

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Discipline: Sciences Du Vivant

Spécialité: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Marie MESSMER

Originalités structurales et fonctionnelles du système
d'aspartylation mitochondrial humain

Soutenue le 19 novembre 2008 devant la Commission d'examen

Dr. Anne Marie Duchêne
Dr. Mathias Springer
Dr. Michael Ibba
Dr. Marie Sissler
Pr. Catherine Florentz

Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Membre invité
Directeur de thèse

C'est avec beaucoup de plaisir mais aussi avec beaucoup d'émotions que je commence ce manuscrit en remerciant les personnes qui m'ont permis d'accomplir ce travail, accompagnée pendant ces trois années et me permettent maintenant de vous le présenter.

Tout d'abord, je remercie Madame Anne-Marie Duchêne, Maître de conférence rattachée à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (Strasbourg) et Messieurs Mathias Springer, Directeur de recherche à l'Institut de Biologie Physico-Chimique (Paris) et Michael Ibba, Directeur de recherche à l'Ohio State University (Columbus, USA), pour l'honneur qu'ils me font en jugeant mon travail.

Je remercie aussi Monsieur Eric Westhof, Professeur à l'Université Louis Pasteur mais aussi Directeur de notre UPR, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour le soutien qu'il m'a manifesté tout au long de mes années passées au sein de son UPR.

J'exprime toute ma gratitude à Catherine Florentz, directrice de ma thèse et Professeur à l'Université Louis Pasteur, pour m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse dans son équipe. Merci pour les connaissances que tu m'as transmises, pour ton investissement, ta disponibilité et ton soutien.

Merci à toi Marie, qui m'a accueillie à mon début de thèse et m'a accompagnée pendant ces trois années. Nos échanges m'ont beaucoup appris et ton soutien quotidien (même par téléphone !) m'a beaucoup touchée. Merci de m'avoir amenée aussi loin. Tu m'as également appris à rythmer mes journées de travail : 9h, 11h50 et 15h sont les heures clés et ton indulgence à mon égard et mes petites, moyennes et grosses bêtises m'ont plus d'une fois surprise (mais promis juré, si nous sommes amenées à manipuler ensemble à nouveau, je ne jetterai plus 60 boîtes de cellules dans la poubelle de javel !).

Joern, merci de m'avoir fait choisir ce laboratoire mais surtout de m'avoir encouragée, soutenue et encadrée pendant mon année de DEA. C'est toi, le premier qui m'a fait découvrir la vie en laboratoire, ton enthousiasme et ta générosité m'ont beaucoup apporté.

C'est maintenant à vous trois Catherine, Joern et Marie que j'exprime ma sincère et profonde reconnaissance. Vous m'avez épaulée, soutenue, encouragée et fait confiance à un moment de ma vie qui était moins heureux que les autres. Malgré mes incertitudes, vous avez pris le parti de m'accueillir dans votre équipe. Merci beaucoup !

Je tiens également à remercier Richard Giegé. Votre enthousiasme pour la recherche a contribué à ma motivation durant les années passées au sein de ce département.

C'est maintenant à toutes les personnes des labos 443 et 447 que je m'adresse.

Magali, merci pour tous les moments d'échange, le temps et les nombreux conseils dont tu m'as fait bénéficier. Ton soutien tant professionnel que personnel m'a beaucoup fait avancer et pour tout ça je t'en suis profondément reconnaissante.

Joëlle, merci pour ton aide pendant mes heures de probing ! Ta bonne humeur de tous les jours ont rendu mon quotidien au labo beaucoup plus joyeux et animé.

Anne, ton calme et ta gentillesse m'ont beaucoup apporté. Merci de m'avoir ravitaillée en orchidées et en asperges !

Je n'oublie pas non plus les trois hommes du labo : Denis, Claude et Bernard. Merci pour votre disponibilité et votre soutien.

Bien qu'il ne fasse pas partie physiquement de ces deux labos, je tiens à inclure Jean-Christophe. Tu m'as beaucoup fait rire et tes passages même furtifs dans le labo ont toujours été accompagnés de blagues et d'éclats de rire ! Merci !

Merci à Luc, à Tania et à Maya de m'avoir accompagnée pendant ma thèse. Je n'oublierai ni les étapes de relooking de Luc, ni les congrès partagés avec Tania et nos déconvenues en matière de western, ni les longues discussions avec Maya pendant nos heures solitaires durant les week-end !

Un grand merci à Agnès. Ton aide quotidienne et toutes tes astuces techniques m'ont énormément fait avancer !

Caroline, travailler à tes côtés a été un réel bonheur ! Merci pour ta générosité et tous les moments de rigolade et de petits et gros potins...

J'en viens maintenant à tous vous remercier pour m'avoir aidée, peut-être inconsciemment, pendant une période de ma vie moins sereine. Votre discrétion, votre soutien et quelques fois votre silence m'ont aidée à panser mes plaies. Un énorme merci !

À mes amis maintenant !

Une énorme pensée pour Agnès et Michaël ! Merci pour ces sorties, ces fous rires mais aussi pour votre amitié. Un infini merci pour m'avoir fait rencontrer ce charmant anglais qui partage maintenant ma vie. Merci à toi Michaël de lui avoir appris ses premiers mots de français, le « bonjour mademoiselle, voulez-vous... » , c'était d'enfer !

Ma chère Gaëlle ! Et oui tu vois, j'ai appris à dire bonjour et à ne plus être snob ! Merci de m'avoir invitée à ta soirée pizza, ça a été le début d'une belle amitié ! Merci d'avoir partagé mes moments de bonheur mais aussi toutes mes angoisses et mes soucis quotidiens de manip ! Merci aussi à Olivier pour ta bonne humeur et nos discussions parfois un peu « animées » !

Caroline et Fabrice, merci pour votre présence au labo mais aussi en dehors. Ça a toujours été de très bons moments que ceux passés avec vous ! Merci à toi Fabrice de partager la même passion qu'Ollie, tu ne peux pas savoir de quel volume sonore tu me soulages au dîner !

Merci à Farah ! Nos cafés et nos petits-déjeuners ont été de réelles bouffées d'air frais. Merci aussi pour ton soutien sans limites pendant toutes ces années !

Ma Catherine... Que de chemin parcouru depuis les bancs de la fac ! Je crois qu'on a rempli nos objectifs, non ? Merci pour toutes nos soirées « pyjama » du dimanche soir, de m'avoir accueillie sur ton canapé sans rien me demander et en me mettant « Friends » en boucle, de me comprendre aussi bien quand je pète mes plombs et d'avoir été à mes côtés tous les jours depuis maintenant 8 ans.

C'est au tour de ma chère famille à présent...

À mes parents Elisabeth et René et à ma sœur Hélène... Votre amour sans limites, votre soutien sans mesure m'ont portée et m'ont amenée jusque-là. Un énorme merci pour votre générosité et pour tout ce que vous m'avez apporté. C'est avec beaucoup de fierté que je vous dédie ce travail...

To my beloved Ollie... Your love, your tenderness, your kindness, your support, your encouragements and your patience helped me to progress so much... Thank you for sharing my life and making it so beautiful. Knowing simply that you are there, on my side, lights my life...

Abréviations

A	adénine
A	ampère
aaRS	aminoacyl-ARNt synthétase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMS	5'-O-[N-(L-aspartyl)sulfamoyl]adenosine
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
arg	arginine
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ARNt	acide ribonucléique de transfert
asp	acide aspartique
aspRS	aspartyl-ARNt synthétase
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine de sérum bovin
C	cytosine
CaCl ₂	chlorure de calcium
CHAPS	(3-[3-(cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CCase	tRNA nucléotidyl transferase
cyt	cytosolique
cpm	coup par minute
Da	dalton
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DLS	dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMP	diméthyl pimelimidate
DMS	diméthyl sulfate
DTE	dithioéритritol
DTT	dithiothréitol
DMSO	diméthyl sulfoxyde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	éthylène diamine tétraacétate de sodium
EF	facteur d'élongation
G	guanine
Gln	glutamine
GlnRS	glutaminyl-ARNt synthétase
Glu	acide glutamique
GluRS	glutamyl-ARNt synthétase
Gly	glycine
GFP	green fluorescent protein
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	acide-N-2-hydroxy éthyl pipérazine N'2 éthane sulfonique
IgG	Immunoglobuline G
IleRS	isoleucyl-ARNt synthétase
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
k_{cat}	constante catalytique

KCl	chlorure de potassium
K_i	constante d'inhibition
K_M	constante de Michaelis-Menten
l	litre
LB	milieu de Luria-Bertani
LeuRS	leucyl-ARNt synthétase
Lys	lysine
M	molaire
MBP	maltose binding protein
MetRS	methionyl-ARNt synthétase
mg	milligramme
MgCl ₂	chlorure de magnesium
min	minute
MME	monométhyl éther
mt	mitochondrial/mitochondriaux
MTS	mitochondrial targeting sequence
μ	micro
n	nano
NaCl	chlorure de sodium
Ni-NTA	nickel nitrilotriacétate
NTP	nucléotide triphosphate
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. kodakaraensis</i>	<i>Pyrococcus kodakaraensis</i>
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDA	pipérazine diacrylamide
PEG	polyéthylène glycol
Phe	phénylalanine
PheRS	phenylalanyl-ARNt synthétase
pH	potentiel hydrogène
pHi	point isoélectrique
PNK	polynucleotide Kinase
ProRS	prolyl -ARNt synthétase
p/v	poids pour volume
rpm	rotation par minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. douglasii</i>	<i>Saccharomyces douglasii</i>
SAP	Shrimp Alcaline Phosphatase
SDS	dodécyl sulfate de sodium
Ser	sérine
T	thymine
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TBE	Tris-Borate-EDTA
TCA	acide trichloroacétique
ThrRS	threonyl-ARNt synthétase
TIM	translocator inner membrane
TOM	translocator outer membrane
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TrpRS	tryptophanyl-ARNt synthétase

Tyr	tyrosine
U	uracile
UV	ultra violet
V	volt
V _{max}	vitesse maximale
v/v	volume à volume
W	watt
ZnCl ₂	chlorure de zinc

Table des matières

Abréviations	i
Table des matières	iv
Table des figures	xiii
Table des tableaux	xvi
Table des articles	xvii
INTRODUCTION	1
A. La mitochondrie, une organelle vitale	5
1. Structure et fonctions	5
2. Origine endosymbiotique	7
3. Génome mitochondrial	7
4. Synthèse protéique mitochondriale	8
B. Les systèmes d'aminocyclation mitochondriaux humains, une famille à part	11
1. Les ARNt mitochondriaux humains ont une fonction canonique mais <i>quid</i> de leur structure	12
1.1. Maturation	13
1.2. Des structures secondaires « bizarres » et des structures tertiaires à explorer	14
2. Les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines	17
2.1. Structures	20
2.2. Particularités d'aminocyclation	21
2.2.1. Activités enzymatiques réduites	21
2.2.2. Large spectre de substrats	22
2.2.3. Jeu d'éléments d'identité simplifié	22
C. L'import des protéines mitochondriales, un processus nécessaire à l'activité mitochondriale	24
1. Signal d'adressage mitochondrial	26
2. Passage à travers la membrane externe	26
3. Passage à travers la membrane interne et maturation dans la matrice	27

D. Les ARNt et les aminoacyl-ARNt synthétases, auxiliaires de nouvelles fonctions	29
1. Structures en fonctions non canoniques des ARNt	31
1.1. ARNtm et dégradation de polypeptides	31
1.2. Pseudo-ARNt et régulation de l'expression des gènes de synthétases	31
1.3. Pseudo-ARNt et ARNt dans l'initiation de la réplication d'ARN de virus, de rétrovirus et de rétrotransposons à LTR (« Long Terminal Repeat »)	32
1.4. Implications dans des voies métaboliques	32
1.5. Vers de nouvelles fonctions	33
2. Fonctions alternatives des aminoacyl-ARNt synthétases	33
2.1. Contrôle de la qualité des ARNt au sein du noyau	34
2.2. Epissage catalytique des introns de groupe I	35
2.3. Régulation de l'expression de gènes	35
2.4. Liaison à l'ADN	36
2.5. Activité cytokine et angiogénèse	36
2.6. Incorporation de l'ARNt ^{Lys} et de la LysRS dans le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	37
2.7. Implication dans le cancer du poumon	37
3. Paralogues des aminoacyl-ARNt synthétases et leurs fonctions	37
3.1. Biogénèse d'acides aminés	38
3.2. Stimulation de l'ADN polymérase	38
3.3. Modification d'ARNt	38
4. Partenaires des aminoacyl-ARNt synthétases	39
E. Le dysfonctionnement des systèmes d'amination mitochondriaux humains, au cœur des pathologies	41
1. Certaines mutations des ARNt ne sont pas sans conséquences...	42
2. Découverte récente des aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales dans des pathologies	44
3. Vers des thérapies des maladies mitochondriales	45
OBJECTIFS	49
RESULTATS ET DISCUSSION	55
Chapitre 1 : Analyse structurale en solution de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain et partenariat avec son AspSR homologue	57

A. Introduction	60
1. Rappel des particularités structurales des ARNt mitochondriaux de mammifères	60
2. L'ARNt ^{Asp} mitochondrial humain	63
3. Interaction entre l'ARNt ^{Asp} et l'AspRS	64
3.1. Les complexes ARNt ^{Asp} /AspRS	64
3.2. Eléments d'identité aspartate	66
B. Structure en solution de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain	68
<u>Article n°1</u> : Enzymatic and chemical structure probing of human mitochondrial tRNA^{Asp}	68
C. « Focus » sur l'interaction tertiaire 9-[12-23] de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain	71
<u>Article n°2</u> : Pathology-related mutation A7526G helps understanding the 3D structural core in mammalian mitochondrial tRNA^{Asp}	71
D. Identité « aspartate » de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain et structure	73
<u>Article n°3</u> : Loss of a primordial identity element for a mammalian mitochondrial aminoacylation system	73
E. MicroARN et ARNt mitochondriaux humains, y aurait-il un lien ?	75
1. Les ARNt mitochondriaux humains : de bon candidats pour être des miARN ?	75
2. Maturation des ARNt mitochondriaux humains transcrits <i>in vitro</i> par Dicer	77
3. Stratégie expérimentale	78
4. Résultats	79
Chapitre 2 : Etude de l'inhibition de l'AspRS mitochondriale humaine par des analogues d'adénylates	83
A. Introduction	85
1. Les aminoacyl-ARNt synthétases, des cibles de molécules antibiotiques	85
1.1. Pourquoi être à la recherche de nouveaux antibiotiques ?	85
1.2. Les aminoacyl-ARNt synthétases, des cibles idéales	86
1.3. La structure des antibiotiques basée sur des intermédiaires réactionnels	87
2. Organisation modulaire et structures des AspRS	88
3. L'AspRS mitochondriale humaine, une AspRS de type eubactérienne	91
3.1. Sa structure...	91

3.2. Ses propriétés d'aspartylation	94
B. Etude de l'inhibition de l'AspRS mitochondriale humaine par deux analogues d'adénylates	96
<u>Article n°4</u> : Peculiar inhibition of human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase by adenylate analogs	96
C. Perspectives	99
Chapitre 3 : A la découverte des nouvelles originalité pour l'AspRS mitochondriale humaine	105
A. A la recherche de protéines partenaires de l'AspRS mt et de sa caractérisation N-terminale	107
1. Introduction	107
2. Premiers indices expérimentaux d'un partenariat protéique par une approche « pull down »	108
3. Recherche de partenaires par co-immunoprécipitation	109
3.1. Stratégie expérimentale	109
3.2. Résultats préliminaires et optimisations	109
3.3. Premiers résultats	111
4. Conclusions et perspectives	113
B. Etude du produit d'épissage alternatif de l'AspRS mitochondriale humaine	113
1. Introduction	113
2. Etude d'un produit d'épissage alternatif de l'ARNm de l'AspRS mitochondriale humaine	115
<u>Article n°5</u> : Alternative splice-variants for human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases	115
3. Nouvelles perspectives	117
3.1. Surproduction de la protéine recombinante et études fonctionnelles <i>in vitro</i>	117
3.2. Vers les approches <i>in vivo</i>	120
3.3. Localisation subcellulaire de l'AspRS-ΔExon13 au niveau du noyau	121
3.3.1. Observations inattendues en microscopie confocale	121
3.3.2. Données bioinformatiques	121
3.3.3. Présence plus large de signaux d'adressage et d'export nucléaire dans les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines	123
4. Conclusions et perspectives	124

