitochondrial humain

Le système leucine mitochondrial humain fera l'objet principal des travaux de cette thèse en raison de très nombreuses mutations “pathologiques” détectées dans le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)} (point chaud de mutations). C'est pourquoi nous allons développer ci-dessous, l'état des connaissances concernant ce système.

1. LeuRS mitochondriale humaine

Les Leucyl-ARNt synthétases sont des enzymes de classe I (Cusack et coll., 2000; Eriani et coll., 1990). Plus de 100 séquences de LeuRS sont connues. Généralement un seul gène code pour ces enzymes. Cependant, une exception vient d'être décrite avec le cas de la LeuRS de l'extrémophile *Aquifex aeolicus* qui s'est avérée être un hétérodimère $\alpha\beta$ (Gouda et coll., 2002; Xu et coll., 2002; Zhao et coll., 2003). La première structure cristallographique d'une LeuRS a été obtenue récemment à 2Å de résolution (Cusack et coll., 2000). Il s'agit de l'enzyme de *T. thermophilus* qui possède une fonction d'“editing” (Fig. 11). Elle présente (i) un domaine catalytique formé du domaine de Rossmann, qui est la partie centrale de la molécule, (ii) deux domaines de fixation du zinc, (iii) un domaine de fixation de l'anticodon formé de 5 hélices α caractéristiques de la sous-classe Ia, (iv) un domaine “Leucine-specific” et (v) un domaine d'“editing”. Le domaine “Leucine-specific” est uniquement présent chez les LeuRS de type procaryote-like, mais il n'est pas très conservé en séquence et en taille. Il pourrait interagir avec l'ARNt^{Leu} au niveau de la base du bras accepteur. Le domaine d'“editing” est un large domaine. Il est inséré après le domaine de fixation du zinc I uniquement chez les LeuRS procaryotes et mitochondriales. Notons que pour les ValRS, IleRS et les LeuRS d'archéobactéries et cytoplasmiques eucaryotes, ce même domaine est inséré entre les deux parties du domaine de fixation du zinc. Ceci entraîne une différence de 180° d'orientation de ce domaine chez la LeuRS par rapport à l'IleRS. La fixation de l'adénosine du leucyl-adenylate entraîne des changements conformationnels dans le site actif, qui se propagent à d'autres régions de la molécule permettant d'obtenir une structure plus ordonnée pour l'aminocyclation ou l'“editing”. Les bases structurales et mécanistiques de l'“editing” par la LeuRS ont été décrites récemment chez *E. coli* (Lincecum et coll., 2003).

Les LeuRS de certains organismes présentent une autre fonction particulière, l'épissage. La LeuRS mt de *S. cerevisiae* possède un domaine d'insertion CP1 qui lui permet de faciliter l'épissage des introns de groupe I dans la mitochondrie (Labouesse, 1990 ; Rho et coll., 2002).



Figure 11. Structure cristallographique de la Leucyl-ARNt synthétase de *Thermus thermophilus* (Cusack et coll., 2000). Les différents domaines sont l'extension N-terminale (gris), le domaine catalytique (Rossmann-fold, rouge), le domaine d'“editing” (jaune), le domaine d'insertion leucine spécifique (bleu turquoise), le domaine de fixation de l'anticodon (beige), le module de connexion (vert). Les séquences consensus “HIGH” et “KMSKS” du site catalytique sont en gris clair. Les résidus impliqués dans les domaines de fixation du zinc ZN-1 et ZN-2 sont en jaune et les atomes de zinc sont représentés sous la forme de sphères de couleur orange. A noter, l'absence de l'extrémité C-terminale car ce domaine est invisible dans la carte de densité électronique. Cette figure a été générée par l'utilisation du programme PyMol (DeLano, 2002).

Etant donné qu'il n'y a pas d'introns dans les génomes mitochondriaux de mammifères, on pourrait anticiper que la LeuRS mt humaine ne présente pas d'activité d'épissage. Cependant, ceci s'avère inexact puisqu'il est possible de remplacer le gène de la LeuRS mt de levure par le gène codant par la LeuRS mt humaine en conservant l'épissage (Houman et coll., 2000).

Les connaissances concernant la LeuRS mt humaine sont très récentes et limitées. Le gène codant pour cette enzyme avait été reconnu par (Houman et coll., 2000) et cloné par (Bullard et coll., 2000). L'enzyme mitochondriale est codée par un gène nucléaire différent du gène codant pour la LeuRS cytoplasmique. La LeuRS mt humaine présente une forte ressemblance avec d'autres LeuRS mt ou d'organismes procaryotiques (Bullard et coll., 2000). Ainsi, elle présente par exemple, 45 % d'identité avec la LeuRS des *Synechocystis* (cyanobactérie), 38 % avec la LeuRS mt de *S. cerevisiae*, et 33 % avec celle de *T. thermophilus*. Par contre, elle partage si peu d'homologies de séquence avec l'enzyme cytoplasmique que l'alignement des deux séquences est difficile. La comparaison de sa séquence avec celle de *T. thermophilus* (Fig. 12) montre qu'elle ne possède que le domaine de fixation du zinc 2. Son domaine d'“editing” est moins ressemblant que le reste de la séquence, tout comme le domaine “Leucine specific” qui est plus court. Parmi les résidus essentiels pour le mécanisme d'“editing” mis en évidence récemment (“threonine-rich peptide”, Asp347) (Lincecum et coll., 2003), le résidu thréonine 252 n'est pas présent alors qu'il est conservé par exemple dans la LeuRS mt de *S. cerevisiae*. Ceci laisse présager d'un mécanisme d'“éditing”, s'il est présent, différent.

La LeuRS mt humaine a été surproduite et étudiée partiellement en ce qui concerne les paramètres cinétiques d'aminocyclation des ARNt totaux d'*E. coli* (Bullard et coll., 2000). Une difficulté dans le clonage du gène codant pour une protéine à localisation mitochondriale, concerne la reconnaissance précise de la région codant pour le signal d'adressage mitochondrial, et en son élimination dans le vecteur d'expression. Dans le cas du gène de la LeuRS mt humaine, une séquence de localisation mitochondriale (MLS) a été pressentie en région N-terminale (Bullard et coll., 2000). Un site de coupure de cette pré-séquence après import de la protéine dans la mitochondrie a été prédit par un programme informatique (PSORT) comme étant au niveau de l'acide aminé 21. Bullard et coll. ont réalisé le clonage correspondant et surexprimé une enzyme délétée des 21 premiers acides aminés ($\Delta 21$ -LeuRS), de masse moléculaire apparente de 100 kDa. Cette enzyme est active sous forme monomérique comme les LeuRS canoniques, mais comme la plupart des synthétases mitochondriales, est moins efficace que ses homologues eucaryotiques ou procaryotiques (Bullard et coll., 2000).

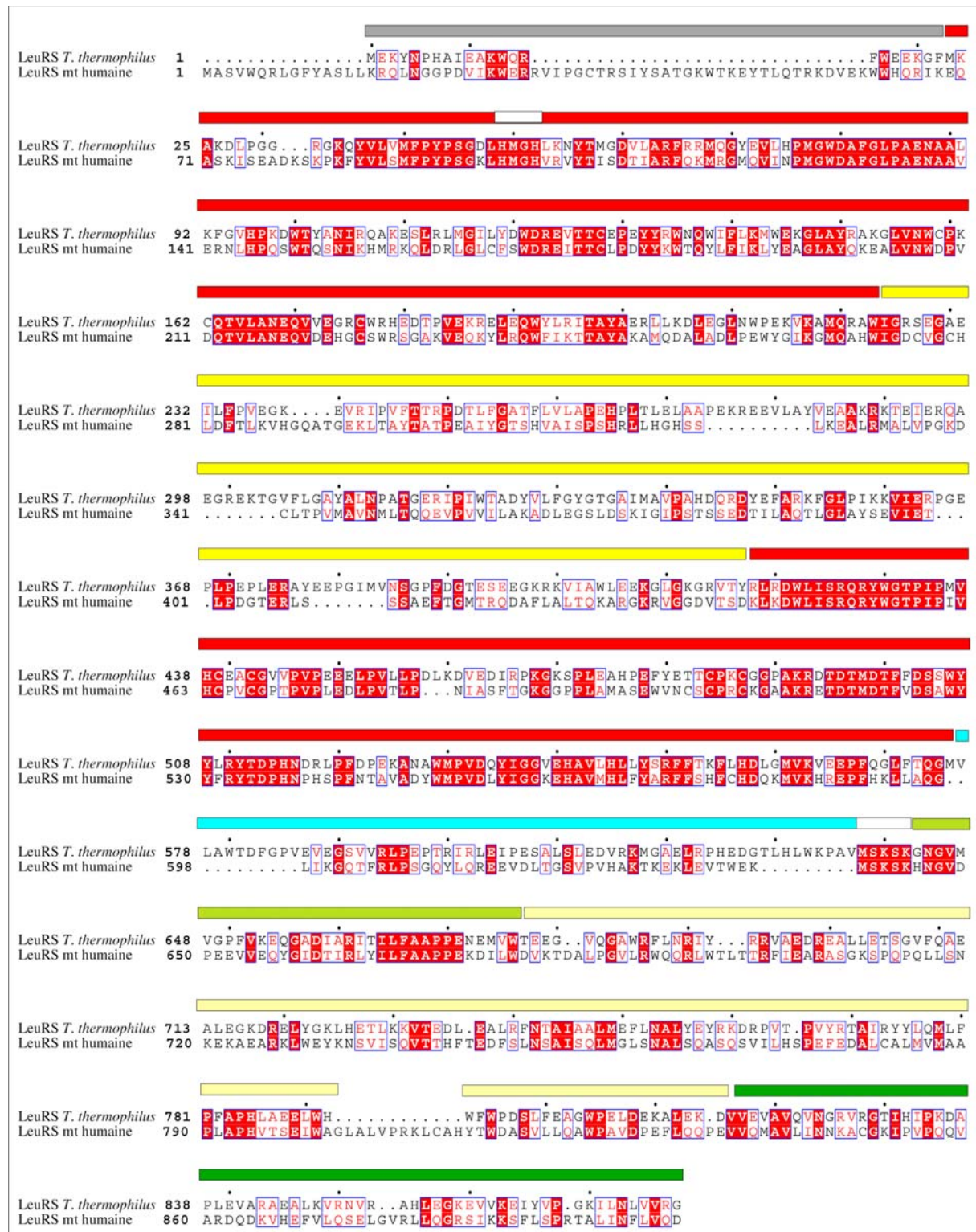


Figure 12. Alignement des séquences de la LeuRS mt humaine et de *Thermus thermophilus*. L'alignement a été réalisé avec Clustal X (Thompson et coll., 2000) et dessiné avec ESript (Gouet et coll., 1999). Au dessus des alignements, un code couleur rappelle les différents domaines structuraux de la LeuRS de *T. thermophilus* défini dans la Figure 11. Le domaine C-terminal, absent sur la structure cristallographique, est représenté ici en vert.

2. Les ARNt^{Leu} mitochondriaux humains

La mitochondrie humaine possède deux ARNt isoaccepteurs de la leucine : l'ARNt^{Leu(UUR)} et l'ARNt^{Leu(CUN)} qui décodent les codons leucine UUR et CUN respectivement. L'ARNt^{Leu(CUN)} est un ARNt léger (transcrit à partir du brin d'ADN lourd) et contient donc une faible teneur en G (15 %). L'analyse théorique de sa séquence indique qu'il possède les nucléotides permettant l'établissement de 6 des 9 interactions tertiaires responsables du repliement 3D classique sous la forme d'un L (Fig. 13A).

L'ARNt^{Leu(UUR)} est également un ARNt léger et contient seulement 16,7% de G. Sa séquence primaire tout comme celle de l'ARNt^{Leu(CUN)} est l'une parmi les 22 ARNt mt, des plus conservées dans les mitochondries de mammifères (Helm et coll., 2000) (Fig. 13C et D). L'ARNt^{Leu(UUR)} possède en théorie une structure secondaire et une structure tertiaire canoniques. Non seulement il contient les domaines structuraux attendus (*i.e.* bras et boucles) et de bonne taille, mais encore tous les éléments permettant l'établissement de l'ensemble des neuf interactions tertiaires classiques, y compris les interactions entre les boucles D et T (Helm et coll., 2000) (Fig. 13B). Ces neuf interactions sont G18-U55, G19-C56, (U8-A14)-A21, G9-(U23-A12), G15-C48, (C25-G10)-A45, (G13-U22)-N46, A26-U44, U54-A58. Sa composition en nucléotides conduit à des caractéristiques particulières telles que la rareté des paires de bases G-C (7 sur 21) et la présence de nombreuses séquences pyrimidine-A qui sont des sites de fragilité de la chaîne ribose-phosphate (Dock-Bregeon et coll., 1989; Florentz et coll., 1982) ce qui pourrait rendre cet ARNt plus sensible aux dégradations. La séquence de l'ARNt^{Leu(UUR)} natif, extrait de placenta humain, a été établie et l'ensemble des modifications post-transcriptionnelles identifié (Helm et coll., 1999a; Suzuki et coll., 2002; Yasukawa et coll., 2000). Cet ARNt contient des modifications classiques, communes à de nombreux ARNt, mais également une modification spécifique au niveau de l'anticodon, nouvellement découverte pour cet ARNt. Il s'agit d'un dérivé méthylé de la taurine (5-taurino methyl uridine) (Suzuki et coll., 2002).

Les deux ARNt^{Leu} mt humain (et de façon générale les ARNt^{Leu} de mitochondries de mammifères) présentent une petite région variable. Ceci les distingue de l'ensemble des ARNt^{Leu} trouvés dans les autres organismes qui possèdent une grande région variable. Ainsi, l'ARNt^{Leu} est un des seul ARNt (avec l'ARNt^{Tyr}) dont l'architecture générale n'est pas conservée au cours de l'évolution. Notons enfin que le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)} présente dans sa séquence un signal de terminaison de la transcription qui permet une expression plus importante des gènes des deux ARNr (voir §IIB3 Transcription et maturation).

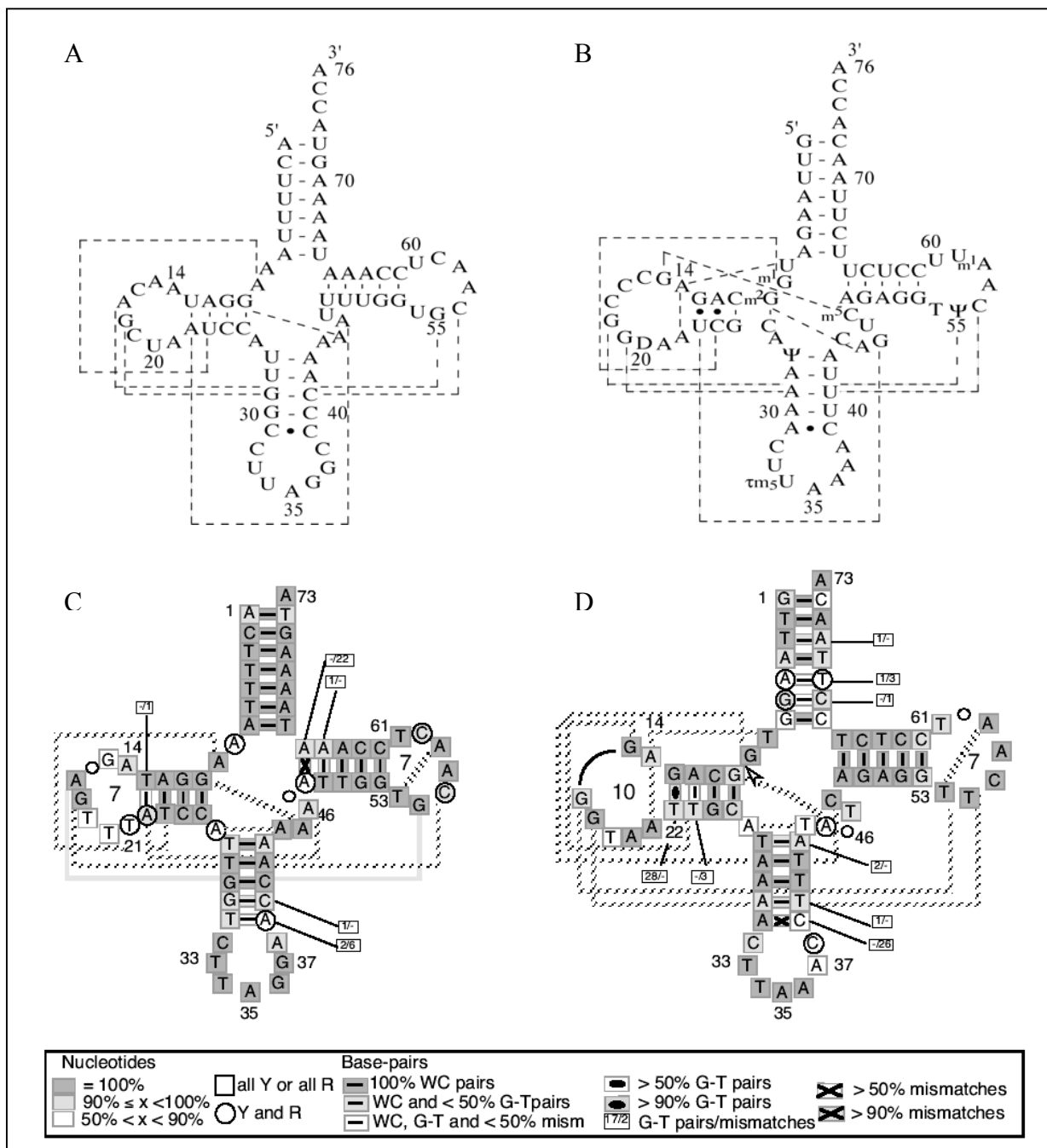


Figure 13. ARNt mt humains (A, B) et de mammifères (C, D) de la leucine. L'ARNt^{Leu(CUN)} et l'ARNt^{Leu(UUR)} sont représentés respectivement en (A, C) et en (B, D). Dans les deux isoaccepteurs humains les interactions tertiaires potentielles sont indiquées. Elles correspondent à une structure "classique" commune à tous les ARNt (Sprinzl et coll., 1998) et montrent la possibilité de repliement 3D conventionnel. Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNt^{Leu(UUR)} sont indiquées. Les séquences consensus (C, D) ont été obtenues par compilation de 32 génomes mitochondriaux de mammifères (Helm et coll., 2000).

3. Eléments d'identité leucine-spécifiques

Les éléments responsables de l'identité leucine ont été bien étudiés chez *E. coli* (Asahara et coll., 1993; Asahara et coll., 1998; Du & Wang, 2003; Larkin et coll., 2002; Normanly et coll., 1992; Tocchini-Valentini et coll., 2000). Les positions A73 et A14 ont été montrées comme éléments d'identité majeurs. La position des résidus G18 et G19 dans la boucle D, le résidu 47n et l'interaction A15-U48, sans être des éléments directs d'identité, ont un rôle important dans le repliement tertiaire correct de l'ARNt, nécessaire à la reconnaissance par la synthétase. La grande boucle variable de l'ARNt^{Leu} d'*E. coli* n'est pas requise pour son identité. D'autres systèmes leucine ont également été étudiés comme celui de *S. cerevisiae*, où les nucléotides A73, A35 et G37 de la boucle anticodon ont été mis en évidence comme éléments d'identité (Soma et coll., 1996). Pour le système cytosolique humain, l'identité leucine est définie par le nucléotide A73, trois paires de bases du bras accepteur (C3-G70, A4-U69, G5-C68) et la région variable (Breitschopf et coll., 1995; Breitschopf & Gross, 1996). Enfin, chez la bactérie *Haloferax volcanii*, la position A73 et la région variable (particulièrement les positions des résidus 47c, d, et h) ont été mises en évidence (Soma et coll., 1999). Ainsi, l'identité du système leucine apparaît peu conservée au cours de l'évolution.

La comparaison des éléments d'identité d'*E. coli* avec les nucléotides présents chez l'ARNt^{Leu(UUR)} mt humain indique que seuls les résidus A73 et A14 sont conservés (Helm et coll., 2000). Le système de leucylation mitochondrial humain n'a pas été étudié en tant que tel, mais des éléments de réponse indirects concernant les éléments importants pour l'aminacylation proviennent de l'étude de mutations pathologiques. Il a été ainsi montré que la mutation A3243G (A14G) située dans le bras D de l'ARNt^{Leu(UUR)} affecte l'aminacylation *in vivo* (Börner et coll., 2000). Il est donc possible que cette mutation modifie un élément d'identité ou qu'elle affecte la structure tertiaire en empêchant l'interaction U8-A14. Dans cette même logique, les mutations répertoriées dans l'ARNt^{Leu(UUR)}, conduisant à des pathologies, doivent être considérées comme affectant des positions potentiellement impliquées dans l'identité. Ces positions ont une probabilité plus élevée d'être des éléments d'identité que les positions qui n'ont jamais été répertoriées. Cependant, les positions, non corrélées à une mutation pathologique, pourraient être également d'une grande importance dans les propriétés d'aminacylation de sorte qu'elles engendrent un phénotype létal, donc non répertorié.

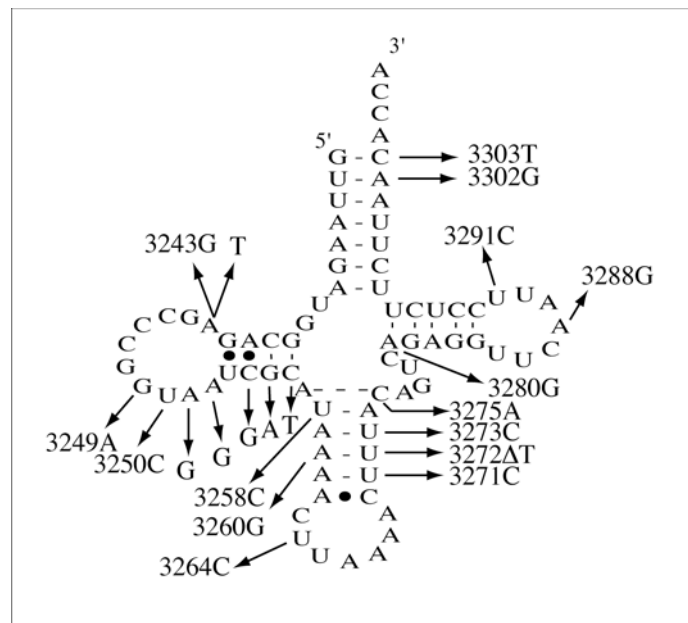


Figure 14. Mutations pathologiques répertoriées pour le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)}. Les positions mutées sont celles présentées dans le Tableau 3.

4. Mutations pathologiques dans l'ARNt^{Leu(UUR)}

L'ARNt^{Leu(UUR)} présente le plus grand nombre de mutations liées à des maladies mitochondriales (Fig. 14), puisque 21 des 140 mutations y ont été trouvées. Parmi celles-ci, la mutation A3243G, liée au syndrome MELAS, est la plus fréquente. Les différents impacts moléculaires des mutations sur la vie de l'ARNt^{Leu(UUR)}, rappelés dans l'article de revue, montrent que de la transcription à l'aminocyclation de l'ARNt, chaque étape a été trouvée affectée par une ou plusieurs mutations *in vivo*. En effet, la transcription est affectée par les mutations A3243G et A3302G. La maturation des transcrits, réaction catalysée par la RNase P, est inhibée par la présence des mutations A3243G, C3256T, A3260T, et T3271C. La mutation A3243G réduit de 50 % la méthylation du nucléotide G10 et abolit complètement la modification en U34. Cette dernière modification est également affectée par la mutation T3271C. La formation d'un duplexe d'ARNt a été mise en évidence en présence de la mutation A3243G. Les mutations A3243G et A3271C affectent la stabilité des ARNt, et la mutation A3243G altère l'aminocyclation *in vivo*. Cependant, ces études sont limitées par rapport au nombre de mutations répertoriées dans l'ARNt^{Leu(UUR)} et les résultats obtenus par des approches *in vivo* ne vont pas toujours vers une conclusion identique (Jacobs & Holt, 2000). Les difficultés d'études de l'ensemble des mutations proviennent du fait que l'étude *in vivo* est fastidieuse. En effet, elle nécessite de disposer soit de biopsies humaines en quantité suffisante, soit de disposer de couples de cellules cybrides (cellules comportant 100 % d'ADN mt sains ou 100 % d'ADN mt muté). Cependant, un couple de cellules cybrides ne permet d'étudier qu'une seule mutation et les résultats de l'étude peuvent être différents en fonction de l'origine du noyau de la cellule (ostéosarcome, HeLa) (Jacobs & Holt, 2000). De par ces difficultés, la mise au point d'un système d'aminocyclation *in vitro* permettant de comparer de manière systématique les effets des différentes mutations sur la fonction majeure des ARNt, semblait primordial.

V. Objectifs et contribution de la thèse

L'objectif principal de ma thèse a été de contribuer à la compréhension des effets moléculaires induits par des mutations pathologiques présentes dans les gènes d'ARNt mt humains. Dans ce but, deux grands axes de recherche ont été poursuivis. Le premier a consisté à étudier l'impact de nombreuses mutations dans les événements fondamentaux de la traduction mitochondriale et le second à rechercher des impacts de mutations à longues distances, hors de la synthèse protéique mitochondriale. La première approche, très ciblée, m'a amenée à étudier la réaction d'aminoacylation de l'ARNt^{Leu(UUR)} mt *in vitro*. Parmi les 21 mutations répertoriées dans l'ARNt^{Leu(UUR)} qui sont liées aux maladies mitochondriales, seule la mutation A3243G (A14G) avait été étudiée en aminoacylation au début de nos travaux. Au cours de ma thèse, j'ai adapté les tests d'aminoacylation *in vitro*, utilisés couramment au laboratoire, au système leucine mitochondrial, afin d'étudier l'impact potentiel de plusieurs mutations supplémentaires. Ceci m'a permis de mesurer et comparer les constantes cinétiques correspondant aux ARNt mutés et ainsi, de déterminer l'influence de ces mutations sur l'efficacité de la réaction de leucylation. Cette approche a impliqué non seulement une étude fonctionnelle, mais également une étude structurale approfondie. J'ai ainsi déterminé le repliement en solution du transcrite de l'ARNt^{Leu(UUR)}, étudié sa stabilisation et mis en évidence les régions de la molécule en contact avec la LeuRS.

Une deuxième approche plus globale a consisté à mettre en évidence la ou les conséquence(s) indirecte(s) que ces mutations, présentes dans les ARNt mt humains, pouvaient avoir sur l'ensemble du métabolisme mitochondrial. En effet, il a été montré que certaines mutations dans les ARNt mt n'influencent pas forcément la synthèse protéique mitochondriale et pouvaient entraîner une diminution du potentiel de membrane (Antonicka et coll., 1999), une augmentation de l'apoptose (Zhang et coll., 1998), ou encore une acidification du cytoplasme. En particulier, étant donné le grand nombre d'échanges existant entre le compartiment mitochondrial et le reste de la cellule, nous avons décidé d'étudier l'influence des ARNt mt mutés sur la composition totale en protéines des mitochondries (l'ensemble des protéines importées et d'origine mitochondriale) afin de rechercher et de définir les protéines mitochondriales éventuellement dérégulées par la présence de la mutation. Dans ce but, j'ai participé à l'introduction d'une nouvelle technique au laboratoire, la protéomique comparative. Cette technique permet de comparer directement les compositions en protéines de mitochondries sauvages et mutées (dans leurs gènes d'ARNt) et a été appliquée aux deux mutations les plus répandues chez les malades : la mutation A3243G

présente dans l'ARNt^{Leu(UUR)} qui est corrélée au syndrome MELAS et la mutation A8344G présente dans l'ARNt^{Lys} qui est corrélée au syndrome MERRF. Cette approche prend en considération l'existence d'une relation complexe entre le génotype des pathologies mitochondriales et leur phénotype, et suggère l'intervention de nombreux facteurs (à découvrir) impliqués dans l'expression de la maladie. Certains de ces facteurs pourraient être communs à plusieurs pathologies et seraient des cibles idéales pour développer une thérapie globale.

Matériel et Méthodes

I. Matériel et techniques générales

A. Produits

[γ ³² P]-ATP / [α ³² P]-ATP	Amersham Pharmacia
Acide phosphorique	Fluka
Acrylamide 40 %	Bio-Rad
AESBF	Interchim
Ampicilline	Carl Roth
Bleu de Coomassie G250	Sigma-Aldrich
Bleu de Coomassie R250	Carl Roth
Bleu de trypan	GIBCO
Bromodeoxyuridine	Sigma-Aldrich
Carbonate de potassium	Sigma-Aldrich
CHAPS	Sigma-Aldrich
Chloramphénicol	Amersham Pharmacia
Digitonine	Sigma-Aldrich
DMEM	Sigma-Aldrich
EDTA	Boehringer Mannheim
Formaldéhyde	Sigma-Aldrich
Glycine	Sigma-Aldrich
Iodoacétamide	Bio-Rad
IPTG	Euromedex
Kanamycine	Sigma-Aldrich
Leucine	Merck
[³ H]-leucine	Amersham Pharmacia
Metrizamide	Sigma-Aldrich
Nitrate d'argent	Sigma-Aldrich
Nystatine	Sigma-Aldrich
Pipérazine DiAcrylamide (PDA)	Bio-Rad
Pénicilline	GIBCO
Percoll	Sigma-Aldrich
Rotiphorèse Gel (acrylamide and N,N'-méthylène-bis-acrylamide)	Carl Roth, GmbH
Sérum de veau fœtal et nouveau-né	Sigma-Aldrich
Streptomycine	GIBCO
Taurine	Sigma-Aldrich
Thiosulfate de sodium	Sigma-Aldrich
Thiourée	Sigma-Aldrich
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich
Trypsine-EDTA	GIBCO

B. Enzymes

BamH I	New England Biolabs
BstN I	New England Biolabs
Phosphatase intestinale de veau (CIP)	Boehringer Mannheim
Hind III	New England Biolabs
Nucléase S1	Amersham Pharmacia
Phosphatase alcaline bactérienne (BAP)	Amersham Pharmacia
Phosphodiesterase de <i>Crotalus durissus</i>	USB

Ribonucléase T1	IRL
Ribonucléase T2	Invitrogen
Ribonucléase V1	Amersham Pharmacia
T4 ADN ligase	Boehringer-Mannheim
T4 polynucléotide kinase	Ozyme
T7 ADN polymérase	Amersham Pharmacia

C. Souches cellulaires et plasmides

1. Souches cellulaires

a. Souche TG1

Amersham Pharmacia

Cette souche exprime le répresseur lacI^q et est utilisée pour l'expression de gènes, sous le contrôle du promoteur lactose, après induction à l'IPTG. Elle est déficiente en enzymes de modification ou de restriction de l'ADN, et permet ainsi l'amplification d'ADN transformés. Cette souche peut également être utilisée pour la détection de plasmides recombinants exprimant la β -galactosidase.

b. Souche BL21(DE3)pLysS

Stratagene

Cette souche est utilisée pour la surproduction de protéines et d'acides nucléiques (Studier & Moffatt, 1986). Son génome a intégré le gène codant l'ARN polymérase du phage T7 dont la transcription est sous le contrôle du promoteur lacUV-5 . La synthèse de la T7 ARN polymérase est réprimée par le répresseur lacI^q et est induite par l'IPTG. De plus, cette souche est transformée par un plasmide qui code pour le lysozyme du phage T7 et qui lui confère une résistance au chloramphénicol (Cam^R), permettant la sélection de ce plasmide. Le lysozyme inhibe, en s'y liant spécifiquement, l'ARN polymérase du phage T7 présente au taux non-induit et empêche l'expression de tout gène inséré dans le vecteur d'expression transformant la souche.

c. Souche BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

Stratagene

Cette souche est utilisée pour la surproduction de protéines hétérologues qui contiennent dans leurs gènes de nombreux codons dont la fréquence d'utilisation est rare chez *E. coli*. Cette souche (dérivée de la souche BL21(DE3)pLysS) contient un plasmide portant des copies supplémentaires des gènes des ARNt Arg, Ile et Leu qui reconnaissent respectivement les codons arginine AGA et AGG, isoleucine AUA et leucine CUA, et une résistance à la tétracycline (Tet^R) permettant la sélection de ce plasmide. Elle contient également le plasmide

qui code pour le lysozyme du phage T7 et qui lui confère une résistance au chloramphénicol (Cam^R).

d. Cellules cybrides H94I et H43B

A. Chomyn & G. Attardi, Pasadena, Etats-Unis

Ces cellules ont été créées par la fusion de cellules humaines immortalisées déplétées de leurs mitochondries et de myoblastes dépourvus de noyau (King & Attardi, 1989) (Fig. 15). Cela permet la construction de cellules avec le même génome nucléaire, mais avec des génomes mitochondriaux différents. La lignée cellulaire H94I possède le gène sain de l'ARNt^{Leu(UUR)} à l'état homoplasmique et la lignée cellulaire H43B possède la mutation A->G à la position 3243 dans le gène mitochondrial de l'ARNt^{Leu(UUR)} à l'état homoplasmique. Ces deux lignées possèdent le même génome nucléaire.

2. Plasmides

a. pTFMA

Ce plasmide est un dérivé du vecteur pUC118 (Yanisch-Perron et coll., 1985). Il s'agit d'une construction hybride entre un vecteur à copie multiple de type pUC 18 et celui du bactériophage M13. Le vecteur possède le gène codant pour la β -lactamase qui confère à la souche hôte la résistance à l'ampicilline, ainsi qu'une cassette de clonage. Dans le cas du vecteur pTFMA, le gène synthétique de l'ARNt^{Asp} de levure a été inséré entre les sites de restriction Hind III/BamH I. Ce vecteur possède également la région intergénique (f1) du phage M13. Ainsi, en infectant les cellules contenant ce plasmide par un phage "helper filamenteux", on pourra obtenir la synthèse et l'encapsidation d'une copie monobrin de l'ADN phagique.

b. pET-21c Δ 21-LeuRS

Martinis, Houston, Etat-Unis

Le gène de la LeuRS mt humaine délétée des 21 premiers acides aminés, a été inséré en phase dans une cassette de clonage en aval du promoteur T7 de la T7 ARN polymérase et en amont d'une séquence codant pour un marqueur histidine (en C-terminal) qui permettra sa rétention sur une colonne Ni-NTA. Le vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R).

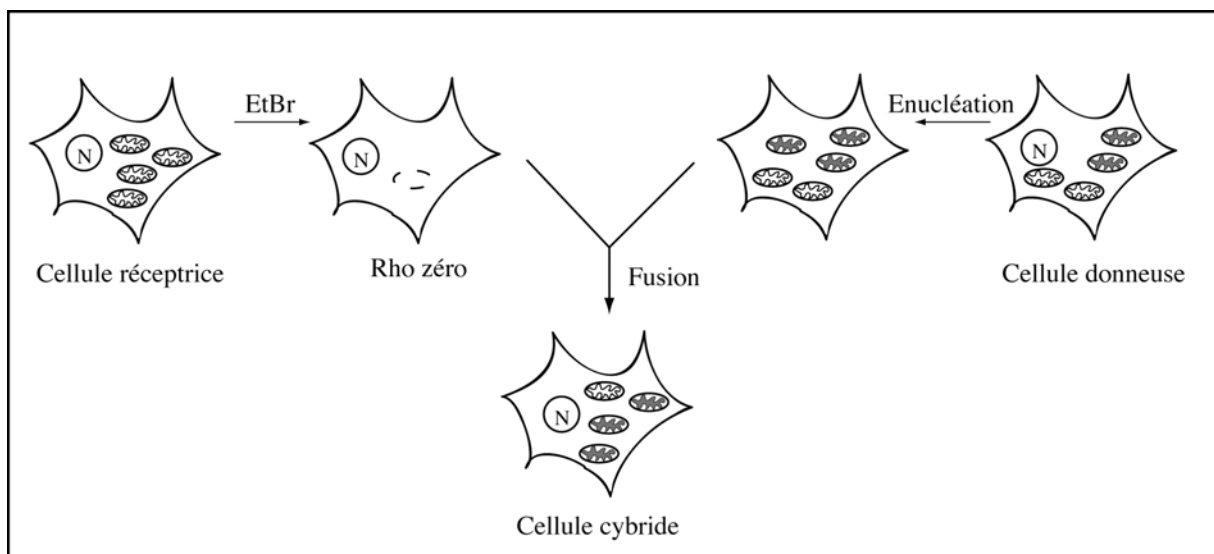


Figure 15. Principe général de la création d'une ligné cellulaire cybride. Les cellules réceptrices, généralement une ligné cellulaire transformée, sont déplétées de l'ADN mt par exposition au bromure d'éthidium (EtBr). Les cellules qui en résultent sont appelées Rho zéro. Les cellules donneuses sont en général des fibroblastes ou des myoblastes de patients, qui portent une mutation pathogénique dans certaines copies de l'ADN mt (mitochondries noires dans le schéma). Ces cellules sont énucléées par la cytochalasine B pour garder le cytoplasme. Les cellules rho zéro sont fusionnées avec ce cytoplasme. Les cellules qui en résultent possèdent la mutation pathogénique d'intérêt dans l'ADN mt à un taux plus ou moins élevé et permettent ainsi l'étude des différentes mutations avec un génome nucléaire identique.

c. pET-24d Δ 39-LeuRS

H. Park & M. King, Philadelphie, Etat-Unis

Le gène de la LeuRS mt humaine délétée des 39 premiers acides aminés, a été inséré en phase dans une cassette de clonage en aval du promoteur T7 de la T7 ARN polymérase et en amont d'une séquence codant pour un marqueur histidine. Le vecteur possède un gène de résistance à la kanamycine (Kan^R).

D. Techniques générales**1. Manipulation des acides nucléiques****a. Détermination de la concentration d'une solution d'acides nucléiques**

Les acides nucléiques absorbent la lumière ultraviolette et présentent un pic d'absorption à 260 nm. La concentration d'une solution d'ADN est estimée par la relation : concentration (mg/ml) = 0,05 x DO₂₆₀, tandis que la concentration en ARN est estimée par la relation : concentration (mg/ml) = 0,04 x DO₂₆₀. Sur un spectre d'absorption réalisé entre 220 et 320 nm, une solution pure d'acide nucléique présente un maximum d'absorption à 256-260 nm et un rapport A₂₆₀/A₂₈₀ compris entre 1,8 et 2. Une solution contaminée par des protéines présentera un pic d'absorption à 280 nm.

b. Extraction phénolique

L'échantillon à traiter est additionné d'un volume de phénol saturé en TE (10 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 7,5-8), agité vigoureusement pendant 2 min, puis centrifugé 5 min à 8 000 g. La phase aqueuse supérieure est soigneusement prélevée, en évitant d'entraîner les protéines dénaturées se trouvant à l'interphase. Les traces de phénol sont éliminées en ajoutant 1 volume d'éther à la phase aqueuse, l'ensemble est mélangé vigoureusement, puis centrifugé rapidement, la phase étherée est éliminée. Cette procédure est répétée deux fois. Après évaporation des traces d'éther à l'air, les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont généralement précipités.

c. Précipitation des acides nucléiques (ADN/ARN)

La solution d'ADN ou d'ARN à précipiter est additionnée de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH \approx 5,5-6,0) puis de 3 volumes d'éthanol à 4°C et placée à -20°C pendant au moins 1 h. Après centrifugation à 11 000 g et à 4°C pendant 30 min, le culot est lavé

délicatement avec de l'éthanol 70 %. Après une seconde centrifugation dans les mêmes conditions, le surnageant est éliminé et le culot est séché sous vide.

Une méthode particulière pour précipiter les petits fragments, ou les petites quantités d'ARN, utilise un mélange de perchlorate de lithium à 2 % dans l'acétone (p/v) (Vlassov et coll., 1995). La précipitation se fait par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, 10 volumes du mélange LiClO₄/acétone à 4°C, et centrifugation immédiate à 11 000 g pendant 30 min à 4°C suivi par un lavage du culot à l'éthanol 70 %.

Les entraîneurs utilisés pour précipiter les faibles quantités d'ARNt dépendent de l'utilisation qui sera faite de l'ARN. Il s'agit habituellement d'autres acides nucléiques (poly-U, poly-A, GMP, ARNt total de levure ou d'*E. coli*) mais on peut aussi utiliser le glycogène. Généralement 5-10 µg d'acides nucléiques entraîneurs ou 10-20 µg de glycogène contribuent à précipiter de faibles quantités d'ARN présents dans un volume (tampon/éthanol) de 1,5 ml.

d. Electrophorèse sur gel d'agarose

Un gel d'agarose 1 % est préparé en dissolvant à chaud 1 g d'agarose standard dans 100 ml de TBE 1x (0,1 M Tris-base, 0,1 M acide borique, 2 mM EDTA, pH 8,3). Les échantillons sont déposés sur le gel, après addition d'un volume de solution de dépôt (30 % glycérol, 0,25 % (p/v) xylène cyanol et bleu de bromophénol) à un volume de solution d'ADN. La migration s'effectue à 110 V dans une solution de TBE 1x. Les acides nucléiques sont visualisés sous UV après un bain dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml, TBE 1x.

e. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une méthode largement utilisée pour la purification et l'analyse d'ADN et d'ARN. Le gel de polyacrylamide est un copolymère constitué d'acrylamide et de N-N'-méthylène bis-acrylamide dont le rapport est de 19/1 respectivement. Le gel dénaturant est constitué d'acrylamide/bis-acrylamide de 6 à 22 %, et de TBE 1x. Dans le cas des gels dénaturants, de l'urée est ajoutée à une concentration de 8 M. La polymérisation du gel est déclenchée par l'ajout de 1 % (v/v) de solution de peroxydisulfate d'ammonium à 5 % et de 0,1 % (v/v) de TEMED. L'épaisseur du gel varie de 0,4 mm pour les gels analytiques ou de séquençages à 3 mm pour les gels "préparatifs" (pour la purification de grandes quantités d'ARN). Avant dépôt, les échantillons sont additionnés d'un volume d'une solution de dépôt (50 % (p/v) saccharose, 7 M urée, 10 mM EDTA, 0,05 % (p/v) xylène cyanol et bleu de bromophénol). L'électrophorèse est réalisée dans le tampon TBE 1x. La

migration des échantillons s'effectue sur mini-gel (0,04x8,5x10,5 cm) à 150 V, sur gel de séquence ou gel de purification (0,04x30x40 cm) à 1 800 V et 55 mA, et sur gels préparatifs (0,3x30x40) à 650 V et 55 mA. La durée de migration varie en fonction de l'ADN ou de l'ARN.

f. Elution des ARN à partir de gels de polyacrylamide

Après migration sur gel de polyacrylamide, les transcrits sont visualisés aux UV sur un écran de fluorographie. Les transcrits marqués radioactivement sont visualisés par application d'un film autoradiographique. La bande de gel contenant la molécule de taille correcte est découpée et les ARN sont extraits soit de manière passive, soit par électroélution.

Elution passive. Le fragment de gel dans lequel se trouve l'ARN est incubé dans 300 µl d'un tampon d'élution (0,5 M acétate d'ammonium, 10 mM acétate de magnésium, 0,1 mM Na₂EDTA et 0,1 % SDS). Sa forte salinité, la présence de SDS et son pH de 6,7 assurent une bonne protection des ARN, en particulier contre la dégradation par les nucléases.

Electroélution. Cette méthode est utilisée lorsque la bande de gel contenant l'ARN est épaisse, comme c'est le cas pour les gels "préparatifs". Les bandes sont placées dans un appareil à électroélution "Biotrap" (Schleicher & Schuell) muni de membranes semi-perméables. Sous l'influence du courant électrique les ARN sortent du gel et sont concentrés dans la chambre anodique, où ils sont récupérés après une heure de migration à 150 V. Cette procédure est renouvelée deux fois. L'opération se réalise à 4°C avec pour tampon d'élution du TBE 1x stérile comme tampon d'élution. Les échantillons sont ensuite précipités pour être concentrés.