Chapitre 4 : Le signal d'adressage mitochondrial de l'AspRS mitochondriale humaine	125
A. A la découverte du signal d'adressage de l'AspRS mitochondriale humaine	127
1. Le MTS théorique est-il vraiment le signal d'adressage de l'AspRS	128
1.1. Permet-il de guider l'AspRS mitochondriale humaine vers les mitochondries ?	128
1.1.1. Principe	128
1.1.2. Résultats	129
1.2. Permet-il l'import de l'AspRS mitochondriale humaine dans les mitochondries ?	130
1.2.1. Principe et expérience témoin	130
1.2.2. Import <i>in vitro</i>	133
2. Localisation de la traduction mitochondriale au niveau des membranes internes ?	137
2.1. Exploitation des résultats d'import <i>in vitro</i> de l'AspRS mitochondriale humaine	137
2.2. Présence plus large du motif R-10 dans les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines	138
3. Conclusions et perspectives	140
B. Etude d'une mutation au sein du MTS théorique de l'AspRS mitochondriale humaine liée à une leucoencéphalopathie	142
<u>Article n°6</u> : Non-processing of a mitochondrial protein is a cause of leukoencephalopathy	142
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	145
A. Conclusions	147
1. L'ARNt ^{Asp} et l'AspRS au sein de la traduction mitochondriale	147
1.1. Structure de l'ARNt ^{Asp} en solution	147
1.2. L'AspRS mitochondriale humaine est très sensible à des inhibiteurs, analogues de substrats	149
2. Originalités structurales et fonctionnelles	150
2.1. Implication des ARNt mitochondriaux humains dans une nouvelle fonction ?	150
2.2. L'AspRS mitochondriale humaine a-t-elle des partenaires	151
2.3. Nouvelle(s) localisation(s) sub-cellulaire(s) de l'AspRS mt humaine	152
2.3.1. Localisation à proximité de la membrane interne	152

2.3.2. Localisation nucléaire des aminacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines	154
3. Découverte et caractérisation d'un premier produit d'épissage alternatif d'une aaRS mitochondriale humaine	154
4. Les fonctions alternatives de l'ARNtAsp et de l'AspRS : le chaînon manquant à la compréhension des pathologies mitochondriales	154
B. Perspectives	157
1. Traduction mitochondriale	157
2. Fonctions alternatives	159
3. Pathologies	161
MATERIEL ET METHODES	163
A. Matériel	165
1. Produits	165
2. Enzymes	166
2.1. Enzymes commerciales	166
2.2. Enzymes non commerciales	166
3. Souches cellulaires et vecteurs	166
3.1. Souches cellulaires	166
3.2. Vecteurs	167
B. Clonages	169
1. Principe	
1.1. Amplification du gène par PCR	169
1.2. Clonage dans un vecteur TOPO®	169
1.3. Clonage dans un vecteur d'expression	170
1.3.1. Purification de l'insert	170
1.3.2. Digestion et déphosphorylation du vecteur d'expression	170
1.3.3. Ligation	171
1.4. Clonage selon la technique Gateway®	171
1.4.1. Clonage dans le vecteur d'entrée	171
1.4.2. Clonage dans le vecteur de destination	172
2. Description des clones	173

C. Préparation de matériel biologique spécifique	174
1. Mitochondries de cellules humaines	174
2. Mitochondries de pommes de terre	175
3. ARNt ^{Asp} natif : purification par oligonucléotide antisens	175
3.1. Principe	175
3.2. Préparation d'ARNt totaux mitochondriaux	176
3.3. Immobilisation de l'oligonucléotide antisens sur des billes d'agarose	176
3.4. Purification de l'ARNt ^{Asp} mitochondrial humain	177
4. ARNt synthétiques : préparation par transcription <i>in vitro</i>	177
4.1. Principe	177
4.2. Transcription <i>in vitro</i>	178
4.2. Purification des transcrits	178
5. AspRS mitochondriale humaine	179
5.1. Surproduction	179
5.2. Purification de l'AspRS mitochondriale humaine	179
6. Culture cellulaire	180
6.1. Décongélation des cellules	180
6.2. Amplification des cellules	180
6.3. Congélation des cellules	180
D. Immunoprécipitation de l'AspRS et analyse par électrophorèse bidimensionnelle	181
1. Principe	181
2. Fixation des anticorps à la protéine G couplée à l'agarose	181
2.1. Liaison non covalente des anticorps à la protéine G	181
2.2. Liaison covalente des anticorps à la protéine G	182
2.3. Immunoprécipitation de l'AspRS mitochondriale humaine	183
2.3.1. Préparation des extraits cellulaires	183
2.3.2. Immunoprécipitation	183
3. Gel bi-dimensionnel	184
3.1. Isoélectrofocalisation	184
3.2. Equilibration des strips	185
3.3. Séparation sur gel de polyacrylamide (seconde dimension)	185
3.4. Coloration des gels au bleu colloïdal	185

E. Immunodétection de l'AspRS mitochondriale humaine	186
F. Import <i>in vitro</i>	187
1. Principe	187
2. Réaction d'import <i>in vitro</i>	187
2.1. Transcription et traduction <i>in vitro</i>	187
2.2. Test d'importation <i>in vitro</i> dans les mitochondries	188
G. Expression de l'AspRS dans des cellules humaines	189
1. Principe	189
2. Méthode	189
H. Aminoacylation <i>in vitro</i>	190
1. Principe des tests d' aminoacylation	190
2. Paramètres cinétiques étudiés	190
3. Le test d' aminoacylation	191
4. Le test d' inhibition	192
4.1. Détermination du type d' inhibition	192
4.2. Détermination du K_i dans le cas d' une inhibition compétitive	193
I. Cartographie des ARNt en solution	194
1. Principe	194
2. Marquage des ARNt en 5'	195
3. Marquage des ARNt en 3' par ligation de 5' [³² P]-pCp	195
4. Isolement des produits marqués	196
5. Cartographie	196
5.1. Sondage enzymatique	196
5.2. Sondage chimique	197
5.2.1. Formation d' adduits par action du DMS ou DEPC	198
5.2.2. Clivage chimique	199
5.3. Séparation des produits de clivage enzymatiques et chimiques	199
J. Clivage des ARN par Dicer	200

K. Manipulation des ARNt et des aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriaux de mammifères en vue de leur caractérisation structurale et fonctionnelle	201
<u>Article n°7</u> : Handling mammalian mitochondrial tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases for functional and structural characterization	201
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203

Table des figures

Figure 1. Représentation schématique de la mitochondrie	6
Figure 2. Organisation du génome mitochondrial humain	8
Figure 3. Origine double de la machinerie traductionnelle mitochondriale	9
Figure 4. Structures secondaires et tertiaires des ARNt canoniques	14
Figure 5. Propriétés structurales des ARNt mitochondriaux humains	15
Figure 6. Exemple de variabilité des structures tridimensionnelles des ARNt mitochondriaux humains	16
Figure 7. Structures cristallographiques de la TyRS et de la PheRS mitochondriales humaines	20
Figure 8. Description des différentes voies d'import des protéines mitochondriales	25
Figure 9. Fonctions non canoniques des ARNt et des structures en pseudo-ARNt	30
Figure 10. Réseau de signalisation médié par les aminoacyl-ARNt synthétases de mammifères	34
Figure 11. Distributions des mutations pathologiques sur la structure en feuille de trèfle de l'ARNt	43
Figure 12. Présentation des structures alternatives des ARNt mitochondriaux humains transcrits <i>in vitro</i>	62
Figure 13. Structures secondaires des ARNt ^{Asp} mitochondriaux de mammifères	64
Figure 14. Structures cristallographiques des macromolécules partenaires de l'aspartylation chez <i>S. cerevisiae</i>	65

Figure 15. Biosynthèse, structure et mécanisme d'action des miARN	76
Figure 16. Structures en tige boucle de Let-7 et de deux ARNt mitochondriaux humains	77
Figure 17. Représentation linéaire des sites de fragilité CpA et UpA au sein des structures en épingle à cheveux des ARNt ^{Asp} et ARNt ^{Lys} mt humains	78
Figure 18. Coupure de l'ARNt ^{Asp} mitochondrial humain par Dicer	79
Figure 19. Coupure des ARNt ^{Lys} mitochondriaux humains par Dicer	81
Figure 20. Organisation modulaire des AspRS eubactérienne, eucaryote et archae	88
Figure 21. Structures cristallographiques d'AspRS de trois règnes du vivant	89
Figure 22. Alignement de séquences de l'AspRS mitochondriale humaine avec d'autres AspRS	92
Figure 23. L'AspRS mitochondriale humaine : organisation modulaire et modèle de sa structure	93
Figure 24. Influence de l'analogue Asp-AMS sur la solubilité de l'AspRS mt humaine	101
Figure 25. Gel SDS-PAGE 12% typique de co-immunoprécipitation	110
Figure 26. Séparation des protéines immunoprécipitées avec l'AspRS mt humaine sur gel bi-dimensionnel (1)	111
Figure 27. Séparation des protéines immunoprécipitées avec l'AspRS mt humain sur gel bi-dimensionnel (2)	112
Figure 28. Expression de MTS-mt-AspRS-ΔExon13 et MTS-mt-AspRS fusionnées à la GFP	119
Figure 29. Localisation des signaux d'import et d'export nucléaires théoriques sur le modèle de la structure de l'AspRS mitochondriale humaine	122

Figure 30. Séquence d'adressage théorique de l'AspRS mitochondriale humaine	128
Figure 31. Présentation des variants de l'AspRS mitochondriale fusionnés à la GFP	128
Figure 32. Expression transitoire de mtAspRS-, MTS- et MTS-mtAspRS-fusionnés à la GFP dans des cellules humaines	130
Figure 33. Principe de l'import <i>in vitro</i>	132
Figure 34. Présentation des variants de l'AspRS mitochondriale	133
Figure 35. Import <i>in vitro</i> des variants de l'AspRS mt humaine dans des mitochondries purifiées de pommes de terre	134
Figure 36. Import <i>in vitro</i> de protéines mitochondriales dans des mitochondries purifiées à partir de cellules HEK 293T	136
Figure 37. Localisation sub-mitochondriale des protéines présentant le motif R-10	138
Figure 38. Vue schématique de la localisation mitochondriale de certains composants de la machinerie traductionnelles mitochondriale humaine	140
Figure 39. Perspectives de mon travail de thèse : grandes thématiques et approches expérimentales	157
Figure 40. Oligonucléotide biotinylé complémentaire à l'ARNt ^{Asp} mitochondrial humain	176
Figure 41. Gel SDS-PAGE 10% typique des résultats de liaison covalente des IgG aux protéines G	183
Figure 42. Détermination du K_{Mapp} en fonction du type d'inhibition	193
Figure 43. Mécanismes de modification des ARN par sondes structurales chimiques	198

Table des tableaux

Tableau 1.	Principales caractéristiques des aminoacyl-ARNt synthétases conduisant à leur classement en deux familles	17
Tableau 2.	Répartition des aminoacyl-ARNt synthétases en deux classes	18
Tableau 3.	Séquences d'adressage prédites pour les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines	19
Tableau 4.	Paramètres cinétiques de l'aminacylation des aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines	22
Tableau 5.	Ensemble des données concernant les structures cristallographiques d'AspRS	89
Tableau 6.	Paramètres cinétiques des AspRS mitochondriale humaine et d' <i>E. coli</i>	94
Tableau 7.	Acides aminés des AspRS d' <i>E. coli</i> et mitochondriale humaine impliqués dans la reconnaissance de l'ATP et de l'acide aspartique	96
Tableau 8.	Interprétation des résultats des expériences de « Dynamic Light Scattering » réalisées sur l'AspRS mt humaine	102
Tableau 9.	Présentation des différentes conditions de surexpression et de purification de l'AspRS- Δ Exon13	117
Tableau 10.	Séquences théoriques d'import et d'export nucléaire dans les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines	123
Tableau 11.	Nouvelles prédictions de séquences N-terminales correspondant aux signaux d'adressage mitochondriaux des aaRS mt humaines	139

Table des publications

Article n°1 Enzymatic and chemical structure probing of human mitochondrial tRNA^{Asp}	68
Article n°2 Pathology-related mutation A7526G helps understanding the 3D structural core in mammalian mitochondrial tRNA^{Asp}	71
Article n°3 Loss of a primordial identity element for a mammalian mitochondrial aminoacylation system	73
Article n°4 Peculiar inhibition of human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase by adenylate analogs	96
Article n°5 Alternative splice-variants for human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases	115
Article n°6 Non-processing of a mitochondrial protein is a cause of leukoencephalopathy	142
Article n°7 Handling mammalian mitochondrial tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases for functional and structural characterization	201

INTRODUCTION

Les mitochondries occupent une place capitale dans le métabolisme cellulaire énergétique. En convertissant l'énergie libérée par l'oxydation des nutriments sous forme d'ATP, elles représentent la centrale énergétique de la cellule. Elles sont le siège des voies cataboliques terminales des molécules énergétiques comme la β -oxydation des acides gras ou encore le cycle de Krebs mais leur diversité fonctionnelle s'étend à d'autres fonctions. Ainsi ces organelles jouent un rôle de régulateur majeur de l'apoptose, mais aussi un rôle déterminant dans le vieillissement cellulaire, l'homéostasie du calcium et de nombreuses voies anaboliques. Les mitochondries fonctionnent, en partie, grâce à leur information génétique propre qui, chez l'Homme, est un petit ADN circulaire codant pour 13 protéines, 2 ARN ribosomiques, et 22 ARN de transfert (ARNt). Néanmoins, leur fonctionnement dépend également de l'import de nombreuses protéines codées par le génome nucléaire. Ces protéines sont aussi bien impliquées dans le maintien et l'expression du génome mitochondrial que dans les activités métaboliques et dans les mécanismes d'import eux-mêmes. Il apparaît ainsi que le fonctionnement de ces organelles nécessite une interaction étroite entre ces deux génomes.

La traduction de l'information génétique nucléaire mais aussi mitochondriale se place au cœur de la vie cellulaire et met en œuvre une orchestration fine, précise et spécifique de très nombreuses macromolécules. Les ARNt et les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS), enzymes qui catalysent la fixation d'un acide aminé sur l'extrémité de l'ARNt, y occupent une place cruciale en contribuant à la sélection et au transfert des acides aminés spécifiques qui seront incorporés dans les protéines naissantes au niveau du ribosome. Les connaissances acquises au sujet des ARNt et des aaRS mitochondriaux (mt) sont encore limitées. Cependant, les systèmes d'aminacylation mt sont considérés comme originaux car les ARNt, codés par le génome mt, possèdent au vu de leurs séquences primaires, des structures secondaires et tertiaires dégénérées, alors que les aaRS, codées par le génome nucléaire, semblent très proches des synthétases classiques.

L'étude de ces deux partenaires est d'autant plus intéressante et importante qu'ils sont également les cibles de mutations pathologiques. En effet, depuis une vingtaine d'années, des corrélations de plus en plus nombreuses ont pu être établies entre des pathologies sévères et variées et des mutations dans le génome mitochondrial. Les gènes des ARNt mt sont particulièrement touchés. Depuis la première mise en évidence de l'effet pathologique d'une mutation ponctuelle dans le gène de l'ARNt^{Leu(UUR)} en 1990, de nouvelles mutations sont détectées fréquemment et atteignent aujourd'hui un nombre de 130 mutations pathologiques touchant l'ensemble des gènes des ARNt mt. Elles sont associées à de nombreux syndromes incluant principalement des encéphalopathies et des myopathies mais également des surdités

neurosensorielles, des ophtalmoplégies, voire des diabètes. Ce n'est qu'en 2007 que des mutations pathologiques ciblant les aaRS mt humaines ont été découvertes. À ce jour, les gènes de l'AspRS mt et de l'ArgRS mt ont été trouvés être les cibles de mutations qui entraînent dans les deux cas des leucoencéphalopathies.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur le système d'aspartylation mt humain et son objectif a été d'apporter des éléments de compréhension des propriétés structurales et fonctionnelles de ce système. Quatre grands axes ont été développés. Dans le cadre strict de la traduction mitochondriale, une étude a porté sur la structure secondaire et tertiaire de l'ARNt^{Asp} mt humain représentatif des ARNt mt de mammifères considérés comme « bizarres ». Une seconde étude a concerné les propriétés catalytiques de l'AspRS mt humaine face à des inhibiteurs. Ensuite, dans un cadre plus large, l'organisation supramoléculaire des aaRS mt (recherche de partenaires protéiques de l'AspRS mt) et la question de leur localisation sub-mitochondriale ont été abordés. Puis, une découverte fortuite observée au laboratoire dans le cadre du clonage systématique des gènes de plusieurs aaRS mt humaines nous a amené à explorer l'existence de variants d'épissage alternatif et à tenter de les caractériser. Enfin, une partie des travaux a été consacrée à l'exploration de l'incidence moléculaire de mutations liées à des pathologies ciblant aussi bien l'ARNt^{Asp} que l'AspRS.

L'introduction de cette thèse est partagée en 5 parties. La première partie est consacrée à la mitochondrie avec un accent particulier sur les différentes fonctions de cette organelle, les particularités de son génome ainsi que ses mécanismes d'expression. La deuxième partie porte sur les systèmes d'aminocyclation mt humains, dans laquelle les ARNt et les aaRS mt humains seront présentés successivement sous leurs aspects structuraux et fonctionnels. La troisième partie est dédiée à la relation établie entre la mitochondrie et le génome nucléaire en développant les différentes voies d'import des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytosol. La quatrième partie est vouée aux originalités fonctionnelles à la fois des ARNt et des aaRS eucaryotiques et eubactériens. Enfin la cinquième partie est consacrée aux pathologies mitochondriales et plus précisément aux pathologies liées à des mutations touchant les différents partenaires de la machinerie de traduction mitochondriale.

A. La mitochondrie, une organelle vitale

La mitochondrie est largement connue pour sa fonction principale, la synthèse de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP. Ses implications dans les voies cataboliques et anaboliques telles que l'oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, le cycle de l'urée ainsi que la néoglucogenèse et son rôle déterminant dans des processus biologiques comme le vieillissement cellulaire, l'homéostasie du calcium et la régulation de l'apoptose, la place au cœur de nombreuses problématiques fondamentales motivées par la nécessité d'approfondir les connaissances déjà acquises au sujet de son évolution, sa biogenèse ou encore son métabolisme (Scheffler, 1999).

La mitochondrie est à l'heure actuelle au centre de l'attention d'un grand nombre de membres de la communauté scientifique de par le monde. Son implication dans des problématiques comme le cancer, les maladies neurodégénératives, le diabète, le vieillissement ou encore les maladies cardiovasculaires (revue par *e.g.* (Zeviani & Carelli, 2003)) propulse la compréhension de ses fonctions et de son implication dans ces pathologies vers des travaux de recherche de plus en plus nombreux et ambitieux.

Afin de bien comprendre la mécanistique de certaines des pathologies liées au dysfonctionnement de la mitochondrie, ses éléments structuraux et fonctionnels ainsi que les originalités de sa machinerie traductionnelle, qui font d'elle une organelle si particulière, sont présentés dans les paragraphes suivants.

1. Structure et fonctions

Le mot « mitochondrie » trouve son origine dans la civilisation grecque, *mitos* signifiant « filament », *chondros* signifiant « graine » et a été pensé suite à l'observation de leur apparence par microscopie optique et électronique (revue par *e.g.* (Logan, 2006)). Cette organelle, de quelques dizaines de micromètres, est présente en nombre variable dans le cytosol, pouvant aller de quelques centaines à quelques milliers selon le type cellulaire. Loin d'être statiques et isolées, les mitochondries sont en mouvement permanent et sont liées entre elles par des mécanismes membranaires de fusion et de fission formant ainsi un réseau mitochondrial (mt) (Suen et al., 2008). Elles sont morphologiquement bien définies (Figure 1) et délimitées par deux membranes. Alors que la membrane externe est perméable aux

petites molécules de poids moléculaire inférieur ou égal à 5 kDa, la membrane interne est imperméable aux ions. Elles sont toutes deux impliquées dans le mécanisme d'import des protéines grâce à la présence de translocases au sein des deux membranes. Enfin, la cavité délimitée par la membrane interne constitue la matrice mitochondriale et contient le génome mitochondrial.

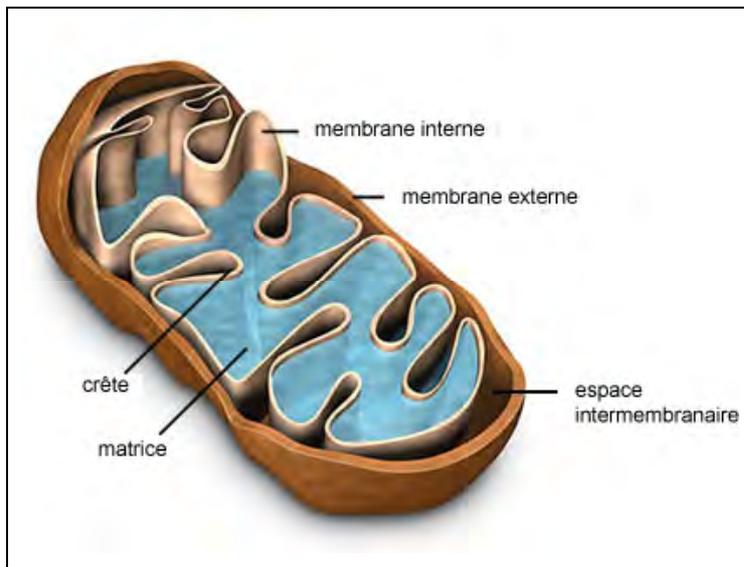


Figure 1. Représentation schématique de la mitochondrie. Illustration extraite du site <http://atheneumveurne.com>.

La phosphorylation oxydative permet de produire l'ATP et a lieu au niveau de la membrane interne, faisant des mitochondries les centrales énergétiques de la cellule. Leur physiologie étant orientée vers la production intense d'ATP, la présence de replis formant des crêtes permet d'augmenter la surface de la membrane interne et accroît le rendement de production d'ATP. En plus d'approvisionner la cellule en ATP, la mitochondrie est impliquée dans des réactions métaboliques comme la néoglucogenèse, le cycle de l'urée, la dégradation des acides gras et la biosynthèse des hormones stéroïdes. Avec le réticulum endoplasmique, elle participe également à la régulation de la concentration intracellulaire en calcium (revue par *e.g.* (Graier et al., 2007)). Enfin, en libérant le cytochrome c dont la fonction est d'activer les caspases, elle joue un rôle central dans le mécanisme de mort cellulaire programmée, l'apoptose (revues par *e.g.* (Green & Reed, 1998 ; Oberst et al., 2008)).

2. Origine endosymbiotique

L'origine de la mitochondrie semble bien établie et la théorie de l'endosymbiose fait maintenant autorité. Une α -protéobactérie serait l'endosymbiote original (revue par *e.g.* (Gray et al., 2001)) dont l'évolution aurait été accompagnée d'un transfert massif de gènes vers le génome nucléaire de son hôte. L'existence de nombreux pseudogènes homologues à des fragments de l'ADN mt humain retrouvés dans le génome nucléaire viendrait soutenir cette hypothèse. Cependant, l'analyse de protéomes mitochondriaux a révélé que seulement 20% des protéines seraient d'origine α -protéobactérienne, alors que 30% auraient une origine eubactérienne autre et que les 50% restantes ne présenteraient pas ou plus d'homologues eubactériens (Brindefalk et al., 2007). Cette origine eubactérienne (différente de l' α -protéobactérie) s'explique alors par des phénomènes de transfert horizontal, de délétion et de duplication de gènes. Enfin, le maintien de seulement certains gènes dans le génome mitochondrial pourrait être lié au caractère extrêmement hydrophobe des protéines correspondantes qui viendrait gêner leur import à travers les membranes mitochondriales. Ainsi, les évènements d'endocytose d'eubactéries et de transfert de gènes semblent avoir été nombreux au cours de l'évolution, et une connaissance approfondie des différents génomes permettra certainement la clarification du schéma illustrant le statut initial ainsi que l'histoire évolutive de l'endosymbiote.

3. Génome mitochondrial

La matrice mitochondriale contient plusieurs copies d'ADN mitochondrial ainsi que tous les éléments nécessaires à sa réplication et son expression. Alors que le génome mt d'*Arabidopsis thaliana* est de grande taille (125 000 pb) (Initiative, 2000) et que celui de *Saccharomyces cerevisiae* est composé de 87 559 pb (Foury et al., 1998), le génome mitochondrial humain est un petit ADN circulaire double brin de 16 569 pb (Figure 2) dépourvu d'histones (Anderson et al., 1981). Il est d'origine maternelle et est transmis par les mitochondries présentes dans les ovocytes. Sa séquence complète a été déterminée en 1981 (Anderson et al., 1981) et révisée en 2000 (Ingman et al., 2000) et sa composition nucléotidique le distingue du génome nucléaire. En effet, il est constitué d'un brin dont la composition riche en résidus G le caractérise comme étant un brin lourd, tandis que l'autre est dit léger.

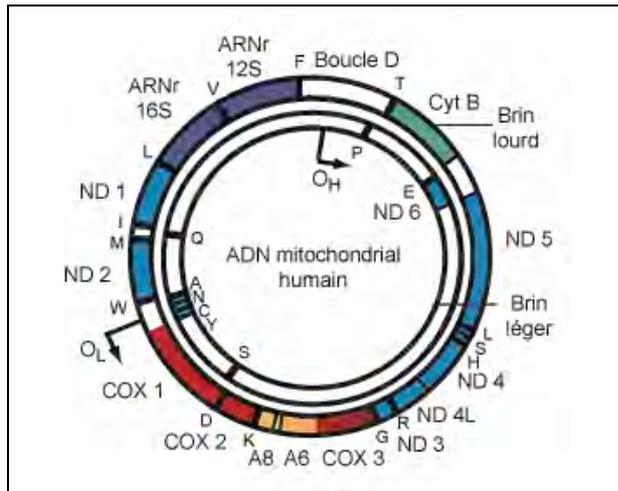


Figure 2. Organisation du génome mitochondrial humain. Les brins lourd et léger sont représentés par le cercle extérieur et intérieur, respectivement. O_H et O_L indiquent les origines de réplication du brin lourd et léger, respectivement. Les gènes d'ARNt sont représentés par des traits noirs et indiqués par l'acide aminé correspondant d'après le code à une lettre. Les gènes des ARN ribosomiques 12S et 16S sont indiqués en violet, les gènes de la chaîne respiratoire en bleu pour le complexe I (ND 1-6), en vert pour le complexe III (Cyt B), en rouge pour le complexe IV (COX 1-3) et en orange pour le complexe V (ATPase A6 et A8). La boucle D est en blanc.

Chaque brin possède une origine de réplication propre qui peut être soit bidirectionnelle et asynchrone (revue par *e.g.* (Clayton, 1991)) soit unidirectionnelle (Holt et al., 2000; Yang et al., 2002), (revue par *e.g.* (Falkenberg et al., 2007)). L'extrême compaction de l'ADN mt humain le rend également très particulier. Il présente peu de zones intergéniques qui se limitent à quelques nucléotides et aucune séquence intronique. Il code uniquement pour 13 protéines (toutes des sous-unités de la chaîne respiratoire), 2 ARN ribosomiques (ARNr) et 22 ARN de transfert (ARNt). Il n'est composé que d'une seule région non codante, la boucle D, nécessaire à la réplication et à la transcription du génome. Sa transcription est bidirectionnelle et indépendante à chaque brin. Elle est réalisée par une ARN polymérase de type T₃/T₇ qui génère trois transcrits polycistroniques (revues par *e.g.* (Clayton, 1991; Falkenberg et al., 2007)).

4. Synthèse protéique mitochondriale

La synthèse protéique mitochondriale humaine fait intervenir différents partenaires d'origine mitochondriale mais également d'origine nucléaire (Figure 3) (Florentz et al., 2003). En effet, comme il a été présenté dans le paragraphe précédent, le génome mitochondrial apporte l'ensemble des 22 ARNt ainsi que 2 ARNr (ARNr 12S et 16S) alors que toutes les autres molécules indispensables à la traduction sont codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytosol et importées dans la mitochondrie. Il s'agit par exemple des protéines ribosomales, de l'ARNr 5S, des facteurs de la traduction (initiation, élongation, terminaison), et des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) (revue par *e.g.* (Sissler et al., 2008)).

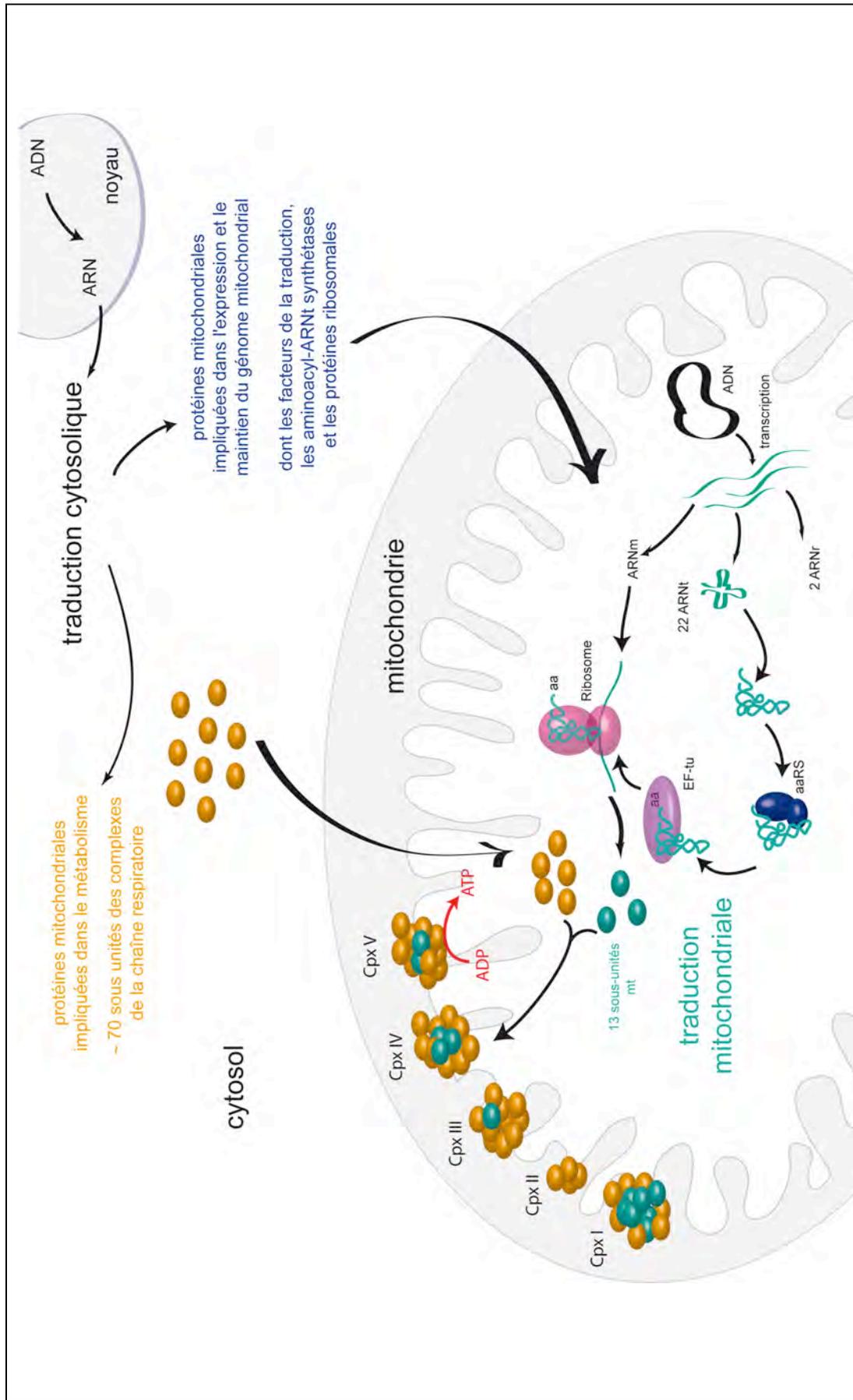


Figure 3 : Origine double de la machinerie traductionnelle mitochondriale. Le génome mt code pour 22 ARNt et 2 ARNr (indiqués en vert) alors que le génome nucléaire code pour toutes les autres macromolécules impliquées dans la machinerie traductionnelle, en particulier les aaRS (en bleu). La traduction des 13 gènes mt de protéines conduit à des sous-unités (ovale vert) des complexes de la chaîne respiratoire. Ceux-ci sont complétés par ~ 70 sous-unités additionnelles (ovale orange) traduites des gènes nucléaires et importées du cytosol.