2. Manipulation des protéines

a. Détermination de la concentration d'une solution protéique

Les protéines peuvent être quantifiées par dosage colorimétrique selon la méthode de Bradford (réactif Bio-Rad) en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme protéine étalon. La concentration en protéines pure est calculée en fonction du coefficient d'extinction molaire de celle-ci, selon la relation de Beer-Lambert : $c \text{ (mg/ml)} = DO_{280} \times E^{-1} \times l^{-1}$, où E est le coefficient d'extinction molaire ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) et l la distance optique (1 cm). Le coefficient d'extinction molaire de la LeuRS mt humaine délétée des 39 premiers acides aminés est de $178930 M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

b. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS/PAGE)

Cette technique permet d'évaluer la pureté et le poids moléculaire apparent des protéines en solution. Le gel de polyacrylamide est constitué (i) d'un gel de concentration à faible maillage qui permet la concentration des protéines de l'échantillon et (ii) d'un gel de résolution qui permet ensuite la séparation des protéines les unes des autres en fonction de leur poids moléculaire apparent. Les deux parties du gel sont constituées d'acrylamide et de N-N'-méthylène bis-acrylamide dont le rapport est de 37,5/1 respectivement. Le gel de concentration est constitué de 5 % d'acrylamide/bis-acrylamide, 0,1 % de SDS et de 125 mM de tampon Tris-HCl pH 6,8. Le gel de résolution est constitué de 6 à 15 % d'acrylamide/bis-acrylamide, 0,1 % de SDS et de 375 mM de tampon Tris-HCl pH 8,8. La migration des protéines s'effectue dans un tampon formé de 25 mM de Tris-base, 140 mM de Glycine et 0,1 % SDS. Avant dépôt sur le gel, les échantillons sont additionnés d'un volume de solution de dépôt (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM DTE, 2 % SDS, 0,1 % bleu de bromophénol, 20 % glycérol) et chauffés 5 min à 100°C. Le voltage appliqué pour la migration est d'abord de 80 V pendant 30 min puis de 150 V. Les protéines sont visualisées par coloration pendant 2 h au bleu de Coomassie (0,25 % (p/v) bleu de Coomassie R250, 30 % méthanol, 10 % acide acétique), puis décoloration jusqu'à visualisation des bandes par une solution contenant 30 % méthanol, 10 % acide acétique.

c. Séquençage de la partie N-terminale d'une protéine

Cette technique permet d'assigner une protéine et/ou de vérifier son intégrité. Après avoir fait migrer une partie aliquote de la protéine sur gel SDS/PAGE 10 %, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur deux membranes "problott" (Perkin Elmer) dans un tampon (0,01 M d'acide 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonique, 10 % méthanol) grâce à un appareil de transfert Transblott SD. Le transfert a lieu pendant 2 h 30 à 10 V et sous 3 mA par cm² de gel. Les protéines sont ensuite colorées par une solution au bleu de Coomassie 0,1 %, acide acétique 1 %, méthanol 40 %. Les bandes correspondant aux protéines à tester sont découpées, décolorées dans une solution de méthanol 50 % et le contenu en protéines est séquencé dans un séquenceur de peptides Applied Biosystem 470A par la technique d'Edmann. Le séquençage est réalisé au sein de l'UPR par J. Reinbolt et C. Lichté.

d. Western-blot

Cette technique permet de mettre en évidence une protéine à l'aide d'un anticorps spécifique. Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE 10 %, puis transférées sur une membrane Immobilon P (Millipore) par transfert semi-sec 1h à 10 V dans le tampon de

transfert (50 mM Tris-base, 40 mM Glycine, 0,004 % SDS, 20 % méthanol) grâce à un appareil de transfert Transblott SD. Après saturation de la membrane pendant 1h avec 3 % BSA diluée dans du TBS-Tween (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20), l'anticorps primaire, spécifique de la protéine d'intérêt, dilué dans le même tampon, est appliqué pendant au moins 2h, puis l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase, également dilué dans le TBS-Tween, est appliqué pendant 1h. La réaction est révélée par la méthode ECL (Amersham Biosciences). Après exposition, les estimations quantitatives des différents échantillons sont réalisées avec le logiciel Quantity One (Bio-Rad).

II. Préparation de matériel biologique spécifique

A. Mitochondries

L'obtention de mitochondries humaines nécessite une culture intensive de cellules.

1. Cellules cybrides

Culture et suivi des cultures. La culture des cellules cybrides se fait par adhérence dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre dans le milieu "Dulbecco's modified eagle's medium" (DMEM) à 4,5 g/l de glucose et 110 mg/l de pyruvate de sodium, supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal, 100 000 u/l de pénicilline, 0,1 g/l de streptomycine, 0,1 g/l de kanamycine, ainsi que 0,1g/l de bromodéoxyuridine. Trois à 6. 10⁵ cellules sontensemencées dans 10 ml de milieu et mises en culture à 37°C sous 5 % CO₂. Le milieu est changé tous les 2 jours jusqu'à une densité de ~ 6. 10⁶ cellules/ml. Le surnageant est alors aspiré et les cellules adhérentes aux parois sont lavées avec 10 ml de tampon TD (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄) à 37°C, puis récoltées avec 2-3 ml de tampon TD-T (TD, 1 mM EDTA, 0,5 g/l trypsine, 10 000 u/l pénicilline, 20 mg/l streptomycine, 0,003 % rouge de phénol) à 37°C. Après centrifugation à 250 g pendant 3 min, le culot est resuspendu dans 5-6 ml de milieu pour un comptage à l'aide d'une cellule de Neubauer. Les cellules sont ensuite diluées dans du milieu pour obtenir à nouveau une concentration de 3 à 6. 10⁵ cellules par boîte de Pétri.

Récoltes des cellules. Les cellules sont lavées et récoltées de la même façon mais les cellules récoltées au fur et à mesure sont conservées dans 10 % de sérum de veau nouveau-né (v/v final) dans la glace. A la fin de la récolte, les cellules sont centrifugées à 100 g puis conservées à -80°C.

2. Purification de mitochondries

L'ensemble des étapes suivantes doit être effectué dans la glace ou à 4°C.

a. Extraction des mitochondries

Les cellules cybrides (10⁷-10⁸) récoltées à partir des boîtes de Pétri sont centrifugées pendant 15 min à 300 g. Le culot est d'abord lavé dans 50 ml de tampon "Mito" (5 mM HEPES, 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM EDTA), et centrifugé pendant 3 min à 450 g. Les cellules sont ensuite resuspendues à raison de 4 ml de tampon "Mito" par g de

cellules, auxquels sont ajoutés 4 μ l de digitonine (10 % (p/v) dans du DMSO) par g de cellules. L'ensemble est incubé 1 min dans la glace et la perméabilité des cellules est vérifiée grâce au bleu de trypan au microscope entre lame et lamelle. La concentration en digitonine est augmentée par fraction de 2 μ l/g de cellules jusqu'à obtenir environ 90 % de cellules perméables. Le volume final est alors ajusté à 10 ml avec le tampon "Mito", puis les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 3 000 g. Le culot est repris dans 5 ml de tampon "Mito" et transféré dans un Potter-Elvehjem. Après 10-15 coups de Potter, l'efficacité de broyage est vérifiée au microscope optique entre lame et lamelle : il doit y avoir environ 80 % de cellules broyées.

b. Enrichissement par centrifugations différentielles

Le broyat est additionné de 5 ml de tampon "Mito", puis centrifugé pendant 5 min à 625 g. Le surnageant, contenant les mitochondries, est récupéré et la centrifugation à basse vitesse est renouvelée jusqu'à disparition du culot. Le surnageant est alors centrifugé à haute vitesse (10 000 g) pendant 20 min, le culot est d'abord rincé, puis remis en suspension dans 25 ml de ce même tampon jusqu'à que la suspension devienne homogène. Après centrifugation à haute vitesse pendant 20 min, le culot formé de mitochondries "purifiées" est repris dans 100 μ l de tampon "Mito" par g de cellules de départ et conservé à -80°C . Les mitochondries sont quantifiées par dosage des protéines selon la méthode de Bradford. La concentration en protéines est alors de 10 à 15 g/l.

c. Purification par gradient de metrizamide

Une étape supplémentaire de purification des mitochondries sur gradient de metrizamide peut être appliquée (Scheffler et coll., 2001). Une suspension de mitochondries obtenues par centrifugations différentielles (1 g de mitochondries) est centrifugée à 10 000 g pendant 15 min, le culot est repris dans 2,5 ml de tampon (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,25 M sucrose, 0,5 mM EDTA). Les mitochondries sont alors déposées à la surface d'un gradient de metrizamide préparé extemporanément. Il est formé de bas en haut de 2 ml de metrizamide 35 %, 2 ml de metrizamide à 17 %, 5 ml de percoll à 6 % dans des tubes Ultra-Clear (14 x 89 mm, Beckman). Le gradient est centrifugé à 55 000 g pendant 40 min à 4°C . Les mitochondries, localisées entre les phases de 17 % et 35 %, sont collectées et centrifugées 15 min à 9000 g et reprises dans 100 μ l de sucrose 0,25 M. Le rendement de cette étape est très faible. Un gramme de mitochondries "purifiées" permet d'obtenir environ 250 μ g de mitochondries "ultra pures".

B. ARNt natif : purification par oligonucléotide antisens

Cette technique, utilisée pour l'obtention d'ARNt^{Leu(UUR)} natif humain, nécessite une quantité importante de cellules. Elle permet d'extraire spécifiquement une espèce d'ARNt de séquence connue d'un mélange complexe, tel qu'un mélange d'ARN total. La méthode est basée sur l'affinité d'un ARN donné pour un oligonucléotide antisens complémentaire immobilisé sur des billes d'agarose. Appliquée dans un premier temps à des ARNt cytosoliques (par exemple Tsurui et coll., 1991), cette technique a été adaptée aux ARNt mitochondriaux (Mörl et coll., 1994). L'oligonucléotide antisens est complémentaire aux 30 nucléotides en 3' de l'ARNt cible (sauf le CCA terminal). Il est biotinylé à une extrémité et immobilisé sur une matrice d'agarose (billes) substituée en streptavidine. L'ARNt est récupéré en dénaturant le duplex ARNt-ADN antisens par la chaleur.

1. Cellule HeLa

Une culture de 12×10^8 (60 10^8 cellules) de cellules HeLa, en phase exponentielle de croissance a été achetée au service de culture de l'IGBMC (Ilkirch). Les cellules sont prêtes à l'emploi (elles sont fournies lavées et culottées).

2. Préparation d'ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits par addition de 1 ml de "TRI REAGENT" (Sigma) à 500 mg de cellules. Le "TRI REAGENT" est constitué de chlorure de guanidium, de phénol et de chloroforme et il permet la séparation simultanée de l'ADN, l'ARN et des protéines contenus dans un échantillon. Après agitation vigoureuse, le mélange est incubé 5 min, puis additionné de 200 μ l de chloroforme et à nouveau bien agité. La solution est laissée 10 min à température ambiante, puis centrifugée pendant 15 min à 9 000 g. La phase aqueuse contenant les ARN est prélevée, et ces derniers sont précipités à l'isopropanol. Les ARN sont repris dans 1 ml d'eau par chauffage pendant 10 min à 65°C, puis additionnés de 0,2 volume de NaCl 5 M pendant 1 à 2 h dans la glace. La solution est alors centrifugée pendant 20 min à 1300 g. Le culot contient les ARN de haut poids moléculaire et le surnageant contient les petits ARN dont les ARNt. Le surnageant est précipité avec 2,5 volumes d'éthanol puis centrifugé 40 min à 9000 g.

3. Immobilisation de l'oligonucléotide antisens sur des billes d'agarose

Les billes d'agarose ont un diamètre de 0,1 μm ou de 0,22 μm et sont couplées à la streptavidine (GIBCO). Elles (200 μl) sont placées dans un tube Ultra-free (Millipore), centrifugées brièvement, puis lavées deux fois avec 300 μl de Tris-HCl 10 mM pH 7,3. Les billes sont reprises dans 300 μl de Tris-HCl, et 4 nmoles d'oligonucléotides biotinylés sont ajoutées. Le mélange est incubé sur une table roulante pendant 60 min à température ambiante. Après centrifugation, la DO du surnageant doit être inférieure à 0,03. Les billes sont lavées deux fois comme décrit précédemment et transférées dans un microtube.

4. Purification d'un ARNt spécifique

Les ARN totaux précipités sont repris dans 300 μl de tampon SSC 6x (SSC 1x : 150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium, pH 7,0), et ajoutés aux billes. Dans le cas de la purification de l'ARNt^{Leu(UUR)} mt humain, l'ensemble est chauffé à 75°C pendant 5 min puis l'hybridation s'effectue pendant 60 min à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est éliminé, les billes sont lavées 3 à 4 fois jusqu'à obtention d'une DO de 0,02 et replacées dans un tube Ultra-free. Elles sont alors additionnées de 300 μl de SSC 0,1X préchauffé à 70°C, chauffées pendant 5 min à 70°C, puis centrifugées. L'éluat contenant l'ARNt est récupéré. Cette étape de déshybridation est répétée deux fois et l'ensemble des éluats est collecté. Les ARNt sont ensuite précipités.

C. ARNt synthétique : préparation par transcription *in vitro*

1. Principe

Les gènes synthétiques des ARNt ont été clonés en adaptant la méthode du "transzyme" (Fechter et coll., 1998). Cette méthode est basée sur le clonage et la transcription d'un gène artificiel constitué par la séquence d'un ARN autocatalytique, un ribozyme en tête de marteau, en aval de la séquence promotrice optimale de la T7 ARN polymérase et en amont de la séquence de l'ARNt. Un site de restriction *Bst*NI placé à la fin du gène permettra d'obtenir des transcrits avec une extrémité 3' -CCA_{OH}. Les molécules primaires d'ARN correspondant à ce gène sont appelées transzyme (trans- pour ARN de transfert, -zyme pour ribozyme). Une séquence courte du ribozyme (7 nucléotides dans le cas de l'ARNt^{Leu(UUR)}) complémentaire à l'extrémité 5' de l'ARNt est suffisante pour permettre le repliement correct de celui-ci. La coupure autocatalytique de la molécule a lieu avant le nucléotide en position +1 de l'ARNt, permettant ainsi la libération d'un ARNt de séquence attendue, mais ne

possédant pas le phosphate 5'-terminal des ARNt classiques. Cependant, l'absence de phosphate ne modifie pas en général les capacités d'aminoacylation des ARNt préparés par cette technique (Fechter et coll., 1998).

2. Construction et clonage de gènes synthétiques d'ARNt

Le clonage des ARNt est réalisé à partir d'une série de 7 oligonucléotides complémentaires, chevauchants d'environ 40 nucléotides chacun.

Phosphorylation des oligonucléotides. Cette réaction se fait à 37°C pendant 15 min dans 50 µl de milieu réactionnel contenant 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTE, 1 mM ATP, 400 pmoles d'oligonucléotide et 10 U de T4 polynucléotide kinase. L'enzyme est ensuite inactivée par incubation à 65°C pendant 10 min.

Hybridation des oligonucléotides. Pour chaque construction, la série des 7 oligonucléotides complémentaires est mélangée et chauffée à 80°C pendant 10 min, puis refroidie lentement (3-4 h). La réaction s'effectue dans 60 µl de tampon contenant 16 pmoles de chaque oligonucléotide phosphorylé, 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 50 µg/ml BSA.

Préparation du vecteur. La linéarisation du vecteur pTFMA par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III est réalisée à 37°C pendant 2h dans un milieu de 100 µl contenant 50 µg de vecteur, 50 U de chacune des enzymes, 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Le vecteur est purifié par extraction phénolique puis précipitation éthanolique. La déphosphorylation du vecteur linéarisé est effectuée dans un volume de 50 µl en présence de 2 U de phosphatase alcaline bovine, 5 µl de "tampon phosphatase alcaline" à 60°C pendant 30 min.

Ligation des oligonucléotides au vecteur. La ligation s'effectue à 20°C pendant 10 min aux ultrasons dans le milieu réactionnel de 18,5 µl contenant 0,1 µg de plasmide linéarisé, 2,5 mM ATP, 2,6 pmoles d'oligonucléotides hybridés et 5 U de T4 ADN ligase.

Préparation de bactéries compétentes. Une pastille d'*E. coli* souche TG1 est incubée sous agitation dans 3 ml de milieu LB stérile (10 g tryptone, 5 g extrait de levure, 10 g NaCl pour 1 l) à 37°C pendant la nuit. Ces bactéries sont alors inoculées dans 300 ml de LB et placées à 37°C sous agitation. Les cellules sont récoltées en pleine phase exponentielle de croissance ($A_{700nm}=0,6$). Après centrifugation pendant 15 min à 2600 g, le culot est repris dans 30 ml de CaCl₂ 50 mM et laissé pendant 1h dans la glace. Après une centrifugation de 15 min à 2600 g, les bactéries rendues compétentes sont reprises dans 2 ml de CaCl₂ 50 mM,

1 ml de glycérol 50 % et conservées à -80°C .

Transformation des bactéries compétentes. La transformation s'effectue par incubation dans la glace de 300 μl de bactéries compétentes en présence de 15 μl du milieu de ligation pendant 45 min. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique de 2 min à 42°C , et laissées 5 min dans la glace. Le mélange est étalé sur boîte de Pétri contenant du milieu LB gélosé (1,5 g de bactoagar pour 100 ml de LB) en présence d'ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

3. Séquençage

Minipréparation d'ADN double brin. Les colonies sont prélevées et mises en culture dans 5 ml de milieu LB/Amp à 37°C pendant 15 h. L'ADN plasmidique est ensuite purifié grâce au kit "QIAwell 8 plus" (Qiagen), puis dénaturé en présence de NaOH 0,2 M pendant 10 min à 20°C . L'ADN est alors précipité à l'éthanol.

Séquençage. Le séquençage se fait selon la méthode des didésoxyribonucléotides (Sanger et coll., 1977) avec l'amorce universelle du phage M13. La technique repose sur hybridation de l'amorce au vecteur, son élongation en présence d'un désoxyribonucléotide radioactif ($[\alpha\text{-}^{35}\text{S}] \text{dATP}$) par la T7 ADN polymérase puis l'arrêt statistique de la synthèse par 4 milieux de terminaison contenant chacun un didésoxyribonucléotide différent. Une partie aliquote de chaque mélange est déposée sur PAGE 8 %/urée 8M. Après migration, le gel est séché et soumis à une autoradiographie. La lecture de la séquence permet de définir les clones positifs.

4. Amplification de l'ADN plasmidique

Les plasmides contenant les séquences à transcrire sont amplifiés par culture de la souche bactérienne correspondante, dans 100 ml de 2YT/Amp. La purification de l'ADN plasmidique est réalisée à l'aide du "plasmid MAXI kit" (Genomed). L'ADN bicaténaire est alors quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm.

5. Transcription *in vitro*

Le plasmide est linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction *Bst*NI. Un milieu réactionnel de 250 μl contenant 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 25 μg de BSA, 100 μg d'ADN plasmidique, 60 U de *Bst*NI, est incubé 2h à 60°C . La réaction est arrêtée par extraction phénolique et l'ADN digéré est précipité à l'éthanol. La

linéarisation est vérifiée sur un gel d'agarose analytique 1 %. Les conditions de transcription doivent être optimisées en fonction de la séquence à transcrire. Dans le cas de l'ARNt^{Leu(UUR)} mt humain, les conditions optimales sont les suivantes: 40 mM Tris-HCl pH 8,1, 30 mM MgCl₂, 5 mM DTE, 0,01 % triton X100, 1 mM spermidine, 50 µg ADN linéarisé et 10 µl T7 ARN polymérase dans un milieu réactionnel de 500 µl. La transcription est effectuée à 37°C pendant 3 h et la réaction est arrêtée par extraction phénolique et précipitation éthanolique. L'efficacité de la transcription et de la coupure du transzyme sont vérifiées par analyse sur mini PAGE 12 %/urée 8 M. La T7 ARN polymérase a été préparée au laboratoire par M. Ryckelynck et C. Paulus selon (Becker, 1998).

6. Purification des transcrits

Les produits de transcription *in vitro* sont contaminés par l'ADN matrice, par les nucléotides excédentaires non incorporés et les produits de transcription incomplets. De plus, la T7 ARN polymérase synthétise des transcrits possédant un ou deux nucléotides supplémentaires en 3', qui peuvent représenter plus de 50 % du matériel final. Les transcrits d'intérêt sont purifiés par migration sur gel préparatif de polyacrylamide 12 %/urée 8 M permettant la résolution au nucléotide près. La migration est effectuée pendant 16 h. Les transcrits sont ensuite visualisés aux UV sur un écran de fluorographie. La bande de gel contenant la molécule de taille correcte est découpée et les transcrits sont extraits par électroélution. L'éluat récupéré dans du tampon TBE stérile est alors précipité à l'éthanol. Le culot d'ARN est lavé, séché puis repris dans 100 µl d'eau.

D. Leucyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine

1. Transformation et surexpression

Préparation de cellules électrocompétentes. Une colonie de bactéries BL21-CodonPlus(DE3)-RIL ayant poussé sur une boîte LB/Cam/Tet est prélevée stérilement et mise en culture dans 500 ml de LB/Cam/Tet à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO₇₀₀ = 0,6 (phase exponentielle). Après centrifugation du milieu pendant 15 min à 2 600 g, le culot est repris dans 500 ml de HEPES-NaOH 1 mM pH 7,6 à 4°C, puis recentrifugé pendant 15 min à 2 600 g. Cette étape de lavage est renouvelée, puis le culot cellulaire est repris dans 20 ml de glycérol 10 % à 4°C. La solution est centrifugée et le culot est repris dans 600 µl de

glycérol 10 % à 4°C. Les cellules peuvent être conservées ainsi à -80°C par aliquotes de 50 µl.

Transformation des cellules. La transformation de la souche BL21-CodonPlus(DE3)-RIL par le vecteur pET-24d Δ39-LeuRS se fait par électroporation à 2 500 V, de 50 µl de bactéries compétentes en présence de 50 à 100 ng de plasmides recombinants. Après transformation, les cellules sont additionnées de 50 µl de LB, étalées sur une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé LB/Cam/Tet/Kan, et incubées à 37°C pendant 16 h.

2. Surproduction

Une colonie transformée est mise en culture dans 4 ml de LB/Cam/Tet/Kan à 37°C. Cette préculture permet d'ensemencer 1 l de LB/Cam/Tet/Kan à 37°C qui va pousser jusqu'à obtention d'une $DO_{700nm} = 0,8$. L'expression de la LeuRS est ensuite induite par 1 mM final d'IPTG à 15°C pendant 12 h. Le milieu est centrifugé et les cellules sont lavées par le tampon PBS (1 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 135 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,4) puis congelées à -20°C.

3. Purification de la LeuRS

Le gène de la LeuRS a été cloné en amont d'une séquence polyhistidine (6-His) ce qui permet la purification de la protéine sur colonne substituée en nickel Ni-NTA.

Obtention de l'extrait brut. Les cellules sont reprises dans 20 ml de tampon A (50 mM NaH_2PO_4 pH 8, 300 mM NaCl, 0,05 % triton, 1 mM AEBSF (inhibiteur de protéases à sérine)). Le milieu est soniqué 8x45 s à 100 V, puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 30 min à 30 000 g.

Purification. Le surnageant est déposé, à un débit de 1 ml/min, sur une colonne contenant 4 ml de résine Ni-NTA préalablement équilibrée avec le tampon A additionné de 10 mM d'imidazole. La colonne est lavée par 5 volumes de tampon d'équilibration, puis l'élution est faite sur 25 ml avec un gradient de 10 à 250 mM d'imidazole. Ce gradient est réalisé par addition du tampon B (composition identique au tampon A mais 500 mM d'imidazole). La LeuRS est détachée de la colonne par 60 à 110 mM d'imidazole. Les fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE 10 % coloré au bleu de Coomassie pour rechercher la protéine (masse de 97 kDa) et vérifier la pureté de celle-ci.

Concentration de la protéine. Les fractions contenant la protéine sont dialysées dans un boudin de dialyse (12-14 kDa) à 4°C pendant 10 h contre 1 l de tampon de dialyse (50 mM

K₁K₂ pH 7,4, 150 mM KCl, 50 % glycérol, 1mM EDTA, 10 mM β-mercaptoéthanol). Le tampon de dialyse est changé après 1h. La LeuRS est ensuite conservée à -20°C.

Assignment de la protéine. La protéine majoritaire, de taille attendue, retenue sur la colonne Ni-NTA, a été séquencée à son extrémité N-terminale. Cette protéine est bien la LeuRS mt humaine délétée des 39 premiers acides aminés et active.

III. Aminoacylation

A. Principe du test d' aminoacylation

La détection de la charge *in vitro* de l'ARNt est réalisée grâce à l'utilisation d'acides aminés radioactifs, et à l'utilisation d'une méthode permettant de séparer l'acide aminé libre de celui qui s'est accroché à l'ARNt. La méthode de séparation consiste à déposer l'échantillon réactionnel sur un morceau de papier buvard du type 3MM puis à jeter ce papier dans de l'acide trichloroacétique (TCA). Les acides nucléiques sont acido-précipitables et vont se coller sur les fibres du papier tandis que les acides aminés non chargés sont solubles et vont quitter le papier au cours des lavages.

B. Les paramètres cinétiques étudiés

L' aminoacylation peut être suivie et quantifiée *in vitro* si celle-ci se fait en présence d'un acide aminé radioactif. Ceci permet de calculer le plateau de charge, ainsi que les constantes cinétiques k_{cat} et K_M . Le plateau de charge représente la proportion d'ARNt aminoacylé pour des quantités optimales d'aaRS. Il représente l'équilibre entre les formes acylées et non acylées de l'ARNt (Bonnet & Ebel, 1972). Les constantes k_{cat} et K_M sont calculées en principe pour des concentrations saturantes en ATP et en acide aminé ($> 10 K_M$). Cependant, le prix de la $[^3H]$ -Leucine utilisée pour déterminer ces constantes nous oblige à travailler dans des conditions où nous déterminerons uniquement des k_{cat} et K_M apparents. Les cinétiques sont effectuées dans des conditions de vitesse initiale lorsque le produit s'accumule linéairement en fonction du temps. Les constantes K_M et k_{cat} sont déterminées par la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk $1/v = K_M/V_{max} \times 1/[S_0] + 1/V_{max}$, où V_{max} est la vitesse maximale et $[S_0]$ la concentration en substrat de départ. La constante de Michaelis-Menten, K_M , peut être approximée comme étant l'inverse de l'affinité, mais le calcul de cette constante peut être biaisé par la proportion d'ARNt mal replié. Le k_{cat} est un paramètre décrivant directement l'activité de l'enzyme et sa vitesse de réaction. Le rapport k_{cat}/K_M indique l'efficacité catalytique du système. En effet, en condition de substrat très inférieur au K_M , l'équation de vitesse s'écrit $v = (k_{cat}/K_M) \times [E_0] \times [S_0]$, où $[E_0]$ est la concentration en enzyme initiale. Le rapport $(k_{cat}/K_M)_{sauvage} / (k_{cat}/K_M)_{mutant}$ représente la perte d'efficacité catalytique du mutant par rapport à la molécule sauvage.

C. Le test d'aminacylation

Le milieu réactionnel optimal pour le système leucine mitochondrial humain est constitué de 50 mM HEPES-KOH pH 7,6, 12 mM MgCl₂, 2,5 mM ATP, 50 µM L-[³H] Leucine (153 cpm/pmole), 0,2 mg/ml BSA, 1 mM spermine. Les tests sont réalisés à 30°C ou à 37°C dans un volume final de 50 µl. Les quantités d'ARNt et de LeuRS varient en fonction du paramètre à déterminer. La LeuRS est diluée dans un tampon contenant 100 mM HEPES-KOH pH 7,4, 1 mM DTT, 10 % glycérol, 5 mg/ml BSA. Une étape de renaturation des ARNt de 2 min à 60°C dans l'eau, suivie d'un refroidissement lent (10 min) en présence du milieu réactionnel est d'abord effectuée. L'aminacylation est initiée par addition de la synthétase au milieu d'incubation contenant l'ensemble des réactifs nécessaires, y compris l'ARNt. Des aliquotes de 10 µl sont prélevées à différents temps et déposées sur des rondelles de papier Whatman 3 MM. Ces papiers sont plongés immédiatement dans une solution à 5 % de TCA. Cette solution de TCA contient de la leucine non radioactive (une pointe de spatule par 250 ml), ce qui permet de réduire la fixation aspécifique de leucine radioactive sur le papier Whatman. Les rondelles sont soumises à trois lavages au TCA 5 %, puis lavées à l'éthanol et mises à sécher. Elles sont ensuite déposées dans des fioles contenant 2 ml de liquide de scintillation Ecoscint 0TM (National Diagnostics) et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation. Les plateaux d'aminacylation ont été déterminés sur 30 min d'incubation, à partir de 1,4 µM d'ARNt transcrit et 80, 800, ou 1,6 µM de LeuRS. Les taux de charge (plateau optimal de leucylation) sont exprimés en pourcentage d'aminacyl-ARNt par rapport à la quantité totale d'ARNt par expérience. Les constantes cinétiques apparentes k_{cat} et K_M sont calculées à partir de la méthode de Lineweaver-Burk sur les expériences réalisées avec 1 à 10 µM d'ARNt et 400 à 3,2 µM de LeuRS (-39) dans des conditions non saturantes en leucine.

Les tests d'aminacylations effectués pour déterminer l'influence du facteur EF1A de *S. cerevisiae* sont réalisés dans le milieu réactionnel décrit ci-dessus. La concentration en ARNt^{Leu(UUR)} transcrit sauvage est de 5 µM et la concentration en LeuRS utilisée est de 100 nM. Le facteur EF1A couplé au GDP et EF1B de *S. cerevisiae* ont été préparés par Magali Frugier au laboratoire, dans un tampon contenant 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM GDP, 100 mM chlorure d'ammonium, 10 mM acétate de magnésium, 0,2 mM DTT, 25% glycérol. EF1A est utilisé à des concentrations de 100 nM à 1µM. Le facteur EF1B est utilisé à une concentration de 25 nM, en présence ou pas de 1 mM de GTP. Les facteurs EF1A et

EF1B (+/- GTP) sont incubés 5 min à température ambiante avec l'ARNt après renaturation de ce dernier dans les conditions décrites ci-dessus.

Calcul de l'activité spécifique (A.S.). Dans la méthode utilisant la précipitation sur papier 3MM, il existe une particularité qui doit être prise en compte pour la quantification de l'ARNt aminoacylé lorsqu'un acide aminé utilisé est tritié. Les rayons β du tritium ont une pénétration faible dans l'air, de plus, une certaine proportion de rayons ne traverse pas l'épaisseur du papier Whatman. Or, les distributions dans le papier Whatman d'un ARNt aminoacylé et d'un acide aminé libre ne sont pas les mêmes. Les ARNt sont précipités à la surface du papier alors que les acides aminés libres pénètrent en profondeur. Cette localisation différentielle est à l'origine d'un facteur de diffusion différentiel du rayonnement β , qui doit être pris en compte en particulier lors de la détermination de l'A.S. de l'acide aminé libre. C'est pourquoi, l'ampleur de ce quenching différentiel a été mesurée pour la leucine. Deux réactions d'aminocyclations identiques, l'une avec un acide aminé tritié et l'autre avec un acide aminé marqué au carbone 14, pour lequel il n'y a pas de quenching, sont réalisés en parallèle. Les A.S. des deux acides aminés libres sont également mesurées. L'A.S. obtenue pour l'acide aminé-[^{14}C] libre est considérée comme exacte. Elle permet d'accéder au nombre de picomoles d'ARNt aminoacylés, qui est identique dans la réaction utilisant le carbone 14 ou le tritium. Dans le cas de la leucine, le facteur de correction calculé est de 2,2.

IV. Empreinte de la LeuRS sur l'ARNt

A. Principe

L'analyse structurale de l'interaction entre un ARNt et son aaRS par cartographie en solution consiste en l'étude de la réactivité de l'ARN, sous sa forme libre et complexée avec son aaRS, aux différentes sondes chimiques ou enzymatiques. Seules les sondes enzymatiques ont été utilisées dans notre étude, mais le principe est le même pour les sondes chimiques.

La méthode consiste à soumettre la molécule (libre ou complexée à l'aaRS spécifique) à une sonde et à discerner les zones réactives, donc accessibles, de celles non réactives considérées comme inaccessibles. Ainsi, la comparaison des cartographies d'un ARNt libre et du même ARNt complexé à l'aaRS va permettre de déterminer les zones d'interaction entre les deux molécules et permet de dessiner un modèle d'interaction. L'attaque par la sonde doit rester modérée et statistique (en moyenne de 0 à 1 impact par molécule). Ceci est nécessaire car la première attaque peut modifier la structure de la molécule, et une seconde attaque (à l'origine de coupures dites "secondaires") sur la même molécule pourrait alors révéler la structure modifiée et non la structure originale. La recherche des conditions statistiques pour chaque sonde est donc une étape importante. L'utilisation d'un ARN marqué au [³²P] à l'une ou l'autre de ses extrémités (5' ou 3') permettra, en séparant sur gel les différents produits de coupure, d'obtenir un aperçu complet des zones accessibles.

Les principes généraux, les sondes utilisables, les méthodes expérimentales ainsi que les constructions graphiques des techniques de cartographie des ARN en solution sont décrites dans la revue (Giegé et coll., 1999) et ont déjà été appliquées à différents systèmes d'aminacylation dans le laboratoire (Helm et coll., 1998; Helm et coll., 1999b; Sissler et coll., 1997).

Plusieurs sondes enzymatiques ont été utilisées pour déterminer l'empreinte de la LeuRS mt humaine sur l'ARNt^{Leu(UUR)} transcrit ou natif. Les sondes utilisées sont la nucléase S1, les ribonucléases V1, T1, T2 qui sont de poids moléculaire élevé de 10 à 40 000 Da. Elles permettent de mesurer l'accessibilité des régions simple ou double brin de l'ARNt. Le Tableau précise la spécificité de reconnaissance et de coupure des différentes sondes enzymatiques qui ont été utilisées dans ce travail.

Sondes	PM (Da)	Cible
Nucléase S1	32 000	Région simple brin
RNAse T1	11 000	Guanosine simple brin
RNAse T2	36 000	Région simple brin
RNAse V1	15 900	Région double brin ou structurée

Tableau 7. Récapitulatif des différentes sondes utilisées, de leur poids moléculaire ainsi que de la spécificité de reconnaissance de chacune.

B. Marquages des ARNt

1. Marquage en 5'

Les acides nucléiques sont directement marqués à l'extrémité 5' avec la T4 polynucléotide kinase (T4 PNK) lorsque le premier nucléotide ne possède pas de groupement phosphate. Dans le cas contraire, une étape préalable de déphosphorylation par la phosphatase intestinale de veau (CIP), est nécessaire. La déphosphorylation de 100 pmoles d'ARNt est réalisée à l'aide de 3 U de CIP dans un tampon "CIP" pendant 30 min à 37°C. La réaction est arrêtée par une extraction phénolique. Les acides nucléiques sont précipités et repris dans un volume de 10 µl.

Le marquage en 5' de 50 pmoles d'ARNt est effectué pendant 30 min à 37°C en présence de 20 µCi de [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (A.S. 3 000 Ci/mmol), dans 15 µl du milieu composé de 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTE, 1 mM ATP, 10 U de T4 PNK. Après ajout d'un volume de "solution de dépôt", le milieu est déposé sur un gel analytique PAGE 8 %/urée 8 M pendant 1 h.

2. Marquage de l'extrémité 3'-CCA

L'extrémité 3' des ARNt peut être marquée radioactivement par l'ARNt nucléotidyl transférase d'*E.coli* (CCAse). Cette dernière a été purifiée au laboratoire par A. Théobald-Dietrich. L'extrémité 3' simple brin est d'abord dégradée par hydrolyse ménagée avec une 3'-exonucléase, la phosphodiesterase de venin de serpent *Crotalus durissus*. Pour cela, 100 pmoles d'ARNt sont incubés dans 25 µl du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂ en présence de 0,1 µg de phosphodiesterase à 20°C pendant 10 min. La réaction est ensuite arrêtée par extraction phénolique et les acides nucléiques sont précipités puis repris dans 10 µl d'eau. La reconstitution de l'extrémité 3' s'effectue dans 20 µl de milieu réactionnel composé de 50 mM Tris-glycine pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 8 mM DTE, 50 µM CTP et 20 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP (A.S. 3 000 Ci/mmol). La réaction est initiée par l'ajout de 1,5 µg de CCAse d'*E.coli*. Le milieu est incubé pendant 30 min à 37°C, puis additionné d'un volume de solution de dépôt et déposé sur un PAGE 8 %/urée 8 M.

3. Purification des ARNt marqués

Les nucléotides marqués non incorporés et les fragments de dégradation de l'ARNt sont éliminés par migration sur un PAGE 8 %/urée 8 M. Les bandes correspondant aux ARNt radioactifs sont révélées par autoradiographie puis sont excisées. L'ARNt est récupéré par élution passive (voir §ID1f) puis précipité et repris dans l'eau afin d'obtenir une solution à 50 000 cpm/ μ l (mesure Cerenkov).

Les faibles quantités d'ARNt marqués (1-5 pmoles) sont purifiées à l'aide d'une colonne G-25 qui permet d'éliminer les nucléotides marqués non incorporés. L'étape de précipitation est réalisée à l'aide de glycogène (50 μ g/ml).

C. Etablissement des empreintes

1. Sondages enzymatiques

Les sondes enzymatiques (T1, T2, V1, S1) ont été utilisées pour déterminer l'empreinte de la LeuRS sur l'ARNt^{Leu(UR)} sauvage natif et transcrit ainsi que sur un transcrit variant. La LeuRS est préalablement dialysée contre le tampon F (50 mM HEPES-KOH pH 7,6, 12 mM MgCl₂, 25 mM KCl) et l'ARNt est dénaturé/renaturé par chauffage pendant 2 min à 60°C dans l'eau suivi d'un refroidissement lent. Le milieu réactionnel (10 μ l) contenant le tampon F, 50 000 cpm d'ARNt marqué, 1 μ M d'ARNt non marqué et 10-40 μ M de LeuRS (ou de tampon sans LeuRS) est incubé 5 min à température ambiante. La sonde enzymatique est ajoutée (0,1 U de nucléase T1, 0,08 U de nucléase T2, 1,5 mU de nucléase V1 ou 1,5 U de S1 et 1 μ M ZnCl₂) et le milieu est incubé pendant 15 min à 4°C. La réaction est arrêtée par addition d'un volume de stop mix (0,6 M AcONa pH 5, 3 mM EDTA, 0,1 mg/ml d'ARNt total d'*E.coli*), et les produits de clivage sont purifiés par extraction phénolique, et précipités par la technique au chlorure de lithium. Afin de visualiser d'éventuelles dégradations de l'ARN au cours des manipulations, des expériences de contrôle sont également effectuées sans sondes enzymatiques.

2. Echelle alcaline et échelle de guanosine

L'échelle alcaline est réalisée dans 10 μ l de milieu réactionnel contenant 50 mM NaHCO₃ pH 9, 50 000 cpm d'ARNt marqué et 5 μ g d'ARNt total d'*E.coli* pendant 2 min à 85°C. Le milieu est ensuite refroidi dans la glace puis additionné d'un volume de solution de dépôt.

L'échelle de guanosine est effectuée dans 10 µl de milieu contenant le tampon T1 (25 mM citrate de sodium pH 4,5, 8 M urée, 1 mM EDTA, 0,1 % xylène cyanol et bleu de bromophénol), 50 000 cpm d'ARNt marqué, 1 µg d'ARNt total. Le milieu est incubé pendant 5 min à 55°C, puis refroidi dans la glace. Il est ensuite additionné de 0,1 U de ribonucléase T1 et incubé 10 min à 55°C. La réaction est arrêtée dans la glace.

3. Electrophorèse des fragments ARN et analyse des résultats

Les fragments ARN de différentes tailles résultant de la coupure par les sondes enzymatiques sont séparés par migration sur un PAGE 12 %/urée 8 M. Afin de pouvoir effectuer une comparaison des différentes conditions réalisées (\pm aaRS, \pm sondes), des quantités identiques de radioactivité doivent être déposées pour chaque échantillon. Après migration, les bandes correspondant aux coupures des ARN sont révélées par autoradiographie (Kodak, BIOMAX MR).

V. Protéomes comparatifs de mitochondries humaines par électrophorèse bidimensionnelle

A. Principe

L'ensemble des protéines mitochondriales est séparé par électrophorèse selon deux dimensions. Lors de la première étape, l'isoélectrofocalisation, les protéines sont séparées selon leur pH isoélectrique. La deuxième étape correspond à un gel de polyacrylamide dénaturant qui sépare les protéines selon leur poids moléculaire. Les protéines ainsi séparées sur le gel de polyacrylamide, peuvent être visualisées par coloration au nitrate d'argent ou au bleu colloïdal. Cette technique sera appliquée à des mitochondries possédant des génotypes différents. Les cartes de l'ensemble des protéines mitochondriales seront alors comparées entre elles afin de rechercher d'éventuelles variations dans le contenu protéique mitochondrial en fonction du génotype. Les protéines dérégulées seront excisées du gel et identifiées grâce à des approches de spectrométrie de masse.

B. Gel bidimensionnel (2D-PAGE)

La quantité de protéines mitochondriales utilisée pour la réalisation d'un gel dépend de l'utilisation qui sera faite du gel 2D : pour l'analyse quantitative comparative, 50 à 150 µg de protéines mitochondriales suffisent, alors que pour l'identification de protéines par spectrométrie de masse, 500 µg sont nécessaires.

Isoélectrofocalisation. Les mitochondries, contenues dans 100 µl de tampon "Mito" (voir §II.B. Purification des mitochondries), sont solubilisées pendant 1 h à température ambiante par addition de 400 µl de tampon de lyse contenant 9 M urée, 2,5 M thiourée, 5 % CHAPS, 12,5 mM DTT, 0,5 % ampholytes porteurs (pH 3-10, Bio-Rad). Le CHAPS est un détergent non dénaturant qui participe à la solubilisation des membranes. Les ampholytes augmentent la solubilité et assurent une conductibilité uniforme au cours de la focalisation. L'échantillon est ensuite déposé sur un gel à gradient de pH immobilisé et pré-coulé (IPG strip, Bio-Rad) de 17 cm de longueur, couvrant une gamme de pH particulière allant de 5 à 8 (nous avons testé des gammes allant de pH 3 à 10 / 3-7 / 5-8 / 8-13). La réhydratation et l'imprégnation du "strip" par l'échantillon s'effectue pendant 10 h à 22°C. Le "strip" est protégé de la déshydratation et de l'oxydation par recouvrement à l'huile minérale. L'isoélectrofocalisation est effectuée à 22°C (Bio-Rad, Protean IEF Cell) en plusieurs étapes. Une première application de 300 V pendant 2 h permet d'éliminer les sels du gel. Le voltage

est ensuite augmenté de manière linéaire pendant les 2 h suivantes jusqu'à atteindre 1 500 V. La focalisation proprement dite est réalisée à 3 000 V pendant 16h. Enfin, l'ensemble est stabilisé pendant 4 h à 500 V.

Equilibration. Les strips sont alors équilibrés deux fois 15 min dans un tampon (125 mM Tris-HCl pH 7,7, 6 M urée, 2,5 % SDS, 30 % glycérol) contenant 65 mM DTT, étape de réduction et de saturation du gel en SDS, puis par le même tampon contenant 216 mM iodoacétamide, étape d'alkylation du DTT résiduel et empêchant la ré-oxydation des protéines au cours de l'électrophorèse.