Notons également que la structure complète du ribosome mitochondrial de mammifère 55S en complexe avec un ARNt a été résolue par cryo-électromicroscopie (Sharma et al., 2003). Le mécanisme de la traduction mitochondriale se rapproche beaucoup de celui des eubactéries et se distingue de la traduction cytosolique puisqu'elle débute avec une N-formyl-méthionine et est inhibée par le chloramphénicol. Cependant, elle présente un certain nombre de particularités qui la rendent unique. Ainsi les ARNm sont dépourvus des sites de fixation du ribosome habituellement rencontrés chez les eubactéries (séquence Shine & Dalgarno, revue par *e.g.* (Kozak, 1999; Kozak, 2005)) ou chez les eucaryotes (coiffe m⁷Gppp en 5' et queue polyA en 3', revues par *e.g.* (Sachs et al., 1997; Kozak, 1999; Kozak, 2005)) et débute directement par le codon d'initiation avec éventuellement quelques nucléotides en amont (Montoya et al., 1981). Il a été montré que les extrémités 5' des ARNm mitochondriaux bovins ne présentent pas de structure secondaire et que les codons d'initiation se trouvent ainsi localisés dans une région simple brin. Ceci supporte l'idée que le ribosome mitochondrial serait impliqué uniquement dans la reconnaissance de régions et de codons d'initiation simples brins (Jones et al., 2008). Le code génétique mt dévie du code « universel ». Le codon stop opale UGA est réassigné en codon tryptophane, les codons isoleucine AUA et AUU sont reconnus par l'ARNt^{Met} et les codons arginine AGA et AGG se trouvent être des codons Stop. Ensuite, le ribosome mt a un faible contenu en ARNr (33%, contre 66% pour les eubactéries et 60% pour les ribosomes cytosoliques). Enfin bien que la découverte de la localisation de ce dernier ainsi que celle du facteur d'élongation EF-Tu au niveau de la membrane interne (Liu & Spremulli, 2000; Suzuki et al., 2007) suggère fortement que la traduction pourrait intervenir au niveau de cette membrane, aucun travail n'a encore confirmé qu'elle se déroule effectivement au niveau de ce sous-compartiment mitochondrial.

Les originalités structurales relatives aux ARNt et aux aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriaux, acteurs clés de la machinerie traductionnelle, sont présentées dans ce qui suit.

B. Les systèmes d'aminocyclation mitochondriaux humains, une famille à part

C'est en 1955 que Francis Crick a suggéré l'existence de petites molécules adaptatrices capables de traduire l'information nucléotidique en langage protéique (Crick, 1955). Ce n'est que trois ans plus tard que Hoagland a renforcé cette hypothèse en montrant la présence dans du foie de rat d'ARN solubles capables à la fois de fixer les acides aminés et d'interagir avec les codons des ARNm (Hoagland et al., 1958). Ces deux travaux, pionniers dans le monde de la traduction, sont à l'origine d'un nombre de découvertes et de publications impressionnant, ayant toutes pour point commun ces petits ARN non codants nommés ARN de transfert.

Afin de convertir l'information nucléotidique contenue dans l'ARNm en une protéine, chaque ARNt est amené à interagir avec différents partenaires communs qui interviennent lors de leur biosynthèse et de leur maturation (RNases P et Z, CCCase, endonucléase) ou lors de leur fonction (EF-Tu, ribosome). Ceci implique que l'ensemble des ARNt possède et présente une organisation structurale commune. Cependant, au-delà de cette homologie structurale, chaque ARNt présente des informations qui lui sont propres et qui lui permettent d'être reconnu spécifiquement par son aaRS homologue lors de la réaction d'aminocyclation, étape clé de la biosynthèse des protéines.

La fidélité de cette réaction repose sur des éléments d'identité distribués le long de l'ARNt en partenariat avec des signaux présents dans l'aaRS. Ceci constitue le langage propre de chaque ARNt qui lui permet d'être reconnu par l'aaRS homologue et définit ainsi le « second code génétique » (Lengyel, 1966). Les éléments à l'origine de la reconnaissance spécifique de l'ARNt par son aaRS homologue sont appelés « déterminants » alors que ceux empêchant l'interaction de l'ARNt avec une aaRS hétérologue sont définis comme « antidéterminants ». Ces jeux d'identité ont été déterminés complètement chez les ARNt d'*E. coli* et de *S. cerevisiae* et ponctuellement chez un certain nombre d'organismes modèles, notamment l'eubactérie *Thermus thermophilus*, le nématode *Caenorhabditis elegans*, la plante *A. thaliana* et l'Homme (revue par e.g. (McClain, 1995; Giegé et al., 1998; Beuning & Musier-Forsyth, 1999; Giegé & Frugier, 2003). Ils peuvent être des éléments structuraux, comme par exemple, l'orientation de la grande région variable de l'ARNt^{Ser} (Lenhard et al.,

1999), des nucléotides isolés (par exemple la base discriminatrice G73 de l'ARNt^{Asp} (Pütz et al., 1991)), des paires de bases (G3:U70 de l'ARNt^{Ala} (Hou & Schimmel, 1988; Francklyn & Schimmel, 1989)), ou encore des groupements chimiques portés par certaines bases, résultats de leurs modifications post-transcriptionnelles (Lysidine de l'ARNt^{Lle} (Muramatsu et al., 1988)). Il est important de noter que les éléments d'identité ne sont pas obligatoirement en contact direct avec l'aaRS et inversement, les résidus de l'ARNt en contact avec les acides aminés des aaRS (révélés par les structures cristallographiques des complexes) ne font pas toujours partie du jeu d'identité.

On comprend alors aisément que la traduction repose sur une série de partenariats au sein desquels les informations structurales portées par l'ARNt occupent une place fondamentale.

En plus d'avoir, en partie, ces mêmes exigences, la traduction mitochondriale soulève une problématique supplémentaire. En effet, comme indiqué précédemment, alors que seuls les ARNt et les ARNr sont codés par le génome mt, tous les autres partenaires nécessaires à la biosynthèse des protéines au sein de la mitochondrie, dont les aaRS, sont codés par le génome nucléaire. La double origine de cette machinerie traductionnelle mt, à laquelle s'ajoute la déviation du code génétique mt humain, rend la problématique de la spécificité de reconnaissance des différents partenaires, et notamment celle des ARNt mt/aaRS mt, particulièrement intéressante et laisse supposer que les systèmes d'aminocyclation mt humains pourraient avoir leurs particularités propres.

1. Les ARNt mitochondriaux humains ont une fonction canonique mais *quid* de leur structure ?

Le séquençage du génome mt humain a révélé que les ARNt mt humains présentent des déviations structurales jusqu'alors insoupçonnées par rapport aux ARNt classiques et rien que la description de leur séquence primaire révèle déjà des caractéristiques bien inhabituelles. Alors que le cytosol contient une soixantaine d'ARNt pour les 20 acides aminés, seuls 22 ARNt mt sont codés par le génome mt. À chaque acide aminé correspond un ARNt mt à l'exception de la leucine et de la sérine pour lesquels 2 ARNt mt sont présents. L'ensemble est suffisant à la traduction mitochondriale, et aucun phénomène d'import d'ARNt, comme il a été montré pour l'ARNt^{Lys} chez les marsupiaux (Dörner et al., 2001), chez la levure (Tarassov & Entelis, 1992; Tarassov et al., 1995b; Entelis et al., 1998;

Rinehart et al., 2005), chez les plantes (Dietrich et al., 1996; Brubacher-Kauffmann et al., 1999; Delage et al., 2003; Salinas et al., 2005; Salinas et al., 2006)) ou encore chez les protozoaires, n'est requis (Hauser & Schneider, 1995; Schneider, 1996) (revues par *e.g.* (Tarassov & Martin, 1996; Schneider & Maréchal-Drouard, 2000; Bhattacharyya & Adhya, 2004; Salinas et al., 2008)).

1.1. Maturation

À l'issue de la transcription, les ARNt mt doivent subir des phénomènes de maturation indispensables à leur fonction. Les transcrits primaires sont clivés par la RNase P (à l'extrémité 5' de l'ARNt) et la RNase Z (à l'extrémité 3' de l'ARNt) (Levinger et al., 2004a). Ces deux coupures s'accompagnent de l'addition du trinuécléotide CCA en 3', indispensable à l'aminocyclation et de plusieurs modifications de nucléotides. À ce jour, le séquençage d'une centaine d'ARNt (pour une grande majorité classiques et dont la moitié appartient au règne animal) a permis l'identification de certaines modifications post-transcriptionnelles (Sprinzl & Vassilenko, 2005). Chez l'homme, la séquence de 6 ARNt mt est connue (Lys, Ile, Leu(UUR), Ser(UCN), Ser(AGY), et Pro). Bien qu'étant globalement moins modifiés que les ARNt classiques, ils partagent avec eux la majorité des modifications recensées. Néanmoins, certaines sont présentes à des positions inhabituelles comme la méthylation de l'adénine en position 9 identifiée pour 13 ARNt mt de mammifères et qui, dans le cas de l'ARNt^{Lys} humain, a été démontrée comme étant indispensable au repliement secondaire classique en « feuille de trèfle » (Helm et al., 1999b). Seul un faible nombre d'ARNt mt humains ont été séquençés à ce jour ce qui laisse présager que beaucoup d'autres modifications restent encore inconnues pour le moment, à l'image de la découverte récente des uridines modifiées par le groupement taurine dans l'anticodon des ARNt^{Lys} et ARNt^{Leu(UUR)} (Suzuki et al., 2002). Ce groupement, identifié dans les ARNt^{Lys} et ARNt^{Leu(UUR)} mt humain et bovin sains, n'a pas été retrouvé dans les mêmes ARNt provenant de cellules de malades présentant respectivement les syndromes MERFF (« Myoclinic Epilepsy with Ragged Red Fibers ») (Yasukawa et al., 2000b) et MELAS (« Mitochondrial Epilepsy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes ») (Yasukawa et al., 2000c). Ce travail suggère à quel point cette modification post-transcriptionnelle est importante et ouvre ainsi une nouvelle piste de travail pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de ces deux syndromes.

1.2. Des structures secondaires « bizarres » et des structures tertiaires à explorer...

La grande majorité des séquences d'ARNt classiques connues à ce jour a une taille comprise entre 75 et 95 nucléotides. Quinze de ces nucléotides sont strictement conservés et 8 d'entre eux ne sont que semi-conservés. Ils participent à l'établissement d'un réseau d'interactions tertiaires qui permettent à l'ARNt de glisser d'un repliement secondaire en feuille de trèfle vers un repliement tridimensionnel en L (Figure 4).

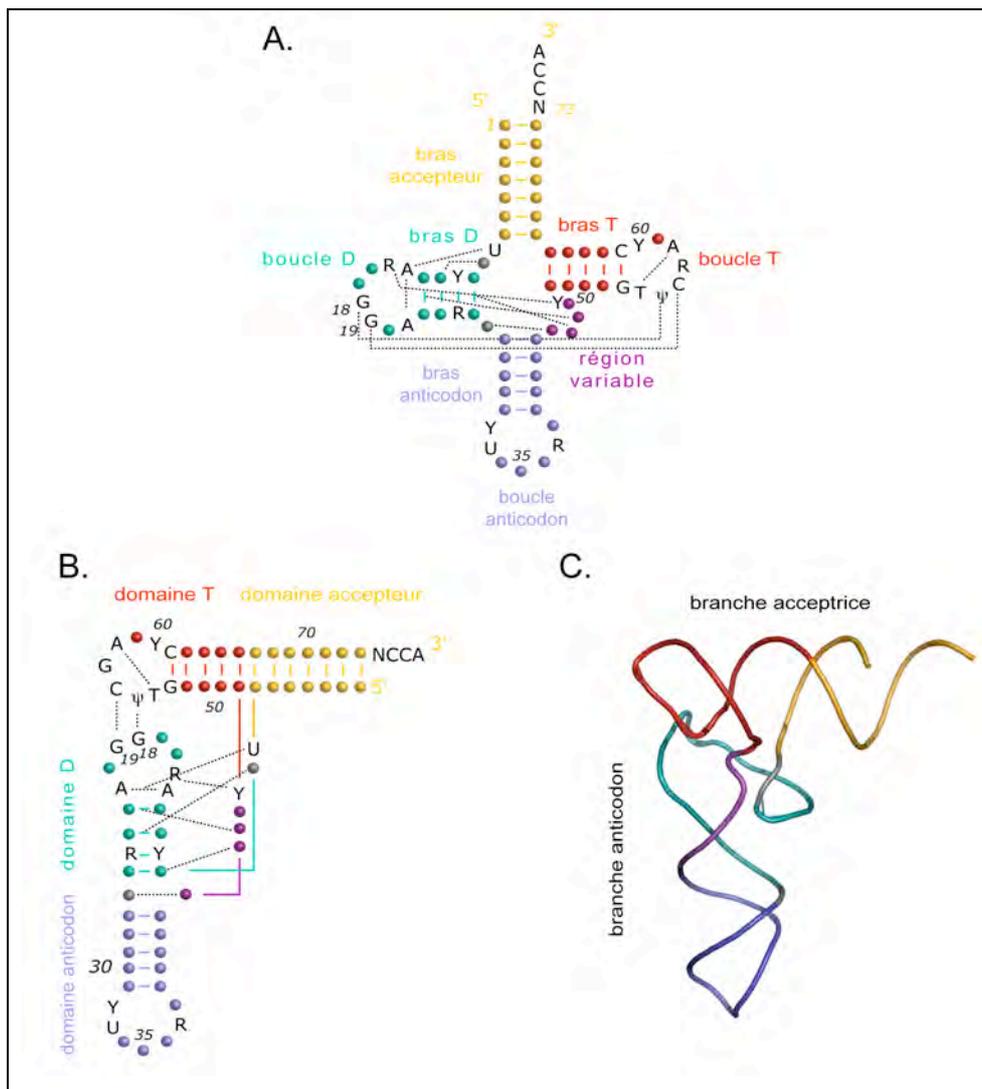


Figure 4. Structures secondaires et tertiaires des ARNt canoniques. Les différents domaines structuraux se distinguent par leurs couleurs, le réseau d'interactions tertiaires à l'origine du repliement tridimensionnel est représenté par des traits pointillés noirs. La numérotation des nucléotides est celle définie par (Sprinzl & Vassilenko, 2005). Les nucléotides indiqués en noir sont ceux conservés dans tous les ARNt. Y: pyrimidine, R: purine, A: adénosine, C: cytosine, G: guanosine, T: thymine, U: uridine, Ψ: pseudouridine. **A.** Structure secondaire consensus en feuille de trèfle des ARNt canoniques. **B.** Représentation en deux dimensions du repliement tertiaire de l'ARNt. **C.** Structure cristallographique de l'ARNt^{Phe} de *S. cerevisiae* (Jovine et al., 2000).

Les gènes des ARNt mt humains sont répartis tout au long du génome mt à la fois sur le brin lourd (14 ARNt) et sur le brin léger (8 ARNt). Ainsi, les ARNt lourds, transcrits à partir du brin léger, présentent une grande proportion de paires de bases G•U et un faible taux de mésappariements alors que les ARNt légers, pauvres en G, n'ont que très peu de paires de bases G•U mais beaucoup plus de mésappariements et possèdent une forte proportion de dinucléotides CpA et UpA (Helm et al., 2000). Ces dinucléotides les rendent plus sensibles aux hydrolyses spontanées. Cette composition nucléotidique atypique les rend d'autant plus différents de leurs homologues cytosoliques qui ont une composition équilibrée de 25% pour chacun des 4 nucléotides. La compaction du génome mitochondrial implique également qu'ils sont globalement plus petits que les ARNt classiques (62 à 78 nucléotides contre 75 à 95 nucléotides) (Helm et al., 2000).

Ensuite, à l'exception des ARNt^{Ser(AGY)} (pour qui il manque entièrement le bras D) et ARNt^{Ser(UCN)} (pour qui le connecteur 9 est absent), l'ensemble des ARNt pourraient adopter de manière théorique une structure secondaire classique en feuille de trèfle (Figure 5). Cependant, pour la majorité d'entre eux, la taille des boucles D et T varie de manière importante. Leurs régions variables se trouvent restreintes à seulement 4 à 5 nucléotides alors que celle d'un ARNt classique peut s'étendre jusqu'à 24 résidus.

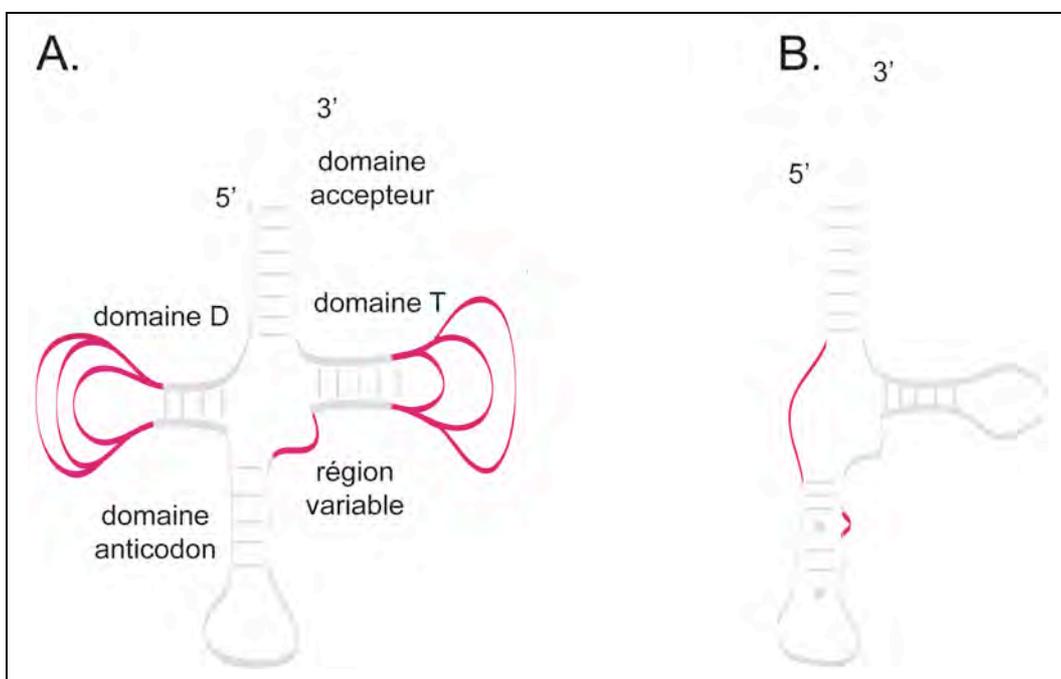


Figure 5. Propriétés structurales des ARNt mitochondriaux humains. **A.** Représentation schématique des structures secondaires en feuille de trèfle de 20 des 22 ARNt mitochondriaux humains. Les différents domaines sont indiqués. Les régions de couleur rose mettent en évidence la grande variation des tailles des boucles D et T et la conservation de la petite taille de la région variable. **B.** Cas de l'ARNt^{Ser(AGY)} pour lequel le bras D est absent.

Enfin, leur repliement tridimensionnel est encore mal compris et soulève beaucoup de questions. Une souplesse du réseau d'interaction tertiaire a été révélée par la recherche des résidus stratégiques (aux positions classiques) impliqués dans l'établissement de celui-ci (Helm et al., 2000). Ainsi, seuls 4 des 22 ARNt mt (Leu(UUR), Leu(CUN), Gln et Asn) possèdent les résidus G18G19 et T54Ψ55C56 responsables de l'interaction classique entre les boucles D et T. La figure 6 illustre l'altération du réseau d'interaction tridimensionnel classique au sein des ARNt mt humains. Mon laboratoire d'accueil a un intérêt tout particulier pour l'étude structurale des ARNt mt de mammifères avec une attention particulière pour le système humain et ses travaux ont contribué largement à l'avancée de la compréhension de leurs structures secondaires (Helm et al., 2000; Pütz et al., 2007).

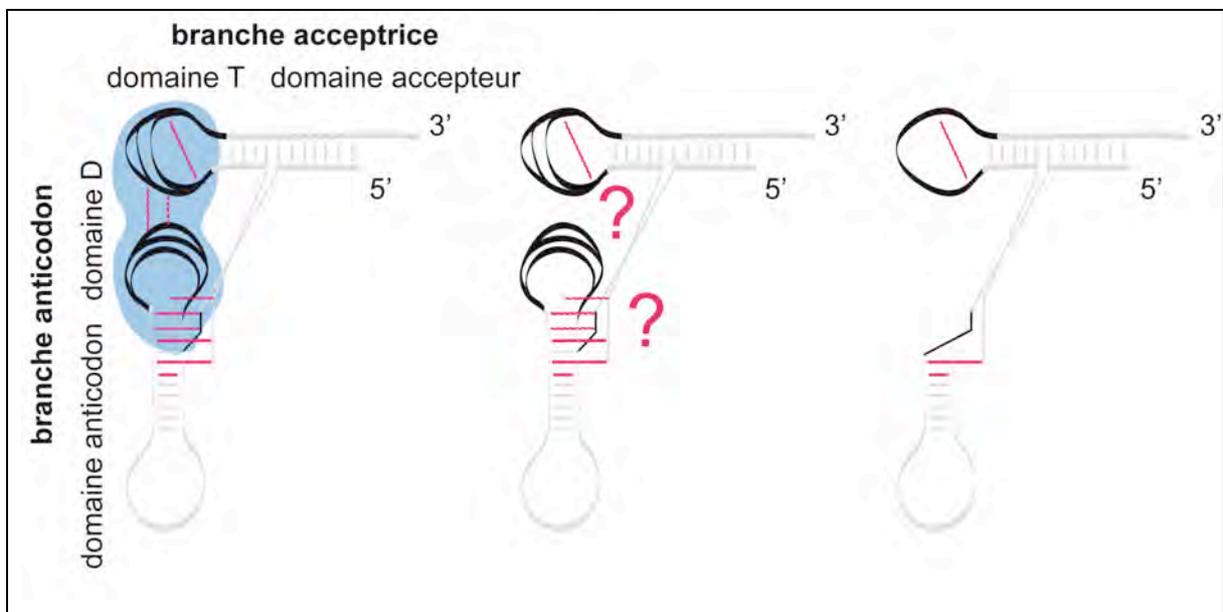
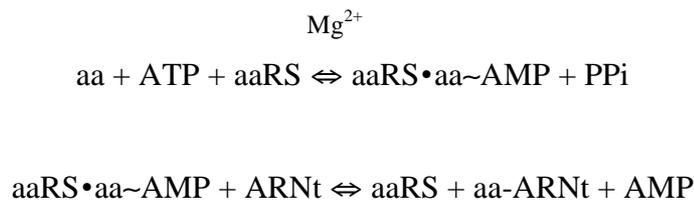


Figure 6. Exemple de variabilité des structures tridimensionnelles des ARNt mitochondriaux humains. Les interactions à longue distance sont représentées en trait plein rose, et les interactions triples non strictement conservées sont indiquées en pointillés roses. Les zones entourées de bleu sont les domaines où le nombre et le type d'interactions varient d'un ARNt à une autre.

2. Les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines

Les aminoacyl-ARNt synthétases sont considérées comme les premières protéines apparues faisant le lien entre le monde des ARN et celui des protéines (revue par *e.g.* (Schimmel et al., 1993)). Elles sont les enzymes qui catalysent la réaction d'aminoacylation qui consiste en la fixation d'un acide aminé sur son ARNt homologue par une réaction en deux étapes :



La première étape, est dite étape d'activation (Hoagland, 1955), et consiste à former l'intermédiaire réactionnel (aminoacyl-adénylate) avec l'acide aminé et une molécule d'ATP, qui sera ensuite transféré sur l'ARNt au cours de la deuxième étape (Hoagland et al., 1957; Hoagland et al., 1958).

Les aaRS cytosoliques sont des enzymes modulaires de taille et de structures oligomériques hétérogènes. Elles sont réparties en deux classes (Cusack et al., 1990; Eriani et al., 1990; Arnez & Cavarelli, 1997) selon les motifs conservés au sein de leurs domaines catalytiques, leurs structures ainsi que leurs propriétés fonctionnelles (tableaux 1 et 2).

Principales caractéristiques	Classe I	Classe II
Motifs conservés	HIGH KMSKS	Motif 1: ...P... Motif 2: ...(GX) ₃ ER... Motif 3: ...FRXE
Structure du site actif	Feuillet de brins β parallèles de type "Rossmann fold"	Feuillet de brins β antiparallèles
Conformation de l'ATP	Etendue	Repliée
Interaction avec l'ARNt		
Bras accepteur	Sillon mineur	Sillon majeur
Boucle variable	Face au solvant	Face à la protéine
Site d'aminoacylation	2'OH	3'OH

Tableau 1. Principales caractéristiques des aminoacyl-ARNt synthétases conduisant à leur classement en deux familles.

Classe I			Classe II		
	AaRS	Oligométrie		AaRS	Oligométrie
Sous-classe Ia	ValRS	α	Sous-classe IIa	SerRS	$\alpha 2$
	IleRS	α		ThrRS	$\alpha 2$
	LeuRS*	α		ProRS	$\alpha 2$
	MetRS*	$\alpha 2$		GlyRS*	$\alpha 2 \beta 2$
	CysRS	α		HisRS	$\alpha 2$
Sous-classe Ib	TyrRS	$\alpha 2$	Sous-classe IIb	AspRS	$\alpha 2$
	TrpRS	$\alpha 2$		LysRS [§]	$\alpha 2$
Sous-classe Ic	GluRS	α		AsnRS	$\alpha 2$
	GlnRS	α	Sous-classe IIc	PheRS*	$\alpha 2 \beta 2$
	ArgRS	α		AlaRS*	$\alpha 4$

Tableau 2. Répartition des aminoacyl-ARNt synthétases en deux classes. * aaRS pour lesquelles la structure oligomérique n'est pas conservée au cours de l'évolution. [§] Une LysRS de classe I a été mise en évidence dans certains organismes (Ibba et al., 1997).

Alors que les aaRS cytosoliques de très nombreux organismes ont été largement étudiées et ce, depuis bien longtemps, les connaissances accumulées au sujet des aaRS mitochondriales humaines et de mammifères ne datent que du milieu des années 1990 et restent encore limitées (Bonfond et al., 2005a; Sissler et al., 2005; Sissler et al., 2008).

Afin de comprendre et d'étudier l'incidence de mutations pathologiques touchant certains ARNt mt humains, la PheRS (Bullard et al., 1999), la LeuRS (Bullard et al., 2000), la LysRS (Tolkunova et al., 2000), la TrpRS (Jørgensen et al., 2000), la MetRS (Spencer et al., 2004) et l'AlaRS (Dickey et al., 2006) ont été identifiées, clonées et caractérisées. Des informations au niveau du gène de la GlyRS (Shiba et al., 1994) et de l'HisRS (O'Hanlon & Miller, 2002) sont également disponibles.

Cependant, en dehors de ces travaux, les douze aaRS mt humaines restantes, demeuraient inconnues et inexplorées. Mon laboratoire d'accueil s'est impliqué alors dans la recherche systématique et l'identification de leurs gènes (Bonfond et al., 2005a) et ceci dans le but de comprendre non seulement leurs aspects évolutifs, mais également d'étudier leurs fonctions d'amination et de connaître leurs structures cristallographiques. Ceci a permis, pour l'instant, de révéler les caractérisations biochimiques de l'AspRS et de la TyrRS (Bonfond et al., 2005a) et de résoudre la structure cristallographique de la TyrRS (Bonfond et al., 2007). D'autres propriétés ont également pu être dévoilées. Ainsi toutes les aaRS mitochondriales sont codées par un gène nucléaire différent de l'aaRS cytosolique à l'exception de la GlyRS et LysRS où un même gène code pour les deux aaRS à la fois.

Pour la GlyRS, la présence de deux sites d'initiation de la traduction permet de produire les deux formes de l'enzyme (Shiba et al., 1994; Mudge et al., 1998), alors que dans le cas de la LysRS, c'est un épissage alternatif qui entre en jeu (Tolkunova et al., 2000). De façon prédictive, toutes ces aaRS présentent un signal d'adressage mitochondrial en N-terminal (Tableau 3) et suivront, en théorie, une des routes d'import décrites dans le § C. Alors que le ribosome et le facteur d'élongation EF-Tu mitochondriaux ont été localisés au niveau de la membrane interne, la localisation finale sub-mitochondriale des aaRS n'a pas encore été déterminée.

aaRSs	Taille (nombre aa)		Séquences d'adressage mitochondrial prédites	
	MTS	aaRS mature		
Classe Ia	ValRS	30	963	MPHLPLASFRPPFWGLRHSRGLPRFHSVST
	IleRS	62	931	SLWGTPLRSPGWQATKRLLVRSVSGASNHQPNNSNGRYRDTVLLPQTSFPMKLLGRQQP
	LeuRS	39	864	MASVWORLGFYASLLKRQLNNGGPDVIKWERRVIPGCTRS
	MetRS	18	576	TMLRTSVLRLGRTGASR
	CysRS	63	501	MLRTTRGPGLPPLLQAALGLGRAGWHWPAGRAASGGRGRAWLQPTGRETGVQVYNSLTGRKE
Classe Ib	TyrRS	17	460	MAAPILRSFSWGRWSTGLNLSVLLPLGLRKA
	TrpRS	18	342	MALHSMRKARERWSFIRA
Classe Ic	GluRS	26	497	MAALLRRLQREPSAASGRPVGRRE
	GlnRS			
	ArgRS	17	561	MACGFRRRAICQLSRVL
Classe IIa	SerRS	21	497	MAASMARRLWPLLTRRGRFRPR
	ThrRS	40	678	MALYQRWRCLRLQGLQACRLHTAVVSTPPRWLAERLGLFE
	ProRS	48	427	MEGLLTRCRALPALATCSRQLSGYVPCR/FHHCAPRRGRRLLSRVF
	GlyRS	54	685	MLRAGGARRERRHPLWTAQGRRLMPSRPVLLRGARAALLLLPPRLARPSLL
	HisRS	34	472	MPLLGLLPRRAWASLLSOLLRPPCASCCTGAVRCQ
Classe IIb	AspRS	49	596	MYFPSWLSQLYRGLSRPIRRITQPIWGLYRSLQSSQRRIPEFSSF
	LysRS	16	609	MLTQAAVRLVRGSLRK
	AsnRS	15	462	MLGVRCLLRSVRECS
Classe IIc	PheRS	37	414	MVGSALRRGAHAYVYLVSKASHISRGHQHQAWGSRPP
	AlaRS	65	916	MAASVAAAARRLRRAIRRSPAWRGLSHRPLSSEPPAAKASAVRAAFLNFFRDRHGHRLVPSASVPRPGD

Tableau 3. Séquences d'adressage prédites pour les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines. Ces séquences ont été prédites par les logiciels Predotar (Small et al., 2004) et MitoProt (Claros & Vincens, 1996). Les résidus basiques Lysine (K) et Arginine (R), typiques des séquences d'import, sont indiqués en gras. Les acides aminés impliqués dans une structure en hélice α sont soulignés et ceux impliqués dans un feuillet β sont en italique.

2.1. Structures

Les aaRS mitochondriales partagent, de manière théorique, les mêmes oligométries que les aaRS connues, à l'exception de la GlyRS et de la PheRS mitochondriales qui sont respectivement homodimérique (α_2) et monomérique (α) et non hétérotétramériques ($\alpha_2\beta_2$). Bien qu'elle soient toutes plus petites que les aaRS cytosoliques (sauf l'AspRS), elles conservent les motifs caractéristiques qui les définissent comme des synthétases de classe I ou II (Tableau 2).

Alors qu'un très grand nombre de structures cristallographiques d'aaRS sont connues (Giegé et al., 2008), la résolution des structures d'aaRS mt de mammifères et notamment humaines n'en est qu'à ses balbutiements et est un domaine en véritable émergence. Ainsi, très récemment deux structures d'aaRS mt humaines sont venues s'ajouter à celles de la SerRS mt bovine (Chimnaronk et al., 2005) et de la GlyRS (Xie et al., 2006) : il s'agit de la TyrRS (Bonfond et al., 2007) et de la PheRS (Klipcan et al., 2008) (Figure 7).