SDS-PAGE. Une solution stock de polyacrylamide est formée d'un mélange 30 % acrylamide/ 0,8 % (p/v) Pipérazine DiAcrylamide (PDA), ce dernier étant plus résistant que le bisacrylamide et conduit à une meilleure résolution pour la coloration à l'argent. Le gel SDS-PAGE final sera constitué de 10 % acrylamide/PDA, 0,2 M Tris-HCl pH 8,1. Le strip est fixé en haut du gel de polyacrylamide 10 % (20x20 cm) avec une solution d'agarose "low melting" 1 %, 0,2 M Tris-HCl, pH 8,1, et 0,1 % bleu de bromophénol. La migration des protéines s'effectue dans un tampon Tris-aurine (50 mM Tris-base, 200 mM aurine, 0,1 % SDS) pour la cuve du haut (anode), et dans un tampon Tris-glycine (50 mM Tris-base, 400 mM glycine, 0,1 % SDS) pour la cuve du bas (cathode). L'électrophorèse (40 mA/gel) est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol est en bas du gel, ce qui permet une résolution des protéines de faible poids moléculaire (7 kDa).

C. Coloration des protéines

1. A l'argent

Les gels destinés à l'analyse quantitative sont colorés à l'argent selon (Rabilloud et coll., 1998). Les gels sont fixés pendant une nuit dans une solution d'acide acétique 5 % et d'éthanol 30 %. Après quatre rinçages de 10 min dans de l'eau milliQ, la solution de sensibilisation (0,2 g/l thiosulfate de sodium) est appliquée durant 1 min. Le gel est rincé 2 x 1 min, puis l'argent (2 g/l AgNO₃) est appliqué pendant 30 à 120 min. Le gel est rincé, puis la solution de développement (4 % carbonate de potassium, 0,25 ml/l formaldéhyde, 0,025 % thiosulfate de sodium) est appliquée pendant 10 à 20 min sous agitation constante. Lorsque le développement est suffisant, le gel est passé dans la solution d'arrêt (4 % Tris-base (p/v), 2 % acide acétique (v/v)). Le gel est ensuite rincé à l'eau, scanné (GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad) et séché.

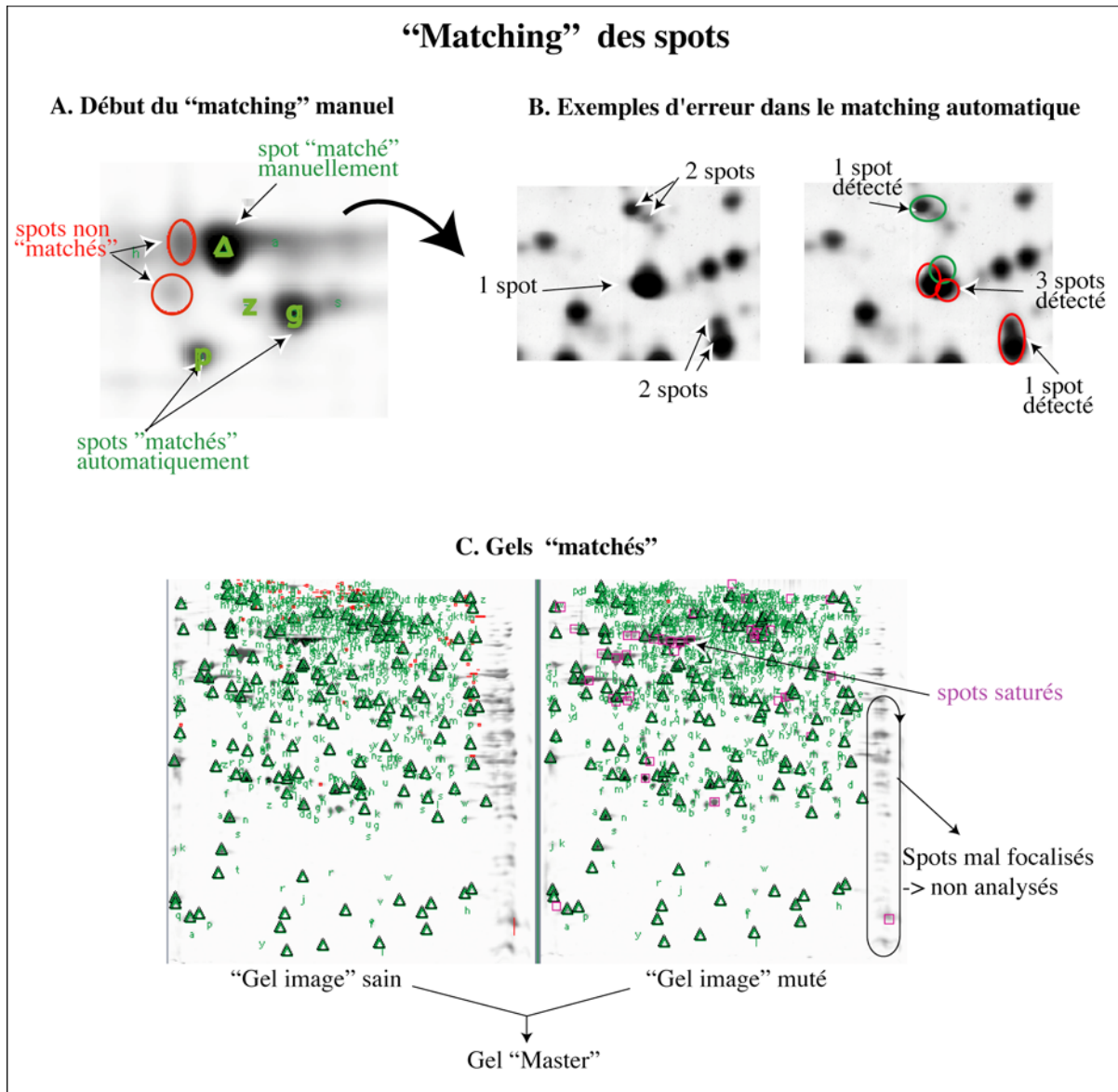


Figure 16. “Matching” des spots. Les spots identiques identifiés sur les 2 gels sont représentés (i) par un triangle vert pour les identifications manuelles, (ii) par une lettre verte pour les spots identifiés par le logiciel. Les spots dont le spot équivalent n’est pas encore identifié sur l’autre gel sont en rouge. Les croix jaunes représentent les spots détectés lors de l’étape de détection automatique des spots. Les spots violets représentent les spots saturés. A. Après chaque identification manuelle, le programme complète l’identification des spots qu’il reconnaît dans la région où le spot vient d’être “matché” par l’opérateur. B. Le logiciel fait parfois des erreurs en ne détectant qu’un spot alors qu’il y en a deux ou inversement, ce qui nécessite une vérification de toutes les détections et une correction par l’opérateur. C. Le couple de “gels images” sain et muté est entièrement “matché” dans la zone exploitable. Le logiciel fournit alors un gel “Master” qui contient l’ensemble des informations des spots.

2. Au bleu colloïdal (G-250)

Les gels dont les protéines seront identifiées par spectrométrie de masse doivent être traités avec une technique compatible (Neuhoff et coll., 1988). Ils sont fixés 3 fois 30 min dans 30 % d'éthanol (v/v) et 2 % d'acide phosphorique (v/v), puis rincés 3 fois 20 min dans 2 % d'acide phosphorique (v/v). Ils sont ensuite équilibrés dans une solution de 2 % acide phosphorique (v/v), 18 % éthanol (v/v), 15 % sulfate d'ammonium (v/v) pendant 30 min. Le bleu colloïdal G250 est ajouté à la solution d'équilibration à une concentration finale de 0,02 %. Les gels sont colorés pendant 24-36 h, puis lavés avec de l'eau pour diminuer le bruit de fond et scannés. Finalement, les "spots" d'intérêt sont découpés au scalpel en prenant soin ne pas les contaminer avec de la kératine (hotte à flux laminaire, gants, masque, charlotte) et conservés à -20°C dans des microtubes.

D. Analyse quantitative et comparative des gels (PDQuest)

Les cartes bidimensionnelles des protéines de mitochondries saines et malades sont comparées. L'analyse quantitative et comparative des gels est réalisée à l'aide du logiciel PD-Quest (Bio-Rad). Ce logiciel attribue à chaque spot des coordonnées x, y et z : x et y représentent l'étendue du spot au niveau horizontal et vertical et z l'intensité du signal. Ainsi, chaque spot est quantifié en tenant compte de l'ensemble de ces paramètres. Après avoir scanné les gels colorés au nitrate d'argent (scan 2-D), la quantification et la comparaison se déroulent en plusieurs étapes.

Détection des spots. Un seuil de détection est donné au programme qui procède alors à la détection des spots automatiquement sur le scan 2-D. Une étape de "nettoyage" du gel est alors nécessaire. En effet, des traînées, des particules d'argent, et des poussières sont également détectées comme spots et il est nécessaire de les dé-assigner. Ensuite, il faut définir les limites du gel, limites qui devront être identiques pour l'ensemble des gels qui seront comparés. Les fichiers ainsi créés sont appelés "gel image".

"Matching" des spots. Plusieurs méthodes de comparaison des gels sont proposées par le programme. Il est possible soit (i) de créer deux groupes (gels sains et gels malades) et de comparer ces deux groupes, ou (ii) de comparer immédiatement un gel sain et un gel malade et de répéter cette opération sur plusieurs couples afin de faire ressortir les variations significatives. Bien que la première approche semble plus satisfaisante, c'est cette dernière méthode que nous avons appliquée. En effet, des limitations du programme PD-Quest ne permettent pas l'exploitation finale des données provenant de la première approche.

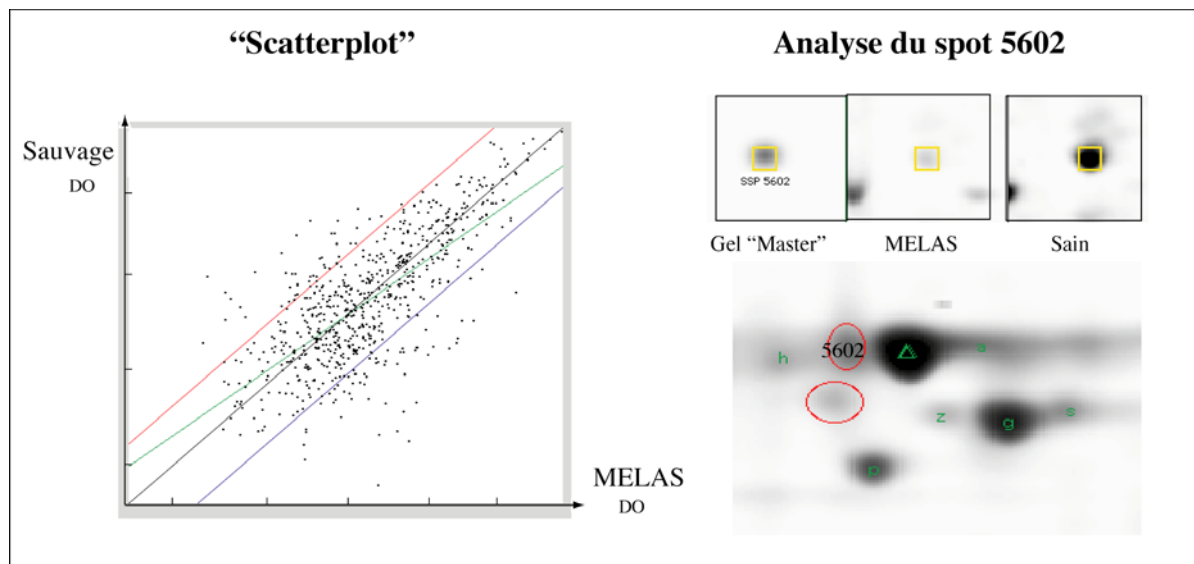


Figure 17. Analyses des données. Le "scatterplot" représente la conservation moyenne des spots d'un gel par rapport à l'autre. Les points en dehors des diagonales extérieures varient d'un facteur supérieur à 4. Pour chaque spot, il est possible d'obtenir l'histogramme représentant la variation quantitative du spot dans les deux gels comparés.

Pour cela, un “matchset” est créé à partir de deux gels image (sain et malade). Un des deux gels est désigné comme gel standard. Il est préférable de choisir pour cela le gel qui présente le plus de spots. Pour que le programme puisse identifier chaque spot sur les deux gels, il est nécessaire d’identifier manuellement au moins 10 % des spots “identiques” (Fig.16A). Ces 10 % doivent être répartis sur l’ensemble du gel. Dans les régions où il y a beaucoup de spots rassemblés, il est parfois nécessaire d’en identifier jusqu’à 1 sur 2. Au fur et à mesure du “matching” manuel, le programme identifie les spots qu’il reconnaît comme identiques. Cependant, il est nécessaire dans les zones contenant beaucoup de spots de corriger certaines assignations du programme (Fig. 16B). Une fois que le programme a identifié l’ensemble des spots sur les deux gels, un gel “master” est obtenu (Fig. 16C).

Normalisation des gels. Lors de la réalisation d’un gel, la quantité de mitochondries utilisée, les erreurs de pipetage, l’intensité de coloration, sont autant d’éléments propres à chaque gel. Afin que ces variations n’affectent pas les comparaisons des gels entre eux, chaque couple de gel est normalisé. La manière la plus précise serait de normaliser les gels par rapport à un petit groupe de spots invariants. Dans notre cas, il n’est pas possible de savoir d’avance quel spot sera conservé quantitativement. Afin de trouver la normalisation la plus précise dans notre cas, nous avons effectué différentes normalisations sur plusieurs couples de gel. La normalisation par rapport à la densité totale du gel, à l’ensemble des spots valides, de même que par rapport à 8 spots qui semblaient être invariants “à l’œil”, nous ont donné les mêmes résultats. Nous avons donc fixé de manière arbitraire que la normalisation serait toujours effectuée par rapport à la totalité des spots valides.

Analyses des données. Le gel “master” contient la totalité des informations de chaque spot (surface, densité, quantité). Il est alors possible de mettre en évidence les spots augmentés ou diminués d’un facteur déterminé et de visualiser les intensités de l’ensemble des spots d’un gel par rapport à l’autre (“scatterplot”) (Fig. 17). L’ensemble de ces données est alors exporté sous forme de fichiers Excell pour être analysé.

Remarque. Pour l’analyse quantitative, les gels sont colorés à l’argent. Cette technique est linéaire selon une gamme plus restreinte que la coloration au bleu colloïdal, mais elle présente l’avantage d’avoir un seuil de sensibilité 10 fois plus élevé, ce qui est non négligeable lorsque les mitochondries sont préparées à partir de cultures de cellules adhérentes. La comparaison de l’intensité de deux séries de spots dans deux expériences indépendantes révèle que les deux colorations donnent le même résultat quantitatif excepté pour les spots proches de la saturation dans la coloration à l’argent. Dans ce cas, la variation quantitative détectée sera sous-estimée.

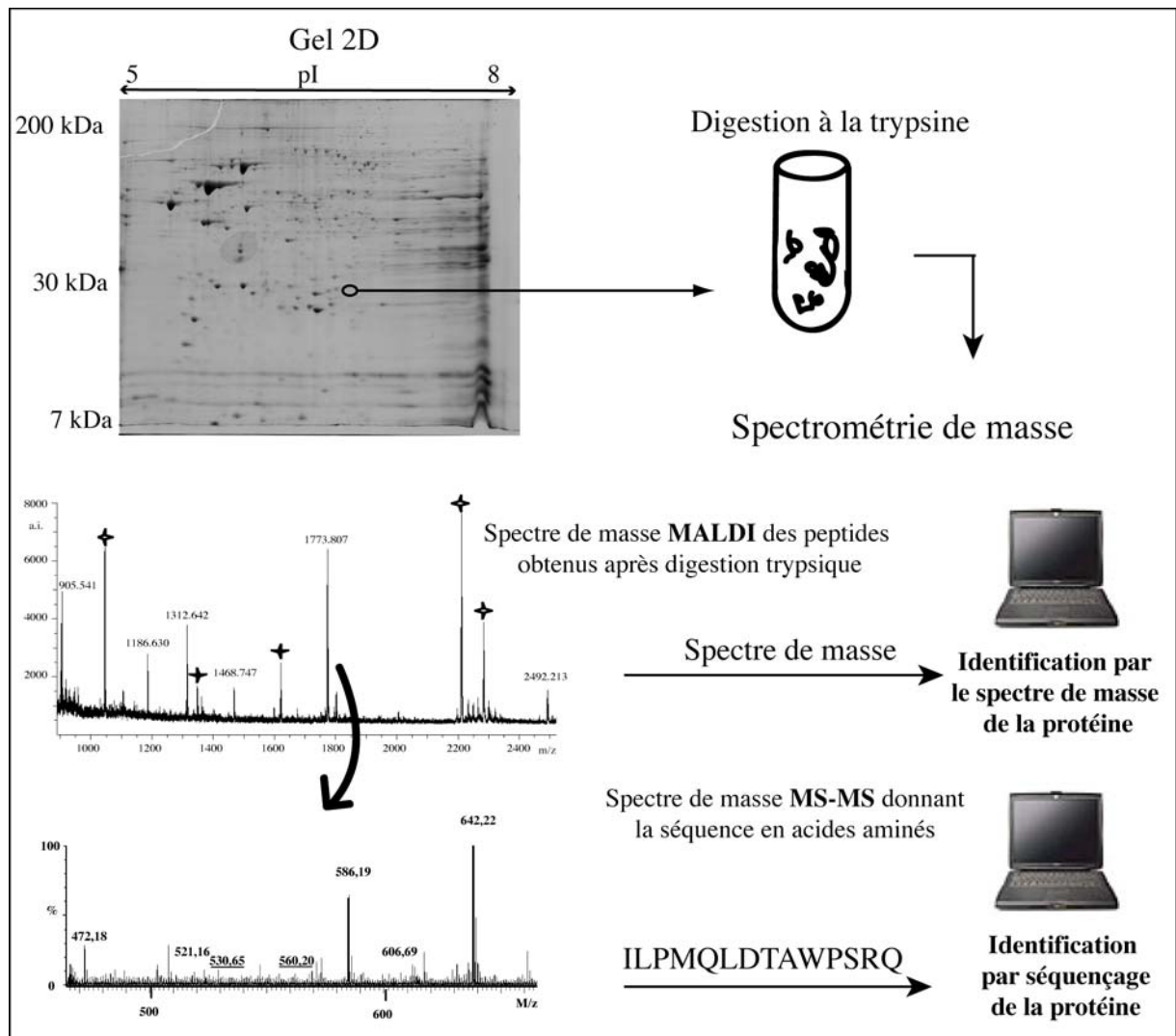


Figure 18. Les différentes étapes permettant l'identification d'une protéine à partir d'un gel 2D. Le spot d'intérêt est découpé du gel coloré au préalable au bleu de Coomassie, puis digéré par la trypsine permettant l'obtention de peptides de différentes tailles. Ces peptides sont analysés par spectrométrie de masse MALDI qui donnent la masse de différents peptides de la protéine (spectre de masse de la protéine). Ce spectre est comparé au spectre de masse virtuel des protéines disponible dans les banques de données à l'aide d'outils informatiques et il en ressort une liste de protéines qui ont un spectre de masse virtuel identique ou proche de la protéine d'intérêt. Pour une assignation sûre de la protéine, il est parfois nécessaire d'utiliser la spectrométrie de masse MS-MS qui permet d'obtenir la séquence d'un peptide de la protéine.

E. Assignment des protéines par spectrométrie de masse

L'assignation des protéines a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr. Alain Van Dorsselaer à Strasbourg (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, LSMBO à l'école de Chimie des Polymères). La digestion des protéines et la spectrométrie de masse ont été réalisées par Sophie Richert (LSMBO, Strasbourg). La démarche générale de l'étude est résumée dans la Figure 18. Les spots dérégulés sont excisés du gel et envoyés dans le laboratoire de spectrométrie de masse. Les protéines sont digérées dans le gel par la trypsine puis les peptides sont extraits du gel à l'aide d'un mélange eau/acétonitrile. Deux techniques d'assignation des protéines ont été utilisées, le MALDI-ToF (Matrix Assisted-Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight) et la nano-LC-MS-MS (nanoscale capillary Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry). Le MALDI-MS est une technique qui est basée sur l'analyse de l'échantillon co-cristallisé avec une matrice. L'ensemble est bombardé par un rayon laser, la matrice transmet alors l'énergie du laser aux peptides. Il y a un mécanisme de transfert de protons de la matrice vers la protéine donnant des ions monochargés en phase gazeuse. Ces ions sont ensuite analysés selon leur rapport masse sur charge (M/z) dans l'analyseur (Time of Flight, ToF). Le MALDI-MS permet ainsi d'obtenir la masse de différents fragments de la protéine obtenus après la digestion trypsique. C'est le spectre de masse de la protéine. Ce spectre est comparé à l'aide d'outils informatiques aux spectres de masse virtuels des protéines disponibles dans les banques de données spécialisées (ex : SWISS-PROT). Cette comparaison est basée sur un score obtenu par une protéine en fonction du nombre de peptides trypsiques identifiés par spectrométrie de masse et en fonction de la précision de masse des peptides. Les meilleurs scores correspondent aux comparaisons les plus fiables. Cependant pour une assignation sûre, il est parfois nécessaire d'avoir recours à la technique MS-MS.

La nano-LC-MS-MS est un couplage d'une chromatographie liquide et d'un spectromètre de masse. En sortie de la colonne (LC), l'échantillon est soumis à un fort champ électrique qui entraîne la pulvérisation de l'échantillon en microgouttelettes multichargées. Le spectromètre de masse est formé de deux analyseurs en tandem séparés par une cellule de collision. Lorsque les ions peptidiques multichargés (après le premier analyseur) arrivent dans la cellule de collision, ils entrent en collision avec des molécules de gaz rares et se fragmentent au niveau des liaisons peptidiques, ils sont ensuite analysés dans le deuxième analyseur. Cette technique permet d'obtenir le spectre de fragmentation d'un peptide ce qui équivaut au séquençage du peptide. Cette technique permet d'assigner de manière univoque

une protéine et peut être nécessaire pour identifier la nature précise des modifications post-traductionnelles ainsi que leurs localisations.

Chapitre 1

ARNt^{Leu(UUR)}

et

traduction mitochondriale

Nous avons choisi de mettre en place un modèle d'étude de l'ARNt^{Leu(UUR)} mt humain par une approche *in vitro*. Ceci en vue de la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents aux pathologies liées à des mutations dans cet ARNt. Cette approche permettra également l'acquisition de connaissances fondamentales sur les relations structure/fonction de ces ARNt dans le cadre de la synthèse protéique mitochondriale.

Les études menées jusqu'à présent *in vivo* dans un certain nombre de laboratoires conduisent certes à des résultats importants concernant les effets de mutations pathologiques sur les différentes étapes de la traduction mitochondriale, mais ne permettent d'aborder qu'une seule mutation à la fois, sur un système cellulaire particulier. Les études sont menées sur des biopsies (rarement) ou sur des cellules cybrides créées à partir de divers types cellulaires cancéreux, ou encore sur des lignées cellulaires établies à partir de cellules de patients (lymphoblastes, fibroblastes, myeloblastes). Ces cellules diffèrent toutes au niveau de leur ADN nucléaire et ne permettent donc pas de comparaisons rigoureuses. Ainsi, non seulement les études sont fastidieuses car elles sont basées sur des cultures de cellules, mais encore les résultats ne sont pas directement comparables car ils ne sont pas issus d'un même système d'étude. Cette diversité a déjà conduit à des résultats frappants, par exemple, dans le cas de l'étude de l'impact des mutations MERRF (A8344G dans l'ARNt^{Lys}) et MELAS (A3243G dans l'ARNt^{Leu(UUR)}) sur les capacités d'aminacylation des deux ARNt. Les variabilités observées ont été relevées et discutées dans une publication au titre provocateur et révélateur "The np 3243 MELAS mutation: damned if you aminoacylate, damned if you don't" (Jacobs & Holt, 2000).

L'analyse *in vitro* permettra d'étudier de façon systématique, en dehors du contexte cellulaire, l'impact de l'ensemble des mutations répertoriées dans un ARNt donné, en l'occurrence l'ARNt^{Leu(UUR)}, et de pouvoir ainsi les comparer. Concernant l'acquisition de connaissances fondamentales sur les ARNt, il sera en particulier possible de déchiffrer les règles qui régissent les systèmes d'aminacylation mitochondriaux humains, de connaître les partenaires en jeu, de définir les paramètres cinétiques des réactions d'aminacylation et de contribuer à l'identification de nucléotides d'identité de l'ARNt^{Leu(UUR)}, et des zones d'interaction entre les aaRS et les ARNt.

L'étude du système leucine mitochondrial humain *in vitro* nécessitait que nous disposions d'une part de transcrits de l'ARNt^{Leu(UUR)} (séquence sauvage ou séquences mutées) et de la LeuRS mt humaine. Ainsi, j'ai cloné le gène synthétique correspondant à l'ARNt^{Leu(UUR)} en aval d'un promoteur transcriptionnel du phage T7 suivi d'un ribozyme en tête de marteau. Ceci permet d'obtenir lors de la coupure auto-catalytique de ce ribozyme

dans le transzyme (transcrit correspondant au ribozyme-ARNt), un ARNt avec une séquence en 5' exacte et précise (Fechter et coll., 1998). Les conditions optimales de transcription et de coupure du transzyme ont du être adaptées à la séquence de l'ARNt^{Leu(UUR)}. Enfin, la purification de l'ARNt s'est révélée délicate en raison d'une grande fragilité intrinsèque de cette molécule, liée à une richesse en séquences dinucléotides CpA et UpA connues comme étant des sites de dégradation importante des ARN. Nous avons donc été amenés à établir des conditions de transcription et de coupure du transzyme qui sont un compromis entre un nombre suffisant de coupure auto-catalytique libérant l'ARNt, et un temps de réaction diminué afin de limiter la dégradation de l'ARNt. Les conditions optimales sont décrites dans l'article n° 2 et ont permis la production de versions mutées de cet ARNt.

Le gène de la LeuRS mt humaine code pour 903 acides aminés incluant en N-terminal une séquence de localisation mitochondriale. L'étude de la LeuRS mt humaine par (Bullard et coll., 2000) avait conduit ses auteurs à envisager deux sites de coupures potentiels de cette séquence de localisation mitochondriale. Un premier site de coupure pourrait se placer après l'acide aminé 21 (prédiction de séquence de localisation mitochondriale par le programme informatique PSORT). Un second site de coupure pourrait se placer aux alentours du résidu 50 d'après un alignement de séquence avec plusieurs LeuRS bactériennes. Ainsi, deux formes hypothétiques de la LeuRS mature sont possibles. Bullard et collaborateurs avaient choisi de cloner la LeuRS mt délétée des 21 premiers acides aminés (Δ 21-LeuRS). Afin d'exprimer cette enzyme humaine de manière optimale dans *E. coli*, les souches ont été co-transformées avec des plasmides permettant l'expression d'ARNt considérés comme rares chez *E. coli* mais dont l'anticodon est complémentaire à des codons largement présents dans le gène humain. Ainsi, un plasmide (pArgU218) portant une copie de l'ARNt isoaccepteur Arg décodant les codons AGG/A représentant 60% des codons arginine du gène de la LeuRS a été co-transformé. L'enzyme ainsi produite, la Δ 21-LeuRS, a été étudiée pour ses capacités d'aminocyclation de l'ARNt total d'*E. coli*.

L'équipe de S. Martinis (Houston), a cloné la LeuRS mt humaine sur le même modèle et nous a gracieusement fourni le clone. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de surproduire cette enzyme dans les conditions décrites par Bullard. Les différentes conditions que nous avons alors testées, n'ont permis de purifier que de faibles quantités d'enzyme. Les premiers essais d'aminocyclation réalisés sur l'ARNt^{Leu(UUR)} transcrit *in vitro* n'ont pas été concluants.

L'étude de la séquence de la LeuRS nous a permis de constater qu'en plus des codons arginine AGG/A, la séquence contenait également 6% de codons leucine CUA et 13% de codons isoleucine AUA qui sont considérés comme d'utilisation rare chez *E. coli*. Nous avons alors introduit le plasmide portant le gène de la $\Delta 21$ -LeuRS dans une souche contenant des copies supplémentaires des isoaccepteurs capables de lire ces codons (souche BL21-RIL, R pour arginine, I pour isoleucine et L pour leucine).

En parallèle, le plasmide portant le gène de la LeuRS délété des 39 premiers acides aminés ($\Delta 39$ -LeuRS) nous a été fourni par l'équipe de M. King (Philadelphie). Ce plasmide a été également transformé dans la souche BL21-RIL. La purification de la $\Delta 21$ -LeuRS n'a permis d'obtenir que de faibles quantités d'enzyme, contrairement à celle de la $\Delta 39$ -LeuRS qui est produite dans des quantités appréciables (Fig. 19A). L'analyse théorique de la structure secondaire de cette enzyme montre que la délétion des 21 premiers acides aminés entraîne la formation d'un fragment non structuré en N-terminal. Nous proposons que ce fragment pourrait rendre la protéine $\Delta 21$ -LeuRS insoluble ou alors qu'il entraînerait un repliement particulier de la protéine empêchant l'accessibilité du marqueur 6-His en C-terminal lors de la purification sur colonne (Fig. 19B).

Des tests d'aminoacylation comparatifs ont été réalisés avec ces deux enzymes en utilisant de l'ARNt total d'*E. coli* comme substrat. Il s'est avéré que pour une même concentration d'enzyme (1 μ M), les taux de charge obtenus en présence de la $\Delta 39$ -LeuRS étaient 10 fois plus élevés que ceux atteints en présence de la $\Delta 21$ -LeuRS (Fig. 19C). C'est pourquoi nous avons poursuivi toutes nos études en utilisant l'enzyme $\Delta 39$ -LeuRS. Cette enzyme pourrait correspondre d'avantage à la forme mature, que ce soit par son activité, par les alignements de séquences avec ses homologues procaryotes ou encore par sa structure secondaire potentielle qui présente un fragment non structuré en N-terminal plus court que l'enzyme $\Delta 21$ -LeuRS. Cette forme de la LeuRS s'est avérée très récemment être effectivement celle mimant le mieux la situation *in vivo* (Yao et coll., 2003).

Une fois les deux partenaires disponibles, nous avons pu étudier le système leucine mitochondrial d'un point de vue fondamental ainsi qu'en ce qui concerne le niveau de l'impact de plusieurs mutations liées à des pathologies. Les résultats sont décrits dans les deux publications suivantes, et dans une troisième partie de ce chapitre consacrée à la recherche d'un co-facteur pour l'aminoacylation mitochondriale.

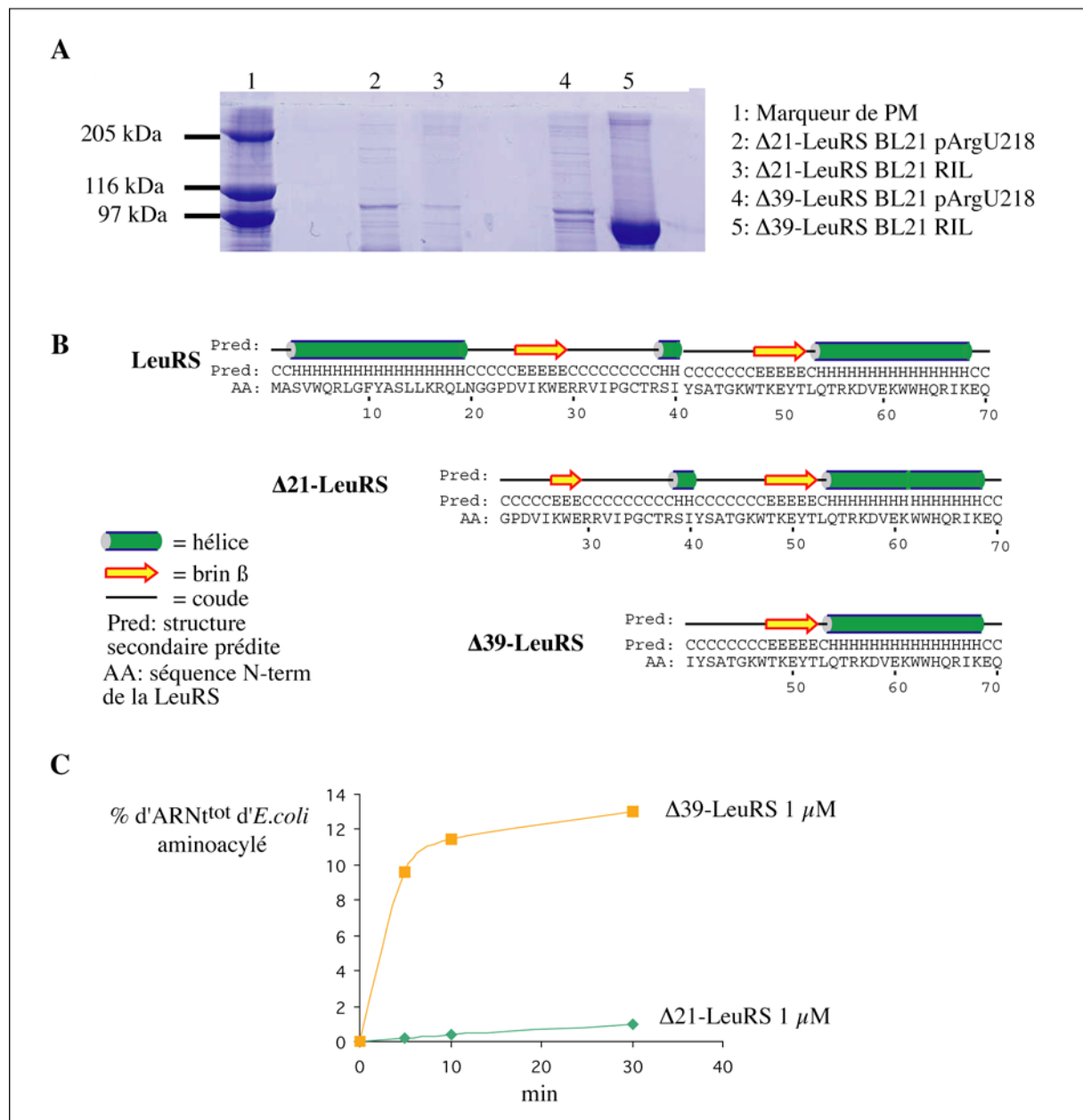


Figure 19. Recherche de la forme active de leucyl-ARNt synthétase. A. Analyse par électrophorèse en condition dénaturante de la $\Delta 21$ -LeuRS (2, 3) et $\Delta 39$ -LeuRS (4, 5) produites dans la souche BL21 pArgU218 (2, 4) ou dans la souche BL21 RIL (3, 5). B. Analyse de la structure secondaire théorique de la LeuRS ainsi que des formes délétées des 21 ou des 39 premiers acides aminés. Cette prédiction de structure a été réalisée à l'aide du programme informatique PSIPRED (McGuffin et coll., 2000). C. Taux de charge de l'ARNt total d'*E. coli* (20 μ M) par la $\Delta 39$ -LeuRS (1 μ M) ou la $\Delta 21$ -LeuRS (1 μ M). Les conditions d'aminocyclation sont identiques à celles décrites dans (Bullard et coll., 2000).

I. Article n°2

Vers la compréhension de l'identité du système d'aminacylation leucine mitochondrial humain

B. Sohm, M. Frugier, H. Brulé, K. Olszak, A. Przykorska & C. Florentz

2003

Journal of Molecular Biology, 328, 995-1010

Résumé :

La reconnaissance spécifique des ARNt par leur aminoacyl-ARNt synthétase dépend de jeux d'éléments d'identité, bien définis pour de nombreux systèmes d'aminacylation procaryotiques et cytosoliques eucaryotiques. Seul un nombre restreint d'informations sont disponibles concernant les systèmes d'aminacylation mitochondriaux humains, malgré les particularités liées à la structure non classique des ARNt et leurs implications dans un nombre grandissant de maladies humaines neurodégénératives en raison de mutations dans ces gènes d'ARNt. Une difficulté majeure devant être surmontée concerne la préparation de transcrits *in vitro* actifs permettant une analyse rationnelle des mutations, comme cela est déjà couramment réalisé pour les ARNt classiques. Ici, les propriétés structurales et les propriétés d'aminacylation de l'ARNt^{Leu(UUR)} transcrit *in vitro* sont présentées. L'analyse structurale en solution utilisant une combinaison de sondes enzymatiques et chimiques, a révélé un repliement partiel en forme de L avec une branche acceptrice structurée mais une branche anticodon lâche. L'optimisation des conditions d'aminacylation a permis de charger jusqu'à 75% des molécules, montrant qu'en dépit de la structure partiellement relâchée, l'ARNt^{Leu(UUR)} transcrit *in vitro* est capable de s'adapter à la synthétase. L'analyse de mutants a démontré que la base discriminatrice tout comme le résidu A14 sont des éléments d'identité leucine importants. Ainsi, le système de leucylation humain mitochondrial est dépendant de règles similaires à celles qui s'appliquent chez *E. coli*. L'impact d'un groupe de mutations liées à des pathologies sur l'aminacylation et la structure de l'ARNt a également été étudié. Les variants ne présentent pas de réarrangements structuraux majeurs et soit n'affectent pas l'aminacylation (mutations T3250C, T3271C, C3303T) soit entraînent des effets prononcés. Ainsi de manière intéressante, deux variants présentant une mutation à la même position (A3243G et A3243T) entraînent des pertes d'efficacité dans l'aminacylation nettement différentes (10 et 300 fois respectivement).

II. Article n°3

Reconnaissance de l'ARNt^{Leu(UUR)} mitochondrial humain par la Leucyl-ARNt synthétase correspondante

B. Sohm, M. Sissler, H. Park, M. King & C. Florentz

2003

Soumis à Journal of Molecular Biology

Résumé :

La précision de la synthèse protéique dépend de la reconnaissance et de l'aminocyclation spécifiques des ARN de transfert (ARNt) par leur aminoacyl-ARNt synthétase correspondante. Les règles régissant ces processus ont été établies pour de nombreux systèmes d'aminocyclation procaryotiques et cytosoliques eucaryotiques, mais seules des informations restreintes sont connues pour les systèmes mitochondriaux humains. Récemment, nous avons initié une étude des règles de la leucylation mitochondriale humaine en établissant un système d'aminocyclation basé sur des ARNt transcrits *in vitro*. Il a été observé que l'ARNt^{Leu(UUR)} transcrit, de séquence sauvage, était chargé à 75 % par la leucyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine (LeuRS) en dépit du repliement incorrect de l'ARN. L'analyse structurale en solution à l'aide de sondes enzymatiques a révélé en effet, une déviation prononcée par rapport à la structure secondaire en feuille de trèfle des ARNt classiques, avec un mélange de structures alternatives au niveau des bras D et anticodon. Ceci a soulevé des questions concernant le mécanisme de reconnaissance de l'ARNt^{Leu(UUR)} par la synthétase correspondante et en particulier la contribution des bras D et anticodon dans ce processus.

Ici, nous présentons à la fois une analyse de mutations et une analyse d'empreinte par sondage enzymatique de la LeuRS sur des transcrits *in vitro* et sur l'ARNt^{Leu(UUR)} natif, afin d'étudier la contribution de la branche anticodon dans la reconnaissance par la LeuRS et le rôle de mésappariements C•A dans le repliement et l'aminocyclation de l'ARNt. Le remplacement de mésappariements par une paire de bases G-C dans le bras anticodon ou dans le bras D est suffisant pour induire (i) une structure secondaire en feuille de trèfle, (ii) une augmentation de l'efficacité de l'aminocyclation et (iii) une interaction avec la synthétase suivant un profil identique à l'ARNt natif. Les contacts avec la LeuRS sont situés aussi bien dans la branche acceptrice de l'acide aminé que dans la branche anticodon et dans la boucle D. Nous concluons que la reconnaissance par la LeuRS implique à la fois la branche acceptrice de l'acide aminé et la branche anticodon de l'ARNt^{Leu(UUR)}, une situation nouvelle pour les systèmes d'aminocyclation leucine. L'empreinte par sondage enzymatique sur le transcrit, de séquence sauvage, non structuré, montre des changements structuraux par fixation de la synthétase en faveur d'une adaptation de l'ARNt sur l'enzyme. La construction d'un transcrit pseudo-sauvage possédant une structure en feuille de trèfle et des propriétés d'aminocyclation efficaces permettra de nombreuses études dont la recherche systématique des éléments d'identité leucine dans le système mitochondrial humain.

Recognition of human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} by its cognate leucyl-tRNA synthetase

**Bénédicte Sohm¹, Marie Sissler¹, Hyejeong Park², Michael P. King² and
Catherine Florentz¹**

¹UPR 9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15, rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

²Thomas Jefferson University, 233 South 10th Street, BLSB 308, Philadelphia, PA 19107, USA

Accuracy of protein synthesis depends on specific recognition and aminoacylation of transfer RNAs (tRNAs) by their cognate aminoacyl-tRNA synthetases. Rules governing these processes have been established for numerous prokaryotic systems and eukaryotic cytosolic systems, but only limited information is known for human mitochondrial systems. Recently, we have initiated investigation of the human mitochondrial leucylation rules by setting-up an aminoacylation assay based on *in vitro* transcribed tRNAs. It was observed that the wild-type tRNA^{Leu(UUR)} transcript becomes charged to 75% by human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) despite an incorrect folding of the RNA. Nuclease probing in solution revealed indeed a marked deviation from the classical tRNA cloverleaf secondary structure, with a mixture of alternative structures at the level of the D- and anticodon arms. This raised questions as to the mechanism of tRNA^{Leu(UUR)} recognition by its cognate synthetase, and in particular on the contribution of anticodon- and D-arms in this process.

Here we present both a mutagenic and a footprinting analysis of LeuRS on *in vitro* transcripts and on native tRNA^{Leu(UUR)} aimed at investigating the anticodon branch contribution to LeuRS recognition and the role of C•A mismatches in tRNA folding and aminoacylation. Replacement of mismatches either in the anticodon- or D-stem by G-C pairs is sufficient to induce (i) improved aminoacylation efficiency, (ii) cloverleaf folding and (iii) interaction with the synthetase along a same pattern as native tRNA. Contacts with LeuRS take place as well in the amino acid acceptor stem as in the anticodon stem and the D-loop. We conclude that recognition by LeuRS involves both the amino acid acceptor branch and the anticodon branch of tRNA^{Leu(UUR)}, an unprecedented situation for a leucine aminoacylation system. Footprints on the wild-type unstructured *in vitro* transcript show structural changes of the transcript upon binding to the cognate synthetase, in favor of an adaptation of the tRNA on the synthetase for efficient aminoacylation. Engineering of a pseudo-wild-type *in vitro* transcript with a cloverleaf structure and efficient aminoacylation properties will allow for further investigations among which a systematic search of leucine identity elements in the human mitochondrial system.

Keywords human mitochondrial tRNA, leucyl-tRNA synthetase, footprinting, aminoacylation, mitochondrial disorder

* Corresponding author

Abbreviations: LeuRS, leucyl-tRNA synthetase, mt, mitochondrial.

Introduction

Transfer RNAs (tRNAs) are key molecules during translation of genetic information. Charged by their cognate aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs), they carry the corresponding amino acid to the nascent protein at the level of the ribosome. Specificity of recognition depends on the precise interaction between the two molecules, a process governed by defined sets of chemical elements in both partners and by reciprocal structural adaptations (reviewed e.g. in refs 1,2). Recognition rules between tRNAs and aaRS have been studied for a large number of prokaryotic systems and eukaryotic cytosolic systems, but only limited information is so far available for organelle systems (e.g. ref. 3). However, organelle tRNAs, and especially mitochondrial tRNAs, very often present non-classical "bizarre" structures, markedly deviating from the canonical cloverleaf (e.g. refs 4-8), thus leading to intriguing questions as to the mechanisms of recognition and aminoacylation by their cognate synthetases. While some of these tRNAs are devoid of complete structural domains (e.g. D-arm, T-arm), others show unexpected size variations in these domains and/or nucleotide compositions leading to the absence of classically conserved or semi-conserved nucleotides, and thus to the absence of classical tertiary interactions for three-dimensional folding. Others however, do present all expected sequence and structural features, at least from a theoretical point of view⁷.

Studies towards understanding the aminoacylation rules of human mt tRNA^{Leu(UUR)} by its cognate leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) have been initiated in setting-up a leucylation system based on *in vitro* transcribed tRNA and cloned synthetase⁹⁻¹². Such an approach, based on tRNAs deprived of post-transcriptional modifications, had been validated over the last 20 years for a vast majority of aminoacylation systems from various organisms and allowed for similar results as those obtained by *in vivo* approaches

^{1,13}. Within the 22 human mt tRNAs, tRNA^{Leu(UUR)} is of particular importance since the corresponding gene is a hot spot for point mutations correlated to severe neurodegenerative disorders^{8,14,15}. As much as 21 different pathology-related mutations have been discovered so far in this specific gene, within a total of ~90 mutations over 21 out of the 22 tRNA genes (updated from ref. 16). Since aminoacylation is a key process in translation, investigation of the impacts of mutations at this level is critical for deciphering the molecular mechanisms of the diseases. From a structural point of view, this tRNA was expected to be of classical type (Fig. 1A). However, in our initial studies¹¹, structure probing in solution using nucleases as probes, revealed unexpectedly that *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)} presents only partially the typical structural domains of a tRNA (Fig. 1B). The amino acid acceptor stem and T-arm are formed, but the expected anticodon- and D-arms are absent. In place there are mixtures of alternative structures with large single-stranded stretches of nucleotides, collectively accounted for as "floppy" structures. A similar result was already observed for *in vitro* transcribed human mt tRNA^{Lys}¹⁷. However, in this case the resulting structure was in line with theoretical analysis of the sequence, highlighting the absence of classical structural elements. Despite partial folding of tRNA^{Leu(UUR)}, LeuRS is able to undergo the aminoacylation reaction¹¹. This raised the question as to the mechanisms of recognition of tRNA^{Leu(UUR)} by LeuRS, and especially on the involvement of the anticodon- and D-domain nucleotides/structures in this process. A possible hypothesis is that all elements important for recognition of the tRNA are concentrated within the amino acid acceptor branch (acceptor stem and D-arm) of the 3D-structure of the tRNA and that the anticodon branch (D-arm and anticodon-arm) is not involved at all in the recognition process. An alternative hypothesis would at opposite take into account not only a role for the acceptor branch, but also a role for the anticodon branch. In this case, LeuRS would induce structural or conformational changes in the

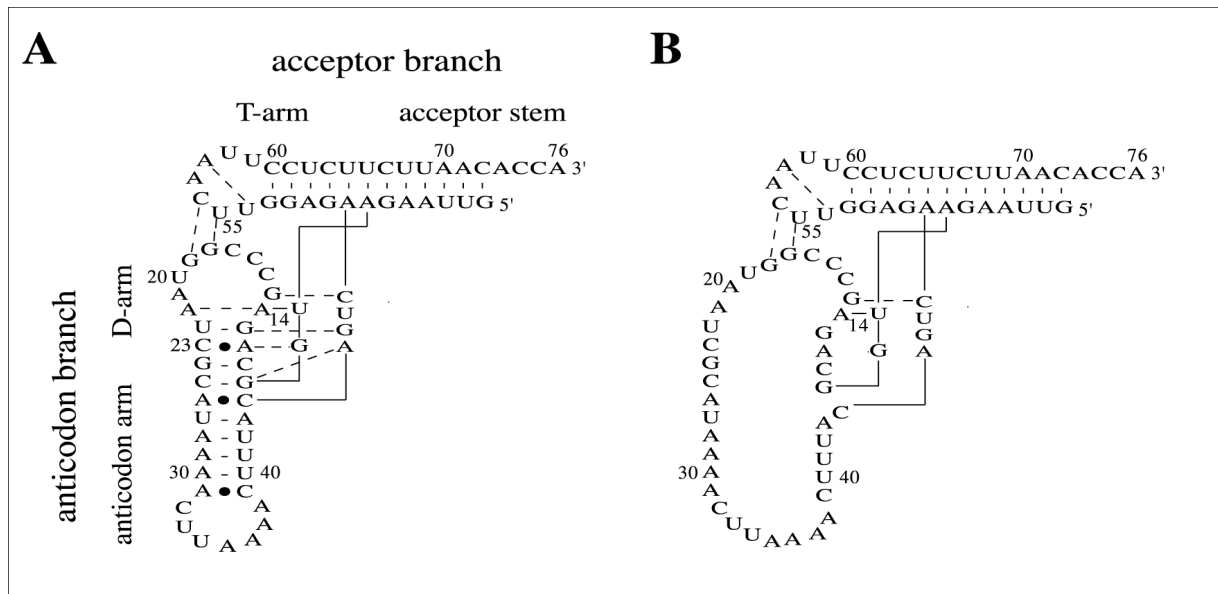


Figure 1. Theoretical *versus* experimental structure of *in vitro* transcribed human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)}. (A) Model for L-shaped tertiary structure highlighting the different secondary structural domains and the presence of nucleotides typically involved in tertiary interactions in canonical tRNAs⁴³. (B) Schematic representation of the experimental solution structure as probed with structure specific nucleases under ionic and temperature conditions allowing for optimal aminoacylation¹¹. The floppy structure of the anticodon branch is the most dramatic deviation from the classical tRNA structure and corresponds to a mixture of several alternative structures all characterized by large single-stranded stretches.

In this case, LeuRS would induce structural or conformational changes in the "floppy" domain, allowing for adaptation of the substrate on the enzyme.

To discriminate between these two hypotheses and estimate the contribution of the anticodon branch towards LeuRS recognition, two experimental approaches have been undertaken here. A mutagenic analysis of mismatches in the D-, anticodon- and amino acid acceptor stems has been performed and correlated to both structural probing in solution and aminoacylation properties of the corresponding variants. Indeed, the particular nucleotides content and the presence of mismatches, a peculiarity of mammalian mt tRNAs⁷, is likely to be responsible for a more flexible structure and an intrinsic weakness of the *in vitro* transcribed tRNAs. In parallel, comparative footprinting experiments were performed on *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)} and on native tRNA^{Leu(UUR)} extracted from human mitochondria to determine the tRNA regions in contact with the synthetase. It is shown that (i) it is possible to generate transcripts

which do have a structure close to that of native tRNA by replacing a single mismatch by a Watson-Crick pair, (ii) these transcripts are more efficient substrates than the wild-type transcript, (iii) both the amino acid acceptor branch and the anticodon branch of the tRNA are involved in the recognition process by the synthetase, a situation which distinguishes the human mt system from all other leucylation systems investigated so far. It is also observed that recognition of the wild-type transcript by LeuRS induces structural changes with the tRNA.

Results

Comparative aminoacylation properties of *in vitro* transcribed and native tRNA^{Leu(UUR)}

Aminoacylation properties of the wild-type *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)} were established in a comparative way to those of native tRNA^{Leu(UUR)} extracted from human mitochondria. Purification of fully modified tRNA^{Leu(UUR)} was performed by hybridization to complementary oligonucleotides of total

tRNA from human cells. Since this approach leads to restricted amounts of material¹⁰, classical kinetic parameter determination based on incorporation of labeled amino acid into trichloroacetic acid precipitable material could not be performed. Therefore, the recently described very sensitive approach based on 3'-end [³²P] labeled tRNA was chosen¹⁹. This does not allow for measurement of individual kinetic parameters but only of the ratio k_{cat}/K_M , representative of the aminoacylation efficiency. Results obtained under optimal aminoacylation conditions, i.e. in the presence of 12 mM MgCl₂ and 2.5 mM ATP¹¹ are presented in Table 1. The wild-type tRNA^{Leu(UUR)} transcript is efficiently leucylated with only a 16-fold lower efficiency than native tRNA. This result even restricts the 25-fold gap between these two types of LeuRS substrates as measured in the presence of lower magnesium concentration¹⁰. The 16-fold difference in efficiency however highlights the contribution of post-transcriptional modifications to tRNA^{Leu(UUR)} aminoacylation. This contribution can either be of direct type (important contact with the enzyme) or of indirect type (post-transcriptional modifications are well known to stabilize tRNA conformations²¹ or folding²²).

Table 1. Comparative aminoacylation efficiencies (k_{cat}/K_M) of native and *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)} by human mt LeuRS.

mt tRNA ^{Leu(UUR)}	human mt LeuRS	
	k_{cat}/K_M ($10^{-3} \text{ sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	k_{cat}/K_M relative
Transcript	3.36 ± 1.2	1
Native	54.84 ± 5.1	16.3

Aminoacylation reactions were as described in Materials and Methods according to ref. 19. Means and standard deviation were obtained from three independent experiments.

Investigation of mismatches

Analysis of the theoretical cloverleaf secondary structure of human mt

tRNA^{Leu(UUR)} reveals the presence of A•C mismatches both in the D-stem and in the anticodon stem respectively (Fig. 1A.). These pairs, located near the connected D- and anticodon loops, are ideal candidates contributing the floppy folding of the anticodon branch (anticodon stem and loop + D-stem and loop) of the *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)}. Indeed, A12•C23 neighbors a weak G-U pair, enabling for enlargement of the D-loop and shortening of the D-stem. Mismatch A31•C39 terminates the anticodon stem otherwise formed exclusively by weak A-U pairs. At opposite, both the acceptor stem and the T-stem, forming the acceptor branch of the L-shaped tRNA (Fig. 1), contain only classical A-U and G-C Watson-Crick pairs allowing for a stable regular helical structure.

In an attempt to stabilize the structure of the transcript, i.e. to convert the floppy anticodon branch into a well-structured domain, a mutagenic analysis of the two A•C mismatches has been performed. They have been individually replaced by Watson-Crick pairs or converted into alternate mismatches (Fig. 2). A first series of variants concern the D-stem. Thus, A12•C23 has been replaced by G12-C23 (variant L3), by A12-U23 (variant L4T), as well as by A12•G23 (variant L4G). A second series of variants focuses on the anticodon stem where mismatch A31•C39 has first been replaced by G31-C39 (variant L5). A stronger stabilization was designed by replacing the two last base-pairs of the anticodon stem at once, creating a double mutant with the pairs G30-C40/G31-C39 (variant L6). Finally, a variant with the reverse mismatch C31•A39 was created (variant L7).

To further investigate the contribution of mismatches to tRNA^{Leu(UUR)} structure and aminoacylation activity, a C•A mismatch was introduced into the amino acid acceptor stem. To select for an adequate position along the stem, the sequence of tRNA^{Leu(UUR)} has been compared to tRNA^{Leu(CUN)}, the second leucine isoacceptor tRNA in human mitochondria. These two tRNAs share two strongly

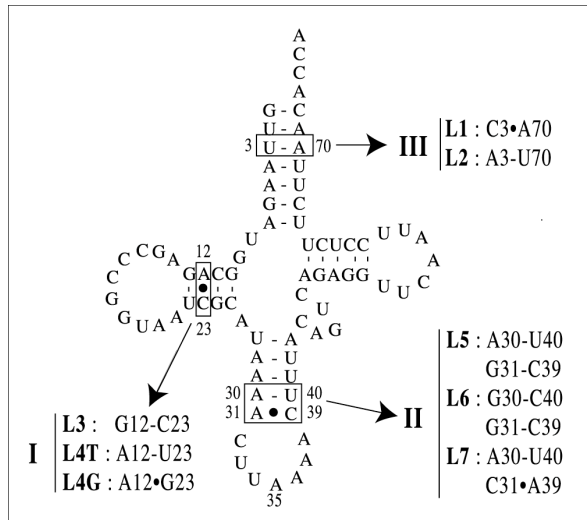


Figure 2. Design of human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} variants. Three domains of the tRNA were mutated and corresponding variants produced by *in vitro* transcription of cloned synthetic genes. Changes performed at different positions are indicated next to the variant names. Numbering of nucleotides is according to classical tRNA rules⁴⁴.

conserved base-pairs within the acceptor stem, namely U3-A70 and A7-U66. The base-pair closest to the amino acid binding site has been selected and U3-A70 has been either replaced by C3•A70 (variant L1) or reversed into A3-U70 (variant L2) to verify the contribution of the individual nucleotides of this pair to aminoacylation (Fig. 2).

Aminoacylation properties of the different *in vitro* transcribed variants

All variants were tested for their efficiency to be charged by human mt LeuRS, under optimal aminoacylation conditions¹¹, i.e. in the presence of 12 mM MgCl₂ and 2.5 mM ATP. Kinetic parameters k_{cat} and K_M are recorded in Table 2, and allow for comparison of the aminoacylation efficiencies (ratio k_{cat}/K_M) of variants with that of wild-type transcript. Both D-stem variants L3 and L4T, with Watson-Crick pairs replacing the A12•C23 mismatch show an improved aminoacylation efficiency with a 2.2- to 3.8- fold gain. In both cases, this is due to a decrease in K_M value. At opposite, replacement of one mismatch by another one (variant L4G) induces a 18.3 fold loss in

aminoacylation efficiency. Here, the K_M is unaffected but k_{cat} is about 20-fold decreased. Those anticodon stem variants aimed at stabilizing the secondary structure show about 5-fold gains in leucylation efficiency as compared to wild-type tRNA^{Leu(UUR)}. Effects are the same for both variants L5 and L6 showing that insertion of a single G-C pair is sufficient and that a second, neighboring, G-C pair does not further improve aminoacylation. In these cases, gains in aminoacylation efficiency are mainly due to increase in k_{cat} . Conversion of mismatch A31•C39 to C31•A39 does not significantly affect the aminoacylation properties of the tRNA, suggesting that the nature of nucleotides at positions 31 and 39 does not influence recognition by LeuRS. Interestingly and in summary, introduction of Watson-Crick pairs in the D-stem enables more efficient aminoacylation by K_M effect and in the anticodon stem by k_{cat} effect.

Table 2. Apparent kinetic parameters of human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase for *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)} derivatives.

mt tRNA ^{Leu(UUR)} variants	human mtLeuRS					
	K_M (μ M)	k_{cat} (10^3 sec^{-1})	k_{cat}/K_M ($10^3 \text{ sec}^{-1} / \mu\text{M}$)	k_{cat}/K_M relative	Loss (x-fold)	Gain (x-fold)
Wild-type	17.9	24	1.34	1	1	1
D-stem variants: A12•C23 ->						
L3: G12-C23	5.4	16.2	3	2.24	-	2.2
L4T: A12-U23	2.8	14.3	5.1	3.81	-	3.8
L4G: A12•G23	16.6	1.2	0.073	0.05	18.3	-
Anticodon stem variants: A30-U40/A31•C39 ->						
L5: A30-U40/G31-C39	10.9	81	7.43	5.54	-	5.5
L6: G30-C40/G31-C39	11.4	73.1	6.41	4.78	-	4.8
L7: A30-U40/C31•A39	15.8	14.5	0.92	0.68	1.45	-
Acceptor stem variants: U3-A70 ->						
L1: C3•A70	15.0	0.4	0.026	0.02	50	-
L2: A3-U70	14.6	10.3	0.70	0.52	1.90	-

Aminoacylation reactions were as described in Materials and Methods. Loss values for duplicates varied by <10% except for variant L1 for which kinetic parameters were difficult to reproduce and varied from 6 to 24 μ M for K_M and 0.1 to 0.8 10^3 sec^{-1} for k_{cat} .

Insertion of a C3•A70 mismatch within the acceptor stem of the tRNA^{Leu(UUR)} leads to a strong decrease in aminoacylation efficiency (~50-fold loss) with a dramatic effect on k_{cat} . Replacement of the U3-A70 pair by an A-U pair has a limited (2-fold loss) effect, suggesting that the structure, rather than the sequence elements of the 3-70 pair is important for LeuRS.

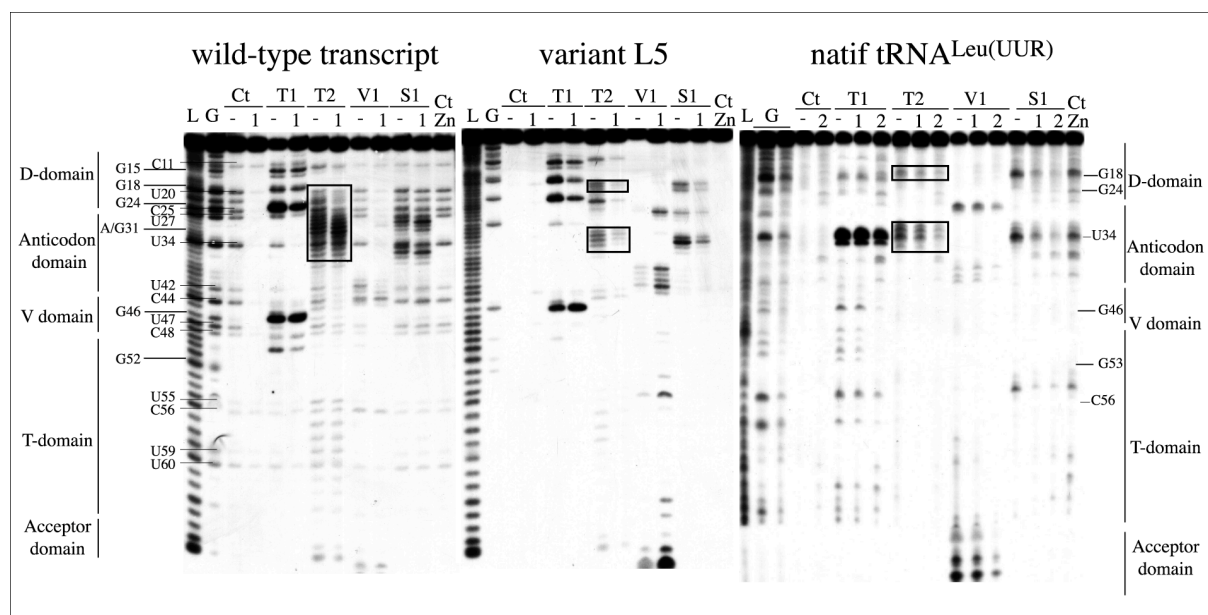


Figure 3. Typical autoradiograms of solution structure probing and of footprinting in presence of human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, of different human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} derivatives. In the displayed experiments, tRNAs were 3'-end labeled and cleavage products were separated on 12% polyacrylamide/8M urea gels. Probing was done at 4°C in the presence of 12 mM MgCl₂ (see Methods for details). L, alkaline ladder; G, RNase T1 digestion ladder under denaturing conditions; Ct, control incubation without any treatment, CtZn, control incubation in nuclease S1 buffer containing 1 mM ZnCl₂; T1, T2, V1, S1, digestion in the presence of specific nuclease or ribonuclease under non denaturing conditions in the absence (-) or the presence (1, 2) of LeuRS. In each experiment, RNA concentration was 1 μ M and LeuRS concentration 10 μ M (1) or 40 μ M (2). Numbering of nucleotides appears along the left and right parts of the autoradiograms. Typical degradation sites are also indicated along the left side. The three panels correspond to wild-type *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)}, *in vitro* transcribed variant L5 presenting an anticodon stem in which the mismatch A31•C39 has been replaced by a G31-C39 pair and native tRNA^{Leu(UUR)} extracted from human cell lines.

Variant L5 is the most efficient substrate for LeuRS within the series of transcripts tested above and has thus been further analyzed. It was favored with regard to variant L6, quite as efficiently aminoacylated, since the restricted numbers of mutations it contains. Its aminoacylation properties have been confirmed using the Wolfson's approach (not shown), which places it in between the wild-type and the native tRNAs.

Solution structure probing of variant L5

Solution structure of variant L5 has been established and compared not only to that of the wild-type transcript but also to that of native tRNA^{Leu(UUR)}. This tRNA, only accessible in limited amounts by specific oligonucleotide hybridization¹⁰, has all the post-transcriptional modifications. Probing has been performed at 4°C in the presence of

12 mM MgCl₂, using single-strand specific nuclease S1 and ribonucleases T1 and T2, as well as nuclease V1, sensitive to higher order structures²³. Transcripts were 5'-end and/or 3'-end labeled and cleavage fragments were revealed on 12% and 8% denaturing polyacrylamide gels. Representative autoradiograms of 12% polyacrylamide gels are presented in Figure 3 and mean results of several experiments are summarized in Figure 4. Control incubations without probes confirmed the intrinsic weakness of the wild-type transcript at pyrimidine-A bounds (as already described¹¹). All degradations are annotated on the left side of the autoradiograms. Most striking and typical reactivity for the wild-type transcript corresponds to strong cleavages by single-strand specific enzymes all along nucleotides 20 to 34 as well as cleavages by the double-strand specific enzyme within the same domain, namely from residue C17 to A30.

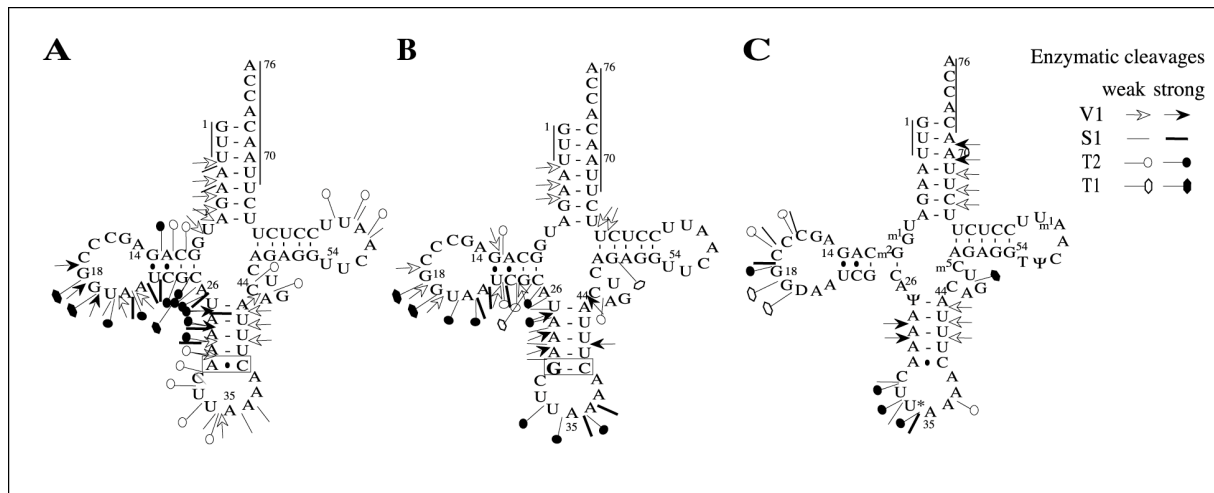


Figure 4. Location of enzymatic cleavage sites on cloverleaf diagrams of wild-type *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)} (A), *in vitro* transcribed variant L5 (B), and native tRNA^{Leu(UUR)} (C), as probed by various nucleases and ribonucleases. Numbering of nucleotides is as in Figures 1 and 2. Nucleotides which could not be tested are marked by a line. The primary sequence of the native tRNA is according to ²⁴. Abbreviation of post-transcriptional modifications is according to ref. 44. Modification of U34 is 5-taurinomethyl-uridine ^{25,45}.

Also, residues G18, G19 and G24 are strongly reactive to nuclease T1 digestion. The global cleavage pattern is in agreement with a floppy anticodon domain structure and a well-folded amino acid acceptor stem and T-stem and loop ¹¹. Variant L5 shows a clearly different cleavage pattern in the D- and anticodon domains, with strong single-strand specific enzyme cleavages restricted to short stretches of nucleotides within D-loop (residues G18, G19, U20 and A20:1) and anticodon loop (residues U33, U34 and A35), and nuclease V1 cleavages in the D-stem (residues A12, U22 and C23) and in the anticodon stem (residues U27, A28, A29, U40 and A44). Especially strong differences in ribonuclease T2 cleavage patterns of wild-type transcript and of variant L5 can be easily appreciated in the gel presented in Figure 3. Also, while residues G18 and G19 remain accessible to ribonuclease T1, G24 is less strongly cleaved than in the wild-type transcript. Altogether, these results support the existence of both a well-defined D-stem and loop and a well-defined anticodon stem and loop in variant L5. In other words, this variant has a cloverleaf-like secondary structure. However, this structure is not unique since some weak single-strand specific cleavages overlap with double strand specific cuts (for residue A12 and from U22 to A29), suggesting that a limited sub-

population of transcript L5 still conserves a floppy anticodon branch structure.

Solution structure probing of native, fully modified tRNA^{Leu(UUR)} extracted from human mitochondria leads to clear cut cleavage patterns (Fig. 3 and 4). Single-strand specific nucleases strongly cleave residues C16, C16:1, C17, G18 and 19 from the D-loop and residues C32, U33, U34 and A35 from the anticodon-loop. In addition, nuclease V1 cleaves residues A28, A29, U40, U41 and U42 in the anticodon stem. These cleavage positions are typically in agreement with the presence of a D-arm and an anticodon arm. A strong nuclease V1 cleavage pattern at the 3'-end of the tRNA (from residues U66 to A70) is in agreement with the presence of a well-structured acceptor stem. In this tRNA, as well residues G18 and G19 as residue G24 are protected from strong cleavage by ribonuclease T1 indicating that they might be involved in long distance interactions (G18 and G19).

In summary, structure probing shows that variant L5 has structural properties close to those of native tRNA, especially in the anticodon and D-domains, but clearly distinguishing from the wild-type transcript. It folds mostly into a cloverleaf secondary structure. However, according to the different reactivity to the enzymatic probes, some subtle structural differences still distinguish

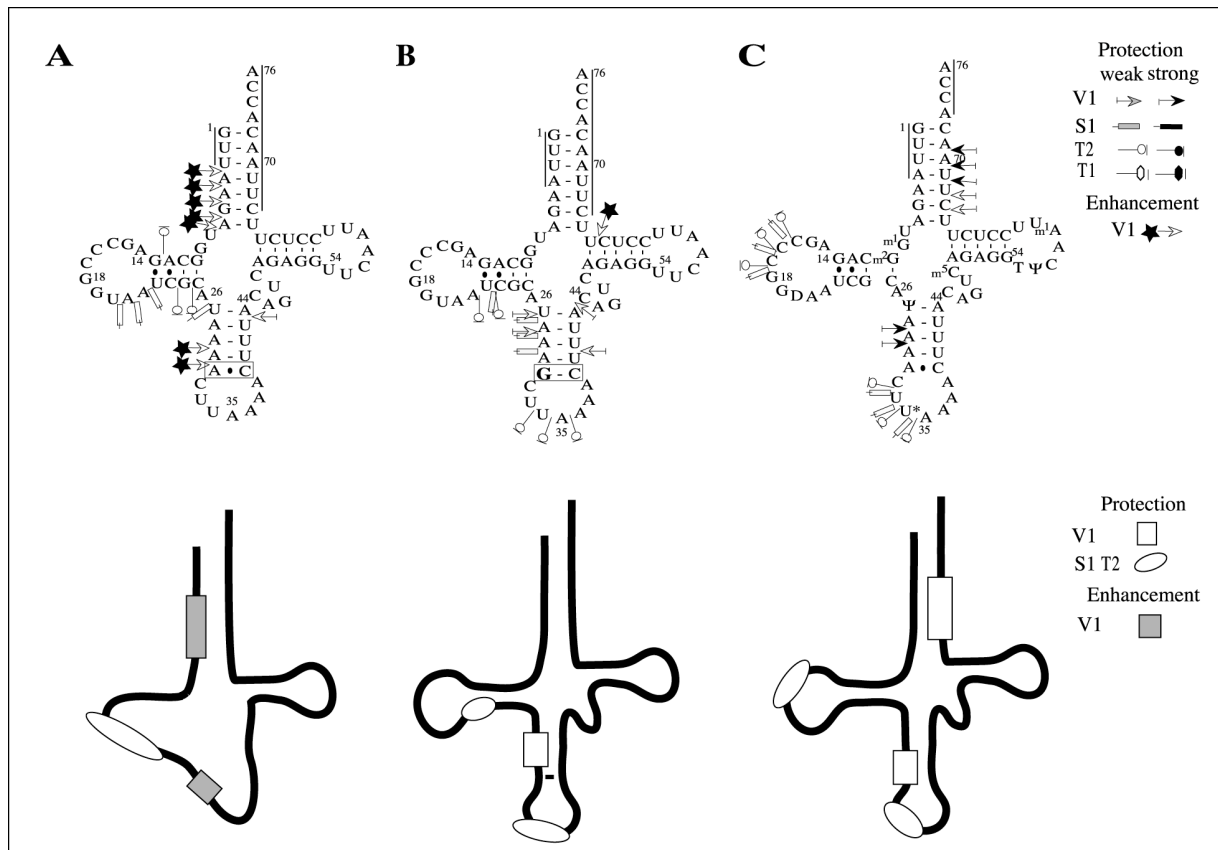


Figure 5. Footprints of human mitochondrial LeuRS on wild-type *in vitro* transcribed tRNA^{Leu(UUR)} (A), *in vitro* transcribed variant L5 (B), and native tRNA^{Leu(UUR)} (C). Symbols indicate protection by LeuRS against cleavages by the various enzymatic probes, as indicated in the inset. The bottom part of the Figure corresponds to a schematic representation of footprint patterns.

this transcript from native tRNA. We conclude that variant L5 is a structural intermediate between initial wild-type transcript and native tRNA^{Leu(UUR)}.

Footprints of Leucyl-tRNA synthetase on three efficient substrates tRNA^{Leu(UUR)}

Structural probing in the absence and in the presence of an excess of human mt LeuRS enables to footprint the enzyme on the different tRNAs. Experiments presented in the above paragraph were reconducted in the presence of 10 μM or 33 μM of LeuRS, respectively (lanes labeled “1” or “2” in Fig. 3) and are summarized in Figure 5. Native tRNA^{Leu(UUR)} is protected by LeuRS from nuclease cleavages in several domains (Fig. 5C). Strong protections against nuclease V1 are observed along the amino acid acceptor stem and in the anticodon stem. Weak protections against single-strand specific nucleases S1 and T2 are seen in the

anticodon- and D-loops (5' side of residues G18-G19). Protection patterns of the two transcripts are less clear out than for native tRNA. This is likely linked to the presence of alternate conformations to a large extent for the wild-type transcript and to a smaller extent for variant L5, as well as to the low affinity of both transcripts for LeuRS (K_M in the 10 μM range). Moreover, in the presence of 10 μM or 33 μM of synthetase, theoretical considerations show that only ~50% of complexed forms of tRNAs can be obtained. However, higher LeuRS concentrations could not be tested since the enzyme precipitates.

Variant L5 shows a similar protection pattern to native tRNA, especially along the anticodon stem (residues U27, A28, A29, U40 and A43) and loop (U33, U34 and A35). Further, some protections are seen at the 3' end of the D-loop (residues A21 and U22). Unfortunately, it was not possible to test for protections within the acceptor stem. Probing of wild-type tRNA^{Leu(UUR)} transcript in

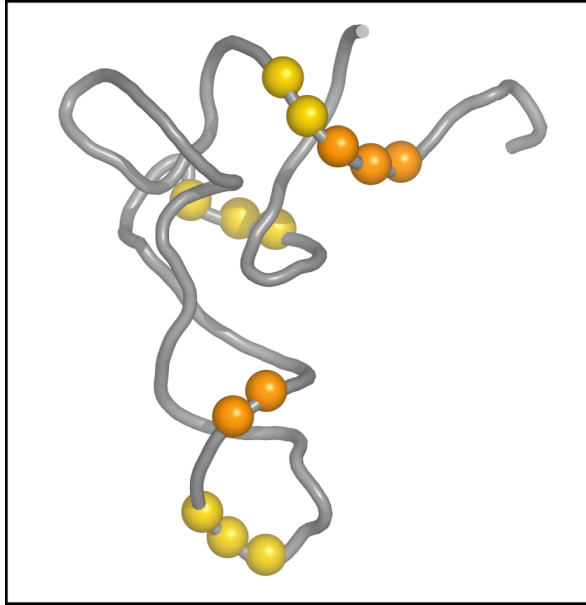


Figure 6. Footprint pattern of human mt LeuRS on mt tRNA^{Leu(UUR)}. As model of three-dimensional structure of tRNA^{Leu(UUR)}, the crystallographic structure of *E. coli* tRNA^{Gln} has been chosen⁴⁶. This choice was governed by the fact that both tRNAs are aminoacylated by a class I synthetase^{47,48} and that the two tRNAs share a variable loop of same size. Balls correspond to phosphodiester bonds of native tRNA^{Leu(UUR)} protected by LeuRS from cleavage with nucleases. Strong protections are indicated in dark gray and weak protections are indicated in light gray.

presence of LeuRS reveals both protections against cleavages and enhancements of some cleavages. Protections are observed at the 3' end of the putative "D-loop" (residues U20, A20:1 and A21), as was the case for variant L5, and at the level of nucleotides 23, 24 and 26. Interestingly, cleavage enhancements occur for nuclease V1, at the level of nucleotides 29 and 30 and along the amino acid acceptor stem. Since this enzymatic probe is specific for double stranded or higher ordered domains, and since enhancements in the anticodon domain occur at positions where V1 cleavages are observed in variant L5 and native tRNA, these results are in favor of LeuRS induced folding of the transcript. However, changes are not sufficient to allow for contacts of this transcript by LeuRS in a same way as native tRNA or variant L5.

Discussion

In a previous work, it was shown that despite its conventional primary sequence, *in vitro* transcribed human mt tRNA^{Leu(UUR)} does not fold into the expected cloverleaf secondary structure and L-shaped 3D structure, but displays a "floppy" anticodon branch formed of a mixture of alternative structures. Only the amino acid acceptor branch is formed. However, this substrate is aminoacylated by the cognate human mt LeuRS in an appreciable way. We show herein that the gap in aminoacylation efficiency is only 16-fold when compared to native tRNA^{Leu(UUR)} extracted from human mitochondria, confirming that the synthetase can recognize a non classical tRNA structure. Further, this demonstrates that the 9 post-transcriptional modifications present in this tRNA²⁴⁻²⁶ do contribute to leucylation but in a moderate way.

These results suggested a major contribution of the well-folded acceptor branch for efficient aminoacylation but left unexplored the contribution of the anticodon branch. The mutagenic analysis and footprinting experiments performed here are in favor of the contribution of the two tRNA domains in recognition and aminoacylation of tRNA^{Leu(UUR)} by LeuRS.

Importance of the amino acid acceptor branch to recognition by LeuRS

Major contribution to leucylation of the amino acid acceptor branch was reported previously in highlighting the crucial role of the discriminator base A73¹¹. Here, footprints of LeuRS on native tRNA^{Leu(UUR)}, reveals that the 3' side of the acceptor stem (nucleotides 66 to 70) is in close contact with the synthetase.

Inspection of tRNA^{Leu(UUR)} sequence reveals the presence of two mismatches, both within the anticodon branch, and none in the amino acceptor branch. This partition was considered here and a mismatch was purposely introduced in the amino acceptor branch to estimate the requirement of a

structured domain in this part of the tRNA. Replacement of the single base-pair U3-A70, common to the second leucine isoacceptor tRNA in human mitochondria (and to most mammalian mt tRNA^{Leu} sequences⁷), by a C3•A70 mismatch leads to an 50-fold decrease in aminoacylation efficiency. Exchange of the initial pair by the opposite combination A3-U70 has however no effect, showing that the structure rather than the sequence is of importance. The strong negative k_{cat} effect observed by the mismatch insertion, shows the importance of the A-U for signal transmission to the catalytic site of the enzyme. This shows that despite its tolerance to a floppy anticodon branch, LeuRS does not accept a relaxed structure within the amino acid acceptor branch. The natural absence of mismatches within this part of the tRNA, prevents any risk of destabilization and thus, of tRNA malfunctioning.

Contribution of the anticodon branch to recognition by LeuRS

As first attempt to test for the contribution of the anticodon branch of tRNA^{Leu(UUR)} in the recognition process of its substrate by LeuRS, it was verified if structural stabilization leads to improved aminoacylation. Indeed, conversion of either of two mismatches, A12•C23 and A31•C39, present within tRNA^{Leu(UUR)} anticodon branch into canonical A-U and/or G-C pairs, leads to 2.8- to 5.5-fold improved leucylation efficiencies when compared to the wild-type transcript. These gains in leucylation efficiency are important since at most a 16-fold increase can be expected, which corresponds to the distance between the wild-type transcript and the native tRNA, optimal substrate for LeuRS. Interestingly, stabilization in either the D-domain or the anticodon-domain, have a same global positive effect. However, since kinetic parameters are affected differently when considering the two sites of mutation, each domain contributes to aminoacylation in a different mechanistic way. Indeed, while

mutations of nucleotides in the D-domain lead mainly to K_M effects, mutations in the anticodon stem lead to k_{cat} effects. To be noticed, is the fact that a single mutation in the anticodon stem at base-pair 31-39 (variant L5) has the same effect than a double mutant in which two neighboring pairs have been stabilized (pairs 31-39 and 30-40; variant L6). Replacement of A30-U40 by G30-C40 was reported independently to improve aminoacylation efficiency by a factor 2.3¹².

Probing experiments performed on wild-type transcript and on one representative variant with improved aminoacylation capacity (mutant L5) revealed strong differences in cleavage patterns in comparison to native tRNA^{Leu(UUR)} and thus confirmed a structural improvement. Reactivity to enzymatic probes supports the existence of both well-defined anticodon- and D-arms and thus a cloverleaf-like folding. Interestingly, the single stabilization of base-pair 31-39 has long-range effects on the structure of the D-domain, showing that structural stabilization is spreading all along the anticodon branch. Further, control experiments performed in the absence of nucleases show an intensity decrease in spontaneous degradations at pyrimidine-A sites as compared to wild-type transcript.

Noteworthy, one of the studied mutations, A12-U23 replacing the natural mismatch A12•C23 within the D-stem, has been reported as a polymorphism in several individuals²⁷ and was thus expected to be harmless to the affected gene and gene product. The present results are in-line with these expectations. Another mutation at the same position, A12•G23, has been reported as linked to a severe mitochondrial myopathy²⁸. This mutation was found herein to decrease aminoacylation efficiency 18-fold. Thus, A•C or A•G mismatches are not equally considered since the first is tolerated while the second is not. The detailed mechanisms of this discrimination remain to be investigated. However, the large k_{cat} effect observed suggests that signal transmission to the catalytic site of the enzyme is affected.

	<i>H. volcanii</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i> cytosol	<i>P. vulgaris</i> cytosol	<i>H. sapiens</i> cytosol	<i>H. sapiens</i> mitochondria
Important for recognition by cognate aaRS	A73 variable arm	A73 A14 15-48 18-55, 19-56 D-loop	A73 A35 and G37	binding to anticodon stem, D-stem, and hinge region between D- and anticodon- stems	A73 C3-G70, A4-U69, G5-C68 C20a variable arm	A73 A14 binding to acceptor stem, anticodon domain and D-loop
Not important for recognition by cognate aaRS	D-loop and anticodon arm	variable arm and anticodon arm	D-loop and variable arm	?	?	

Figure 7. Schematized view on recognition of various leucine specific tRNAs by their cognate aminoacyl-tRNA synthetases. See text for references. Experimental procedures used are recalled in the bottom of the Figure.

Contribution of the anticodon branch was further confirmed by footprinting experiments of LeuRS on both native tRNA^{Leu(UUR)} and variant L5. The interaction patterns established for both tRNAs highlight contacts with D-loop, with the 5'-side of the anticodon stem and with the 5' side of the anticodon loop. When all protection data are displayed on a three dimensional tRNA structure (Fig. 6), it appears that protected regions lie on both sides of the L-shaped tRNA in such a way that the enzyme would embrace the tRNA. A similar situation was observed between bean cytoplasmic LeuRS and several cognate and non-cognate tRNAs (footprinting experiments with the chemical probe ethylnitrosourea²⁹). Interestingly, the recent resolution of the crystal structure of the complex between LeuRS and tRNA^{Leu} from *Thermus thermophilus*, an extreme thermophile bacteria, shows direct contacts at the levels of the acceptor stem, the anticodon domain, and noticeably of the D-loop of the tRNA, contacted by the C-terminus extension of the enzyme (S. Cusack, personal communication).

The exact contribution of the anticodon branch of tRNA^{Leu(UUR)} to leucylation efficiency remains to be solved but may be linked to different mechanisms since mutations in the D-domain and anticodon-domain lead to K_M or k_{cat} effects, respectively. The anticodon branch may display specific architectural characteristics required for optimal tRNA positioning (as is the case for many aminoacylation systems¹). It may also contain yet unidentified identity elements (in addition to residue A14¹¹) whose optimal presentation to the synthetase depends on the overall tRNA scaffold.

Particular features of the human mitochondrial leucylation system

The outcome of the present study is the contribution of both the tRNA amino acid acceptor branch and anticodon branch in recognition and aminoacylation by the cognate LeuRS. This is an unprecedented situation in regard of leucine specific aminoacylation systems. Elements important for recognition of leucine-specific tRNAs by

their cognate synthetase have been described for prokaryotic and eukaryotic systems (summarized in Fig. 6). These include *Haloferax volcanii*³⁰, *Escherichia coli*³¹⁻³⁵, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*³⁶, the bean cytosolic system²⁹, as well as the human cytosolic system^{37,38}. Interestingly, and as already highlighted by the different contributors (reviewed refs 30,35), these elements differ from one system to the other. This is *per se* an unusual situation for recognition of tRNAs by their cognate synthetases. Indeed, major aminoacylation identity elements are classically conserved along evolution, with only minor changes within different species¹.

For the leucine system, the situation is quite different with species-specific important elements. In *H. volcanii*, A73 and the variable region (especially positions 47c, d, and h) are essential for leucylation³⁰. In *E. coli*, most important elements are A73, A14 and some additional structural features from the core of the tRNA molecule involved in tertiary interactions (A15-U48, location of G18 and G19 within the D-loop, U54-A58, and residue 47n in the variable region)^{31,33-35,39,40}. In *S. cerevisiae*, in addition to A73, two nucleotides within the anticodon loop, A35 and G37, are involved³⁶. Further, footprinting experiments revealed that bean cytoplasmic LeuRS directly contacts the anticodon domains as well as the D-stem and the hinge region between D- and anticodon-stems of different tRNAs (*Phaseolus vulgaris*, *S. cerevisiae* and *E. coli* tRNA^{Leu})²⁹. Finally, in the human cytosolic leucylation system, nucleotide A73 as well as three base-pairs from the acceptor stem (C3-G70, A4-U69, G5-C68), nucleotide C20a in the D-loop and the variable region all contribute^{37,38}. Important elements within the human mt tRNA^{Leu(UUR)} for recognition and aminoacylation by the cognate LeuRS fit with neither category, and form a new pattern (Fig. 6). The contribution of the discriminator nucleotide is the only common element to all systems tested so far. The present study confirms and extends the

variability of tRNA recognition patterns by LeuRSs.

Structural adaptation of the wild-type transcript during interaction with LeuRS

Wild-type tRNA^{Leu(UUR)} produced by *in vitro* transcription folds into a mixture of alternative structures in regard of the anticodon branch, leading globally to a "floppy" anticodon branch. Interestingly, footprints highlight an increase in reactivity of this domain, after protection by LeuRS, towards the double strand specific nuclease V1. Further, increased cleavages are also observed within the amino acid acceptor stem. These results strongly support structural changes within the tRNA after binding by the synthetase. Especially, structured helical domains are built up.