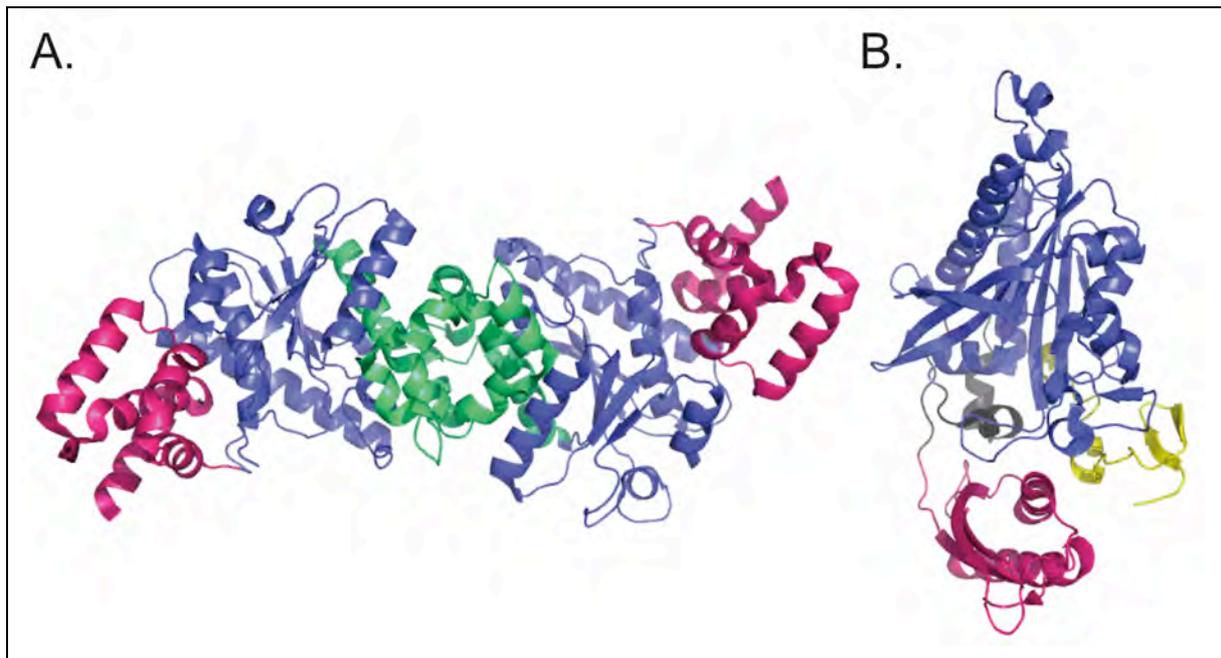


Figure 7. Structures cristallographiques de la TyrRS et de la PheRS mitochondriales humaines. A. Structure de la TyrRS (Bonfond et al., 2007). B. Structure de la PheRS (Klipcan et al., 2008). Les sites catalytiques et les domaines de liaison à l'anticodon des deux aaRS sont colorés en bleu et rose, respectivement. Le domaine CP1 de la TyrRS est en vert, l'extension C-terminale de la PheRS est en jaune et sa région charnière en gris. La figure a été générée en utilisant le programme PyMol (DeLano, 2002).

La structure de la TyrRS est semblable aux TyrRS eubactériennes, présentant un domaine de liaison à la tyrosine canonique et des résidus de liaison à l'adénylate typiques des synthétases de classe I. Cependant son potentiel électrostatique de surface la distingue de toutes les autres TyrRS connues à ce jour. La structure de la PheRS révèle un évènement particulier. Le « docking » de l'ARNt^{Phe} mt dans la structure de l'enzyme (réalisé sur la base de la structure du complexe PheRS/ARNt^{Phe} de *T. thermophilus* (Goldgur et al., 1997)) dévoile que le domaine de liaison à l'anticodon chevauche de façon surprenante la branche acceptrice de l'ARNt^{Phe} et implique un changement conformationnel considérable de la synthétase après liaison à l'ARNt.

2.2. Particularités d'aminacylation

2.2.1. Activités enzymatiques réduites

De façon générale, les activités des synthétases mitochondriales ont été déterminées *in vitro*, sur des protéines recombinantes dépourvues de leur séquence d'adressage mitochondrial. L'activité de la LeuRS recombinante se trouve affaiblie lorsqu'une partie de son signal d'adressage mitochondrial demeure en amont de sa séquence (Yao et al., 2003). Comme il est présenté dans le tableau 4, les synthétases mitochondriales ont montré des efficacités catalytiques faibles (20 à 400 fois plus faibles que leurs homologues cytosoliques ou eubactériennes) avec des affinités réduites pour leurs substrats. Cette observation soulève alors un certain nombre de questionnements. En effet, peut-on généraliser les efficacités catalytiques faibles à l'ensemble des aaRS mt ? Le MTS a-t-il réellement un rôle d'inhibition au sein de l'aminacylation ? La question se pose aussi de savoir si ces activités réduites reflètent une synthèse protéique mitochondriale peu active, due à la nécessité d'une synthèse de seulement 13 protéines, ou si elles constituent un artéfact dû aux expériences réalisées *in vitro* et dans lesquelles il manquerait un ou plusieurs partenaires qui viendraient améliorer l'aminacylation. On comprend alors aisément que l'étude des ces aaRS n'en est qu'à ses débuts, et que beaucoup d'interrogations restent pour le moment en suspens.

Enzyme	Substrat	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1} \cdot \mu M^{-1}$)	Références
IleRS	ARNt ^{Ile} natif	0,127	392 #	3087 #	(Degoul et al., 1998)
	transcrit ^{Ile}	2,92	187 #	187 #	(Degoul et al., 1998)
	transcrit ^{Ile}	4,3	0,13	0,03	(Kelley et al., 2000)
LeuRS	ARNt total <i>E. coli</i>	14	0,12	0,008	(Bullard et al., 2000)
	ARNt ^{Leu} natif			0,055	(Sohm et al., 2003)
	transcrit ^{Leu}			0,003	(Sohm et al., 2003)
	transcrit ^{Leu}	17,9	0,024	0,001	(Sohm et al., 2003)
	transcrit ^{Leu(UUR)}	2,3	0,02	0,009	(Wittenhagen & Kelley, 2003)
MetRS <i>B. taurus</i>	ARNt ^{Met} <i>E. coli</i> natif	2,1	11	5,2	(Spencer et al., 2004)
	ARNt ^{Met} <i>B. taurus</i> natif	0,15	0,019	0,13	(Spencer et al., 2004)
	transcrit ^{Met} <i>B. taurus</i>	0,079	0,018	0,23	(Spencer et al., 2004)
	transcrit ^{Met} <i>H. sapiens</i>	0,16	0,021	0,13	(Spencer et al., 2004)
TyrRS	ARNt total <i>E. coli</i>	0,52	0,21	0,4	(Bonnefond et al., 2005a)
	transcrit ^{Tyr}	4,8	0,046	0,01	(Bonnefond et al., 2005a)
SerRS	ARNt ^{Ser(GCU)}	0,37	0,35	0,95	(Yokogawa et al., 2000)
	ARNt ^{Ser(UGA)}	0,22	0,63	2,86	(Yokogawa et al., 2000)
	ARNt ^{Ser(UGA)}	0,29	0,67	2,31	(Shimada et al., 2001)
	Transcrit ^{Ser(UGA)}	1,2	0,25	0,21	(Shimada et al., 2001)
LysRS	ARNt ^{Lys} natif	0,71	0,003 *		(Yasukawa et al., 2001)
AspRS	ARNt total <i>E. coli</i>	0,15	0,133	0,89	(Bonnefond et al., 2005a)
	transcrit ^{Asp}	0,13	0,01	0,08	(Bonnefond et al., 2005a)
	transcrit ^{Asp} (15°C)	0,19	0,005	0,03	(Fender et al., 2006)
PheRS	ARNt total <i>E. coli</i>	18	0,11	0,006	(Bullard et al., 1999)

Tableau 4. Paramètres cinétiques de l'aminocyclation des aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines. # k_{cat} et k_{cat}/K_M remplacé par V_{max} (en $pmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$) et V_{max}/K_M (en $pmol/min^{-1} \cdot mg^{-1} \cdot \mu M^{-1}$). * k_{cat} remplacé par V_{max} (en $\mu M \cdot s^{-1}$). Ce tableau est extrait du manuscrit de thèse de Luc Bonnefond (Thèse soutenue en 2007).

2.2.2. Large spectre de substrats

Une autre particularité des aaRS mitochondriales est leur large spectre d'action. Ainsi, en plus d'aminocycler les ARNt mt humains, les aaRS mitochondriales sont capables d'aminocycler les ARNt cytosoliques et eubactériens homologues (Kumazawa et al., 1991). Ceci est d'autant plus surprenant que pour le moment, aucune étude n'a encore montré qu'une synthétase cytosolique ou eubactérienne étudiée n'était capable de reconnaître les ARNt mitochondriaux (Buck & Nass, 1969; Lynch & Attardi, 1976; Kumazawa et al., 1991). Cette unilatéralité d'aminocyclation reflète la singularité des ARNt mitochondriaux qui sont uniquement reconnus par les aaRS mitochondriales.

2.2.3. Jeu d'éléments d'identité simplifié

Les études récentes des aaRS mt humaines ont dévoilé que celles-ci reconnaissent un jeu simplifié d'éléments d'identité au sein de leurs ARNt homologues. Par exemple, il a été montré que la TyrRS mt humaine ne reconnaît plus comme élément d'identité la première

paire de bases N1-N72, élément pourtant d'identité classique de l'ARNt^{Tyr} (Bonfond et al., 2005b). En effet, la TyrRS mt humaine peut aussi bien reconnaître la paire de bases G1-C72 typique des ARNt^{Tyr} eubactériens et mitochondriaux que la paire de bases réverse C1-G72 présente dans les ARNt^{Tyr} eucaryotes et d'archéobactéries. Ensuite, alors que pour tous les systèmes d'aminacylation aspartate étudiés à ce jour, la base discriminatrice G73 de l'ARNt^{Asp} constitue un déterminant majeur, cette base ne se retrouve plus impliquée dans l'identité de l'ARNt^{Asp} mt humain. L'AspRS mt s'est adaptée à la dégénérescence de l'ARNt^{Asp} mt et cette perte d'identité a été compensée, au sein du site catalytique de l'AspRS mt humaine, par une mutation d'un acide aminé essentiel impliqué dans la reconnaissance la base discriminatrice. Enfin, l'AlaRS mt humaine, pour sa part, ne reconnaît pas les positions d'identité de l'ARNt^{Ala} caractérisées dans les autres organismes, à savoir la paire de base G3-U70 et la base discriminatrice 73, mais mettrait à profit son extrémité C-terminale étendue pour créer un second jeu de contact avec l'ARNt (Dickey et al., 2006). L'identité des autres systèmes d'aminacylation mt humains demeure jusqu'à présent inexplorée et reste à étudier.

La révélation de jeux d'identité simplifiés soulève un problème fondamental concernant la fidélité et la qualité de la synthèse protéique au sein des mitochondries. Ils pourraient en effet induire des aminacylations incorrectes d'ARNt (phénomènes de mischarging), à l'image de la SerRS mt de mammifère qui aminocyle de manière incorrecte l'ARNt^{Gln} mt (Nagao et al., 2007). Ces auteurs ont considéré cette éventualité et ont montré alors que le facteur d'élongation EF-Tu mt a une affinité plus faible pour Ser-ARNt^{Gln} que pour Ser-ARNt^{Ser} et Glu-ARNt^{Gln}, proposant alors que ce facteur aurait un rôle critique dans le maintien de la fidélité de la traduction en contrôlant la qualité des aa-ARNt.

C. L'import de protéines mitochondriales, un processus nécessaire à l'activité mitochondriale

Parmi les 37 gènes contenus dans le génome mitochondrial humain, seuls 13 codent pour des protéines, toutes composantes de la chaîne respiratoire. Les autres sous unités de cette chaîne (environ 70 protéines) ainsi que les autres protéines mitochondriales (estimées à 1500) (revue par *e.g.* (Taylor et al., 2003)), y compris les aaRS mitochondriales, sont importées du cytosol (Figure 6). Il apparaît alors qu'une mitochondrie fonctionnelle requiert un système d'import efficace (revue par *e.g.* (MacKenzie & Payne, 2007)) et l'importance de ce processus ainsi que la nécessité sa compréhension justifient les connaissances accumulées à son sujet (revues par *e.g.* (Pfanner & Geissler, 2001; Wiedemann et al., 2004; Neupert & Herrmann, 2007; Bolender et al., 2008)).

Le mécanisme d'import est décrit pour une large gamme de protéines mt et bien qu'il soit déjà bien étudié pour les aaRS mt de plantes (Duchêne et al., 2001; Duchêne et al., 2005; Pujol et al., 2007; Rokov-Plavec et al., 2008) et de levure (Tarassov et al., 1995a; Rinehart et al., 2005), seules les séquences d'adressage théoriques des aaRS mt humaines ont été prédites (tableau 3), mais leur mécanisme d'import demeure encore inexploré. Se pose alors la question de la réalité biologique de leurs séquences d'adressage ainsi que la nature de leur mécanisme d'import qui pourrait donner des indices quant à la localisation sub-mitochondriale des aaRS mt humaines. L'exploration de ces problématiques nécessite une connaissance fondamentale des différents systèmes d'import décrits dans les paragraphes qui vont suivre et présentés dans la figure 8.

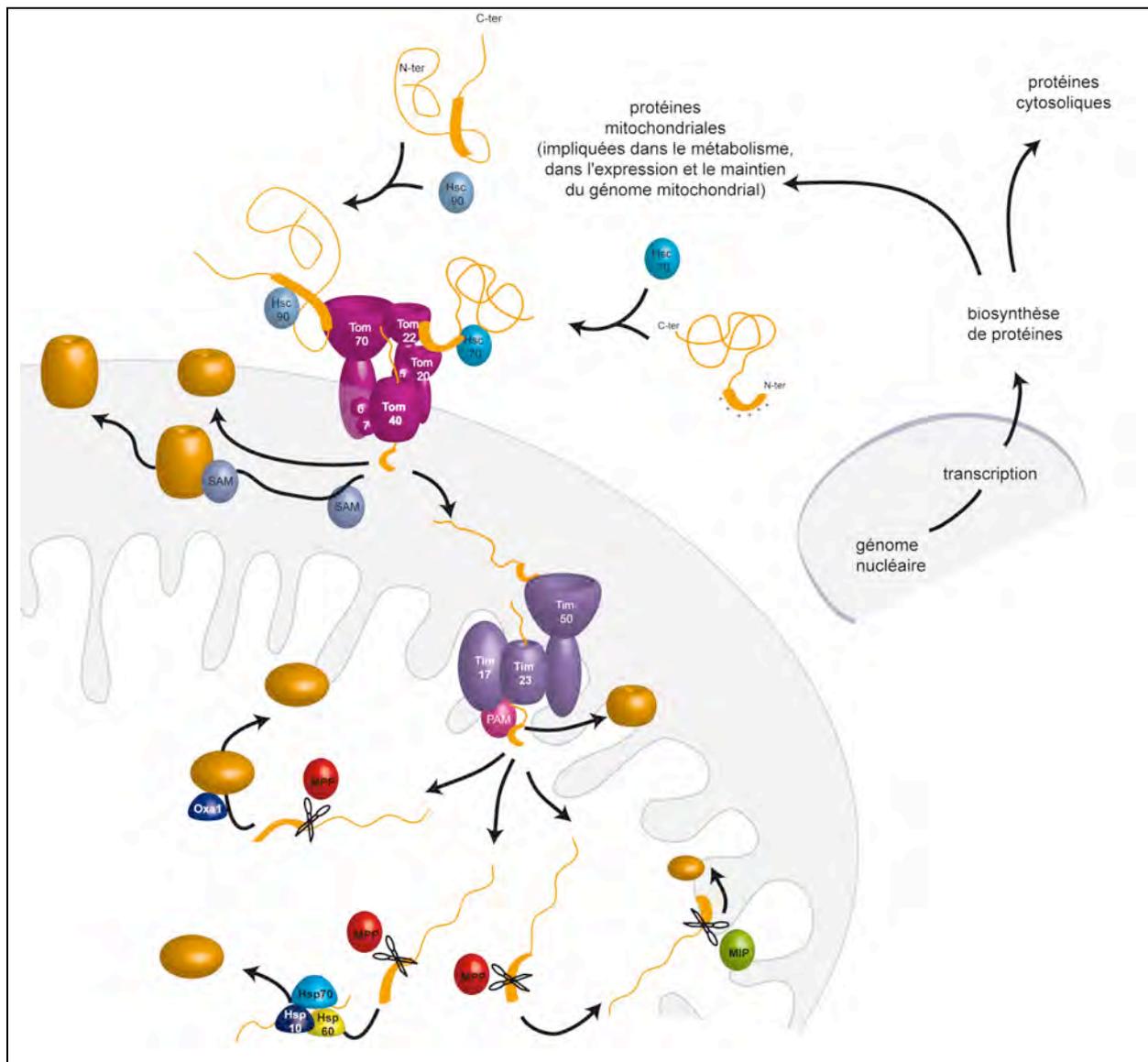
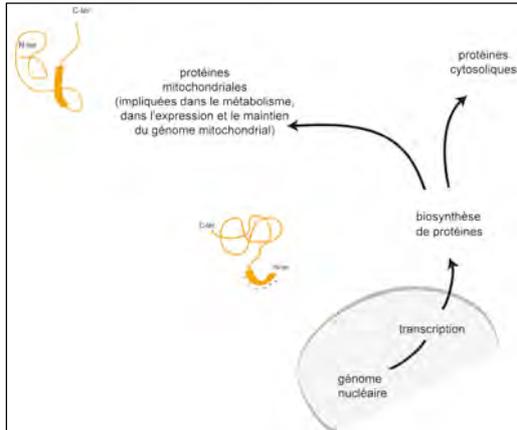


Figure 8. Description des différentes voies d'import des protéines mitochondriales. Différentes voies d'import existent selon la localisation sub-mitochondriale finale de la protéine. Ces voies d'import sont conservées au sein du règne animal (Wiedemann et al., 2004).