Conformational adaptation of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases enabling catalysis are well known events and have been supported by a large experimental panel (reviewed in¹). In particular, movement of the tRNA anticodon domain towards the enzyme, or of the 3' end of the acceptor stem allowing entry to the catalytic site or to the editing sites of the enzyme, were highlighted by solving the crystal structures of several tRNA/synthetase complexes. Conformational changes induced by aminoacylation of the tRNAs, were proposed for human mt tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu(UUR)} after analysis of charged and uncharged tRNAs on denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)⁴¹. The results were interpreted in terms of conformational changes at the 3' end of the amino acid acceptor stems of both tRNAs. Recently, a drastic structural change of a tRNA has been reported as induced by a post-transcriptional modification enzyme⁴². In this case, the initially "L"-shaped tRNA folds into an alternative "□"-shaped structure enabling the enzyme to approach the nucleotide to be modified. It is tempting to explore a parallel situation for mt tRNA^{Leu(UUR)} transcript which folds into a mixture of alternative structures, none of which (or only a limited part of the

molecules) having a cloverleaf secondary structure and thus an "L"-shaped tertiary structure. Contact with the synthetase likely shifts the non-tRNA substrate towards a substrate with sufficient structural information enabling aminoacylation.

Outlook

The similarity in structural and functional results obtained for variant L5 and the native tRNA, shows that the engineered *in vitro* transcript mimics correctly the natural tRNA and can be used as "pseudo-wild type" substrate for further investigations. A systematic investigation of leucine identity by mutagenic analyses is now possible. This will help deciphering structural elements as well as individual nucleotides involved in leucylation, and understanding this unique aminoacylation system. Further, it will allow to test for possible impacts of mutations correlated to pathologies on tRNA^{Leu(UUR)} aminoacylation and/or structure. Let us recall that 21 different mutations have been reported in the sole gene of this tRNA, and only a handful of these has been tested so far for aminoacylation^{10-12,25}.

Materials and Methods

Materials

Restriction enzymes were from New England Biolabs and T4 DNA ligase from Boehringer-Mannheim. PCR-purified oligonucleotides were from Interactiva. Phage T7 RNA polymerase was prepared from an over-expression clone¹⁸. BL21(DE3)-CodonPlus RIL was from Stratagene. Rotiphorese Gel 40 solution of acrylamide and N,N'-methylene-bis-acrylamide (19:1) were from Carl Roth. Radioactive [³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) and [³H]-leucine (153 Ci/mmol) were from Amersham (Orsay, France) and [³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) from Perkin-Elmer. T4 polynucleotide kinase was from Ozyme, and *E. coli* tRNA nucleotidyl transferase was

kindly provided by Anne Théobald-Dietrich. Nuclease S1 was from Pharmacia, ribonuclease T1 from IRL, ribonuclease V1 from Amersham and ribonuclease T2 from Invitrogen.

Production of mitochondrial tRNAs by *in vitro* transcription

Synthetic genes corresponding to the T7 RNA polymerase promoter, connected to the downstream sequence of a hammerhead ribozyme followed by the tRNA sequence and terminating at a *Bst*N1 site, were constructed from overlapping and complementary oligodeoxynucleotides and cloned. Amplification of nine clones was done in *E. coli* TG1 cells. Upon transcription, self cleavage of the hammerhead ribozyme liberates the full length tRNA. After phenol/chloroform extraction, the transcripts were purified on denaturing 12% polyacrylamide/8M urea gels, electroeluted and ethanol-precipitated. All these steps were done according to previously described procedures¹¹.

Purification of native mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} from human cell lines

Native tRNAs were prepared from the wild-type human osteosarcoma cell line AF126.111 as described¹⁰ and total tRNAs extracted using a DNA/RNA purification kit (Qiagen). Specific mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} was isolated from total tRNA by hybridization to a biotinylated oligonucleotide complementary to 33 nucleotides at the 3' end of the tRNA, bound to streptavidin coated Dynabeads. The tRNA^{Leu(UUR)} eluted from the oligonucleotide was further purified by electrophoresis through 20% polyacrylamide-7M urea gels. Typically, 13 pmoles of native tRNA^{Leu(UUR)} was isolated from wild-type cells.

Over-expression and purification of Leucyl-tRNA synthetase

The gene for human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) encodes 903 amino acids including an N-terminal mitochondrial targeting sequence. A mature enzyme of 864 amino acids (Δ 39-LeuRS) with a C-terminal His-tag, was expressed in BL21-CodonPlus (DE3)-RIL strain as described¹⁰. Purification was done by nickel affinity chromatography (Ni-NTA Superflow, Quiagen) using a 10-250 mM imidazole gradient. After dialysis, the enzyme was stored at -20°C in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 150 mM KCl, 50% glycerol, 1 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol. Proteins were quantified by the Bradford method using bovine serum albumin as reference. For footprinting experiments, the enzyme was extemporaneously dialysed against 12 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 25 mM KCl.

Aminoacylation reaction

Aminoacylation of tRNA transcript using [³H]-leucine. Aminoacylation conditions for *in vitro* transcripts, optimized both for the enzyme activity and for the structural renaturing step of the transcripts were as previously described¹¹. Briefly, transcripts were heated for 2 min at 60°C followed by addition of 5X aminoacylation buffer, amino acid, and slowly cooled to room temperature. Aminoacylation reactions were initiated by addition of enzyme and were performed at 30°C . Final conditions were 50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 25 mM KCl, 12 mM MgCl_2 , 2.5 mM ATP, 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, 1 mM spermine, 50 μM [³H]-Leucine (153 Ci/mmol) and adapted tRNA and enzyme concentrations. At different times, aliquots were spotted on 3MM Whatman filter papers and precipitated in cold 5% trichloroacetic acid to terminate the reaction. Incorporation of radioactive leucine was measured by liquid scintillation counting. Aminoacylation plateaus were estimated over 30 min incubation time, using 1.4 μM transcripts and 500 nM of LeuRS. The charging levels (optimal leucylation plateaus)

were expressed as percentages of aminoacylated tRNA *versus* total amount of specific tRNA per experiment. The apparent kinetic parameters k_{cat} and K_{M} were derived from Lineweaver-Burk plots on experiments performed with 1–10 μM tRNA and 400 nM–3.2 μM LeuRS. Displayed data represent averages of at least two independent experiments.

Aminoacylation of [³²P]-labeled native or transcript tRNA. A second method to assay for aminoacylation was performed according to Wolfson et al.¹⁹. The 3'-terminal adenosine of native or *in vitro* transcribed mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} was labeled with [³²P]ATP as described¹⁰. The labeled tRNA was separated from unincorporated nucleotides with a G25 Quick Spin Column (Roche). The conditions used for aminoacylation were as described above except that [³H]-leucine was omitted. After aminoacylation, reaction mixtures were digested with nuclease P1 (Roche), and the products were separated by chromatography on polyethylenimine cellulose TLC plates (Aldrich) using 0.2 M ammonium acetate, pH 5.0 as the mobile phase. The amounts of AMP and leucyl-AMP were quantitated by phosphorimager. $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ of the native tRNA was determined with 5 nM LeuRS and 14 nM native tRNA, $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ of the wild-type transcript was done using 23 nM LeuRS and 100 nM transcript.

Structural mapping in solution and footprinting

End-labeling and renaturation of RNAs. *In vitro* transcripts (50-100 pmoles) were 5' or 3'-labelled (T4 polynucleotide kinase or *E. coli* tRNA nucleotidyl transferase, respectively) as previously described¹⁷. They were subsequently purified on denaturing 8% polyacrylamide gels. Native tRNA^{Leu(UUR)} extracted from osteosarcoma cells was 3'-end labeled (5 pmoles) with *E. coli* tRNA nucleotidyl transferase as described by¹⁰. Before structural probing, tRNAs were denatured by heating at 60°C in

the absence of Mg²⁺, slowly cooled down in the presence of 12 mM MgCl₂.

Nuclease mapping and footprinting. Samples contained 50 000 cpm [³²P]-labeled tRNA and 10 pmoles of non-labeled carrier tRNA (corresponding transcripts). To probe native mt tRNA^{Leu(UUR)}, *in vitro* transcribed wild-type tRNA^{Leu(UUR)} was the carrier. Cleavage with ribonucleases V1, T2 or nuclease S1 were performed as described previously¹⁷. Briefly, transcripts were incubated at pH 7.6 in the presence of 12 mM MgCl₂, 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 25 mM KCl, for 5 min at 4°C with or without 10 μM to 40 μM LeuRS (dialyzed before use in the same buffer). Each reaction was incubated for 15 min at 4°C with either 80 mU ribonuclease T2, 15 mU ribonuclease V1, 15 U nuclease S1. After phenol extraction, the products of the probing reactions were analyzed on 12% or 8% polyacrylamide /8M urea denaturing gels¹⁷. Alkaline ladders were obtained by incubation in 50 mM NaHCO₃ pH 9.0 at 80°C for 2 min and guanine ladders by denaturing T1 digestion²⁰.

Acknowledgments

We thank Caroline Paulus for excellent technical assistance. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Louis Pasteur Strasbourg, Association Française pour les Myopathies (AFM). BS was supported by a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- Giegé, R., Sissler, M. & Florentz, C. (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5017-5035.
- Giegé, R. & Frugier, M. (2003). Transfer RNA structure and identity. In *Translation mechanisms* (Lapointe, J. & Brakier-Gringas, L., eds.), pp. 1-24. Landes Biosciences, Georgetown, TX.
- Sissler, M., Pütz, J., Fasiolo, F. & Florentz, C. (2003). Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. In *The aminoacyl-tRNA synthetases* (Ibba, M., Francklyn, C. & Cusack, S., eds.), pp. in press. Landes Biosciences, Georgetown, TX.
- Wolstenholme, D. R., Macfarlane, J. L., Okimoto, R., Clary, D. O. & Wahleithner, J. A. (1987). Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 1324-1328.
- Watanabe, Y.-I., Kawai, G., Yokogawa, T., Hayashi, N., Kumazawa, Y., Ueda, T., Nishikawa, K., Hirao, I., Miura, K.-I. & Watanabe, K. (1994). Higher-order structure of bovine mitochondrial tRNA^{Ser_{UGA}}: chemical modification and computer modeling. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5378-5384.
- Watanabe, Y.-i., Tsurui, H., Ueda, T., Furushima, R., Takamiya, S., Kita, K., Nishikawa, K. & Watanabe, K. (1994). Primary and higher order structures of nematode (*Ascaris suum*) mitochondrial tRNAs lacking either the T or D stem. *J. Biol. Chem.* **269**, 22902-22906.
- Helm, M., Brulé, H., Friede, D., Giegé, R., Pütz, J. & Florentz, C. (2000). Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* **6**, 1356-1379.
- Florentz, C., Sohm, B., Tryoen-Tóth, P., Pütz, J. & Sissler, M. (2003). Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1356-1375.
- Bullard, J., Cai, Y.-C. & Spremulli, L. (2000). Expression and characterization of the human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase. *Biochem. Biophys. Acta* **1490**, 245-258.
- Park, H., Davidson, E. & King, M. P. (2003). The pathogenic A3243G mutation in human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} decreases the efficiency of aminoacylation. *Biochem.* **4**, 958-64.

11. Sohm, B., Frugier, M., Brulé, H., Olszak, K., Przykorska, A. & Florentz, C. (2003). Towards Understanding Human Mitochondrial Leucine Aminoacylation Identity. *J. Mol. Biol.* **328**, 995-1010.
12. Wittenhagen, L. M., Roy, M. D. & Kelley, S. O. (2003). The pathogenic U3271C human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation disrupts a fragile anticodon stem. *Nucleic Acids Res.* **31**, 596-601.
13. McClain, W. H. (1993). Transfer RNA identity. *FASEB J.* **7**, 72-78.
14. Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1488.
15. Schon, E. A., Bonilla, E. & DiMauro, S. (1997). Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J. Bioenerg. Biomemb.* **29**, 131-149.
16. Kogelnik, A. M., Lott, M. T., Brown, M. D., Navathe, S. B. & Wallace, D. C. (1998). MITOMAP: a human mitochondrial genome database -1998 update. *Nucleic Acids Res.* **26**, 112-115.
17. Helm, M., Brulé, H., Degoul, F., Cepanec, C., Leroux, J.-P., Giegé, R. & Florentz, C. (1998). The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1636-1643.
18. Becker, H. D., Giegé, R. & Kern, D. (1996). Identity of prokaryotic and eukaryotic tRNA^{Asp} for aminoacylation by aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Biochem.* **35**, 7447-7458.
19. Wolfson, A. D. & Uhlenbeck, O. C. (2002). Modulation of tRNA^{Ala} identity by inorganic pyrophosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5965-70.
20. Donis-Keller, H., Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1977). Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA. *Nucleic Acids Res.* **4**, 2527-2538.
21. Agris, P. F. (1996). The importance of being modified: Roles of modified nucleosides and Mg²⁺ in RNA structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **53**, 79-129.
22. Helm, M., Giegé, R. & Florentz, C. (1999). A Watson-Crick base-pair disrupting methyl group (m¹A 9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA^{Lys}. *Biochem.* **38**, 13338-13346.
23. Giegé, R., Helm, M. & Florentz, C. (2001). Classical and novel chemical tools for RNA structure probing. In *RNA* (Söll, D., Nishimura, S. & Moore, P., eds.), pp. 71-89. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
24. Helm, M., Florentz, C., Chomyn, A. & Attardi, G. (1999). Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu(UUR)}. *Nucleic Acids Res.* **27**, 756-763.
25. Yasukawa, T., Suzuki, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S. & Watanabe, K. (2000). Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs^{Leu(UUR)} with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *J. Biol. Chem.* **275**, 4251-4257.
26. Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K. & Watanabe, K. (2001). Novel taurine-containing uridine derivatives and mitochondrial human diseases. *Nucleic Acids Res. Suppl.*(1), 257-8.
27. Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. & Gyllenstein, U. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* **408**, 708-713.
28. Kawarai, T., Kawakami, H., Kozuka, K., Izumi, Y., Matsuyama, Z., Watanabe, C., Kohriyama, T. & Nakamura, S. (1997). A new mitochondrial DNA mutation associated with mitochondrial myopathy: tRNA^{Leu(UUR)} 3254C-to-G. *Neurology* **49**, 598-600.
29. Dietrich, A., Romby, P., Maréchal-Drouard, L., Guillemaut, P. & Giegé, R. (1990). Solution conformation of several free tRNA^{Leu} species from bean, yeast

- and *Escherichia coli* and interaction of these tRNAs with bean cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase. A phosphate alkylation study with ethylnitrosourea. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2589-2597.
30. Soma, A., Uchiyama, K., Sakamoto, T., Maeda, M. & Himeno, H. (1999). Unique recognition style of tRNA^{Leu} by *Haloferax volcanii* leucyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.* **293**, 1029-1038.
 31. Normanly, J., Ollick, T. & Abelson, J. (1992). Eight base changes are sufficient to convert a leucine-inserting tRNA into a serine-inserting tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5680-5684.
 32. Asahara, H., Himeno, H., Tamura, K., Nameki, N., Hasegawa, T. & Shimizu, M. (1993). Discrimination among *E. coli* tRNAs with a long variable arm. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **29**, 207-208.
 33. Asahara, H., Nameki, N. & Hasegawa, T. (1998). *In vitro* selection of RNAs aminoacylated by *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.* **283**, 605-618.
 34. Tocchini-Valentini, G., Saks, M. E. & Abelson, J. (2000). tRNA leucine identity and recognition sets. *J. Mol. Biol.* **298**, 779-793.
 35. Larkin, D., Williams, A., Martinis, S. & Fox, G. (2002). Identification of essential domains for *Escherichia coli* tRNA^{Leu} aminoacylation and amino acid editing using minimalist RNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2103-2113.
 36. Soma, A., Kumagai, R., Nishikawa, K. & Himeno, H. (1996). The anticodon loop is a major identity determinant of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA^{Leu}. *J. Mol. Biol.* **263**, 707-714.
 37. Breitschopf, K., Achsel, T., Busch, K. & Gross, H. J. (1995). Identity elements of human tRNA^{Leu}: Structural requirements for converting human tRNA^{Ser} into a leucine acceptor *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3633-3637.
 38. Breitschopf, K. & Gross, H. J. (1996). The discriminator bases G73 in human tRNA^{Ser} and A73 in tRNA^{Leu} have significantly different roles in the recognition of aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 405-410.
 39. Asahara, H., Himeno, H., Tamura, K., Hasegawa, T., Watanabe, K. & Shimizu, M. (1993). Recognition nucleotides of *Escherichia coli* tRNA^{Leu} and its elements facilitating discrimination from tRNA^{Ser}. *J. Mol. Biol.* **231**, 219-229.
 40. Du, X. & Wang, E. D. (2003). Tertiary structure base pairs between D- and TpsiC-loops of *Escherichia coli* tRNA^{Leu} play important roles in both aminoacylation and editing. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2865-72.
 41. Enriquez, J. A. & Attardi, G. (1996). Evidence for aminoacylation-induced conformational changes in human mitochondrial tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8300-8305.
 42. Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S. & S., Y. (2003). Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme. *Cell* **113**, 383-394.
 43. Giegé, R., Puglisi, J. D. & Florentz, C. (1993). tRNA structure and aminoacylation efficiency. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **45**, 129-206.
 44. Sprinzl, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. & Steinberg, S. (1998). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 148-153.
 45. Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K. & Watanabe, K. (2002). Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.* **21**, 6581-6589.
 46. Rould, M. A., Perona, J. J., Söll, D. & Steitz, T. A. (1989). Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP at 2.8Å resolution. *Science* **246**, 1135-1142.
 47. Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two

classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**, 203-206.

48. Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Härtlein, M., Nassar, N. & Leberman, R. (1990). A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase. *Nature* **347**, 249-255.

III. Recherche d'un cofacteur des systèmes d'aminacylation mitochondriaux humains

Nos propres résultats concernant les capacités d'aminacylation de l'ARNt^{Leu(UUR)} mt humain ainsi que des données de la littérature, nous conduisent à suggérer l'existence d'un cofacteur des systèmes d'aminacylation mitochondriaux humains. Nos arguments en faveur d'un tel élément sont basés sur deux observations majeures. Tout d'abord, il est connu depuis longtemps que les systèmes d'aminacylation mitochondriaux de mammifères sont moins efficaces que ceux d'autres organismes, en particulier les bactéries (Kumazawa et coll., 1991). Les récentes études développées sur les systèmes mitochondriaux humains soit en présence de l'ARNt natif correspondant ou de l'ARNt produit par transcription *in vitro* vont dans le même sens (sauf exception). Le Tableau 8 permet une comparaison des paramètres cinétiques de l'aminacylation des trois systèmes mitochondriaux humains étudiés jusqu'à présent, avec ceux obtenus pour les systèmes d'*E. coli* correspondants. Il présente également le cas de la SerRS mt de foie de boeuf, étudiée en présence d'ARNt préparé par transcription *in vitro*. Bien que ce tableau reste incomplet et que des valeurs absolues ne soient pas directement comparables, il apparaît que dans le cas des LeuRS, l'enzyme d'*E. coli* est de 200 à 5 000 fois plus efficace que celle de la mitochondrie humaine, la PheRS d'*E. coli* est ~3 000 fois plus efficace et enfin la SerRS, 18 à 134 fois, ceci si l'on compare les efficacités d'aminacylation des ARNt natifs ou des ARNt transcrits. Que ce soit au sein des systèmes d'*E. coli* ou au sein des systèmes mitochondriaux, les efficacités sont différentes entre les transcrits et les ARNt natifs. Une exception concerne cependant le système Ile où les modifications post-transcriptionnelles sont très importantes dans *E. coli* alors qu'elles le sont beaucoup moins dans la mitochondrie. Dans ce cas, il semblerait que le système mitochondrial soit tout aussi efficace que le système d'*E. coli*. Le fait que 3 systèmes mitochondriaux sur 4 soient moins efficaces que les systèmes d'*E. coli* correspondant, pourrait se comprendre par le fait que la traduction mitochondriale ne conduit qu'à la synthèse de 13 protéines. Cependant, le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la synthèse concomitante d'ATP dépendent de ces 13 protéines, ce qui laisse supposer un besoin d'une activité traductionnelle intense, aussi bien en termes de quantité que de vitesse. Une seconde considération en faveur d'une suspicion de co-facteurs vient de la compréhension actuelle de l'effet de mutations pathologiques. La sévérité des pathologies liées aux mutations dans les gènes d'ARNt montre que ces mutations affectent très fortement la cellule. Nous savons que dans de nombreux cas, elles ont un impact sur la synthèse de ces 13 protéines sans réelle corrélation avec la répartition des

codons correspondants à l'ARNt affecté. Par ailleurs, les mutations affectent faiblement l'une ou l'autre des différentes étapes de la vie de l'ARNt sans que l'on comprenne cette diversité. Enfin, les mutations modifient le protéome mitochondrial (voir chapitre II, résultats). Une des explications possibles à ces résultats serait que la mutation de l'ARNt affecte sa reconnaissance avec un partenaire à découvrir, nécessaire à tous les 22 ARNt mt. Un tel partenaire pourrait être un co-facteur d'aminacylation.

aaRS	ARNt	K _M apparent (μM)	k _{cat} apparent (sec ⁻¹)	k _{cat} /K _M relatif	Perte d'efficacité au sein d'un système	Perte d'efficacité entre les systèmes	Références	
LeuRS	natif <i>E.coli</i>	0,23	2,7	11,25	1	1	(Tocchini-Valentini et coll., 2000)	
<i>E.coli</i>	transcrit <i>E.coli</i>	0,21	3,2	15,23	0,76			
LeuRS mt	natif mt hm	-	-	0,055	1		(Sohm et coll., 2003)	
hm	transcrit mt hm	-	-	0,0036	16	200 à 5000		
PheRS	natif <i>E.coli</i>	-	-	~17,5*	1	1	(Peterson &	
<i>E.coli</i>	transcrit <i>E.coli</i>	0,08	1,4	17,5	1		Uhlenbeck, 1992)	
	natif <i>E.coli</i>	18	0,11	0,006		2916	(Bullard et coll.,	
PheRS mt	natif mt hm	non déterminé						(1999)
hm	transcrit mt hm	non déterminable car transcrit non fonctionnel						
SerRS	natif <i>E.coli</i>	0,19	3,5	18,4	1	1	(Sampson & Saks, 1993)	
<i>E.coli</i>	transcrit <i>E.coli</i>	0,12	4,2	35	0,5			
SerRS mt	natif mt boeuf	0,35	0,64	1,88	1	135	(Shimada et coll., 2001)	
boeuf	transcrit mt boeuf	2	0,53	0,26	7,2			
IleRS	natif <i>E.coli</i>	5,4	1,6	0,29	1	-	(Nureki et coll., 1993)	
<i>E.coli</i>	transcrit <i>E.coli</i>	8,4	0,0033	0,00039	773	1		
IleRS mt	natif <i>E.coli</i>	-	-	1,44*	1	0,3-9,6	(Degoul et coll., 1998; Kelley et coll., 2000)	
hm	transcrit mt hm	4,3	0,13	0,03	48			

Tableau 8 : Paramètres cinétiques apparents de systèmes d'aminacylation d'*E. coli* et de différents systèmes mitochondriaux humains. Les valeurs indiquées ont été obtenues dans des conditions d'aminacylation différentes et ne peuvent en toute rigueur être comparées entre elles. Cependant, elles nous permettent de voir une "tendance" générale. hm : humain. * valeurs calculées à partir des données des publications citées en références.

Des cofacteurs jouant un rôle dans l'aminacylation des ARNt ont déjà été mis en évidence dans d'autres contextes (bactéries, archaebactéries). Ces facteurs sont généralement spécifiques d'un système d'aminacylation donné. Chez la levure, le facteur Arc1p est capable de lier l'ARNt et la synthétase et augmente l'affinité de l'ARNt pour sa synthétase, stimulant ainsi l'aminacylation. Ce cofacteur est spécifique des systèmes méthionine et glutamine de la levure (Simos et coll., 1998; Simos et coll., 1996). La protéine SmpB a été montrée comme fixant l'ARNtm procaryotique, un ARN ayant à la fois des propriétés d'ARNt

et d'ARN messagers et jouant un rôle important dans les mécanismes de traduction (Karzai et coll., 1999). Le facteur Trbp 111 aurait un rôle de protéine chaperonne de l'ARNt en couvrant et protégeant la connexion des branches acceptrice et anticodon de l'ARNt. Ce rôle de protéine chaperonne ne serait pas spécifique à un système d'aminoacylation mais commun à l'ensemble des systèmes d'*Aquifex aeolicus* (Morales et coll., 1999). Plus récemment, il a été montré que deux synthétases sont nécessaires à l'aminoacylation d'un seul ARNt. Il s'agit du cas particulier de la fixation de la pyrrolysine sur l'ARNt^{Pyl} (Srinivasan et coll., 2002) qui nécessite à la fois la LysRS de classe II et la LysRS de classe I comme co-facteur chez les archeobactéries de type *Methanosarcina* (Polycarpo et coll., 2003).

Pour orienter nos recherches dans cette direction, nous avons pris en compte des travaux récents concernant de nouvelles caractéristiques du facteur d'élongation EF1A. Chez les mammifères, le facteur d'élongation EF1A cytoplasmique, complexé au GTP, prend en charge l'ARNt aminoacylé et le délivre au ribosome. Complexé au GDP, ce facteur interagit avec l'ARNt^{Phe} non chargé et la PheRS de lapin (Petrushenko et coll., 2002; Petrushenko et coll., 1997). Partant du postulat de Deutscher et coll. selon lequel l'ARNt et la synthétase ne sont jamais libres dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Negrutskii & Deutscher, 1991; Stapulionis & Deutscher, 1995), ils ont proposé un modèle présenté dans la Figure 20. Le facteur EF1A, après hydrolyse du GTP en GDP, s'associerait à l'ARNt sortant du site E du ribosome (Fig. 20A) et le complexe EF1A^{GDP}/ARNt interagirait avec la synthétase (Fig. 20B). L'activation de EF1A par EF1B par conversion du GDP en GTP, s'effectuerait alors que EF1A est toujours lié à la synthétase et serait concomitant à l'étape d'aminoacylation de l'ARNt (Fig. 20C et D). Une fois l'ARNt aminoacylé, il pourra interagir immédiatement avec EF1A^{GTP} au niveau du site de fixation de EF1B (Fig. 20E), déplaçant ainsi EF1B. L'ARNt sera ensuite délivré au ribosome (Fig. 20F). EF1A jouerait ainsi un rôle important dans le transfert de l'ARNt d'un facteur à l'autre durant la traduction.

Cette nouvelle interaction entre l'ARNt non aminoacylé et le facteur d'élongation nous a conduit à penser qu'un facteur d'élongation pourrait être cofacteur de la réaction d'aminoacylation dans les systèmes mitochondriaux humains en permettant une meilleure efficacité de reconnaissance entre l'ARNt et sa synthétase. En collaboration avec Magali Frugier, nous avons réalisé des travaux préliminaires en vue de tester les possibilités d'influence des facteurs d'élongation EF1A cytoplasmiques de *S. cerevisiae* (disponible au laboratoire) et EF-Tu mt bovin (don gracieux du Dr. L. Spremulli, Chapel-Hill, USA) sur l'aminoacylation *in vitro* du transcrite de l'ARNt^{Leu(UUR)} sauvage par la LeuRS mt humaine.

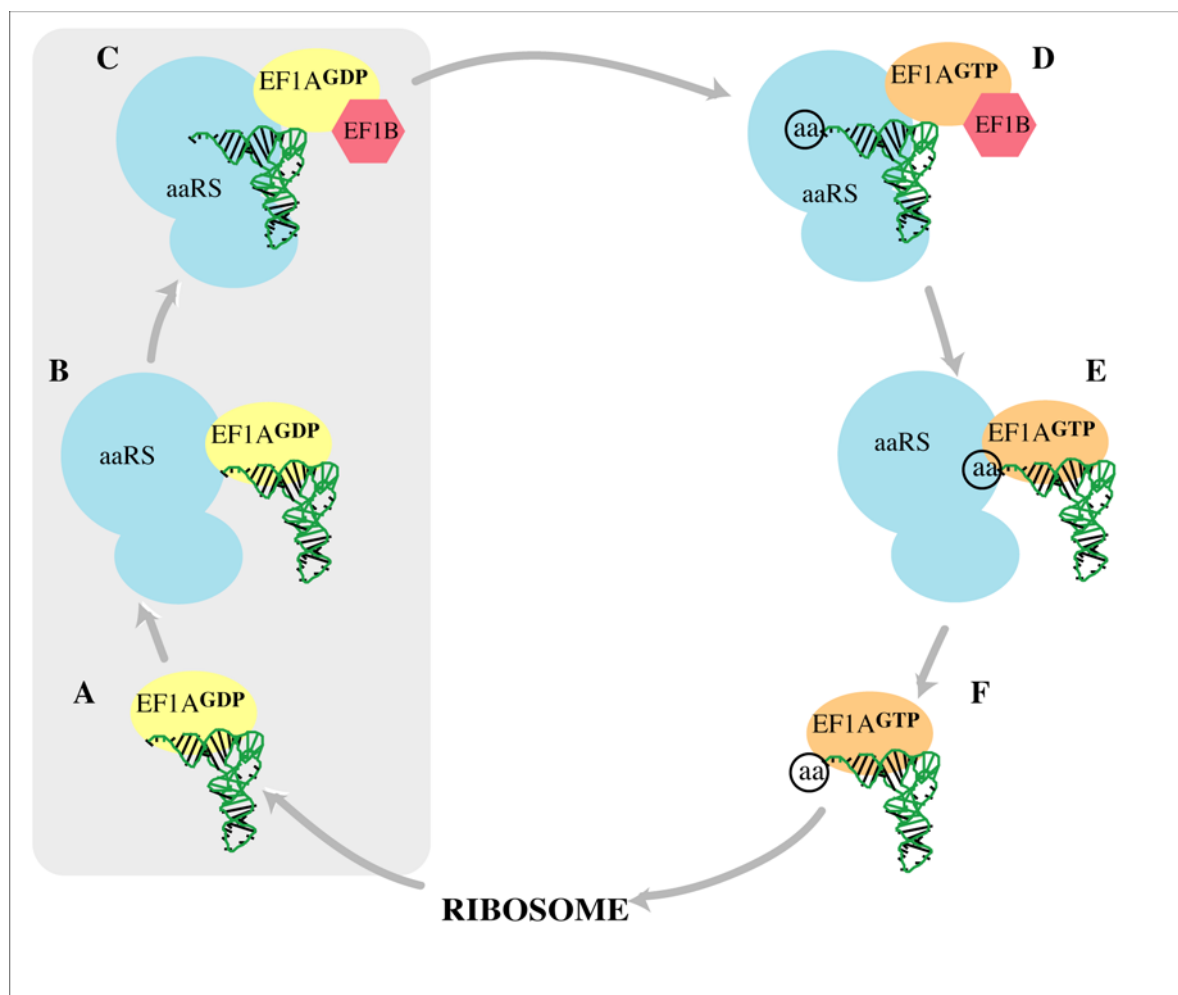


Figure 20. Interaction du facteur EF1A avec un ARNt non aminoacylé au cours du cycle de l'élongation de la traduction. Schéma adapté de l'hypothèse de (Petrushenko et coll., 2002).

A. Tests fonctionnels

1. Aminoacylation *in vitro* en présence du facteur EF1A cytoplasmique

Le facteur EF1A de *S. cerevisiae* possède 81 % d'identité et 89 % d'homologie avec son homologue humain (Fig. 21). Les tests ont été réalisés en présence d'un excès de transcrits d'ARNt^{Leu(UUR)} de séquence sauvage (5 μ M) et une concentration en LeuRS (200 nM) permettant d'être en vitesse initiale. Différentes concentrations en facteurs EF1A ont été ajoutées. Afin de favoriser l'interaction entre les différents partenaires avant le début de la réaction, l'ARNt et EF1A ont été pré-incubés à 30°C pendant 5 min dans le milieu d'aminocyclation dépourvu de LeuRS. La Figure 22A montre que des concentrations croissantes en EF1A complexé au GDP stimulent la vitesse d'aminocyclation du transcrit leucine. Cette stimulation peut atteindre un facteur 3 pour des concentrations atteignant 1 μ M (Fig. 22B). Cependant, en présence de 1 mM GTP et 25 nM de facteur EF1B, ce qui permet de convertir EF1A^{GDP} en EF1A^{GTP}, la stimulation de l'aminocyclation n'est plus détectable (Fig. 22C). Ceci montre que cette stimulation n'est pas une conséquence de la prise en charge de l'ARNt aminoacylé par le facteur EF1A^{GTP} qui, en déplaçant l'équilibre stimulerait la LeuRS, mais qu'elle est spécifique de EF1A^{GDP} et concorde avec le modèle cytoplasmique présenté au début de ce chapitre. Des expériences supplémentaires nous ont permis de vérifier que le GTP seul n'inhibe pas la réaction (Fig. 22C).

2. Aminoacylation en présence du facteur EF-Tu mitochondrial

Le facteur EF-Tu mt bovin ne différant que d'un nombre très restreint de résidus (24/452), il a été choisi comme modèle pour EF-Tu mt humain. Nous avons testé sa capacité à stimuler la réaction de leucylation mitochondriale *in vitro* dans les différentes conditions utilisées pour le facteur EF1A cytoplasmique de levure. Dans ces conditions, aucune stimulation n'a pu être mise en évidence. Par alignements de séquences, nous avons observé que EF-Tu mt humain ne partage que 31 % d'identité et 46 % d'homologie avec EF1A cytoplasmique (Fig. 23A), alors qu'il présente 48 % d'identité et 64 % d'homologie avec le facteur EF-Tu d'*E. coli* (Fig. 23B). Cette proximité de séquence entre EF-Tu mt et EF-Tu d'*E. coli* pourrait également refléter une proximité fonctionnelle, c'est-à-dire l'incapacité de se lier avec une affinité correcte à un ARNt non aminoacylé.

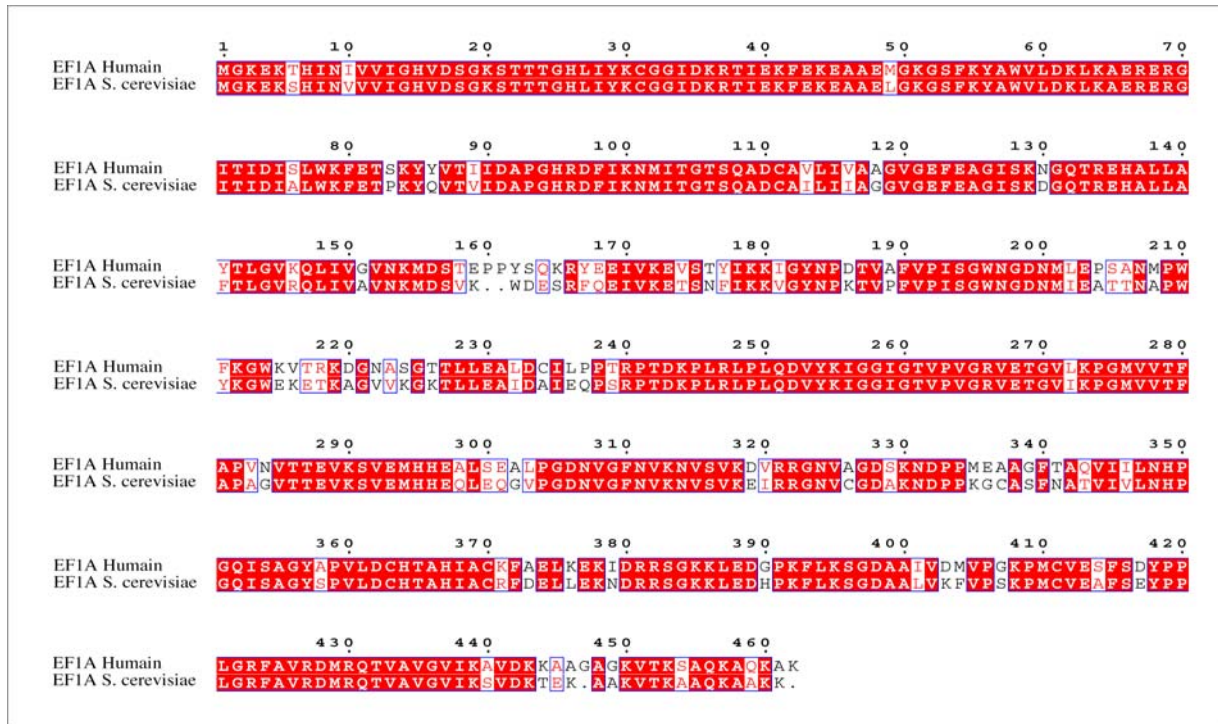


Figure 21. Alignement des séquences du facteur d'élongation EF1A humain et de *S. cerevisiae*. L'alignement a été réalisé avec Clustal X (Thompson et coll., 2000) et dessiné avec ESPript (Gouet et coll., 1999).

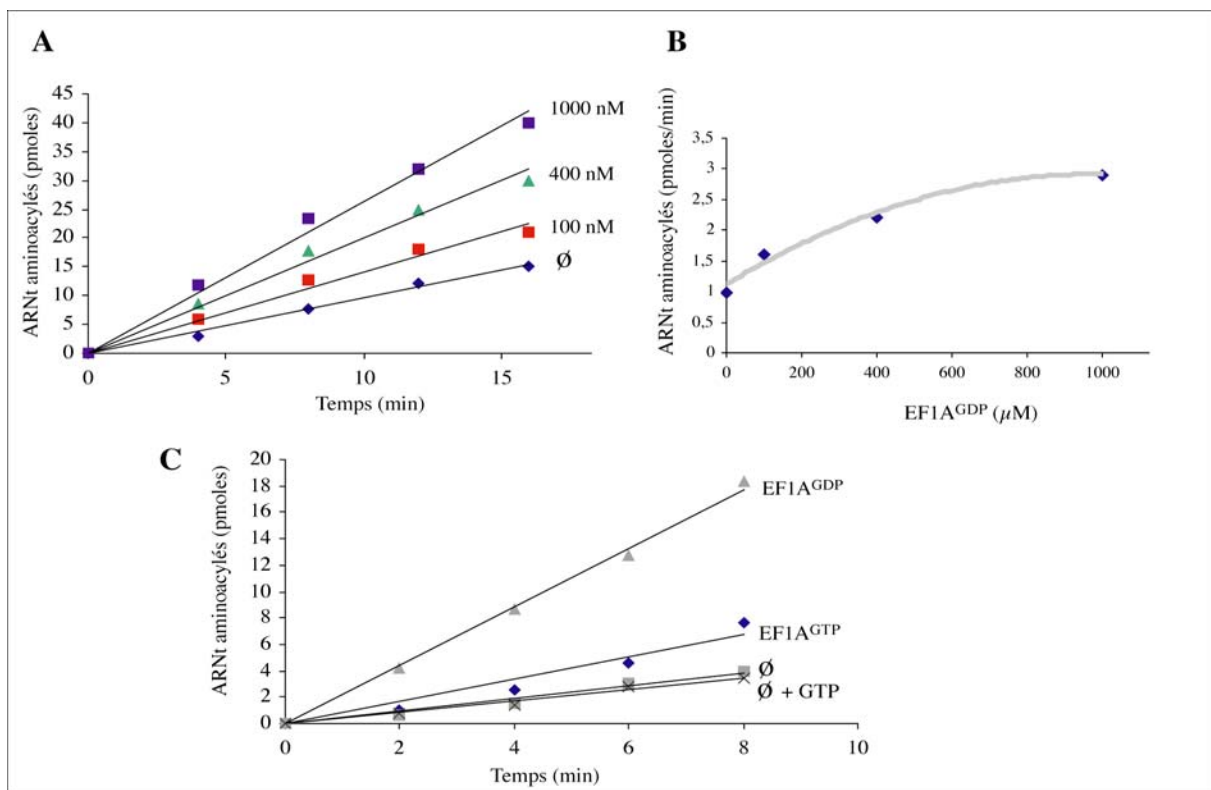


Figure 22. Tests d'aminocyclation de l'ARNt^{Leu(UUR)} transcrit sauvage (5 µM) par la LeuRS mt humaine (100 nM) réalisés dans les conditions d'aminocyclation optimales (chapitre Matériel et Méthodes). A. Effet de différentes concentrations de EF1A^{GDP} de *S. cerevisiae* (0,1-1 µM) sur les vitesses initiales. B. Stimulation des vitesses d'aminocyclation en fonction de la concentration en facteur EF1A^{GDP}. C. Effet de la protéine EF1A^{GTP} (250 nM), de la protéine EF1B (25 nM) permettant à EF1A de se complexer au GTP, et de GTP seul (1 mM).

En effet, bien que EF-Tu soit l'homologue fonctionnel bactérien de EF1A chez les procaryotes, EF-Tu se distingue du facteur d'élongation cytoplasmique eucaryote par une affinité très faible pour les ARNt non chargés (Ott & Sprinzl, 1992) et une incapacité à former un complexe quaternaire avec l'ARNt et son aminoacyl-ARNt synthétase correspondante (Petrushenko et coll., 2002).

3. Hypothèses

Le fait que le facteur EF1A cytoplasmique de levure stimule l'aminocyclation d'un facteur 3, et que le facteur EF-Tu mt bovin ne conduise pas à une stimulation nous a orienté vers l'hypothèse que EF1A cytoplasmique humain pourrait stimuler l'aminocyclation des ARNt mt s'il se trouvait, au moins en partie, au sein de la mitochondrie.

B. Localisation subcellulaire de EF1A humain

Le facteur d'élongation EF1A est considéré comme un facteur cytoplasmique. La localisation mitochondriale d'une protéine dépend d'un signal, classiquement en N-terminal mais parfois au sein même de la séquence et donc difficilement détectable. Le gène du facteur EF1A ne possède pas de séquence signale en N-terminal, bien que quelques acides aminés soient communs à l'extension N-terminale du facteur EF-Tu mt humain. Les différents protéomes de mitochondries humaines réalisés jusqu'à présent n'ont pas permis de détecter EF1A cytoplasmique dans la mitochondrie (Fountoulakis et coll., 2002; Lescuyer et coll., 2003; Scheffler et coll., 2001). Ceci pourrait s'expliquer par une limite technique liée au pHi très basique de EF1A (pHi=9,1) qui pourrait l'exclure de la majorité des analyses sur gel. En effet, les gammes de séparation utilisées couramment dépassent rarement un pHi de 8. Cependant, le fait que nous ayons trouvé des indices en faveur d'une stimulation d'activité d'aminocyclation mitochondriale par ce facteur nous pousse à vérifier si les différents partenaires pourraient se retrouver dans la mitochondrie. Il nous a donc semblé important de rechercher avec soin la présence éventuelle du facteur EF1A dans les mitochondries.

Les mitochondries ont été purifiées à partir de cellules HeLa sur gradient de metrizamide ce qui permet d'éliminer fortement les contaminations cytoplasmiques (Scheffler et coll., 2001). Afin de vérifier d'une part la qualité de nos préparations et d'autre part la présence de EF1A dans les mitochondries, nous avons utilisé plusieurs anticorps dirigés contre des protéines spécifiques d'un compartiment cellulaire,

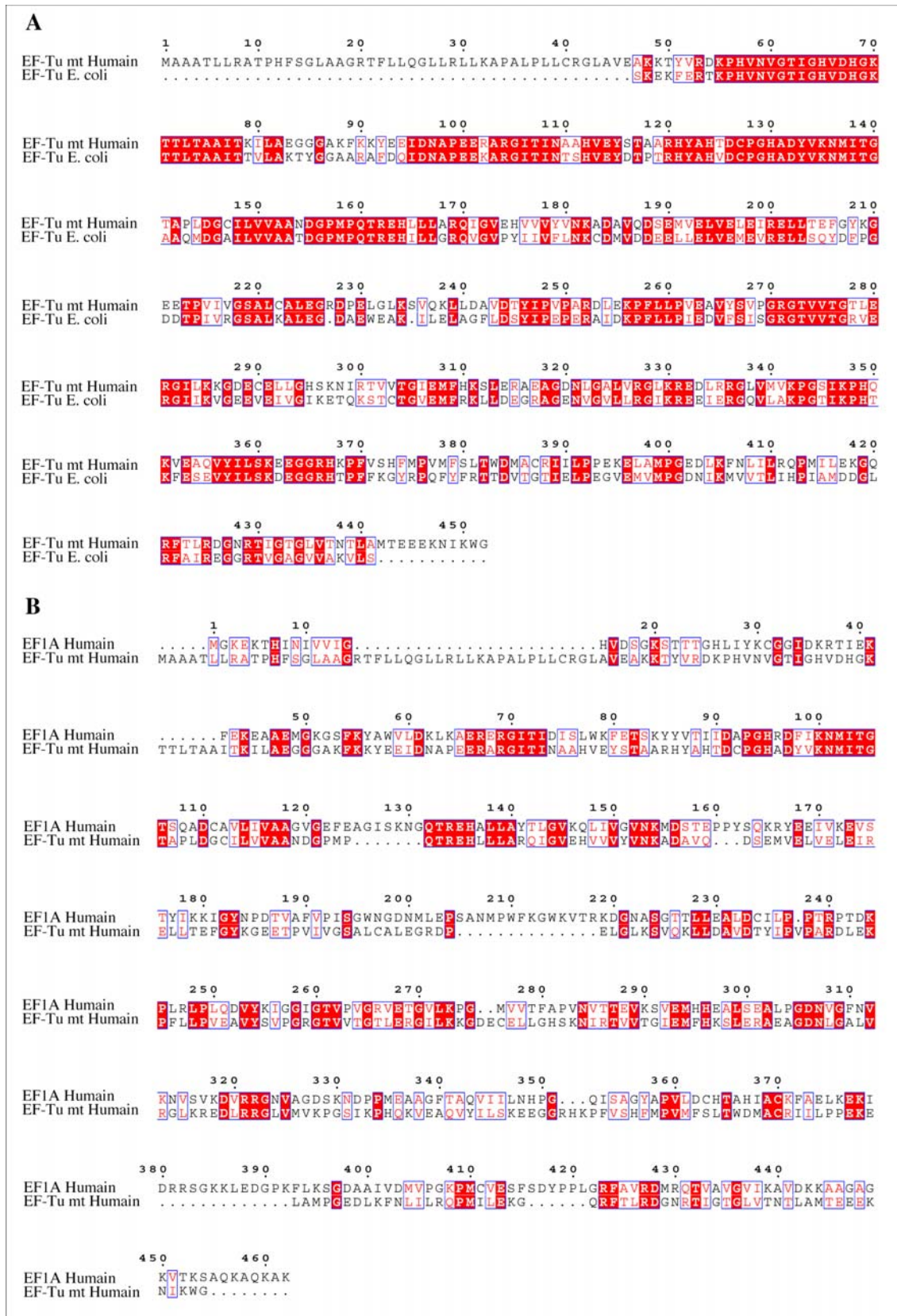


Figure 23. Comparaison de la séquence du facteur EF1A. A. Alignement des séquences du facteur d'élongation EF-Tu mt humain et de *E. coli*. B. Alignement des séquences du facteur d'élongation EF-Tu mt humain et du facteur d'élongation EF1A humain. Les alignements ont été réalisés avec Clustal X (Thompson et coll., 2000), et dessinés avec ESPript (Gouet et coll., 1999).

(i) anti-EF-Tu/EF-Ts mt bovin (gracieusement fourni par Dr. L. Spremulli) spécifique du compartiment mitochondrial, (ii) anti-EF1B bovin (don de Dr. L. Spremulli) protéine supposée exclusivement cytoplasmique, et (iii) anti-EF1A humain (Upstate Biotechnology) pour caractériser la localisation cellulaire de cette protéine. Des concentrations croissantes des extraits cytoplasmiques de protéines (10 à 50 µg) et mitochondriaux (20 à 100 µg) ont ainsi été testées (Fig. 24). Les concentrations en protéines mitochondriales utilisées sont deux fois plus élevées afin de détecter éventuellement un taux plus faible de protéines. Nous observons sur le premier western-blot (anti-EFTu/Ts) la validité des extraits protéiques mitochondriaux et des quantités de matériel utilisées. Le western-blot concernant l'anticorps anti-EF1B montre que les mitochondries purifiées sont majoritairement dépourvues de contaminations d'origine cytoplasmique, bien que l'anticorps n'ait pas une spécificité très forte. Le troisième western-blot nous permet de conclure sans ambiguïté que EF1A n'est pas détectable dans les mitochondries, même à de très fortes concentrations de protéines. La confirmation de sa localisation exclusivement cytoplasmique nous indique que EF1A n'est pas un cofacteur des systèmes d'aminacylation mitochondriaux humains.

C. Perspectives

La mise en évidence de la stimulation de la réaction de leucylation mitochondriale par EF1A ouvre des perspectives intéressantes pour l'identification d'un cofacteur. Cependant, d'autres études fonctionnelles sont nécessaires pour déterminer si la stimulation observée concerne l'ensemble des systèmes d'aminacylation mitochondriaux ou est spécifique de la leucine. Pour cela, il nous faudra tester plusieurs couples ARNt/synthétase mitochondriaux *in vitro*, ce qui pourra être réalisé prochainement au laboratoire étant donné que deux autres synthétases mitochondriales humaines y ont été clonées récemment. Il serait également intéressant de tester l'effet de EF1A sur l'aminacylation d'ARNt natifs (modifiés post-transcriptionnellement). Enfin, l'étude approfondie de cette stimulation devrait nous apprendre si l'effet que nous observons est une conséquence de la stabilisation par EF1A de la structure particulièrement instable qui caractérise les ARNt mt, ce qui signifierait que EF1A a un rôle de protéine chaperonne. En supposant que l'homologie fonctionnelle que nous étudions soit supportée par une homologie de séquence, les protéines humaines homologues à EF1A cytoplasmique et possédant une séquence de localisation mitochondriale devront être recherchées.

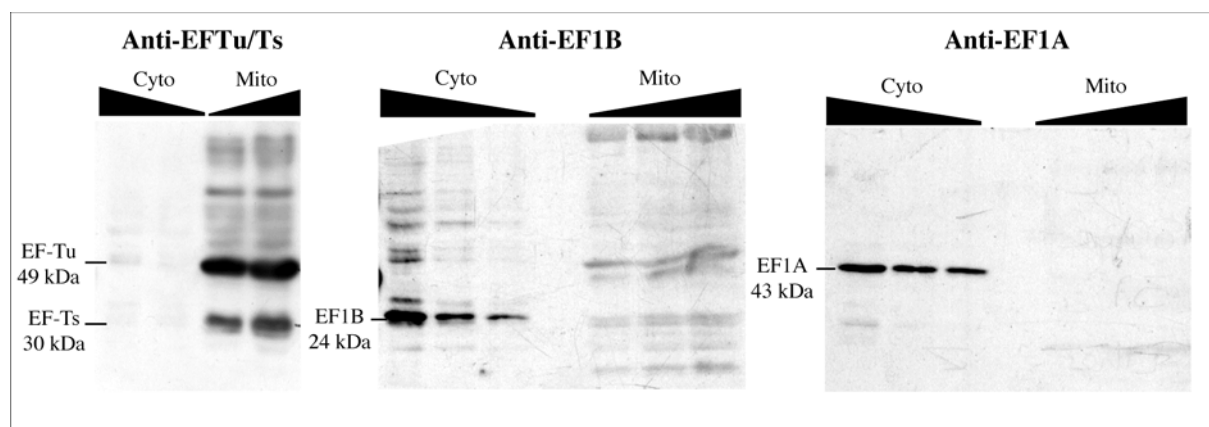


Figure 24. Localisation sub-cellulaire de la protéine EF1A humaine par western-blotting. Des concentrations croissantes d'extrait cytoplasmique (10, 20 et 50 μ g) ou d'extrait de mitochondries purifiées (20, 50 et 100 μ g) ont été utilisées. L'anticorps primaire anti-EF-Tu/EF-Ts mt de bovin, anti-EF1B cytosolique bovin, ou anti-EF1A human (dilué au 1/1000^{ième}) est appliqué puis l'anticorps secondaire anti-lapin (dilué au 1/400^{ième}, BioRad) sauf dans le cas de l'anti-EF1A ou c'est l'anticorps secondaire anti-souris (dilué au 1/3000^{ième}, BioRad).

Chapitre 2

ARNt

et

protéomes mitochondriaux

L'ensemble des recherches développées jusqu'à présent dans les différents laboratoires se préoccupant de la compréhension des mécanismes moléculaires des pathologies mitochondriales liées aux ARNt ont eu pour objectif principal de déterminer le niveau moléculaire précis d'impact de la mutation sur la synthèse protéique mitochondriale. Elles montrent qu'il n'y a pas *une* étape de la vie de l'ARNt spécifiquement affectée dans l'ensemble des mutations, mais qu'au contraire, chaque mutation semble avoir un impact à un autre niveau (voir revue dans Introduction). Nos propres travaux vont également dans ce sens puisque seul un petit nombre de mutations dans l'ARNt^{Leu(UUR)} affectent la fonction d'aminacylation suggérant que les autres mutations affectent d'autres aspects de l'ARNt. Par ailleurs, les effets observés sont généralement (et étonnement) faibles. Ainsi, chaque mutation semble être un cas particulier et la compréhension de l'ensemble des pathologies associées aux différentes mutations (plus de 140 mutations répertoriées à l'heure actuelle) sous-entend un travail fastidieux. Ainsi, la recherche d'une thérapie commune ciblant l'impact premier de la mutation sur le cycle de vie de l'ARNt apparaît compromis. Une hypothèse alternative serait que les ARNt mt interagissent avec un facteur commun (à découvrir) et que les mutations quelles qu'elles soient affectent l'interaction avec ce partenaire.

Avant d'entreprendre les études moléculaires concernant les ARNt, il était établi que les pathologies sont liées à des effets biochimiques typiques. L'étude de biopsies de patients ou encore l'analyse de cellules particulières en culture (les cellules cybrides homoplasmiques pour une mutation donnée (King & Attardi, 1989; King & Attardi, 1996a)), ont permis de montrer que les mutations ponctuelles dans les gènes d'ARNt étaient directement responsables d'une diminution dans les capacités respiratoires des mitochondries, dans la consommation d'oxygène et dans la synthèse d'ATP (Wallace, 1999). Cette diminution a ensuite été expliquée par une diminution de la vitesse de la synthèse protéique mitochondriale, c'est-à-dire dans la synthèse des 13 sous-unités de la chaîne respiratoire codées par le génome mitochondrial. Cependant, des exceptions existent ou seulement une faible diminution dans la synthèse protéique a été rapportée (Janssen et coll., 1999). Il a été montré également que les mutations dans les gènes d'ARNt entraînaient d'autres perturbations telles qu'une diminution du potentiel de membrane (Antonicka et coll., 1999), une augmentation de l'apoptose (Zhang et coll., 1998), une acidification du cytoplasme (acidose lactique) ou encore une augmentation du stress oxydatif. Tous ces effets biochimiques pourraient induire des perturbations moléculaires à un niveau plus large et affecter par exemple l'importation de protéines à localisation mitochondriale codées par le génome

nucléaire. Ces perturbations secondaires pourraient également contribuer à l'expression des pathologies et, si elles se rapportaient à des protéines communes à différentes pathologies, pourraient devenir des cibles thérapeutiques simples.

C'est pour toutes ces raisons qu'il nous a semblé très important de développer de nouveaux axes de recherche, qui se placent en dehors du contexte strict de l'étude de la synthèse protéique mitochondriale et qui visent à mettre en évidence des perturbations possibles du contenu protéique total de la mitochondrie. Les développements récents des techniques de protéomique comparative offraient une approche de choix pour répondre à nos hypothèses. La protéomique comparative consiste en l'établissement de cartes des protéines contenues dans des mitochondries saines et des mitochondries portant une mutation dans un gène d'ARNt mitochondrial, par migration sur gel bidimensionnel et comparaison de ces cartes pour rechercher d'éventuelles variations quantitatives et qualitatives au niveau de protéines individuelles. Cette approche très puissante permet non seulement d'analyser des centaines de protéines en même temps mais encore de détecter des variations très subtiles dans les modifications post-traductionnelles (Blackstock & Weir, 1999; Celis et coll., 2000). Dans cet objectif, j'ai tout d'abord contribué à installer la technique de séparation des protéines par gels bidimensionnels au laboratoire (d'abord en collaboration avec Caroline Paulus, technicienne, puis avec Petra Troyen-Tóth, Post-doctorante) et à définir les points expérimentaux importants. Cette approche a été appliquée en parallèle aux cas des deux mutations les plus fréquemment observées : la mutation A3243G dans l'ARNt^{Leu(UUR)} corrélée au syndrome MELAS et la mutation A8344G dans l'ARNt^{Lys} corrélée au syndrome MERRF.

Des études préliminaires de protéomique comparative, réalisées dans notre laboratoire en collaboration avec T. Rabilloud à Grenoble, sur des mitochondries extraites de lignées de cellules cybrides, avaient prouvé la faisabilité et le potentiel d'une telle approche. Cette analyse, réalisée par comparaison "à l'œil" de cartes bidimensionnelles colorées au nitrate d'argent, avait mis en évidence deux protéines codées par le génome nucléaire dont le taux était très fortement diminué dans les mitochondries MERRF et MELAS par rapport aux mitochondries saines. Ces protéines étaient des sous-unités d'un complexe de la chaîne respiratoire, la cytochrome c oxydase, codées par le génome nucléaire (Rabilloud et coll., 2002). Suite à ces résultats, nous avons réalisé l'analyse protéomique quantitative détaillée de près de 1 000 protéines dans le cas de ces deux mutations. La recherche de différences significatives entre les mitochondries saines et celles portant la mutation a nécessité la culture intensive des deux couples de lignées de cellules cybrides, l'extraction des mitochondries, la réalisation des gels bidimensionnels, une analyse quantitative des gels avec un logiciel

informatique sophistiqué (PD-Quest), et enfin l'assignation des protéines d'intérêt par spectrométrie de masse. Chaque étape a été optimisée. Les résultats concernant la mutation MERRF sont présentés dans l'article n°4 et ceux concernant la mutation MELAS sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre.

I. Article n°4

Conséquences protéomiques d'une mutation dans un ARNt mitochondrial humain, en dehors du cadre de la traduction mitochondriale

P. Tryoen-Tóth, S. Richert, B. Sohm, M. Mine, C. Marsac,
A. Van Dorsselaer, E. Leize & C. Florentz

2003

Journal of Biochemical Chemistry, 278, 24314-24323

Résumé :

De nombreuses pathologies neurodégénératives et neuromusculaires sévères caractérisées biochimiquement par de fortes perturbations dans le métabolisme énergétique, ont été corrélées à des mutations ponctuelles dans des gènes mitochondriaux codant pour des ARN de transfert. Les premiers travaux de protéomique comparative réalisés sur des couples de mitochondries saines et de mitochondries liées à une mutation dans un gène d'ARNt provenant de lignées cellulaires humaines cybrides, ont montré le potentiel de cette approche. Ici, une analyse quantitative de plusieurs centaines de protéines colorées au nitrate d'argent après séparation par électrophorèse bidimensionnelle, a été réalisée dans le cas spécifique du couple de mitochondries contenant ou non la mutation A8344G dans le gène mitochondrial de l'ARNt^{Lys}, corrélée au syndrome MERRF. L'analyse assistée par ordinateur nous a permis de mettre en évidence 38 taches avec une variation quantitative significative, dont 20 ont pu être assignées par spectrométrie de masse. Parmi celles-ci se trouvent des protéines codées par le génome nucléaire à localisation mitochondriale comme des sous-unités de la chaîne respiratoire, des enzymes du métabolisme, une protéine de l'appareil de traduction mitochondriale et des contaminants cytosoliques. De plus, des analyses immunologiques combinées à la spectrométrie de masse ont révélé la présence de nombreuses isoformes des sous-unités de la pyruvate déshydrogénase, portant des variations subtiles dans les modifications post-traductionnelles. Cette analyse par protéomique mitochondriale comparative donne un premier aperçu des protéines codées par le génome nucléaire subissant de grands changements quantitatifs et met en évidence de nouveaux partenaires moléculaires potentiellement impliqués dans la cascade d'événements reliant génotype et phénotype.

II. Analyse protéomique comparative de mitochondries présentant ou non la mutation MELAS

L'analyse des cellules portant la mutation MELAS a été réalisée en parallèle de celle sur les cellules portant la mutation MERRF. Les techniques utilisées sont identiques dans les deux cas, et les cellules utilisées pour cette analyse sont également des cellules cybrides dont le principe est décrit dans la publication n°4 et dans Matériel et Méthodes. La caractérisation du couple de lignées cellulaires H94i (cellules sauvages) et H43B (cellules portant la mutation A3243G dans le gène mitochondrial de l'ARNt^{Leu(UUR)}) est décrite par Chomyn et coll. (1992). L'ensemble de la démarche et les résultats obtenus pour cette analyse protéomique comparative concernant la pathologie MELAS sont présentés ci-dessous. Elle est complétée par une recherche d'isoformes des sous-unités de la pyruvate déshydrogénase, à l'aide d'une analyse par western-blotting sur gels bidimensionnels.

A. Difficultés de reproductibilité des gels MELAS

L'analyse du premier couple de gels obtenus à partir de mitochondries saines (gel sauvage) et de mitochondries portant la mutation MELAS (gel MELAS ou gel mutant) est apparue très prometteuse car une trentaine de spots avec une variation d'intensité supérieure à un facteur 4 ont été mis en évidence. L'analyse des deuxième et troisième couples de gels a également mis en évidence une trentaine de spots dérégulés. Cependant, lors du recouplement des résultats de ces trois analyses, il s'est avéré que les spots dérégulés étaient différents dans les trois expériences. Seule une dizaine de spots dérégulés sont apparus communs mais uniquement dans les couples pris deux à deux. Ainsi, l'analyse protéomique de mitochondries "MELAS" semblait d'emblée plus complexe que celle des mitochondries "MERRF".

La reproductibilité des gels a donc été testée. Pour cela, des couples de deux gels sauvages ou de deux gels mutants, ont été comparés. L'intensité d'une série de 30 spots, pris au hasard et correctement identifiés ("matchés") sur les deux gels de chaque couple, a été comparée (Fig. 25). Cette analyse a mis en évidence une grande variabilité dans l'intensité des taches sur deux gels mutants alors que les gels sauvages présentent une forte conservation de l'intensité des taches. Cette variation ne provient pas *a priori* d'erreurs expérimentales puisque les gels ont été réalisés en parallèle (migration sur le même appareil, avec des tampons identiques) et que le couple de gels sains ne présente pas de variations.

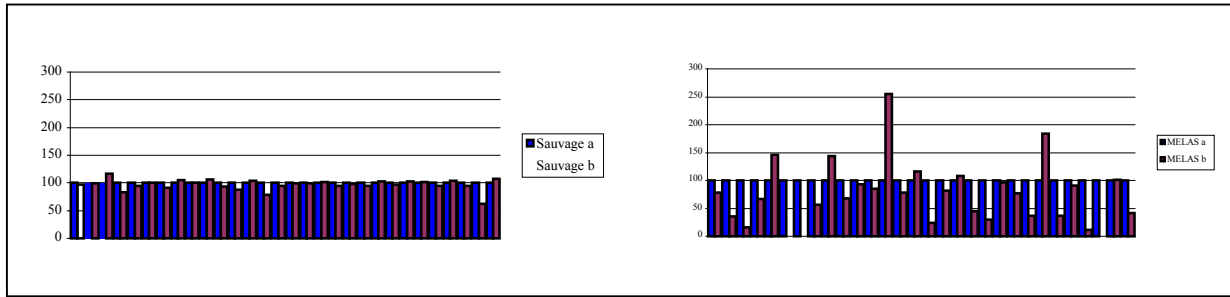


Figure 25: Histogrammes représentant les variations de l'intensité de 30 spots “matchés” au sein d'une comparaison de gels sauvage:sauvage ou mutant:mutant.

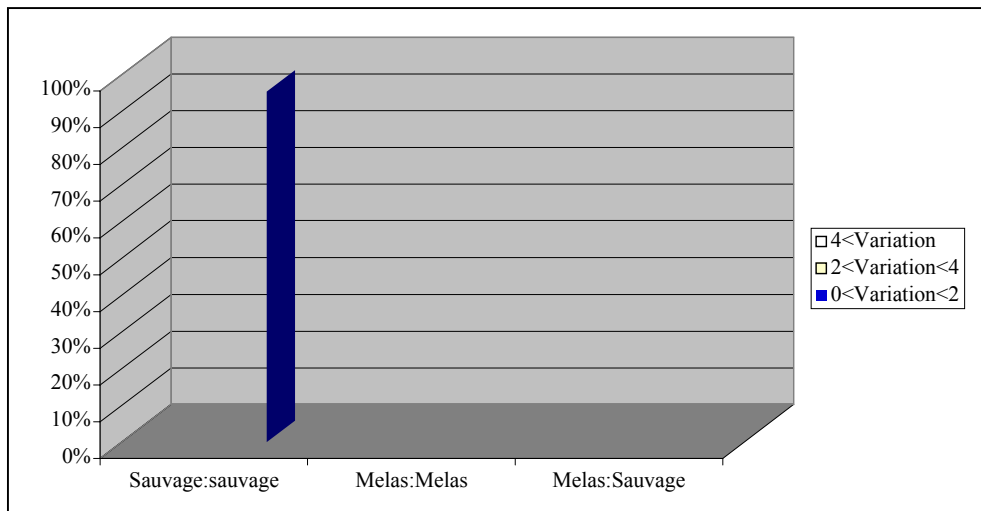


Figure 26. Analyse de la variation quantitative de l'intensité de l'ensemble des spots au sein de différents couples de gels sans vérification du “matching”.

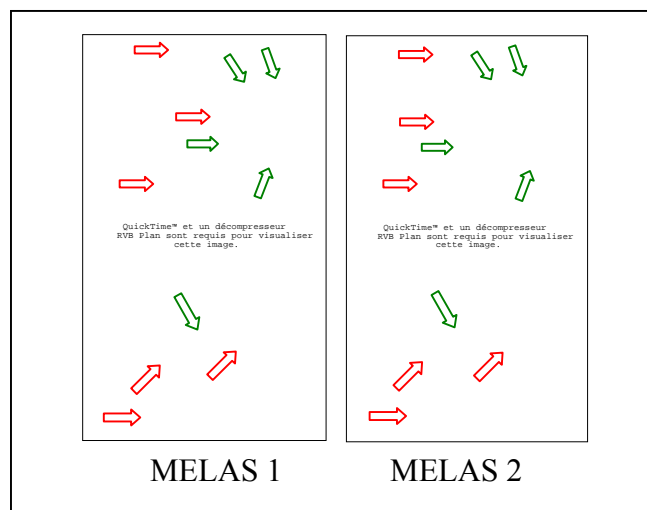


Figure 27. Représentation des variations entre deux gels MELAS sur une partie détaillée du gel. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les spots dont l'intensité est augmentée ou diminuée dans le gel MELAS 1 par rapport au gel MELAS 2. La normalisation a été effectuée par rapport à la quantité totale des spots valides.

Une comparaison des résultats quantitatifs obtenus pour l'ensemble des spots présents sur des couples de gels sauvage:sauvage, mutant:mutant, et sauvage:mutant a été effectuée sans vérification du “matching”, afin d'obtenir un aperçu global des variations (Fig. 26). Dans le couple sauvage:sauvage, moins de 5% des spots varient d'un facteur supérieur à deux, alors que dans le cas des deux gels mutants, plus de 30% des spots varient d'un facteur supérieur à 2. Dans le cas d'un couple sauvage:mutant, plus de 40% des spots varient d'un facteur supérieur à 2. Ceci signifie que sur l'ensemble des spots dérégulés mis en évidence dans l'analyse d'un couple sauvage:mutant, seuls 10% seront trouvés affectés de façon reproductible dans l'ensemble des couples et ne feront pas partie des variations intrinsèques aux gels MELAS. Un exemple de variabilité dans l'intensité des spots observée sur deux gels obtenus à partir de mitochondries MELAS est présenté dans la Figure 27. Pour plusieurs spots l'intensité est largement diminuée et cette diminution est aléatoire puisqu'elle n'est pas conservée dans l'ensemble des gels mutants. De telles variations intrinsèques n'ont pas été observées dans le cas de gels MERRF. Suite à ces résultats, il nous semblait difficile de poursuivre l'exploitation des cartes MELAS sans au préalable comprendre et remédier au problème de reproductibilité des cartes bidimensionnelles.

B. Recherche des causes de la variabilité des gels MELAS

Etant donné la bonne reproductibilité des gels réalisés à partir des échantillons de mitochondries portant la mutation MERRF et les variations observées pour les gels MELAS, il est vraisemblable que nous sommes confrontés à des propriétés directement liées à l'état physiologique des mitochondries MELAS plutôt qu'à un problème d'ordre technique.

1. Activation de protéases

Une des hypothèses permettant de comprendre ces variations pourrait être liée à la dégradation aléatoire des protéines par des protéases plus actives dans les cellules MELAS que dans les cellules MERRF et dans les cellules saines. L'ajout d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche) a été testé au cours des étapes d'extraction, de purification des mitochondries et de l'étape de solubilisation des protéines mitochondriales lors du dépôt sur les gels d'isoélectrofocalisation, mais est resté sans effet. Nous concluons soit qu'il ne s'agit pas d'un problème de protéases, soit qu'il s'agit de protéases intrinsèques aux mitochondries qui sont déjà actives lors de la purification des organelles, et que les inhibiteurs n'ont pas d'effet car ils n'arrivent pas à pénétrer dans la matrice mitochondriale.

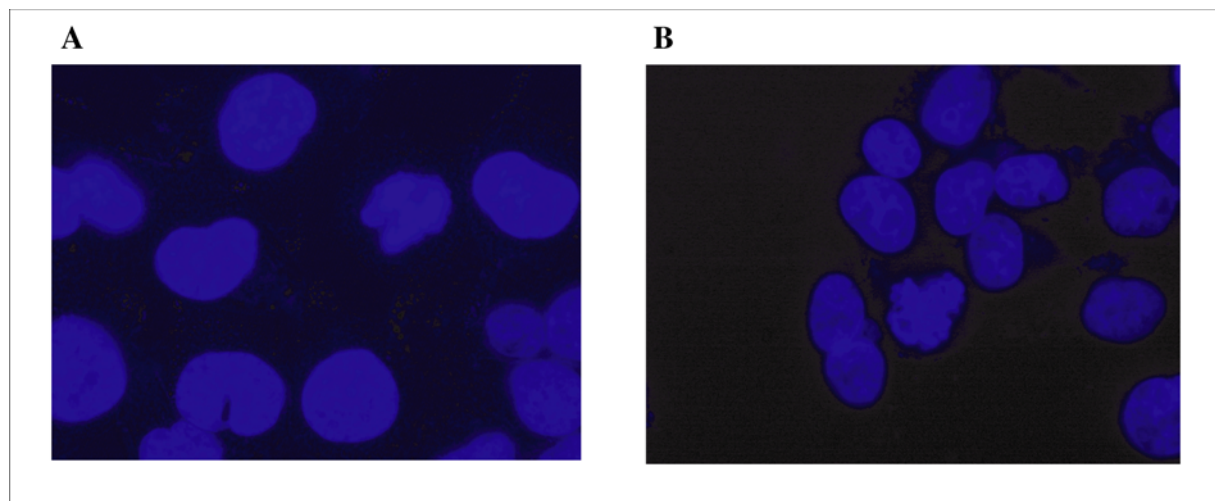


Figure 28. Visualisation par microscopie à épifluorescence de la chromatine de cellules par marquage à l'agent intercalant Hoechst H33258 (longueur d'onde 346 nm). A. Cellules cybrides sauvages (H94I, grossissement 800). B. Cellules cybrides MELAS (H43B, grossissement 600).

Si tel est le cas, il ne semble pas possible de pouvoir contrecarrer les problèmes de reproductibilité des expériences.

2. Activation des phénomènes d'apoptose

Durant ces dernières années, de nombreuses études ont été réalisées sur l'implication de l'apoptose dans les maladies neurodégénératives suggérant une augmentation de phénomènes apoptotiques dans les cellules présentant des mutations ponctuelles dans les gènes d'ARNt (Mirabella et coll., 2000; Zhang et coll., 1998). Les variations aléatoires des spots observées nous ont conduit à penser que les cellules mutées pouvaient subir des perturbations biochimiques telles qu'un grand nombre de cellules allaient s'engager dans la voie apoptotique. Les cellules engagées dans l'apoptose présentent une condensation de la chromatine caractéristique, visible au microscope lorsque cet ADN est marqué avec l'agent intercalant Hoechst H33258 (longueur d'onde 346 nm, Sigma). Cette technique a été appliquée aux deux couples de lignées cellulaires (sauvage et MERRF, sauvage et MELAS). Aucune différence notable n'a pu être observée que ce soit entre les cellules saines et les cellules MELAS (Fig. 28), ou entre les cellules saines et les cellules MERRF (résultats non présentés). Les cellules MELAS ne sont donc pas plus engagées dans les voies de l'apoptose que les cellules saines. Ceci est en fait en accord avec des résultats récents montrant que les phénomènes d'apoptose étaient bien enclenchés dans les muscles présentant la mutation MELAS mais qu'une étape plus en aval de la voie apoptotique était ensuite inhibée et que l'apoptose dans son ensemble était bloquée (Ikezoe et coll., 2002; Sciacco et coll., 2001).

3. Autres causes potentielles

L'une des caractéristiques biochimiques de la pathologie MELAS est, comme son nom l'indique (Mitochondrial Encephalopathy with Lactic Acidosis and Stroke like episodes), une acidification du cytoplasme due à une accumulation d'acide lactique (Goto et coll., 1992; Schmiedel et coll., 2003). Ceci est tout à fait visible dans les cultures cellulaires avec une acidification plus rapide (après 2 jours) du milieu de culture des cellules MELAS que des cellules saines (après 4 jours) et ce, malgré un temps de génération plus long des cellules MELAS (cellules cybrides saines 17-20 h / cellules cybrides MELAS 30 h). Dans le cas des cellules MERRF, le milieu change de couleur après 3 jours de culture. Il est possible que l'acidification du cytoplasme contribue, par des événements directs ou par des événements en cascade, à des perturbations du protéome mitochondrial et ainsi aux difficultés de

reproductibilité des protéomes MELAS. Les changements de pH pourraient interférer avec les mécanismes d'import, avec l'activité des protéases, avec l'activité des enzymes de modifications post-traductionnelles, etc..

Les cellules dont nous disposons pour faire cette analyse sont homoplasmiques pour la mutation A3243G dans le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)} (Chomyn et coll., 1992; Helm et coll., 1999a). Il est possible que la cellule supporte difficilement l'homoplasmie pour cette mutation car cela engendre des perturbations "trop graves". Une solution serait d'utiliser des cellules cybrides hétéroplasmiques pour la mutation A3243G c'est-à-dire contenant 5 % d'ADN sain. Ce faible taux devrait être suffisant pour atténuer le phénotype "malade". En effet, 10 % d'ADN sauvage dans ces cellules sont suffisants pour la réversion du phénotype qui apparaît alors comme sain (Chomyn et coll., 1992). Cependant, cette solution n'est pas applicable car la mutation A3243G confère un avantage réplcatif à l'ADN mt la portant (Attardi et coll., 1995). Ainsi, des cellules cybrides hétéroplasmiques pour cette mutation deviendraient homoplasmiques après quelques divisions cellulaires.

4. Conclusions

Les difficultés de reproductibilité des cartes bidimensionnelles pour les mitochondries MELAS sont probablement liées à des perturbations biochimiques et/ou moléculaires nombreuses et variées au sein des cellules correspondantes. Ces événements sont de nature dynamique et ne peuvent être bloqués de manière nette au moment de l'arrêt des cultures cellulaires et de la purification des mitochondries. Ainsi, à chaque expérience, nous produisons une image différente du contenu protéique mitochondrial. Afin de mieux cerner les variations subies par les protéines (clivages protéolytiques, modifications post-traductionnelles inhabituelles, autres...) et de tenter de repérer un certain nombre de protéines quantitativement affectées dans les mitochondries MELAS par rapport aux mitochondries saines, nous avons considéré non pas des gels entiers, trop complexes, mais des "zones" limitées de gels, en avons établi une analyse quantitative et assigné systématiquement les protéines.

C. Analyse quantitative et qualitative de zones de gels bidimensionnels

L'ensemble des gels réalisés avec les mitochondries portant la mutation MELAS présente un certain nombre de protéines dérégulées communes. Cependant, le repérage de ces protéines nécessite la vérification de l'ensemble des spots dérégulés sur la totalité des couples analysés afin d'éliminer les spots qui varient de façon aléatoire. Toutefois, une telle recherche constituerait un travail trop fastidieux. Nous avons donc défini des zones délimitées et réalisé soit une analyse complète (quantitative et qualitative, 3 couples de gels, facteur 2 de variation d'intensité pris en compte) soit une analyse moins précise (variations supérieures à un facteur 4).

1. Analyse délimitée à deux zones restreintes (C et E)

Nous avons réalisé une analyse complète de deux parties des gels afin de mettre en évidence les protéines dérégulées mais aussi dans le but d'identifier l'ensemble des protéines de ces parties du gel et de vérifier ainsi la nature (fragments, isoformes, ...) des différentes protéines. Ces deux parties correspondent à des régions du gel qui comprennent un nombre restreint de spots, bien définis. Les zones ont été nommées zone C et zone E. Des variations moyennes d'intensité à un facteur ≥ 2 ont été recherchées pour l'analyse comparative réalisée sur 3 couples de gels (sauvage:muté).

a. Zone C

La zone C comprend les protéines de pHi compris entre 5,7 et 7,5 et de masses moléculaires comprises entre 10 kDa et 34 kDa (Fig. 29A). L'analyse des 28 spots bien isolés a permis de mettre en évidence 2 spots dont l'intensité est augmentée d'un facteur ≥ 2 (5C et 23C) et 8 spots diminués (\leq) d'un même facteur (3C, 7C, 14C, 24C, 25C, 26C, 27C, 28C). La Figure 29B montre les variations moyennes de chaque spot observées sur les 3 couples de gels analysés. Sur les 28 spots analysés par spectrométrie de masse, seuls 10 spots ont pu être identifiés et sont consignés dans le Tableau 9A. Les spots non identifiés présentaient une intensité trop faible ou n'étaient pas retrouvés dans les banques de données. L'analyse du Tableau 9A montre tout d'abord que plusieurs spots correspondent à une même protéine.

Ainsi, les spots 1C et 2C correspondent à la prohibitine, une forme ayant un pHi de 5,7 et l'autre de 6,0. De même, les spots 5C et 11C correspondent à deux formes de la peredoxine différentes par la masse d'environ 300 Da et par le pHi de 0,2 unité de pH. Ceci suggère par

exemple des variations dans les modifications post-traductionnelles entre les 2 isoformes ou encore que les deux protéines proviendraient de l'épissage alternatif d'un même gène. Nous excluons la possibilité qu'il s'agisse de fragments d'une même protéine car les deux protéines analysées ont une masse supérieure à la masse théorique (ceci aussi aussi bien pour la prohibitine que la peredoxine). La présence de l'histone H4, protéine d'origine nucléaire, et la grande variation d'intensité (-225 x) est très surprenante car on ne peut pas expliquer comment une protéine à localisation nucléaire, peut se retrouver en de telles quantités dans des préparations de mitochondries sauvages purifiées. Une erreur d'assignation est à envisager en raison d'une différence significative entre le pHi théorique et le pHi expérimental de 4 unités, malgré un recouvrement de séquence de 55 %. Enfin, il est réconfortant de trouver pour les protéines ayant subi une diminution quantitative dans les cellules MELAS, deux sous-unités du complexe respiratoire I, NADH ubiquinone oxydoréductase. Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans le cas de la mutation MERRF et met en relation moléculaire simple l'ADN mt muté et la chaîne respiratoire.

b. Zone E

La zone E comprend les protéines de pHi compris entre 6,2 et 7,1, et de masses moléculaires comprises entre 61 kDa et 36 kDa (Fig. 30A). L'analyse comparative de 28 spots de cette zone a mis en évidence 4 spots diminués (2E, 11E, 16E, 17E) et 5 spots augmentés (13E, 15E, 23E, 24E, 28E) d'un facteur ≥ 2 (Fig. 30B). La technique de spectrométrie de masse a permis l'identification de 14 des 28 spots de la zone E dont 6 des spots dérégulés. L'ensemble des spots identifiés apparaît dans le Tableau 9B. Comme pour la zone C, nous trouvons plusieurs spots correspondant à une même protéine. Ainsi, deux spots correspondent à la dihydrolipoamide succinyl transférase, deux autres à la protéine X de la pyruvate déshydrogénase et deux autres à l'ornithine aminotransférase. Dans chaque cas, une variation de masse (300 Da à 3 200 Da) et une variation de pHi (0,1 à 0,2 unités) est observée suggérant des modifications post-traductionnelles différentes. De façon surprenante, les deux isoformes d'une même protéine ont subi des variations quantitatives opposées (dihydrolipoamide succinyl transférase, pyruvate déshydrogénase). Ainsi, en résumé, les protéines ayant subi des changements d'intensités dans les mitochondries MELAS par rapport aux mitochondries saines sont représentatives des variations dans les modifications post-traductionnelles pour une protéine donnée. Il est tentant de proposer que la cellule malade surproduise les isoformes plus actives qui, soit contribuent à la maladie, soit correspondent à des mécanismes de compensation.

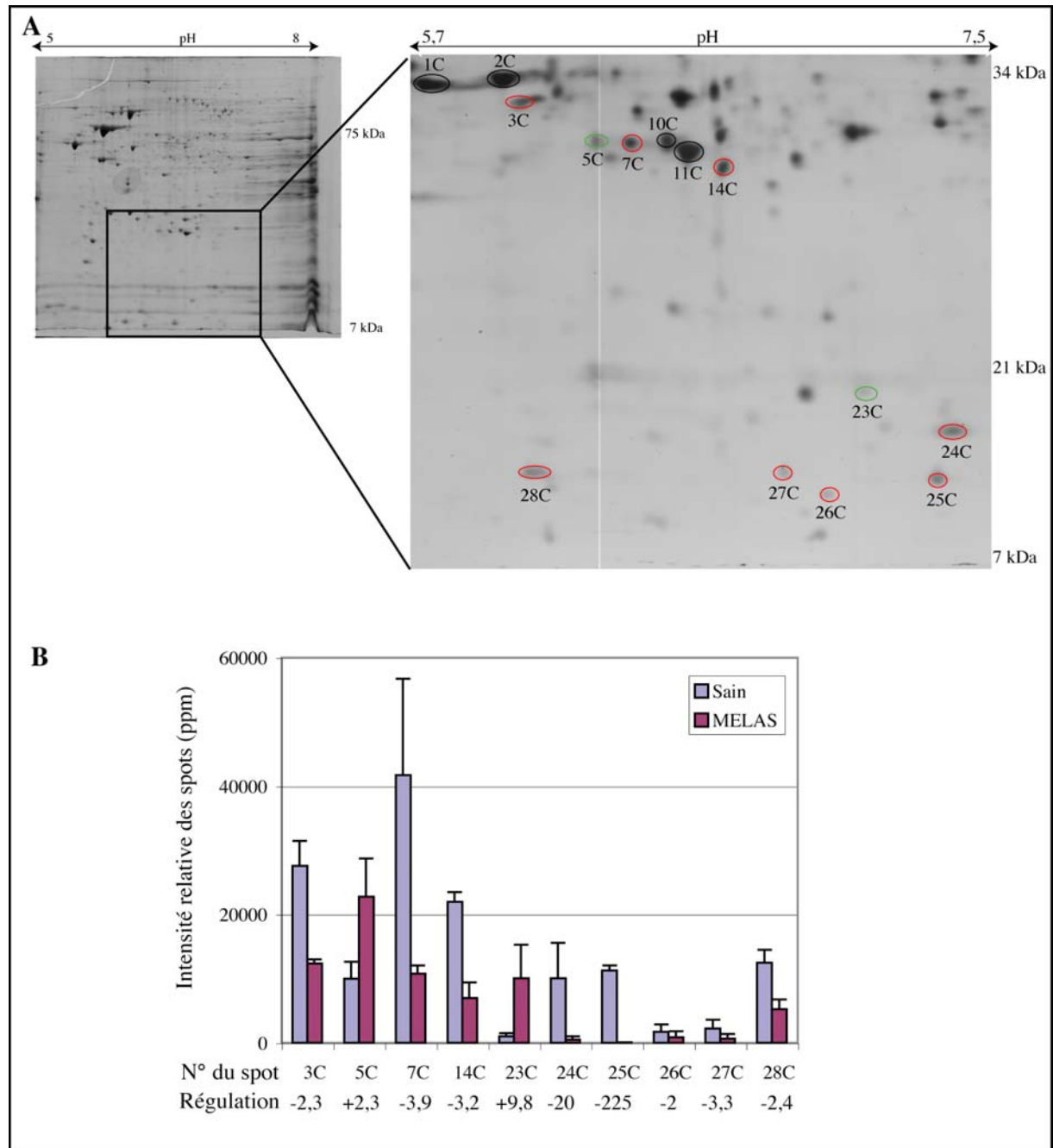


Figure 29. Analyse détaillée quantitative de la zone C du couple de gels sauvage:MELAS. A. Gel bidimensionnel classique, coloré au nitrate d'argent, de mitochondries de cellules cybrides sauvages (H941). Les mitochondries ont été purifiées à partir de lignées de cellules adhérentes et solubilisées à l'aide de fortes concentrations de détergent non ionique et d'agent dénaturant. Les protéines sont séparées par isoélectrofocalisation (pH 5-8), puis par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide-SDS (10 %). Les gels colorés à l'argent ont été scannés. La zone C a été quantifiée par le logiciel informatique PD-Quest. Les spots dont l'intensité est augmentée d'un facteur ≥ 2 dans les 3 gels MELAS sont entourés de vert, les spots dont l'intensité est diminuée d'un facteur ≥ 2 sont entourés de rouge. Les spots invariants identifiés par spectrométrie de masse sont en noir. B. Histogramme représentant les spots qui présentent une variation d'intensité ≥ 2 dans le gel MELAS par rapport au gel sauvage. Les valeurs moyennes de chaque spot pour 3 expériences indépendantes avec les barres d'erreurs standards correspondantes sont indiquées. Les numéros des spots correspondent aux numéros indiqués sur la portion de gel ci-dessus et restent identiques dans l'ensemble de l'analyse.