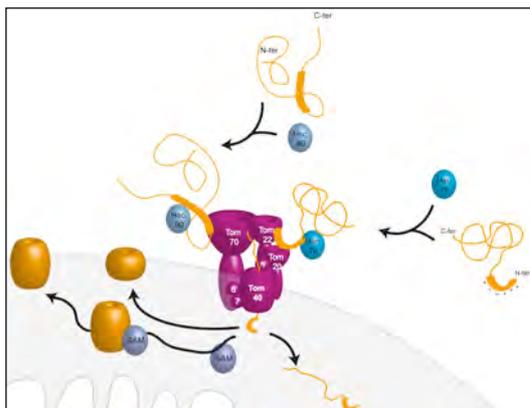
1. Signal d'adressage mitochondrial



Dans le cytosol, les protéines destinées à la mitochondrie sont synthétisées sous la forme de pré-protéines qui possèdent une séquence d'adressage mitochondrial. Celle-ci se définit comme une séquence peptidique à la fois nécessaire et suffisante pour guider la protéine vers la mitochondrie. La majorité des protéines mitochondriales destinées à la matrice

mitochondriale, à l'espace inter-membranaire ainsi qu'à la membrane interne, sont initialement synthétisées sous la forme de protéines précurseurs exhibant une extension N-terminale qui sera clivée après import dans la mitochondrie (Neupert, 1997). Ces extensions consistent habituellement en une vingtaine à une cinquantaine d'acides aminés, et bien qu'il n'y ait aucune identité de séquence partagée entre elles, elles forment toutes des hélices α amphiphiles, enrichies en résidus basiques, hydroxyles et hydrophobes. En revanche, la plupart des protéines mitochondriales localisées au niveau de la membrane externe et les protéines de transport de la membrane interne présentent un signal en N- ou C-terminal ou un signal interne qui, lui, ne sera pas clivé (Rapaport, 2003).

2. Passage à travers la membrane externe



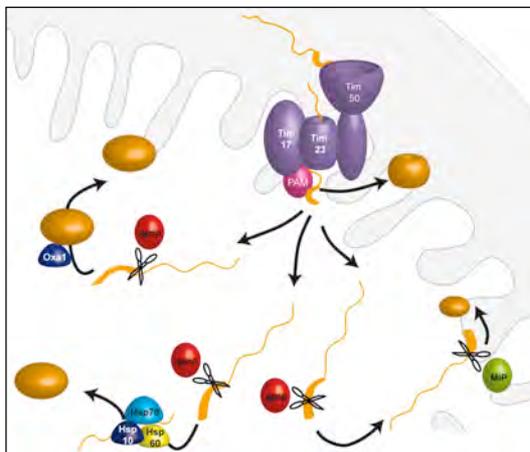
Dans le cytosol, les pré-protéines sont maintenues dans une conformation dépliée grâce à des protéines chaperonnes, ce qui leur permet de traverser les pores membranaires (Beddoe & Lithgow, 2002). La nature du signal d'adressage et la nature des protéines chaperonnes va déterminer la nature du récepteur du complexe de translocation de la membrane externe (TOM pour

« Translocator Outer Membrane ») avec lequel elles vont interagir. Le complexe TOM est constitué de 7 sous-unités différentes qui sont regroupées en 3 catégories : (i) les récepteurs Tom 20, Tom 22 et Tom 70, (ii) le tunnel du complexe TOM constitué par Tom 40 et (iii)

trois protéines de petite taille Tom 5, Tom 6 et Tom 7 (Dietmeier et al., 1997; Hill et al., 1998; Van Wilpe et al., 1999). Les protéines dotées d'un signal N-terminal interagissent avec les protéines chaperonnes Hsc70 et sont reconnues par le complexe Tom20/22. Avec l'aide de Tom 5, elles traversent le pore Tom 40 (Dietmeier et al., 1997). Les protéines comportant un signal interne (qui ne sera pas clivé) sont reconnues par les protéines chaperonnes Hsp90 qui les amènent au récepteur Tom70 (Young et al., 2003). Elles traversent également Tom 40 et y sont amenées à la fois par Tom 5 et les récepteurs Tom 20 et Tom 22.

Le passage à travers la membrane externe ne constitue que la première étape d'import pour la majorité des protéines mitochondriales. Cependant pour celles localisées au sein de la membrane externe et qui présentent une topologie simple (comme un seul segment transmembranaire), seul le passage à travers le complexe TOM est requis. Les autres protéines de la membrane externe de topologie plus complexe (comme Tom 40 qui présente de multiples brins β) traversent le complexe TOM et sont prises en charge, dans l'espace inter-membranaire, par le complexe SAM (pour « Sorting and Assembly Machinery ») qui va ensuite permettre leur insertion dans la membrane externe.

3. Passage à travers la membrane interne et maturation dans la matrice



Le complexe de translocation de la membrane interne (TIM pour « Translocator Inner Membrane ») consiste en l'assemblage de trois protéines membranaires : (i) le récepteur Tim 50 qui expose un large domaine à l'espace inter-membranaire, (ii) Tim 23 qui constitue le pore du complexe TIM et (iii) Tim 17 qui est très étroitement associé à Tim 23 et qui, bien que son rôle exact soit encore inconnu, est supposé réguler

l'activité de Tim 23 (revue par *e.g.* (Bolender et al., 2008)). Le passage des pré-protéines à travers Tim 23 dépend directement du potentiel de membrane qui existe à travers la membrane interne. En effet, ce dernier, en plus d'activer le pore Tim 23, exerce un effet électrophorétique sur les pré-séquences chargées positivement et par ce fait tire la pré-séquence du côté de la matrice.

C'est à cette étape-là que l'import de certaines protéines de la membrane interne s'arrête. En effet celles-ci possèdent un signal hydrophobe qui suit directement la pré-séquence et qui les bloque dans la membrane interne. Elles sont ensuite libérées dans la membrane interne. Cependant, une autre partie des protéines de la membrane interne ainsi que les protéines de la matrice sont happées et tirées dans la matrice par un complexe protéique moteur ATP dépendant, le complexe PAM (pour « Presequence translocase-Associated Motor »).

Une fois dans la matrice et selon la nature de leur pré-séquence, les précurseurs des autres protéines de la membrane interne peuvent subir deux clivages différents avant d'être exportées vers la membrane interne grâce à la protéine Oxa1. Soit leur pré-séquence est clivée en une étape par une métallopeptidase, la MPP (pour « Mitochondrial Processing Peptidase ») (Luciano & Géli, 1996) (revue par *e.g.* (Gakh et al., 2002)) ou alors elle est constituée d'un signal bi-partite qui est clivé successivement par MPP puis par une peptidase mitochondriale intermédiaire, MIP (pour « Mitochondrial Intermediate Peptidase ») (Isaya et al., 1991).

La pré-séquence des protéines de la matrice est clivée par MPP et la protéine mature est ensuite prise en charge par les protéines chaperonnes mt Hsp 70, Hsp 60 et Hsp 10 pour adopter sa conformation tridimensionnelle finale et être fonctionnellement active (Bukau & Horwich, 1998).

D. Les ARNt et les aminoacyl-ARNt synthétases, *auxiliaires de nouvelles fonctions*

Il aurait été bien plus simple mais très certainement bien plus monotone si tous les ARN et les protéines se trouvaient figés à une seule et même fonction. Au lieu de cela, au cours de l'évolution, ces macromolécules ont acquis d'autres activités en plus de leur fonction principale. La nécessité de cette démultiplication de fonctions est soutenue par un constat récent. En effet, le séquençage du génome humain (Consortium, 2001; Venter, 2001) accompagné d'avancées technologiques récentes requises pour l'annotation des gènes a abouti à une conclusion bien surprenante : le nombre de gènes ne correspond pas au besoin protéique cellulaire. Ainsi, chez l'humain, le nombre supposé de gènes a été fréquemment revu à la baisse avec comme point de départ une prédiction d'au moins 100 000 gènes pour arriver maintenant à un nombre avoisinant les 20 000 à 25 000 séquences codantes (Consortium., 2004). Or ce nombre est nettement en dessous du nombre de protéines requises pour les besoins vitaux d'une cellule (environ 150 000 protéines). Au cours de l'évolution, les macromolécules ont alors développé de nouvelles fonctions pour pallier le nombre insuffisant de protéines et les fonctions alternatives des aaRS montrent qu'elles ne dérogent pas à cette règle. Les ARNt, en plus d'être prioritairement responsables du transfert des acides aminés au sein de la chaîne polypeptidique en formation, remplissent eux-aussi d'autres fonctions et enrichissent également la diversité fonctionnelle des molécules impliquées dans la traduction. Enfin, les fonctions des « pseudo-ARNt », variants naturels de la structure tridimensionnelle des ARNt canoniques, viennent s'ajouter à celles des ARNt. Des exemples de fonctions alternatives des ARNt et des aaRS sont rappelées ci-dessous.

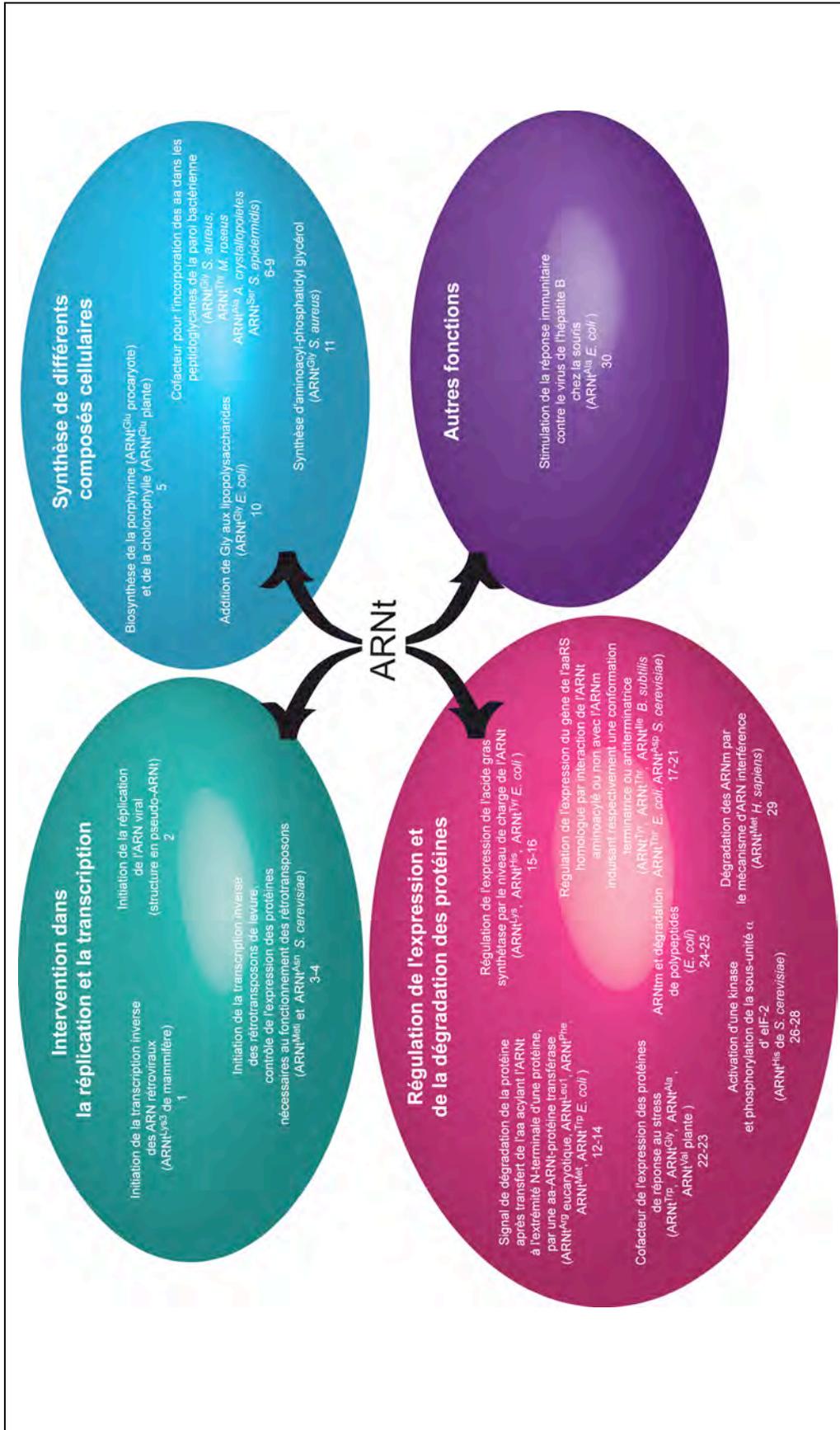


Figure 9. Fonctions non canoniques des ARNt et des structures en pseudo-ARNt. Les chiffres font référence aux publications suivantes : 1 (Marquet et al., 1995), 2 (Dreher, 1999), 3 (Voytas & Boeke, 1993), 4 (Keeney et al., 1995), 5 (Schön et al., 1986), 6 (Kamiryo & Matsushashi, 1969), 7 (Rohrer & Berger-Bächi, 2003), 8 (Roberts, 1974), 9 (Roberts et al., 1968a), 9 (Roberts et al., 1968b), 10 (Gamian et al., 1991), 11 (Gould et al., 1968), 12 (Jenmissen, 1995), 13 (Abramochkin & Shradar, 1995), 14 (Varshavsky, 1992), 15 (Nesbitt & Lennarz, 1968), 16 (Dudek & Semenkovich, 1995), 17 (Grundy et al., 1994), 18 (Grundy et al., 1997), 19 (Putzer et al., 1995b), 20 (Springer et al., 1986), 21 (Frugier & Giegé, 2003), 22 (Frugier & Giegé, 1995), 23 (Brigotti et al., 1998), 24 (Keiler et al., 1996), 25 (Gaudin et al., 2003), 26 (Wek et al., 1989), 27 (Zhu et al., 1996), 28 (Zhu & Wek, 1998), 29 (Maniataki & Mourelatos, 2005), 30 (Wang et al., 2006).

1. Structures et fonctions non canoniques des ARNt

Les ARNt sont des molécules ubiquitaires qui participent, non seulement, à l'efficacité de la synthèse protéique mais aussi à d'autres processus cellulaires très variés présentés dans la figure 9 (revue par *e.g.* (Söll, 1993)).