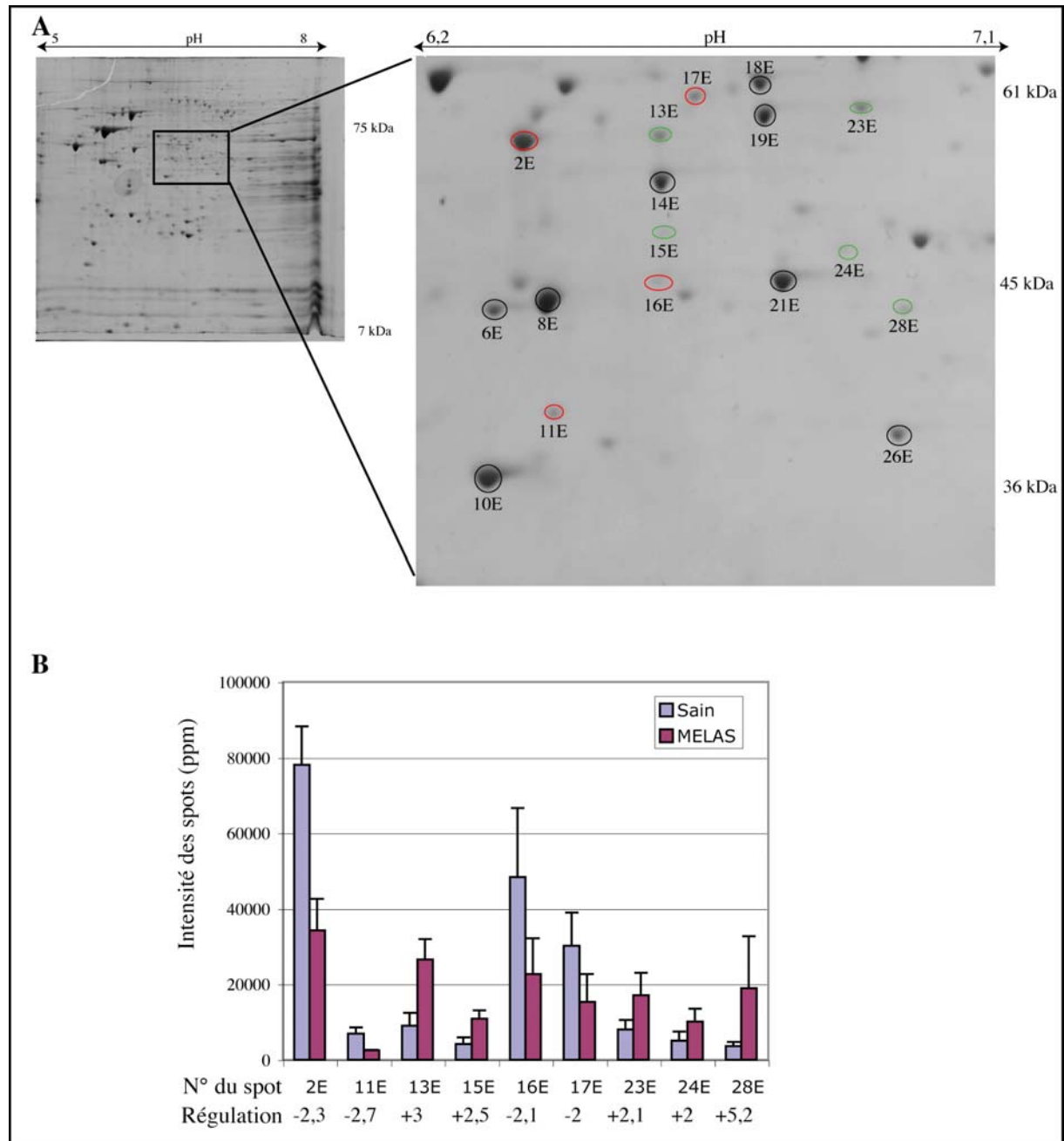


Figure 30. Analyse détaillée quantitative de la zone E du couple de gels sauvage:MELAS. A. Gel bidimensionnel classique, coloré au nitrate d'argent, de mitochondries de cellules cybrides sauvages (H941). Les mitochondries ont été purifiées à partir de lignées de cellules adhérentes et solubilisées à l'aide de fortes concentrations de détergent non ionique et d'agent dénaturant. Les protéines sont séparées par isoélectrofocalisation (pH 5-8), puis par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide-SDS (10 %). Les gels colorés à l'argent ont été scannés. La zone E a été quantifiée par le logiciel informatique PD-Quest. Les spots dont l'intensité est augmentée d'un facteur ≥ 2 dans les 3 gels MELAS sont entourés de vert, les spots dont l'intensité est diminuée d'un facteur ≥ 2 sont entourés de rouge. Les spots invariants identifiés par spectrométrie de masse sont en noir. B. Histogramme représentant les spots qui présentent une variation d'intensité ≥ 2 dans le gel MELAS par rapport au gel sauvage. Les valeurs moyennes de chaque spot pour 3 expériences indépendantes avec les barres d'erreurs standards correspondantes sont indiquées. Les numéros des spots correspondent aux numéros indiqués sur la portion de gel ci-dessus et restent identiques dans l'ensemble de l'analyse.

Expérimental			Exploitation des banques de données					
N° du spot	Régulation	Masse moléculaire/pHi	Nom	N° d'accension	Loc.	Masse moléculaire	pHi	Recouvrement de séquence
A								
1C	Invariant	33,7/5,7	Prohibitine	P35232	C	29804	5,57	41%
2C	Invariant	33,7/6	Prohibitine	P35232	C	29804	5,57	75%
3C	-2,2	32,6/6,1	NADH ubiquinone oxydoreductase, 30 kDa	O75489	Mt	26414	5,48	55%
5C	2,3	30/6,3	Peroxi-doxine 3	P30048	Mt	21468	5,77	42%
7C	-3,9	30,4/6,4	NADH ubiquinone oxydoreductase, 24 kDa	P19404	Mt	23760	5,71	41%
9C	Invariant	32,8/6,5	Enoyl CoA hydratase	P30084	Mt	28501	5,88	46%
10C	Invariant	30,6/6,5	GrpE protéine homologue 1	Q9HAV7	Mt	21233	6,03	47%
11C	Invariant	29,7/6,5	Peroxi-doxine 3	P30048	Mt	21468	5,77	31%
14C	-3,1	29,1/6,7	Protéine de liaison à l'ARN sous-unité régulatrice	O14805	?	19878	6,33	83%
25C	-225	16,1/7,4	Histone H4	P02304	N	11236	11,36	52%
B								
2E	-2,3	59,3/6,4	Dihydroli-poamide succinyl transfér-ase (E2)	P36957	Mt	41349	5,89	30%
6E	Invariant	49,6/6,3	Succinyl-coA ligase sous-unité β	O95194	Mt	46419	5,84	32%
8E	Invariant	50,2/6,4	“Calcium binding transporter” (fragment)	NP037518	?	45819	5,31	34%
10E	Invariant	41,7/6,3	Isocitrate déhydrogenase sous-unité α	P50213	Mt	36787	5,72	44%
13E	3	59/6,6	Dihydroli-poamide succinyl transfér-ase (E2)	P36957	Mt	41349	5,89	28%
14E	Invariant	49,8/6,6	“Processing peptidase” sous-unité α	O75439	Mt	49487	5,77	47%
15E	2,6	58/6,6	Protéine X de la pyruvate déshydrogenase	O00330	Mt	48024	6,01	22%
16E	-2,1	49,8/6,6	Ornithine aminotransfér-ase	P04181	Mt	44808	5,72	28%
17E	-2	61,2/6,6	Protéine X de la pyruvate déshydrogenase	O00330	Mt	48024	6,01	22%
18E	Invariant	63,5/6,7	Aldéhyde déshydrogenase X	P30837	Mt	55292	6,01	41%
19E	Invariant	61,5/6,7	“Processing peptidase” sous-unité α	Q10713	Mt	54624	5,75	33%
21E	Invariant	50,1/6,7	Ornithine aminotransfér-ase	P04181	Mt	44808	5,72	51%
26E	Invariant	42,4/6,9	Protéine ribosomale 28S sous-unité S22	P82680	Mt	41000	7,7	55%
28E	5,2	44,8/6,9	Septine 2	Q15019	C	41487	6,15	28%

Tableau 9. Spots identifiés par la technique de spectrométrie de masse. A. Spots provenant de l'analyse de la zone C du gel. B. Spots provenant de l'analyse de la zone E du gel. A et B. La variation d'intensité des spots a été calculée par le rapport sauvage/mutant ou mutant/sauvage. Le pHi et la masse moléculaire observés sur le gel sont indiqués dans la partie expérimentale. Le pHi et la masse moléculaire de la forme mature de la protéine, la localisation cellulaire de la protéine obtenue à partir de la banque de donnée SwissProt sont indiqués dans la partie théorique. Le pourcentage de recouvrement de séquence obtenu pour l'assignation de chaque spot est indiqué. Loc. localisation cellulaire, Mt, mitochondriale; N, nucléaire; C, cytoplasmique; ?, pas de précision sur la localisation.

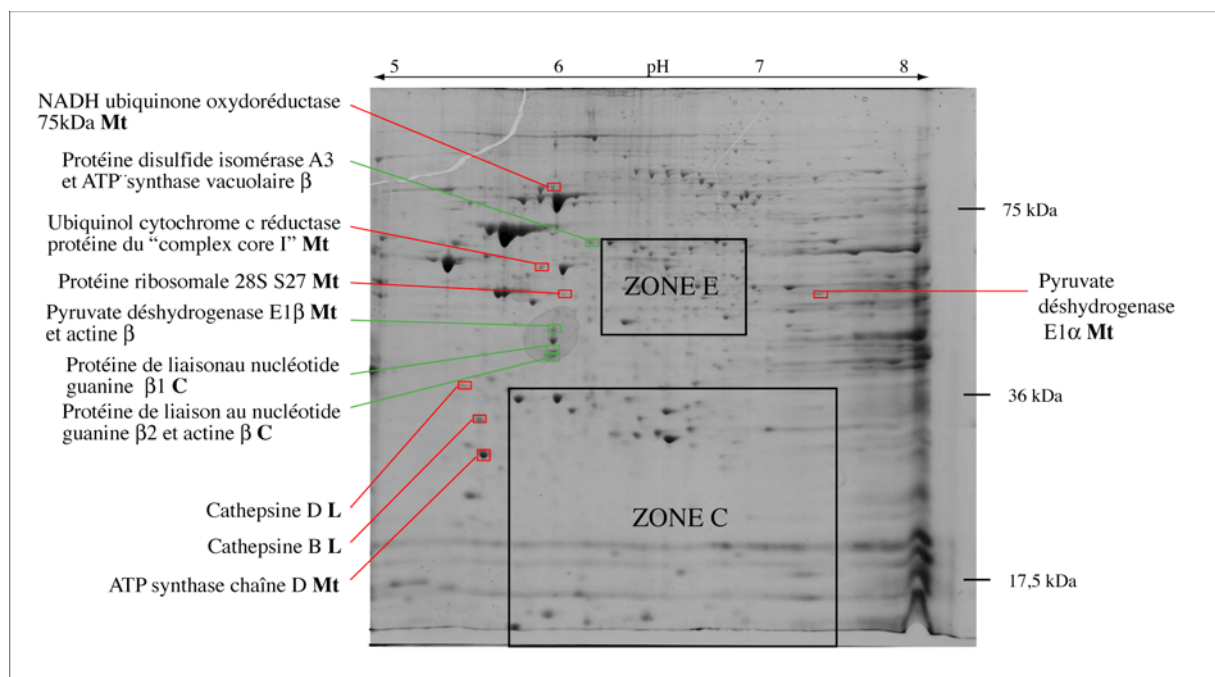


Figure 31. Gel bidimensionnel classique, coloré au nitrate d'argent, de mitochondries de cellules cybrides sauvages (H941) et localisation des protéines qui apparaissent dérégulées dans les gels MELAS pour au moins deux des cinq couples analysés. Les mitochondries ont été purifiées à partir de lignées de cellules adhérentes et solubilisées à l'aide de fortes concentrations de détergents non ionique et d'agent dénaturant. Les protéines sont séparées par isoélectrofocalisation (pH 5-8), puis par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide-SDS (10 %). Les gels colorés à l'argent ont été scannés. L'ensemble du gel a été quantifié par le logiciel informatique PD-Quest. Les spots dont l'intensité est diminuée d'un facteur ≥ 4 dans le gel MELAS sont représentés en rouge. Les spots dont l'intensité est augmentée d'un facteur ≥ 4 dans le gel MELAS sont représentés en vert. Mt : mitochondriale, C : cytoplasmique, L : lysosomale.

2. Analyse globale de zone complémentaire

Une analyse globale de 5 couples de gels a été réalisée autour des zones C et E. Un changement minimal d'un facteur ≥ 4 de l'intensité des spots a été choisi pour cette analyse comparative afin de mettre en évidence préférentiellement les spots qui subissent une dérégulation reproductible. Cependant, pour aucun spot, un même sens de variation n'a été observé sur l'ensemble des 5 couples de gels. Deux spots dérégulés sont présents dans au moins 4 des couples et 19 dans au moins 2 couples. Chaque spot qui présentait une variation identique dans au moins 2 couples a été assigné. Bien qu'une variation identique d'un spot dans seulement 2 couples ne soit pas significative, cela a permis d'obtenir un aperçu des protéines qui pouvaient être dérégulées, mais aussi de contribuer à l'assignation des protéines du protéome de la mitochondrie humaine. Les 11 spots identifiés par spectrométrie de masse sont présentés sur la Figure 31. Cette analyse met en évidence des similitudes avec l'analyse du protéome MERRF. La protéine actine β , la sous-unité β de la pyruvate deshydrogénase ainsi que deux sous-unités de la "guanine nucleotide binding protein" sont également retrouvées augmentées dans l'analyse de la mutation MERRF. De même, la sous-unité 75 kDa de la NADH ubiquinone oxydoréductase varie dans le même sens. Cependant, une isoforme de la sous-unité α de la pyruvate deshydrogénase est diminuée contrairement au protéome MERRF où elle a été trouvée largement augmentée.

D. Analyse des sous-unités de la pyruvate deshydrogénase

Dans l'analyse du protéome MERRF, la présence de nombreuses isoformes des deux sous-unités de la pyruvate deshydrogénase a pu être mise en évidence grâce à la technique des western-blot sur gel bidimensionnel (article n°4). Dans le cas de l'analyse MELAS, les sous-unités α et β sont également apparues dérégulées dans l'analyse quantitative de cartes bidimensionnelles. Il nous a donc paru important de rechercher la présence d'isoformes de ces deux sous-unités dans le cas MELAS, par l'utilisation de cette même approche. La Figure 32 présente le résultat de cette expérience.

Dans le cas de la mutation MELAS, les mitochondries présentent également des isoformes des deux sous-unités de la pyruvate deshydrogénase. La sous-unité β existe sous 2 formes majeures et la sous-unité α sous au moins 8 formes. Cette expérience n'a été réalisée que sur un couple de mitochondries et au vu des résultats décrits ci-dessus, il n'est pas exclu que la déstabilisation des différentes isoformes fluctue en fonction de l'échantillon.

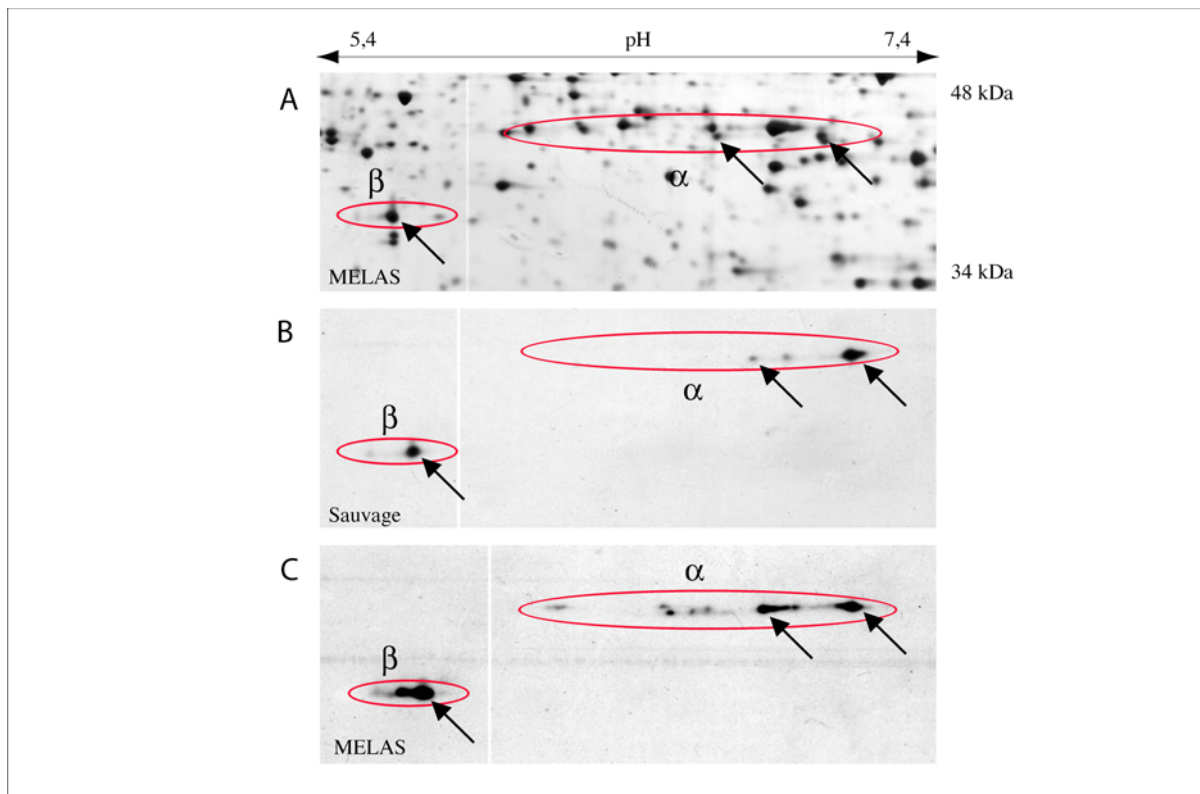


Figure 32. Détection de la présence d'isoformes de sous-unités de la pyruvate déshydrogénase E1. A. Détail d'une zone du gel bidimensionnel MELAS coloré à l'argent. Les spots assignés par spectrométrie de masse dans l'analyse du gel MERRF sont indiqués par des flèches (Tryoen-Tóth et coll., 2003). B et C. Western-blot appliqué sur des gels bidimensionnels avec un anticorps dirigé contre les sous-unités α et β de la pyruvate déshydrogénase E1. B. Gel sauvage, C. Gel MELAS.

Cependant, l'augmentation du nombre d'isoformes dans les mitochondries MELAS tout comme dans les mitochondries MERRF est peut-être un marqueur biologique des maladies mitochondriales. Pour confirmer une telle possibilité, de nombreux contrôles sont nécessaires aussi bien sur des cellules malades liées à d'autres mutations dans les ARNt que sur des cellules saines.

E. Conclusion

L'analyse par protéomique comparative de mitochondries saines et de mitochondries portant la mutation MELAS s'est révélée bien plus difficile dans le cas de la mutation MERRF. En effet, les cartes bidimensionnelles n'ont pas été reproductibles pour un certain nombre de spots, avec l'apparition ou la disparition de spots, des variations quantitatives de certains spots non observées ou différentes pour chaque gel produit. Les variations observées, que nous n'avons pas pu contrecarrer, sont peut-être en relation avec les résultats parfois contradictoires observés pour les événements moléculaires ayant lieu dans différentes lignées cellulaires portant une même mutation. Rappelons en effet que les expériences *in vivo* visant à mesurer le taux d'aminacylation des ARNt mutés ont conduit à des résultats très différents (Jacobs & Holt, 2000). Des tentatives de contrecarrer des effets de protéases se sont avérées infructueuses. Par ailleurs, l'assignation par spectrométrie de masse d'un certain nombre de spot a montré l'absence de fragments protéolytiques (toutes les protéines ont des masses supérieures à leur masse théorique) suggérant que les variabilités des résultats n'étaient pas liées à un problème de protéases.

L'assignation de différents spots comme étant une même protéine montre une diversité dans les modifications post-traductionnelles ou dans les épissages des ARNm correspondants. Plus de 300 modifications post-traductionnelles sont connues dont les glycosylations sont les plus variées et les plus nombreuses (<http://us.expasy.org/alinks.html#PTM>). De même, les phosphorylations/ déphosphorylations sont des modifications très courantes. Il se pourrait que les variabilités dans les distributions de spots que nous avons observées soient en fait le reflet des activités de kinases et de phosphatases que nous ne contrôlons pas lors de la purification des mitochondries en vue de la séparation des protéines sur gel bidimensionnel. Il serait intéressant de faire de nouveaux essais en vue d'établir des cartes exploitables, en ajoutant un inhibiteur de phosphatases aux différentes étapes de préparation des échantillons. Une autre possibilité serait de préfractionner les protéines mitochondriales avant de les déposer sur gel d'isoélectrofocalisation. Il est en effet envisageable d'éliminer par exemple une partie des

protéines phosphorylées (par chromatographie d'affinité sur colonne greffée d'anticorps anti-phosphotyrosine) et d'analyser uniquement les autres. Alternativement, il serait possible de traiter les échantillons à l'aide de phosphatase et de réduire ainsi le nombre d'isoformes de protéines phosphorylées à zéro (Larsen et coll., 2001; Yamagata et coll., 2002).

Malgré ces difficultés, nous avons pu mettre en évidence un petit nombre de protéines dérégulées de façon significative et reproductible dans les mitochondries MELAS, et proposons une liste de protéines “ayant tendance à être dérégulées”. De manière intéressante, il s'agit de protéines codées par le génome nucléaire, montrant ainsi, comme dans le cas de la mutation MERRF, qu'il y avait des effets à longue distance d'une mutation dans un gène mitochondrial et ainsi un lien potentiel entre le génome mitochondrial et le génome nucléaire. Le Tableau 10 présente l'ensemble des protéines ou des sous-unités d'un même complexe enzymatique, qui ont été trouvées dérégulées dans les deux cas. Ainsi, des sous-unités de la NADH ubiquinone oxydoréductase, de la cytochrome c oxydoréductase et de l'ornithine aminotransférase sont retrouvées diminuées d'un facteur ≥ 2 dans les deux cas (la dérégulation des deux sous-unités de la cytochrome c oxydoréductase avait été mise en évidence dans l'étude préliminaire réalisée au laboratoire en collaboration avec T. Rabilloud (Rabilloud et coll., 2002)). D'autre part, les sous-unités E1 α et E1 β de la pyruvate déshydrogénase se retrouvent à un taux plus élevé aussi bien dans les mitochondries MERRF que MELAS. Enfin, dans les deux cas un contaminant du cytosol, la septine 2, est retrouvé en quantité augmentée.

Protéines dérégulées	MERRF	MELAS
NADH ubiquinone oxydoréductase, 13 kDa	diminuée	-
NADH ubiquinone oxydoréductase, 24 kDa	diminuée	diminuée
NADH ubiquinone oxydoréductase, 30 kDa	-	diminuée
NADH ubiquinone oxydoréductase, 75 kDa	diminuée	-
Cytochrome c oxydoréductase Vb	diminuée	diminuée
Cytochrome c oxydoréductase VIa	diminuée	diminuée
Ornithine aminotransférase	diminue	diminuée
Pyruvate déshydrogénase E1 α	augmentée	augmentée (western-blot)
Pyruvate déshydrogénase E1 β	augmentée	augmentée (western-blot)
Septine 2 (cytoplasmique)	augmentée	augmentée

Tableau 10. Récapitulatif des protéines ou des sous-unités d'un même complexe mises en évidence comme dérégulées dans les analyses par protéomique comparative des gels MERRF ou des gels MELAS ou dans l'analyse par western-blot pour les sous-unités de la puruvate déshydrogénase. L'ensemble de ces protéines est à localisation mitochondriale mis à part la septine 2 qui est à localisation cytoplasmique.

Il reste maintenant à vérifier si ces même protéines sont retrouvées affectées dans d'autres lignées cellulaires que des lignées d'ostéosarcomes, et dans des lignées portant

d'autres mutations dans les gènes d'ARNt. L'utilisation de la technique de western-blot sur gel bidimensionnel a permis de révéler de nombreuses isoformes pour les sous-unités E1 de la pyruvate déshydrogénase. Etant donné que les analyses de gels colorés au nitrate d'argent ont également permis de révéler l'existence de différentes versions d'une même protéine, nous pensons qu'il serait extrêmement intéressant, et riche en information, de réaliser des western-blots bidimensionnels sur un grand nombre de protéines. Ceci permettra de vérifier les variations quantitatives fines, et sensibles pour les isoformes d'une même protéine, et aussi d'atteindre une vue très détaillée des événements ayant lieu au sein des mitochondries portant des mutations.

Conclusions et Perspectives

L'objectif principal de ma thèse a été de contribuer à la compréhension des mécanismes d'impact de pathologies liées à des mutations dans les gènes d'ARNt mitochondriaux humains. Pour cela nous avons défini deux approches. Les objectifs de la première approche étaient d'étudier l'impact des mutations au niveau de la traduction mitochondriale et plus précisément sur l'étape cruciale d'aminocyclation de l'ARNt. Pour cela, nous avons choisi de mettre en place un système d'étude *in vitro* de l'ARNt^{Leu(UUR)} mt humain, technique couramment utilisée pour de nombreux systèmes au laboratoire, qui devait permettre de palier aux difficultés des études *in vivo*, mais également de les compléter. De plus, l'étude de ces systèmes *in vitro* nous permettait de contribuer à l'acquisition de connaissances fondamentales concernant les systèmes mitochondriaux humains, domaine encore peu étudié bien que très intéressant et très important. En effet, les caractéristiques structurales originales de ces ARNt (séquence, structure) laissaient entrevoir des mécanismes d'aminocyclation différents des ARNt classiques. Par ailleurs, le nombre croissant de pathologies très sévères liées à des mutations dans les gènes des ARNt mt humains montre un besoin pressant de compréhension des événements moléculaires fondamentaux. Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement l'ARNt^{Leu(UUR)} car il présente (i) le plus grand nombre de mutations répertoriées liées à des pathologies (21 à ce jour), (ii) une structure théorique secondaire et tertiaire classiques en faveur d'une manipulation facile et (iii) une petite boucle variable ce qui le distingue de tous les autres ARNt^{Leu} connus. De plus, le clonage de la LeuRS mt humaine venait d'être publié.

Les objectifs de la seconde approche étaient de mettre en évidence des perturbations engendrées par la mutation sur l'ensemble de la mitochondrie, en dehors du cadre strict de la traduction mitochondriale, par comparaison de protéomes mitochondriaux de cellules sauvages et de cellules portant la mutation A8344G dans le gène de l'ARNt^{Lys}, corrélée au syndrome MERRF, ou de cellules portant la mutation A3243G dans le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)}, corrélée au syndrome MELAS. L'identification de ces protéines dérégulées devait permettre d'évaluer l'ampleur de l'impact de la mutation et de mettre en évidence de nouveaux acteurs impliqués dans l'expression de la pathologie. L'application de cette technique à deux mutations différentes dans les gènes d'ARNt mt ouvrait également la perspective de mettre en évidence d'éventuelles perturbations communes aux deux pathologies et aussi de détecter des biomarqueurs potentiels propres aux pathologies mitochondriales. Enfin cette étude avait comme objectif de contribuer à l'établissement d'un protéome mitochondrial humain.

I. ARNt^{Leu(UUR)} et traduction mitochondriale

Cette approche a, en effet, permis de contribuer à l'acquisition de connaissances fondamentales concernant les systèmes mitochondriaux et à la compréhension des pathologies. L'ARNt^{Leu(UUR)}, obtenu par transcription *in vitro* et riche en nucléotides A et C, s'est avéré plus fragile que les ARNt classiques en ce qui concerne son repliement et sa dégradation. Cependant l'optimisation des conditions de manipulation de ce transcrit a permis d'obtenir un bon compromis entre l'obtention de quantités suffisantes et une dégradation minimale. L'analyse structurale de cet ARNt a révélé un repliement non conventionnel, avec une branche anticodon relaxée, en dépit de la prédiction de structure classique.

L'obtention de la LeuRS mt humaine a nécessité la surproduction dans une souche adaptée à la présence de codons qui sont d'utilisation rare chez *E. coli* (souche BL21-RIL) afin d'obtenir une enzyme soluble et active. Une difficulté supplémentaire concernait la définition de l'extrémité N-terminale. En effet, il s'agissait d'obtenir une enzyme dépourvue du peptide d'adressage vers la mitochondrie, peptide dont il était difficile de prédire la taille exacte. La $\Delta 39$ -LeuRS s'est révélée être active alors que la $\Delta 21$ -LeuRS n'a qu'une très faible activité.

L'aminacylation du transcrit mal replié a été obtenue et optimisée, en dépit de sa structure relâchée. Ceci a permis de charger plus de 75 % de l'ARNt avec de la leucine. L'obtention d'un système de leucylation actif a permis de tester l'impact de différentes mutations corrélées à des pathologies, sur l'étape d'aminacylation et sur la structure de chaque ARNt variant. Cette étude a mis en évidence l'absence de réarrangements structuraux significatifs pour l'ensemble des variants et des effets variables des mutations sur l'aminacylation allant de faibles voire inexistant à un impact fort en particulier pour la mutation A3243T. Cependant, l'interprétation des effets de trois mutations localisées dans la branche anticodon reste délicate en raison de la structure relâchée de ce domaine qui n'est pas forcément représentative de la situation *in vivo*. Cette étude a également montré l'absence de corrélation entre (i) l'impact de deux mutations à la même position sur les propriétés d'aminacylation (A3243G a un effet faible alors que A3243T a un effet fort), (ii) deux mutations corrélées à la même pathologie et l'impact de chaque mutation sur l'aminacylation.

Concernant la compréhension fondamentale des systèmes mitochondriaux humains, l'analyse de l'aminacylation de mutants a permis de mettre en évidence l'importance des nucléotides A73 et A14 dans l'identité du système leucine mitochondrial. La reconnaissance de l'ARNt présentant une branche anticodon non structurée par la LeuRS a posé la question de

la contribution de cette branche dans l'interaction avec l'enzyme. L'importance de la branche anticodon a été validée par la création d'un variant stabilisé, présentant une structure proche de celle de l'ARNt natif et possédant une capacité d'aminacylation, et par l'établissement des zones d'interaction entre la LeuRS et l'ARNt qui montre un contact entre ces deux molécules au niveau de la branche anticodon. Le variant stabilisé présente également un profil d'interaction avec la synthétase proche de celui de l'ARNt natif ce qui montre que cet ARNt sera un bon modèle d'étude pour des investigations futures et pourra remplacer l'ARNt natif, très difficile d'accès. Les changements structuraux visibles en présence de la synthétase sur l'ARNt transcrit sauvage laissent supposer l'existence de changements conformationnels induits par la synthétase. Enfin, l'importance du repliement correct du bras accepteur a été mis en évidence.

Cette étude a également mis en évidence une efficacité d'aminacylation (k_{cat}/K_M) plus lente que pour les systèmes classiques, ce qui nous conforte dans l'idée qu'il existe peut-être un co-facteur d'aminacylation nécessaire et commun aux systèmes mitochondriaux humains (ou de mammifères). L'existence d'un tel facteur permettrait par ailleurs d'envisager un mécanisme commun pour l'ensemble des mutations affectant les ARNt mt humains. La mise au point d'un système efficace de leucylation *in vitro* nous a permis également d'initier la recherche d'un tel co-facteur de l'aminacylation et de trouver un candidat potentiel, le facteur de traduction EF1A.

Intérêt plus général de l'étude du système d'aminacylation leucine

L'ARNt^{Leu(UUR)} qui devait être l'un des meilleurs candidats pour un système d'aminacylation mitochondrial humain *in vitro* de par sa structure théorique classique, s'est révélé mal replié et fragile comme les autres ARNt mt humains précédemment étudiés au laboratoire (Brulé, 1998; Helm et coll., 1998) (M. Sissler, communication personnelle) ou par d'autres (Bullard et coll., 1999; Tolkunova et coll., 2000). Ainsi, il est à prévoir que l'étude de tous les ARNt mt humains nécessitera sûrement une stabilisation de la structure comme pour l'ARNt^{Leu(UUR)} ou l'ARNt^{Lys} (Helm et coll., 1998). Cela vient d'être confirmé pour deux autres ARNt mt humain (Tyr, Asp) en cours d'étude au laboratoire. Seul l'ARNt^{Ile} semble échapper à ce problème (Kelley et coll., 2000; Kelley et coll., 2001). Les conditions d'aminacylation particulières que j'ai définies pour le système leucine se sont avérées être également celles nécessaires et optimales à l'aminacylation de deux autres systèmes mitochondriaux humains en étude au laboratoire. Là encore, il est possible que ces conditions soient utiles pour l'étude d'un grand nombre de systèmes mitochondriaux.

Les connaissances fondamentales acquises au cours de cette étude sont importantes car le système leucine est seulement le deuxième système de mammifère étudié en vue de la recherche des éléments d'identité d'aminacylation et de reconnaissance par la synthétase spécifique (Ueda et coll., 1992). Par ailleurs, différents systèmes leucine avaient déjà été étudiés auparavant et la comparaison de ces systèmes entre eux avait déjà mis en évidence des différences dans la reconnaissance entre l'ARNt^{Leu} par la synthétase (Larkin et coll., 2002). Notre étude étend cette diversité et confirme que les systèmes leucine sont peu conservés évolutivement. L'ARNt^{Leu(UR)} est le premier ARNt^{Leu} présentant une courte boucle variable à être étudié.

L'étude *in vitro* des mutations liées à des pathologies a permis d'obtenir des paramètres cinétiques pour chaque variant et ainsi de mesurer un impact précis de chaque mutation sur la réaction d'aminacylation, en dehors de tout contexte cellulaire. Ceci permet de rechercher très précisément l'impact moléculaire initial de chaque mutation, d'en évaluer l'aspect quantitatif, et surtout de comparer systématiquement et dans un même contexte, plusieurs mutations touchant un même ARNt. Cette analyse *in vitro* peut être perçue comme non représentative de la situation cellulaire et non représentative de la situation pathologique. Cependant deux arguments majeurs vont à l'encontre de cette idée. Tout d'abord, nos travaux sont en accord avec les résultats obtenus par des études *in vivo* sur l'impact de la mutation A3243G (Börner et coll., 2000; Chomyn et coll., 2000) montrant une diminution du taux d'aminacylation. Par ailleurs de très nombreuses études en vue de la recherche des éléments d'identité d'aminacylation chez les procaryotes et chez les eucaryotes (cytosol) ont été menées en parallèle au cours des 20 dernières années. Dans la vaste majorité des cas, des résultats concordants ont été obtenus, montrant que l'approche *in vitro* est tout à fait adaptée (Giegé et coll., 1998; McClain et coll., 1999). La comparaison systématique des effets de diverses mutations *in vitro* permettra non seulement d'avancer plus rapidement dans la compréhension des effets moléculaires, mais encore d'orienter les recherches *in vivo*. La mise en évidence de l'impact faible, voir nul, de mutations permet d'orienter les recherches de l'impact moléculaire de la mutation sur d'autres étapes de la vie de l'ARNt. En effet, la mutation A3442G a déjà été mise en évidence *in vivo* comme affectant la terminaison de la transcription de l'un des ARNm (2 ARNr, ARNt^{Phe}) (Hess et coll., 1991; King et coll., 1992; Yasukawa et coll., 2001), l'ARNt^{Leu(UR)} contenant dans sa séquence sauvage un signal d'arrêt de la transcription de cet ARNm.

Perspectives

Les perspectives émergent de l'étude des ARNt et en particulier leurs propriétés d'aminacylation *in vitro* sont nombreuses. La compréhension fondamentale du système mitochondrial leucine nécessite des études complémentaires. L'ensemble des éléments d'identité doit être identifié, certains nucléotides pourront être mutés préférentiellement comme les nucléotides de l'ARNt^{Leu(CUN)}, le second isoaccepteur leucine de la mitochondrie humaine. L'identité de l'ARNt^{Leu(CUN)} pourra également être étudiée de même que son interaction avec la LeuRS. Une fois l'ensemble des éléments identifié, il sera important de les transférer dans d'autres ARNt, afin de confirmer leur complétude. Le transcrit leucine sauvage avait été décrit comme n'étant pas aminacylable par la LeuRS d'*E. coli* (Brulé, 1998), il serait intéressant de vérifier si le transcrit à structure stabilisée (variant L5) devient substrat pour la LeuRS d'*E. coli*, voir pour l'enzyme cytoplasmique humaine. La LeuRS de certains organismes a été décrite comme possédant une fonction d'“editing” (Lincecum et coll., 2003; Mursinna et coll., 2001), il serait donc intéressant de tester les capacités de correction de la LeuRS mt humaine (en cas d'activation d'un acide aminé autre que la leucine). Cependant, parmi les résidus décrits comme importants dans ce mécanisme, se trouve le résidu thréonine 252. La LeuRS mt humaine ne possède pas de thréonine à cette position.

La recherche d'un cofacteur d'aminacylation a été tout juste initiée. Il y a donc de nombreuses ouvertures à ce projet. Tout d'abord, la mise au point récente de deux nouveaux systèmes d'aminacylation mitochondriaux humains au laboratoire (Asp et Tyr) va permettre de tester la stimulation de EF1A sur ces systèmes. Il faudrait tester la stimulation sur des ARNt natifs possédant l'ensemble des modifications post-traductionnelles. En cas de succès, il serait intéressant de vérifier si EF1A interagit spécifiquement avec l'ARNt ou la synthétase. L'identification du partenaire privilégié du facteur EF1A permettrait de diriger les recherches d'un homologue fonctionnel présentant une séquence de localisation mitochondriale dans les banques de données. En effet, en cas d'interaction spécifique avec l'ARNt, la comparaison de EF1A avec d'autres protéines liant l'ARN déjà connues comme Trbp 111 ou SmpB permettrait de mettre en évidence des similitudes. Dans le cas de l'interaction avec la synthétase, la délétion progressive de la séquence de EF1A et la comparaison à la structure cristallographique de EF1A de *S. cerevisiae* devrait permettre de mettre en évidence un motif plus particulier. Enfin, la recherche d'un co-facteur pourra être étendue au protéome mitochondrial. Les protéines dérégulées mises en évidence dans l'analyse par protéomique comparative pourraient être des bons candidats et devraient être testées individuellement.

L'étude de l'impact des mutations sur la structure et l'aminacylation de l'ARNt^{Leu(UR)} devra être poursuivie par l'analyse de l'ensemble des mutations répertoriées dans cet ARNt. Le clonage de plusieurs synthétases mitochondriales en cours au laboratoire devrait permettre de tester non seulement un grand nombre de mutations dans divers ARNt mais également de rechercher les effets de mutations sur l'aminacylation par des synthétases non correspondantes. En d'autres termes, il sera possible de vérifier si les mutations confèrent des gains de fonctions en permettant la charge par un acide aminé non spécifique.

II. ARNt et protéomes mitochondriaux

L'analyse par protéomique comparative a permis de mettre en évidence un certain nombre de protéines dérégulées d'un facteur égal ou supérieur à 2, dont 20 ont pu être identifiées par spectrométrie de masse dans le cas de la mutation MERRF et 11 dans le cas de la mutation MELAS. L'ensemble de ces protéines dérégulées sont codées par le génome nucléaire. Elles sont majoritairement à localisation mitochondriale et sont des enzymes du métabolisme, des sous-unités de la chaîne respiratoire ou encore des protéines de la machinerie traductionnelle. Certaines protéines affectées sont des contaminants (localisation cytoplasmique, peroxydomale, lysosomale). L'identification des protéines dont le taux d'expression est perturbé dans les cellules malades par rapport aux cellules saines, a mis en évidence un impact de mutations dans le génome mitochondrial sur des protéines codées par le génome nucléaire, ce qui laisse sous-entendre une communication des deux génomes. Les mécanismes d'une telle communication restent à être découverts. Nous avons aussi mis en évidence de nouveaux partenaires moléculaires potentiels impliqués dans la cascade d'événements qui lie le génotype et le phénotype. Nous proposons que la surexpression de certaines protéines correspondent à une tentative de la part de la cellule pour compenser l'impact négatif de la mutation. Ainsi, le statut malade de la cellule serait une combinaison d'effets négatifs et d'effets compensatoires. La découverte de protéines dérégulées communes aux deux analyses conforte l'hypothèse de mécanismes communs aux pathologies mitochondriales liées aux ARNt. L'analyse plus détaillée des deux sous-unités de la pyruvate déshydrogénase E1 a montré la présence de nombreuses isoformes, non détectées par la coloration à l'argent, et cela dans les deux pathologies. Les isoformes de la PDH E1 sont peut-être des marqueurs biologiques des maladies mitochondriales.

Les difficultés de reproductibilité des gels MELAS montrent une variabilité aléatoire de nombreuses protéines. La compréhension de ce phénomène nous a conduit à montrer que

les cellules MELAS tout comme les cellules MERRF ne présentent pas plus de phénomènes d'apoptose que les cellules contrôles. Cependant, le fait que les cellules MELAS présentent une acidification plus rapide de leur cytoplasme que leurs cellules contrôles pourrait contribuer aux variations observées en perturbant la dynamique de modifications post-traductionnelles.

Enfin, ces études ont permis de contribuer à l'établissement d'un protéome de mitochondrie en assignant 33 spots à partir d'expériences menées sur des cellules MELAS et 20 spots à partir de cellules MERRF (dont certains sont communs au deux). Il est à noter qu'il n'existe pas qu'un protéome de mitochondries humaines, mais de nombreux protéomes. Ceci est directement lié à l'origine de la mitochondrie (cellules en culture, fibroblastes, placenta) pour lesquelles les taux d'expression des différentes protéines peut varier ainsi que leurs isoformes.

Intérêt plus large

L'utilisation de cette approche pour la compréhension de maladies mitochondriales est une première dans le domaine. Elle ouvre la voie pour l'application de cette technique à d'autres mutations corrélées à d'autres pathologies. Cette approche a demandé l'installation et la mise au point préalable de cette technique dans ce laboratoire. Elle est maintenant disponible pour d'autres études. Elle a permis l'identification de plusieurs protéines dérégulées qui vont pouvoir être des cibles de recherches pour l'identification du mécanisme des pathologies mitochondriales.

Cependant, l'utilisation de cette technique comporte des inconvénients et des limites. L'utilisation des cellules cybrides MELAS dans cette analyse a permis de mettre en évidence que ce modèle d'étude n'est pas optimal dans le cas de cette pathologie car les cellules sont "trop malades" et il n'y a pas de reproductibilité dans les résultats. Les protéines membranaires, faiblement exprimées ainsi que les protéines hydrophobes ne sont pas détectées. Or les sous-unités de la chaîne respiratoire ainsi que les protéines des complexes d'importation (TOM, TIM) et de nombreuses autres protéines mitochondriales sont transmembranaires et peuvent avoir un rôle important. L'utilisation de la technique du western-blot a mis en évidence que l'absence des protéines faiblement exprimées pouvait induire des erreurs dans la quantification en ne tenant pas compte d'une partie des isoformes. De même, au regard des résultats finaux, cette méthode d'analyse apparaît fastidieuse, elle nécessite la comparaison de nombreux couples de gels contenant chacun plus de 800 protéines pour mettre en évidence seulement une vingtaine de protéines. Il semble évident que nous

n'ayant découvert que le sommet de l'iceberg et qu'il faudra appliquer des techniques plus sensibles pour pouvoir analyser *toutes* les protéines mitochondriales. De telles techniques existent et sont basées sur le marquage différentiel de cystéines. Ainsi la technique ICAT (Gygi et coll., 2000; Gygi et coll., 1999) est très séduisante. Elle donne accès à toutes les catégories de protéines (sous-exprimées, basiques, hydrophobes, etc ...) sans passer par des gels bidimensionnels. Après marquage, les échantillons sont mélangés, traités à la trypsine et les peptides analysés par LC-MS. Ceci donne directement accès à un aspect quantitatif et à l'assignation des protéines. Plus récemment, cette technique a été simplifiée d'avantage. Après le marquage différentiel des protéines, les deux échantillons sont mélangés et les protéines séparées sur gel SDS. Le gel est alors découpé millimètre par millimètre et son contenu analysé et assigné par spectrométrie de masse.

Perspectives

Malgré les difficultés et les limites rencontrées, la protéomique comparative est très instructive et ouvre de nombreuses perspectives. Cette technique devrait être appliquée à d'autres types cellulaires (cellules Hela, fibroblastes) pour déterminer les variations liées à la mutation et non aux types cellulaires. La solution idéale concernerait l'analyse protéomique de tissus obtenus à partir de lignées de souris transgéniques en ce qui concerne les mitochondries. De telles souris, présentant des mutations dans les gènes d'ARNt mt ne sont pas encore disponibles. Cependant, de grands projets sont en cours, qui vont conduire à des lignées "transmitochondriales". Ainsi, une souris avec une délétion de l'ADN mt (Inoue et coll., 2000) et une souris avec une mutation de l'ADN mt (Sligh et coll., 2000) ont déjà été obtenues.

Des mutations différentes comme des mutations dans l'ADN génomique pourraient également être analysées par protéomique comparative. Cependant, l'analyse de protéines spécifiques, déjà mises en évidence dans l'analyse MERRF et MELAS, par une technique plus sensible telle le western-blot sur d'autres mutations serait moins fastidieuse et plus directe que l'analyse globale. Enfin, une partie très intéressante sera d'identifier l'étape de régulation de ces protéines (transcription, traduction, importation). Pour cela, l'utilisation de la PCR quantitative permettrait de comparer le taux de messenger de ces protéines dans les cellules sauvages et malades. Il faudrait évaluer la demi-vie des protéines qui pourrait être augmentée ou diminuée par la présence de modifications post-traductionnelles, et aussi vérifier l'importation de ces protéines en effectuant le rapport entre le taux d'une protéine dans la

cellule entière et le taux dans la mitochondrie purifiée dans les cellules MERRF et en le comparant aux cellules saines.

Références Bibliographiques

A

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. & Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-560.
- Agou, F. & Mirande, M. (1997) Aspartyl-tRNA synthetase from rat: *in vitro* functional analysis of its assembly into the multisynthetase complex. *Eur. J. Biochem.*, **243**, 259-267.
- Ahlers, P.M., Garofano, A., Kerscher, S.J. & Brandt, U. (2000) Application of the obligate aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* as a eucaryotic model to analyse Leigh syndrome mutations in the complex I core subunits PSST and TYKY. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1459**, 258-265.
- Akins, R.A. & Lambowitz, A.M. (1987) A protein required for splicing group I introns in *Neurospora* mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. *Cell*, **50**, 331-345.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, J.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. & Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465.
- Andrews, R., Kubacka, I., Chinnery, P., Lightowlers, R., Turnbull, D. & Howell, N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, **23**, 143.
- Antonicka, H., Floryk, D., Klement, P., Stratilova, L., Hermanska, J., Houstkova, H., Kalous, M., Drahota, Z., Zeman, J. & Houstek, J. (1999) Defective kinetics of cytochrome *c* oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibres ('MERRF') at position 8344 nt. *Biochem. J.*, **342**, 537-544.
- Arnez, J.G. & Moras, D. (1997) Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 211-216.
- Asahara, H., Himeno, H., Tamura, K., Hasegawa, T., Watanabe, K. & Shimizu, M. (1993) Recognition nucleotides of *Escherichia coli* tRNA^{Leu} and its elements facilitating discrimination from tRNA^{Ser} and tRNA^{Ser}. *J. Mol. Biol.*, **231**, 219-229.
- Asahara, H., Nameki, N. & Hasegawa, T. (1998) *In vitro* selection of RNAs aminoacylated by *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.*, **283**, 605-618.
- Attardi, G. & Montoya, J. (1983) Analysis of human mitochondrial RNA. *Methods Enzymol.*, **97**, 435-469.
- Attardi, G., Yoneda, M. & Chomyn, A. (1995) Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems. *Biochim. Biophys. Acta*, **1271**, 241-248.

B

- Ballinger, S.W., Shoffner, J.M. & Wallace, D.C. (1994) Mitochondrial myopathies: genetic aspects. *Current Topics in Bioenergetics*, **17**, 59-98.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. & Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.*, **10**, 25-31.
- Becker, H.D. (1998) Thèse. Université Louis Pasteur, Strasbourg.

- Becker, H.D. & Kern, D. (1998) *Thermus thermophilus* - a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12832-12837.
- Becker, H.D., Roy, H., Moulinier, L., Mazauric, M.-H., Keith, G. & Kern, D. (2000) *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaebacterial aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **39**, 3216-3230.
- Blackstock, W.P. & Weir, M.P. (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, **17**, 121-127.
- Bogenhagen, D.F. (1996) Interaction of mtTFB and mtRNA polymerase at core promoters for transcription of *Xenopus laevis* mtDNA. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12036-12041.
- Bonnet, J. & Ebel, J.-P. (1972) Interpretation of incomplete reactions in tRNA aminoacylation. Aminoacylation of yeast tRNA^{Val}II with yeast valyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.*, **31**, 335-344.
- Börner, G.V., Mörl, M., Janke, A. & Pääbo, S. (1996) RNA editing changes the identity of a mitochondrial tRNA in marsupials. *EMBO J.*, **15**, 5949-5957.
- Börner, G.V., Zeviani, M., Tiranti, V., Carrara, F., Hoffmann, S., Gerbitz, K.D., Lochmuller, H., Pongratz, D., Klopstock, T., Melberg, A., Holme, E. & Paabo, S. (2000) Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 467-475.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Péquignot, E., Munnich, A. & Rötig, A. (1995) Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genetics*, **11**, 144-149.
- Breitschopf, K., Achsel, T., Busch, K. & Gross, H.J. (1995) Identity elements of human tRNA^{Leu}: Structural requirements for converting human tRNA^{Ser} into a leucine acceptor *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3633-3637.
- Breitschopf, K. & Gross, H.J. (1996) The discriminator bases G73 in human tRNA^{Ser} and A73 in tRNA^{Leu} have significantly different roles in the recognition of aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 405-410.
- Brulé, H. (1998) ARNt mitochondriaux humains et pathologies. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de dysfonctionnement des ARNt par une approche *in vitro*. Université Louis Pasteur.
- Bullard, J., Cai, Y.-C., Demeler, B. & Spremulli, L. (1999) Expression and characterization of a human mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.*, **288**, 567-577.
- Bullard, J., Cai, Y.-C. & Spremulli, L. (2000) Expression and characterization of the human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase. *Biochem. Biophys. Acta*, **1490**, 245-258.
- Bult, C.J., XXX, X., Woese, C.R. & Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, **273**, 1058-1073.

C

- Carew, J.S. & Huang, P. (2002) Mitochondrial defects in cancer. *Mol. Cancer*, **1**, 1-12.
- Casano, R.A., Bykhovskaya, Y., Johnson, D.F., Hamon, M., Torricelli, F., Bigozzi, M. & Fischel-Ghodsian, N. (1998) Hearing loss due to the mitochondrial A1555G mutation in Italian families. *Am. J. Med. Genet.*, **79**, 388-391.
- Celis, J., Kruhoffer, M., Gromova, I., Frederiksen, C., Ostergaard, M., Thykjaer, T., Gromov, P., Yu, J., Palsdottir, H., Magnusson, N. & Orntoft, T. (2000) Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Letters*, **480**, 2-16.

- Chen, J.-F., Guo, N.-N., Li, T., Wang, E.-D. & Wang, Y.-L. (2000) CP1 domain in *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase is crucial for its editing function. *Biochemistry*, **39**, 6726-6731.
- Chomyn, A. & Attardi, G. (2003) MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 519-529.
- Chomyn, A., Enriquez, J.A., Micol, V., Fernandez-Silva, P. & Attardi, G. (2000) The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 19198-19209.
- Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S.T., Nonaka, I., Angelini, C. & Attardi, G. (1992) MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstram and downstream mature transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 4221-4225.
- Clayton, D.A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, **28**, 693-705.
- Clayton, D.A. (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **7**, 453-478.
- Cogswell, P.C., Kashatus, D.F., Keifer, J.A., Guttridge, D.C., Reuther, J.Y., Bristow, C., Roy, S., Nicholson, D.W. & Baldwin, A.S., Jr. (2003) NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J. Biol. Chem.*, **278**, 2963-2968.
- Copeland, W.C., Wachsman, J.T., Johnson, F.M. & Penta, J.S. (2002) Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest.*, **20**, 557-569.
- Crothers, D.M., Seno, T. & Söll, D.G. (1972) Is there a discriminator site in transfer RNA? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3063-3067.
- Curnow, A.W., Ibba, M. & Söll, D. (1996) tRNA-dependent asparagine formation. *Nature*, **382**, 589-590.
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Härtle, M., Nassar, N. & Leberman, R. (1990) A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase. *Nature*, **347**, 249-255.
- Cusack, S., Yaremchuk, A. & Tukalo, M. (2000) The 2Å crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and its complex with a leucyl-adenylate analogue. *EMBO J.*, **19**, 2351-2361.

D

- de Vries, D.D., van Engelen, B.G., Gabreels, F.J., Ruitenbeek, W. & van Oost, B.A. (1993) A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. *Ann. Neurol.*, **34**, 410-412.
- Degoul, F., Brulé, H., Cepanec, C., Helm, M., Marsac, C., Leroux, J.-P., Giegé, R. & Florentz, C. (1998) Isoleucylation properties of native human mitochondrial tRNA^{Ile} and tRNA^{Ile} transcripts. Implications for cardiomyopathy-related point mutations (4269, 4317) in the tRNA^{Ile} gene. *Hum. Mol. Gen.*, **7**, 347-354.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL molecular graphics system. Delano Scientific (<http://www.pymol.org>), San Carlos, CA, USA.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. & Hamel, C.P. (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.*, **26**, 207-210.

- Desnuelle, C. (2003) Updating the concept of mitochondrial disease. *Bull. Acad. Natle. Méd.*, **187**, 537-557.
- Di Donato, S. (2000) Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **23**, 247-263.
- Dickinson, E.K., Adams, D.L., Schon, E.A. & Glerum, D.M. (2000) A human SCO2 mutation helps define the role of Sco1p in the cytochrome oxidase assembly pathway. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26780-26785.
- DiMauro, S. & Schon, E. (1998) Nuclear power and mitochondrial disease. *Nature Genetics*, **19**, 214-215.
- Dimauro, S. & Schon, E. (2001) Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. *American Journal of Medical Genetics*, **106**, 18-26.
- Dock-Bregeon, A.-C., Westhof, E., Giegé, R. & Moras, D. (1989) Solution structure of a tRNA with a large variable region: Yeast tRNA^{Ser}. *J. Mol. Biol.*, **206**, 707-722.
- Dörner, M., Altmann, M., Pääbo, S. & Mörl, M. (2001) Evidence for import of a lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 2688-2698.
- Dreher, T.W., Bujarski, J.J. & Hall, T.C. (1984) Mutant viral RNAs synthesized *in vitro* show altered aminoacylation and replicase template activities. *Nature*, **311**, 171-175.
- Du, X. & Wang, E.D. (2003) Tertiary structure base pairs between D- and TpsiC-loops of Escherichia coli tRNA(Leu) play important roles in both aminoacylation and editing. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2865-2872.

E

- Edwards, H., Trézéguet, V. & Schimmel, P. (1991) An *Escherichia coli* tyrosine transfer RNA is a leucine-specific transfer RNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 1153-1156.
- Elizarov, S.M., Zabazarnykh, M., Musoliamov, A., Kovaleva, G.K., Egorov Ts, A. & Kiselev, L.L. (1997) Protein kinase activity strongly related to bovine tryptophanyl tRNA synthetase. *Mol. Biol. (Mosk)*, **31**, 253-262.
- Emelyanov, V.V. (2003) Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1599-1618.
- Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P. & Tarassov, I.A. (2001) 5S rRNA and tRNA import into human mitochondria: comparison of *in vitro* requirements. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45642-45653.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347**, 203-206.
- Estivill, X., Govea, N., Barcelo, E., Badenas, C., Romero, E., Moral, L., Scozzri, R., D'Urbano, L., Zeviani, M. & Torroni, A. (1998) Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 27-35.

F

- Fan, L., Sanschangrin, P.C., Kaguni, L.S. & Kuhn, L.A. (1999) The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: implications for a dual role as primer recognition factor and processivity clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 9527-9532.
- Fechter, P., Rudinger, J., Giegé, R. & Théobald-Dietrich, A. (1998) Ribozyme processed tRNA transcripts with unfriendly internal promoter for T7 RNA polymerase: production and activity. *FEBS Lett.*, **436**, 99-103.

- Fechter, P., Rudinger-Thirion, J., Théobald-Dietrich, A. & Giegé, R. (2000) Identity of tRNA for yeast tyrosyl-tRNA synthetase: Tyrosylation is more sensitive to identity nucleotides than to structural features. *Biochemistry*, **39**, 1725-1733.
- Ferri, K.F. & Kroemer, G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell. Biol.*, **3**, E255-263.
- Florentz, C., Briand, J.-P., Romby, P., Hirth, L., Ebel, J.-P. & Giegé, R. (1982) The tRNA-like structure of turnip yellow mosaic virus RNA: Structural organization of the last 159 nucleotides from the 3' OH terminus. *EMBO J.*, **1**, 269-276.
- Fountoulakis, M., Berndt, P., Langen, H. & Suter, L. (2002) The rat liver mitochondrial proteins. *Electrophoresis*, **23**, 311-328.
- Francin, M., Kaminska, M., Kerjan, P. & Mirande, M. (2002) The N-domain of mammalian lysyl-tRNA synthetase is a functional tRNA binding domain. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1762-1769.
- Francklyn, C., Musier-Forsyth, K. & Martinis, S.A. (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and disease : New evidence for structural and functional diversity in an ancient family of enzymes (Meeting review). *RNA*, **3**, 954-960.
- Francklyn, C., Perona, J.J., Pütz, J. & Hou, Y.-M. (2002) Aminoacyl-tRNA synthetases: Versatile players in the changing theater of translation. *RNA*, **8**, 1363-1372.
- Frugier, M., Moulinier, L. & Giegé, R. (2000) A domain in the N-terminal extension of class IIb eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases is important for tRNA binding. *EMBO J.*, **19**, 2371-2380.

G

- Giegé, R. & Frugier, M. (2003) Transfer RNA structure and identity. In Lapointe, J. and Brakier-Gringas, L. (eds.), *Translation mechanisms*. Landes Sciences, Georgetown, TX, pp. 1-24.
- Giegé, R., Helm, M. & Florentz, C. (1999) Chemical and enzymatic probing of RNA structure. In Söll, D., Nishimura, S. and Moore, P. (eds.), *Prebiotic Chemistry, Molecular Fossils, Nucleosides, and RNA*. Pergamon, Oxford, Vol. 6, pp. 63-80.
- Giegé, R., Puglisi, J.D. & Florentz, C. (1993) tRNA structure and aminoacylation efficiency. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **45**, 129-206.
- Giegé, R., Sissler, M. & Florentz, C. (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5017-5035.
- Goto, Y. (2001) Clinical and molecular studies of mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis*, **24**, 181-188.
- Goto, Y., Tojo, M., Tohyama, J., Horai, S. & Nonaka, I. (1992) A novel point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in a family with mitochondrial myopathy. *Ann. Neurol.*, **31**, 672-675.
- Gouda, M., Yokogawa, T., Asahara, H. & Nishikawa, K. (2002) Leucyl-tRNA synthetase from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus* has a heterodimeric quaternary structure. *FEBS Lett.*, **518**, 139-143.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. & Metz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, **15**, 305-308.
- Gray, M.W., Burger, G. & Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481.
- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- Gygi, S., Rist, B. & Aebersold, R. (2000) Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**, 396-401.

Gygi, S., Rist, B., Gerber, S., Turecek, F., Gelb, M. & Aebersold, R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotech.*, **17**, 994-999.

H

- Hammen, P.K. & Weiner, H. (1998) Mitochondrial leader sequences: structural similarities and sequence differences. *The journal of experimental zoology*, **282**, 280-283.
- Hayes, D.J. (1994) Experimentally induced defects in mitochondrial function. In Darley-Usmar, V. and Schapira, A.H.V. (eds.), *Portland Press Research Monograph*. Portland Press, Vol. V (Mitochondria: DNA, Proteins and Disease), pp. 157-178.
- Helm, M., Brulé, H., Degoul, F., Capanec, C., Leroux, J.-P., Giegé, R. & Florentz, C. (1998) The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1636-1643.
- Helm, M., Brulé, H., Friede, D., Giegé, R., Pütz, J. & Florentz, C. (2000) Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA*, **6**, 1356-1379.
- Helm, M., Florentz, C., Chomyn, A. & Attardi, G. (1999a) Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu(UUR)}. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 756-763.
- Helm, M., Giegé, R. & Florentz, C. (1999b) A Watson-Crick base-pair disrupting methyl group (m¹A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA^{Lys}. *Biochemistry*, **38**, 13338-13346.
- Hess, J.F., Parisi, M.A., Bennett, J.L. & Clayton, D.A. (1991) Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, **351**, 236-239.
- Holt, I.J., Harding, A.E. & Morgan-Hughes, J.A. (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, **331**, 717-719.
- Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K. & Morgan-Hughes, J.A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.*, **46**, 428-433.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E. & Jacobs, H.T. (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, **100**, 515-524.
- Hoogenraad, N.J., Ward, L.A. & Ryan, M.T. (2002) Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**, 97-105.
- Houman, F., Rho, S.B., Zhang, J., Shen, X., Wang, C.-C., Schimmel, P. & Martinis, S.A. (2000) A prokaryote and human tRNA synthetase provide an essential RNA splicing function in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 13743-13748.
- Huoponen, K., Vilkki, J., Aula, P., Nikoskelainen, E.K. & Savontaus, M.L. (1991) A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**, 1147-1153.

I

- Ibba, M., Bono, J.L., Rosa, P.A. & Söll, D. (1997a) Archaeal-type lysyl-tRNA synthetase in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 14383-14388.
- Ibba, M., Francklyn, C. & Cusack, S. (2003) *Aminoacyl-tRNA synthetases*. Landes Biosciences, Georgetown, TX.

- Ibba, M., Morgan, S., Curnow, A.W., Pridmore, D.R., Vothknecht, U.C., Gardner, W., Lin, W., Woese, C.R. & Söll, D. (1997b) A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science*, **278**, 1119-1122.
- Ibba, M. & Söll, D. (2001) The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. *EMBO Rep.*, **2**, 382-387.
- Ikezoe, K., Nakagawa, M., Yan, C., Kira, J., Goto, Y. & Nonaka, I. (2002) Apoptosis is suspended in muscle of mitochondrial encephalopathies. *Acta Neuropathol.*, **103**, 531-540.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. & Gyllenstein, U. (2000) Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, **408**, 708-713.
- Inoue, K., Nakada, K., Ogura, A., Isobe, K., Goto, Y., Nonaka, I. & Hayashi, J.I. (2000) Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nature Genet.*, **26**, 176-181.

J

- Jacobs, H.T. & Holt, I.J. (2000) The np 3243 MELAS mutation: damned if you aminoacylate, damned if you don't. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 463-465.
- Janssen, G., Maassen, J. & van den Ouweland, J. (1999) The diabetes-associated 3243 mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene causes severe mitochondrial dysfunction without a strong decrease in protein synthesis rate. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29744-29748.
- Johns, D.R., Neufeld, M.J. & Park, R.D. (1992) An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 1551-1557.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. & Penninger, J.M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, **410**, 549-554.

K

- Kämper, U., Kück, U., Cherniack, A.D. & Lambowitz, A.M. (1992) The mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase of *Podospora anserina* is a bifunctional enzyme active in protein synthesis and RNA splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 499-511.
- Karzai, A.W., Susskind, M.M. & Sauer, R.T. (1999) SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J*, **18**, 3793-3799.
- Kaukonen, J., Juselius, J.K., Tiranti, V., Kyttala, A., Zeviani, M., Comi, G.P., Keranen, S., Peltonen, L. & Suomalainen, A. (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*, **289**, 782-785.
- Kelley, S., Steinberg, S. & Schimmel, P. (2000) Functional defects of pathogenic human mitochondrial tRNAs related to structural fragility. *Nature Struc. Biol.*, **7**, 862-865.
- Kelley, S.O., Steinberg, S.V. & Schimmel, P. (2001) Fragile T-stem in disease-associated human mitochondrial tRNA sensitizes structure to local and distant mutations. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10607-10611.
- King, M.P. (1996) Use of ethidium bromide to manipulate ratio of mutated and wild-type mitochondrial DNA in cultured cells. *Methods Enzymol.*, **264**, 339-344.
- King, M.P. & Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500-503.
- King, M.P. & Attardi, G. (1993) Post-transcriptional regulation of the steady-state levels of mitochondrial tRNAs in HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10228-10237.

- King, M.P. & Attardi, G. (1996a) Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.*, **264**, 304-313.
- King, M.P. & Attardi, G. (1996b) Mitochondria-mediated transformation of human ρ^0 cells. *Methods Enzymol.*, **264**, 313-334.
- King, M.P., Koga, Y., Davidson, M. & Schon, E.A. (1992) Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA^{Leu(UUR)} mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 480-490.
- Ko, Y.G., Park, H. & Kim, S. (2002) Novel regulatory interactions and activities of mammalian tRNA synthetases. *Proteomics*, **2**, 1304-1310.
- Kobayashi, Y., Momoi, M.Y., Tominaga, K., Momoi, T., Nihei, K., Yanagisawa, M., Kagawa, Y. & Ohta, S. (1990) A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, actic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 816-822.
- Koehler, C. (2000) Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Letters*, **476**, 27-31.
- Koehler, C.M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. & Schatz, G. (1999) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2141-2146.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Stoneking, M. & Pääbo, S. (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, **90**, 19-30.
- Kroemer, G. & Reed, J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, **6**, 513-519.
- Kumazawa, Y., Himeno, H., Miura, K.-I. & Watanabe, K. (1991) Unilateral aminoacylation specificity between bovine mitochondria and eubacteria. *J. Biochem.*, **109**, 421-427.

L

- Labouesse, M. (1990) The yeast mitochondrial leucyl-tRNA synthetase is a splicing factor for the excision of several group I introns. *Mol. Gen. Genet*, **224**, 209-221.
- Larkin, D., Williams, A., Martinis, S. & Fox, G. (2002) Identification of essential domains for Escherichia coli tRNA^{Leu} aminoacylation and amino acid editing using minimalist RNA molecules. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2103-2113.
- Larsen, M.R., Sorensen, G.L., Fey, S.J., Larsen, P.M. & Roepstorff, P. (2001) Phosphoproteomics: evaluation of the use of enzymatic de-phosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. *Proteomics*, **1**, 223-238.
- Larsson, N.-G. & Clayton, D.A. (1995) Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu. Rev. Genetics*, **29**, 151-178.
- Lee, C.P. & RajBhandary, U.L. (1991) Mutants of Escherichia coli initiator tRNA which suppress amber codons in Saccharomyces cerevisiae and are aminoacylated with tyrosine by yeast extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 11378-11382.
- Lescuyer, P., Strub, J.M., Luche, S., Diemer, H., Martinez, P., Van Dorsselaer, A., Lunardi, J. & Rabilloud, T. (2003) Progress in the definition of a reference human mitochondrial proteome. *Proteomics*, **3**, 157-167.
- Lestienne, P. (1995) Les altérations de l'ADN mitochondrial sont-elles la cause ou la conséquence du vieillissement ? *Médecine Thérapeutique*, **1**, 487-494.
- Lestienne, P. & Ponsot, G. (1988) Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet*, **I (8590)**, 885.
- Lewis, W. & Dalakas, M.C. (1995) Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Medicine*, **1**, 417-422.

- Lima, B.D. & Simpson, L. (1996) Sequence-dependent *in vivo* importation of tRNAs into the mitochondrion of *Leishmania tarentolae*. *RNA*, **2**, 429-440.
- Lincecum, T.L., Jr., Tukalo, M., Yaremchuk, A., Mursinna, R.S., Williams, A.M., Sproat, B.S., Van Den Eynde, W., Link, A., Van Calenbergh, S., Grotli, M., Martinis, S.A. & Cusack, S. (2003) Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase. *Mol. Cell.*, **11**, 951-963.
- Liu, M. & Spremulli, L.L. (2000) Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29400-29406.

M

- Mandavilli, B.S., Santos, J.H. & Van Houten, B. (2002) Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat. Res.*, **509**, 127-151.
- Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J. & Florentz, C. (1999a) Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. *EMBO J.*, **18**, 4591-4596.
- Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J. & Florentz, C. (1999b) Aminoacyl-tRNA synthetases: a new image for a classical family. *Biochimie*, **81**, 683-700.
- Masucci, J.P. & Schon, E.A. (1996) tRNA processing in human mitochondrial disorders. *Mol. Biol. Rep.*, **22**, 187-193.
- Mayer, B. & Oberbauer, R. (2003) Mitochondrial Regulation of Apoptosis. *News In Physiological Sciences*, **18**, 89-94.
- McClain, W., Jou, Y.-Y., Bhattacharya, S., Gabriel, K. & Schneider, J. (1999) The reliability of *in vivo* structure-function analysis of tRNA aminoacylation. *J. Mol. Biol.*, **290**, 391-409.
- McClain, W.H. (1995) The tRNA identity problem: past, present and future. In Söll, D. and RajBhandary, U.L. (eds.), *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. Am. Soc. Microbiol. Press, Washington DC, pp. 335-347.
- McGuffin, L.J., Bryson, K. & Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**, 404-405.
- Meinzel, T., Mechulam, Y. & Blanquet, S. (1995) Aminoacyl-tRNA synthetases: Occurrence, structure, and function. In Söll, D. and RajBhandary, U. (eds.), *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC, pp. 251-290.
- Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G. & Attardi, G. (1999) Aging-dependant large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*, **286**, 774-779.
- Mirabella, M., Di Giovanni, S., Silvestri, G., Tonali, P. & Servidei, S. (2000) Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain*, **123**, 93-104.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Naturwissenschaften*, **191**, 144-148.
- Montoya, J., Ojala, D. & Attardi, G. (1981) Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*, **290**, 465-470.
- Morales, A.J., Swairjo, M.A. & Schimmel, P. (1999) Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J.*, **18**, 3475-3483.
- Mörl, M., Dorner, M. & Pääbo, S. (1994) Direct purification of tRNAs using oligonucleotides coupled to magnetic beads. In Uhlén, M., Hornes, E. and Olsvik, O. (eds.), *Advances in Biomagnetic Separation*. Eaton Publishing, Natick, MA, USA, pp. 107-111.
- Mudge, S.J., Williams, J.H., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Cowan, P.J. & Power, D.A. (1998) Complex organisation of the 5'-end of the human glycine tRNA synthetase gene. *Gene*, **209**, 45-50.

- Mursinna, R.S., Lincecum, T.L. & Martinis, S.A. (2001) A conserved threonine within *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase prevents hydrolytic editing of leucyl-tRNA^{Leu}. *Biochemistry*, **40**, 5376-5381.
- Muto, T., Obita, T., Abe, Y., Shodai, T., Endo, T. & Kohda, D. (2001) NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences. *J. Mol. Biol.*, **306**, 137-143.

N

- Negrutskii, B.S. & Deutscher, M.P. (1991) Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo*. *Biochemistry*, **88**, 4991-4995.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
- Nishino, I., Spinazzola, A. & Hirano, M. (1999) Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science*, **283**, 689-692.
- Normanly, J., Kleina, L.G., Masson, J.M., Abelson, J. & Miller, J.H. (1990) Construction of *Escherichia coli* amber suppressor tRNA genes. III. Determination of tRNA specificity. *J. Mol. Biol.*, **213**, 719-726.
- Normanly, J., Masson, J.M., Kleina, L.G., Abelson, J. & Miller, J.H. (1986) Construction of two *Escherichia coli* amber suppressor genes: tRNA^{Phe/CUA} and tRNA^{Cys/CUA}. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 6548-6552.
- Normanly, J., Ollick, T. & Abelson, J. (1992) Eight base changes are sufficient to convert a leucine-inserting tRNA into a serine-inserting tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5680-5684.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W. & Walter, P. (1997) Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell.*, **8**, 1233-1242.
- Nureki, O., Niimi, T., Muto, Y., Kanno, H., Kohno, T., Muramatsu, T., Kawai, G., Miyazawa, T., Giegé, R., Florentz, C. & Yokoyama, S. (1993) Conformational change of tRNA upon interaction of the identity-determinant set with aminoacyl-tRNA synthetase. In Nierhaus, K., Franceschi, F., Subramanian, A.R., Erdmann, V.A. and Wittmann-Liebold, B. (eds.), *The translational apparatus*. Plenum Press, New York, pp. 59-66.

O

- Ojala, D., Montoya, J. & Attardi, G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, **290**, 470-474.
- Omura, T. (1998) Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **123**, 1010-1016.
- Orth, M. & Schapira, A.H. (2001) Mitochondria and degenerative disorders. *Am. J. Med. Genet.*, **106**, 27-36.
- Ott, G. & Sprinzl, M. (1992) Ternary complexes of bacterial aminoacyl-tRNAs with elongation factor Tu and GTP. In Lilley, D.M.J., Heumann, H. and Suck, D. (eds.), *Structural tools for the analysis of protein-nucleic acid complexes*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 323-341.

P

- Papadopoulou, L.C., Sue, C.M., Davidson, M.M., Tanj, K., Nishino, I., Sadlock, J.E., Krishna, S., Walker, W., Selby, J., Glerum, D.M., Van Coster, R., Lyon, G., Scalais, E., Lebel, R., Kaplan, P., Shanske, S., De Vivo, D.C., Bonilla, E., Hirano, M., Dimauro, S. & Schon, E.A. (1999) Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nature*, **23**, 333-337.
- Parone, P.A., James, D. & Martinou, J.C. (2002) Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie*, **84**, 105-111.
- Penta, J.S., Johnson, F.M., Wachsman, J.T. & Copeland, W.C. (2001) Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat. Res.*, **488**, 119-133.
- Peterson, E.T. & Uhlenbeck, O.C. (1992) Determination of recognition nucleotides for *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **31**, 10380-10389.
- Petrushenko, Z.M., Budkevich, T.V., Shalak, V.F., Negrutskii, B.S. & El'skaya, A.V. (2002) Novel complexes of mammalian translation elongation factor eEF1A.GDP with uncharged tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. Implications for tRNA channeling. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4811-4818.
- Petrushenko, Z.M., Negrutskii, B.S., Ladokhin, A.S., Budkevich, T.V., Shalak, V.F. & El'skaya, A.V. (1997) Evidence for the formation of an unusual ternary complex of rabbit liver EF-1alpha with GDP and deacylated tRNA. *FEBS Lett.*, **407**, 13-17.
- Polycarpo, C., Ambrogelly, A., Ruan, B., Tumbula-Hansen, D., Ataide, S.F., Ishitani, R., Yokoyama, S., Nureki, O., Ibba, M. & Söll, D. (2003) Activation of the pyrrolysine suppressor tRNA requires formation of a ternary complex with class I and class II lysyl-tRNA synthetases. *Molecular Cell*, **12**, 287-294.
- Poulton, J. & Holt, I.J. (1994) Mitochondrial DNA: Does more lead to less? *Nature Genetics*, **8**, 313-315.

R

- Rabilloud, T., Kieffer, S., Procaccio, V., Louwagie, M., Courchesne, P., Patterson, P., Martinez, P., Garin, J. & Lunardi, J. (1998) Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis*, **19**, 1006-1014.
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Carte, N., Luche, S., Van Dorselaer, A., Lunardi, J., Giegé, R. & Florentz, C. (2002) Comparative proteomics as new tool for exploring human mitochondrial tRNA disorders. *Biochemistry*, **41**, 144-150.
- Reichert, A., Rothbauer, U. & Mörl, M. (1998) Processing and editing of overlapping tRNAs in human mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31977-31984.
- Reid, F.M., Vernham, G.A. & Jacobs, H.T. (1994) A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum. Mut.*, **3**, 243-247.
- Rho, S.B., Lincecum, T.L.J. & Martinis, S.A. (2002) An inserted region of leucyl-tRNA synthetase plays a critical role in group I intron splicing. *EMBO J.*, **21**, 6874-6881.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A. & Pozzan, T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*, **280**, 1763-1766.
- Rossmann, M.G., Moras, D. & Olsen, K.W. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194-199.

S

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sampson, J.R. & Saks, M.E. (1993) Contributions of discrete tRNA^{Ser} domains to aminoacylation by *E. coli* seryl-tRNA synthetase: A kinetic analysis using model RNA substrates. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 4467-4475.
- Sampson, J.R. & Uhlenbeck, O.C. (1988) Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 1033-1037.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463-5467.
- Scarpulla, R.C. (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*, **286**, 81-89.
- Schatz, G. (1995) Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1271**, 123-126.
- Scheffler, I. (1999) *Mitochondria*. John Wiley & Sons, INC., Publication, New-York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Scheffler, N., Miller, S., Carroll, A., Anderson, C., Davis, R., Ghosh, S. & Gibson, B. (2001) Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric identification of mitochondrial proteins from an SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Mitochondrion*, **1**, 161-179.
- Schimmel, P., Giegé, R., Moras, D. & Yokoyama, S. (1993) An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 8763-8768.
- Schimmel, P. & Ribas de Pouplana, L. (1995) Transfer RNA: From minihelix to genetic code. *Cell*, **81**, 983-986.
- Schmiedel, J., Jackson, S., Schafer, J. & Reichmann, H. (2003) Mitochondrial cytopathies. *J Neurol*, **250**, 267-277.
- Schneider, A. (1994) Import of RNA into mitochondria. *TICB*, **4**, 282-286.
- Schön, A. & Söll, D. (1988) tRNA specificity of a mischarging aminoacyl-tRNA synthetase: Glutamyl-tRNA synthetase from barley chloroplasts. *FEBS Lett.*, **228**, 241-244.
- Schon, E.A. & DiMauro, S. (2003) Primary Disorders of Mitochondrial DNA and the Pathophysiology of mtDNA-Related Disorders. In J., L.J. and A-L, N. (eds.), *Mitochondria in Pathogenesis*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-York, pp. 53-80.
- Sciaccò, M., Fagiolari, G., Lamperti, C., Messina, S., Bazzi, P., Napoli, L., Chiveri, L., Prella, A., Comi, G.P., Bresolin, N., Scarlato, G. & Moggio, M. (2001) Lack of apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology*, **56**, 1070-1074.
- Shadel, G.S. & Clayton, D.A. (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 409-435.
- Shanske, S. & DiMauro, S. (1994) Mitochondrial myopathies: biochemical aspects. *Current Topics in Bioenergetics*, **17 (Molecular Basis of Mitochondrial Pathology. Lee, C.P. ed.)**, 21-58.
- Shiba, K., Schimmel, P., Motegi, H. & Noda, T. (1994) Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30049-30055.
- Shimada, N., Suzuki, T. & Watanabe, K. (2001) Dual mode of recognition of two isoacceptor tRNAs by mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 46770-46778.
- Shoubridge, E.A. (2000) Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum Reprod*, **15**, 229-234.

- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M. & Hurt, E.C. (1996) The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.*, **15**, 5437-5448.
- Singh, K.K. (1998) *Mitochondrial DNA mutations in Aging, Disease and Cancer*. Springer, New York.
- Sissler, M., Eriani, G., Martin, F., Giegé, R. & Florentz, C. (1997) Mirror image alternative interaction patterns of the same tRNA with either class I arginyl-tRNA synthetase or class II aspartyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4899-4906.
- Sissler, M., Pütz, J., Fasiolo, F. & Florentz, C. (2003) Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. In Ibba, M., Francklyn, C. and Cusack, S. (eds.), *The aminoacyl-tRNA synthetases*. Landes Biosciences, Georgetown, TX, p. in press.
- Sligh, J.E., Levy, S.E., Waymire, K.G., Allard, P., Dillehay, D.L., Nusinowitz, S., Heckenlively, J.R., MacGregor, G.R. & Wallace, D.C. (2000) Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *PNAS*, **97**, 14461-14466.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L. & DiMauro, S. (2001) The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 342-352.
- Sohm, B., Frugier, M., Brulé, H., Olszak, K., Przykorska, A. & Florentz, C. (2003) Towards Understanding Human Mitochondrial Leucine Aminoacylation Identity. *J. Mol. Biol.*, **328**, 995-1010.
- Soma, A., Kumagai, R., Nishikawa, K. & Himeno, H. (1996) The anticodon loop is a major identity determinant of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA^{Leu}. *J. Mol. Biol.*, **263**, 707-714.
- Soma, A., Uchiyama, K., Sakamoto, T., Maeda, M. & Himeno, H. (1999) Unique recognition style of tRNA(Leu) by *Haloferax volcanii* leucyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.*, **293**, 1029-1038.
- Sprinzi, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. & Steinberg, S. (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 148-153.
- Srinivasan, G., James, C.M. & Krzycki, J.A. (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in archaea: Charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science*, **296**, 1459-1462.
- Stapulionis, R. & Deutscher, M.P. (1995) A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7158-7161.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. & Schatten, G. (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, **402**, 371-372.
- Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K. & Watanabe, K. (2002) Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.*, 6581-6589.

T

- Tarassov, I.A. & Martin, R.P. (1996) Mechanisms of tRNA import into yeast mitochondria: An overview. *Biochimie*, **78**, 502-510.
- Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W. & Ghosh, S.S. (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 281-286.
- Thompson, J.D., Plewniak, F., Thierry, J.-C. & Poch, O. (2000) Rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2919-2926.

- Tiranti, V., Hoertnagel, K., Carrozo, R., Galimberti, C., Munaro, M., Granatiero, M., Zelante, L., Gasparini, P., Marzella, R., Rocchi, M., Bayona-Bafaluy, M., Enriquez, J., Uziel, G., Bertini, E., Dionisi-Vici, C., Franco, B., Meitinger, T. & Zeviani, M. (1998) Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, **63**, 1609-1621.
- Tiranti, V., Savoia, A., Forti, F., D'Apolito, M.F., Centra, M., Rocchi, M. & Zeviani, M. (1997) Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 615-625.
- Tocchini-Valentini, G., Saks, M.E. & Abelson, J. (2000) tRNA leucine identity and recognition sets. *J. Mol. Biol.*, **298**, 779-793.
- Tolkunova, E., Park, H., Xia, J., King, M.P. & Davidson, E. (2000) The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual splicing of the primary transcript. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35063-35069.
- Tryoen-Tóth, P., Richert, S., Sohm, B., Mine, M., Marsac, C., Van Dorsselaer, A., Leize, E. & Florentz, C. (2003) Proteomic consequences of a human mitochondrial tRNA mutation beyond the frame of mitochondrial translation. *JBC*, **278**, 24314-24323.
- Tsurui, H., Kumazawa, Y., Sanokawa, R., Watanabe, K., Wada, A. & Shirai, T. (1991) Sequence specific purification of a particular tRNA by solid phase DNA probe. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **20**, 149-150.

U

- Ueda, T., Yotsumoto, Y., Ikeda, K. & Watanabe, K. (1992) The T-loop region of animal mitochondrial tRNA^{Ser(AGY)} is a main recognition site for homologous seryl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2217-2222.
- Umaki, Y., Mitsui, T., Endo, I., Akaike, M. & Matsumoto, T. (2002) Apoptosis-related changes in skeletal muscles of patients with mitochondrial diseases. *Acta Neuropathol.*, **103**, 163-170.

V

- Valnot, I., Osmond, S., Gigarel, N., Mehaye, B., Amiel, J., Cormier-Daire, V., Munnich, A., Bonnefont, J.P., Rustin, P. & Rotig, A. (2000a) Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**, 1104-1109.
- Valnot, I., von Kleist-Retzow, J.C., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Taanman, J.W., Mehaye, B., Rustin, P., Tzagoloff, A., Munnich, A. & Rotig, A. (2000b) A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1245-1249.
- van den Heuvel, L., Ruitenbeek, W., Smeets, R., Gelman-Kohan, Z., Elpeleg, O., Loeffen, J., Trijbels, F., Mariman, E., de Bruijn, D. & Smeitink, J. (1998) Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 262-268.
- van den Ouweland, J.M., Lemkes, H.H., Trembath, R.C., Ross, R., Velho, G., Cohen, D., Froguel, P. & Maassen, J.A. (1994) Maternally inherited diabetes and deafness is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene. *Diabetes*, **43**, 746-751.
- Vlassov, V.V., Zuber, G., Felden, B., Behr, J.-P. & Giegé, R. (1995) Cleavage of tRNA with imidazole and spermine imidazole constructs: A new approach for probing RNA structure. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3161-3167.

W

- Wakasugi, K. & Schimmel, P. (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science*, **284**, 147-150.
- Wakasugi, K., Slike, B.M., Hood, J., Ewalt, K.L., Cheresch, D.A. & Schimmel, P. (2002) Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 20124-20126.
- Wallace, D. (2001) Mouse Models for Mitochondrial Disease. *American Journal of Medical Genetics*, **106**, 71-93.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J., 2nd & Nikoskelainen, E.K. (1988a) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, **242**, 1427-1430.
- Wallace, D.C., Zheng, X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M. & Hopkins, L.C. (1988b) Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERFF): Genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*, **55**, 601-610.
- Wu, H., Kanatous, S.B., Thurmond, F.A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R. & Williams, R.S. (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, **296**, 349-352.

X

- Xu, M.G., Chen, J.F., Martin, F., Zhao, M.W., Eriani, G. & Wang, E.D. (2002) Leucyl-tRNA synthetase consisting of two subunits from hyperthermophilic bacteria *Aquifex aeolicus*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 41590-41596.

Y

- Yamagata, A., Kristensen, D.B., Takeda, Y., Miyamoto, Y., Okada, K., Inamatsu, M. & Yoshizato, K. (2002) Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. *Proteomics*, **2**, 1267-1276.
- Yang, M.Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H.T. & Holt, I.J. (2002a) Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell*, **111**, 495-505.
- Yang, X.L., Skene, R.J., McRee, D.E. & Schimmel, P. (2002b) Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **99**, 15369-15374.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Yao, Y.N., Wang, L., Wu, X.F. & Wang, E.D. (2003) The processing of human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase in the insect cells. *FEBS Letters*, **534**, 139-142.
- Yaremchuk, A., Kriklivyi, I., Tukalo, M. & Cusack, S. (2002) Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition. *Embo J*, **21**, 3829-3840.
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S. & Watanabe, K. (2001) Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J.*, **20**, 4794-4802.
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S. & Watanabe, K. (2000) Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs^{Leu(UUR)} with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4251-4257.

Z

- Zamzami, N. & Kroemer, G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**, 67-71.
- Zhang, C., Bills, M., Quigley, A., Maxwell, R.J., Linnane, A.W. & Nagley, P. (1997) Varied prevalence of age-associated mitochondrial DNA deletions in different species and tissues: a comparison between human and rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**, 630-635.
- Zhang, J., Yoneda, M., Naruse, K., Borgeld, H., Gong, J., Obata, S., Tanaka, M. & Yagi, K. (1998) Peroxide production and apoptosis in cultured cells carrying mtDNA mutation causing encephalopathy. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **46**, 71-79.
- Zhao, M.W., Hao, R., Chen, J.F., Martin, F., Eriani, G. & Wang, E.D. (2003) Enzymes assembled from *Aquifex aeolicus* and *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetases. *Biochemistry*, **42**, 7694-7700.
- Zhu, Z., Yao, J., Johns, T., Fu, K., De Bie, I., macmillan, C., Cuthbert, A., Newbold, R., Wang, J., Chevrette, M., Brown, G., Brown, R. & Shoubridge, E. (1998) SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.*, **20**, 337-343.