1.1. ARNtm et dégradation de polypeptides

Il existe chez *E. coli* un ARN transfert-messenger (ARNtm) qui, comme son nom l'indique, joue le rôle à la fois d'un ARNt et d'un ARNm. Il intervient dans la dégradation de protéines synthétisées à partir d'un ARNm tronqué, dépourvu de codon stop (Keiler et al., 1996). Pour ce faire, la structure de l'ARNtm mime celle de la branche acceptrice de l'ARNt^{Ala} qui sera aminoacylée par l'AlaRS (Gaudin et al., 2003) et d'un ARNm codant pour un peptide de 10 acides aminés, qui accroché à l'extrémité C-terminale du polypeptide en cours de synthèse, servira de signal de dégradation pour différentes protéases.

1.2. Pseudo-ARNt et régulation de l'expression de gènes de synthétases

Des structures de type « pseudo-ARNt » se trouvent au sein de régions régulatrices d'ARNm codant par exemple pour la ThrRS d'*E. coli* (Springer et al., 1986; Graffe et al., 1992; Torres-Larios et al., 2002; Romby & Springer, 2003), la MetRS (Dardel et al., 1990), ou encore l'AspRS de *S. cerevisiae* (Frugier & Giegé, 2003). De manière générale, la région 5' non traduite du messenger forme une tige boucle dont la structure mime celle de la branche anticodon de l'ARNt correspondant. En absence d'ARNt libre, l'aaRS homologue va se fixer sur cette structure, empêcher la fixation du ribosome sur l'ARNm et inhiber ainsi la traduction.

Chez *Bacillus subtilis* et d'autres eubactéries gram positives, les ARNt peuvent être impliqués dans un autre phénomène de régulation d'expression de gènes. En effet, il existe un mécanisme d'antiterminaison qui régule l'expression de la plupart des aaRS (16 au total) ainsi que d'autres enzymes impliquées dans la synthèse d'acide aminé (Putzer et al., 1995a). L'ARNm de ces gènes comporte une région régulatrice, longue d'environ 300 nt, qui présente une série de structures en tige boucle suivie d'une séquence conservée, appelée « T-box » qui elle-même se trouve en amont d'une dernière structure en tige boucle terminatrice. À l'état libre, cette structure stoppe la traduction du gène en bloquant la progression du ribosome. En

cas de carence en acide aminé, l'ARNt est alors libre (non aminoacylé) et peut interagir *via* son extrémité CCA-3' non chargée avec la « T-box » de la zone régulatrice. Cette interaction est renforcée par une deuxième interaction entre l'anticodon de l'ARNt et un codon spécifique de l'ARNm. Cette région régulatrice adopte alors une conformation alternative antiterminatrice, le ribosome peut progresser et la traduction de la protéine est poursuivie.

1.3. Pseudo-ARNt et ARNt dans l'initiation de la réplication d'ARN de virus, de rétrovirus et de rétro-transposons à LTR (« Long Terminal Repeat »)

Dans certains génomes de virus de plante, une structure en forme de « pseudo-ARNt » est présente à leur extrémité 3' (revue par *e.g.* (Fechter et al., 2001)). Ces structures sont aminoacylables par différentes aaRS (HisRS, ValRS, TyrRS) avec des constantes cinétiques proches de celles obtenues avec les ARNt classiques. Elles interviennent dans l'initiation de la réplication de l'ARN viral (Dreher, 1999) et dans le cas du virus de la mosaïque jaune du navet, ces structures sont impliquées dans l'initiation interne de la traduction de la polyprotéine virale (Barends et al., 2003).

Certains rétrovirus et rétro-transposons à LTR (« Long Terminal Repeat ») détournent l'ARNt de la machinerie traductionnelle en l'utilisant comme amorce lors de la rétro-transcription pendant leurs cycles de réplication. Cette action fait intervenir la complémentarité de séquence entre l'extrémité 3' de l'ARNt et un site dit PBS (« Primer Binding Site ») dans la partie 5' du génome viral (Marquet et al., 1995). Ce phénomène implique l'ARNt^{Lys3} pour le virus VIH (« Virus de l'Immunodéficience Humaine »), l'ARNt^{Pro} pour le virus de Moloney, l'ARNt^{Tp} pour le virus de la leucose aviaire. Dans le cas des rétrotransposons Ty1 et Ty2 de *S. cerevisiae* il s'agit de l'ARNt^{iMet}.

1.4. Implications dans des voies métaboliques

Les ARNt sont également impliqués dans des voies métaboliques. Ainsi l'ARNt^{Glu} est aminoacylé avant d'être réduit par la glutaminyl-ARNt réductase. Ceci constitue la première étape de synthèse de tétrapyrrole chez la plupart des eubactéries, archéobactéries et chloroplastes et intervient dans les voies de synthèse à l'origine de la formation de l'hème et de la chlorophylle (Schön et al., 1986). L'ARNt^{Gly}, quant à lui, participe au mécanisme de synthèse du peptidoglycane de la paroi eubactérienne de *Staphylococcus aureus* (Kamiryo & Matsubashi, 1969; Rohrer & Berger-Bächi, 2003).

1.5. Vers de nouvelles fonctions pour les ARNt ?

Très récemment, l'ARNt^{Met} mt humain a été détecté dans le cytosol, en association avec une des protéines du complexe ribonucléoprotéique RISC (« RNA Inducing Silencing Complex »), suggérant un rôle potentiel de l'ARNt dans la voie de dégradation des ARNm par ARN interférence (Maniataki & Mourelatos, 2005).

Notons que cette liste n'est pas exhaustive. La découverte de Maniataki et Mourelatos qui est venue l'enrichir encore récemment laisse présager qu'elle se trouvera étendue à d'autres fonctions dans les années à venir et rehausse l'importance de l'étude des ARNt.

2. Fonctions alternatives des aminoacyl-ARNt synthétases

Les aaRS constituent une famille d'enzymes dont la participation dans la biosynthèse des protéines a été clairement établie et analysée à la fois sous ses aspects structuraux et fonctionnels. Cependant, au cours de ces dix dernières années, cet aspect fonctionnel s'est trouvé largement étendu à de nouvelles activités qui peuvent être proches ou alors complètement différentes de la réaction d'amination classique (revues par *e.g.* (Martinis et al., 1999; Francklyn et al., 2002; Ibba et al., 2005; Park et al., 2005; Park et al., 2008)). La figure 10 ne représente que les fonctions alternatives des aaRS de mammifères mais permet de mettre en avant le nombre important de fonctions non canoniques attribuées aux aaRS des organismes eucaryotes et procaryotes. Nous en décrivons quelques exemples ci-dessous. Ce domaine de recherche étant en pleine expansion, de nombreuses nouvelles fonctions viendront très certainement s'y ajouter dans les années à venir.

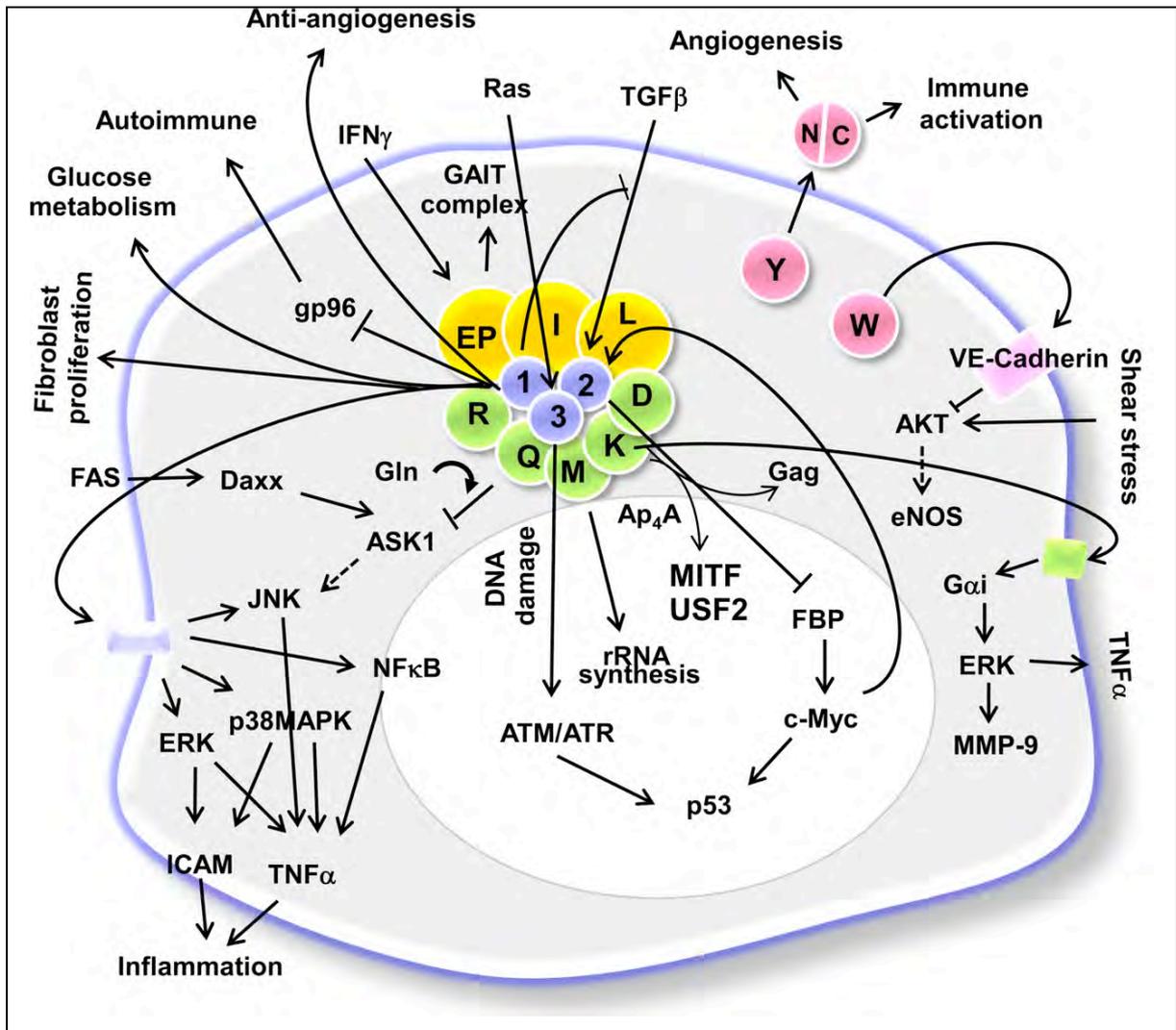


Figure 10. Réseau de signalisation médié par les aminoacyl-ARNt synthétases de mammifères. Figure (en anglais) extraite de (Park et al., 2008). La GluProRS (EP), l'IleRS (I) et la LeuRS (L) sont entourées en jaune, l'ArgRS (R), la GlnRS (Q), la MetRS (M), la LysRS (K) et l'AspRS (D) sont entourées en vert. Les protéines 1, 2 et 3 entourées en bleu correspondent aux facteurs non-enzymatiques p43, p38 et p18. L'ensemble de ces protéines forme un complexe détaillé dans § D.4. La TyrRS (Y) et la TrpRS (W) sont entourées en rose.

2.1. Contrôle de la qualité des ARNt au sein du noyau

Chez les eucaryotes, les ARNt sont synthétisés dans le noyau et pris en charge par l'exportine T avant d'être exportés dans le cytosol *via* un mécanisme Ran-GTPase dépendant. Cependant, avant d'être libérés dans le cytosol où ils vont participer activement à la biosynthèse des protéines, il est nécessaire que leur intégrité soit vérifiée. Il a été dévoilé que des ARNt aminoacylés sont présents dans le noyau (Lund & Dahlberg, 1998) et ceci a été complété par la découverte de l'import des aaRS dans le noyau (Arts et al., 1998; Lund & Dahlberg, 1998; Nathanson & Deutscher, 2000), évoquant la nécessité d'une localisation

nucléaire des aaRS afin de contrôler la qualité des ARNt et valider l'export de ces derniers dans le cytosol.

2.2. Epissage catalytique des introns de groupe I

Les LeuRS mt de *S. cerevisiae* et *S. douglasii* ainsi que les TyrRS mt de *Neurospora crassa* et de *Podospira anserina* sont impliquées dans l'épissage catalytique des introns de groupe I en les aidant à adopter leur conformation active (Herbert et al., 1988; Labouesse, 1990). Dans le cas des LeuRS, l'épissage est réalisé grâce à leur extrémité C-terminale. Il a été proposé, par comparaison avec la LeuRS de *T. thermophilus* (dont l'extrémité C-terminale est impliquée dans la reconnaissance de l'ARNt), que cette extrémité C-terminale serait un domaine général de fixation à l'ARN qui, dans le cas de la LeuRS mt, serait responsable de la fixation de l'intron (Hsu et al., 2006). La résolution de la structure cristallographique d'une version tronquée en C-terminal de la TyrRS mt de *N. crassa* complexée à un intron de groupe I, révèle que le mode d'interaction de la TyrRS avec cet ARN diffère complètement de celui avec l'ARNt (Paukstelis et al., 2005, 2007).

2.3. Régulation de l'expression de gènes

Différentes aaRS participent également à des phénomènes de régulation de l'expression de leur propre gène comme il a été montré initialement pour la ThrRS d'*E. coli* (Romby et al., 1996; Caillet et al., 2003) et présenté dans le § **D.1.2**. En absence d'ARNt^{Thr}, la ThrRS interagit avec l'opérateur de son propre ARNm dont le repliement et la structure miment deux branches anticodon de l'ARNt^{Thr}, et bloque ainsi l'accessibilité au ribosome. Une interaction de la GlnRS humaine avec la région 3' de son ARNm a aussi été mise en évidence (Schray & Knippers, 1991). Enfin, il a également été proposé que le surplus d'AspRS de levure est importé dans le noyau pour interagir avec son propre messenger et ainsi inhiber sa transcription (Frugier & Giegé, 2003). Ceci suggère que ce mécanisme d'autorégulation de l'expression des aaRS par association avec l'ARNm pourrait être plus général.

Ces événements de régulation ne sont pas limités à la traduction mais s'étendent également à la transcription. Ainsi, l'AlaRS d'*E. coli* se lie à la séquence palindromique présente dans le promoteur de transcription de son propre gène et réprime sa transcription *in vitro* (Putney & Schimmel, 1981).

2.4. Liaison à l'ADN

La liaison d'une synthétase à l'ADN a été montrée pour la PheRS de *T. thermophilus* (Lechler & Kreutzer, 1998). En effet, cette aaRS présente en surface un motif hélice-boucle-hélice qui lui permet d'interagir spécifiquement avec deux régions codantes de son génome se trouvant en amont du gène codant pour la PheRS. Cependant l'hypothèse de régulation de l'expression de son propre gène a été écartée et le rôle lié à sa liaison à l'ADN demeure inconnu.

2.5. Activité cytokine et angiogénèse

Certaines aaRS possèdent une activité cytokine et vont intervenir dans l'angiogénèse, mécanisme de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant. Alors qu'un clivage protéolytique ou un épissage alternatif génère des délétions de la partie N-terminale de la TrpRS cytosolique humaine et lui permettent d'inhiber l'angiogénèse (Otani et al., 2002; Wakasugi et al., 2005), le clivage de la TyrRS cyt humaine libère deux protéines qui toutes deux la stimulent (Wakasugi & Schimmel, 1999; Wakasugi et al., 2002a). Il s'agit d'une part, de la CTyrRS (partie C-terminale de la TyrRS) qui comporte un domaine cytokine (homologue au motif EMAP II) et d'autre part du domaine N-terminal de la TyrRS, correspondant au domaine catalytique.

Récemment, l'implication de la LysRS dans l'induction de la réponse immunitaire *via* l'activation de monocytes et macrophages a également été montrée (revue par *e.g.* (Park et al., 2008)). Après être sécrétée des cellules suite à l'induction par la cytokine TNF- α (« Tumor Necrosis Factor »), la LysRS se lie aux monocytes et macrophages afin d'augmenter leur migration et la production de TNF- α .

Howard et coll. ont testé la capacité de diverses aaRS humaines à induire la migration leucocytaire et ont démontré que l'HisRS, l'AsnRS et la SerRS sont impliquées dans la migration des lymphocytes, des neutrophiles et des monocytes (Howard et al., 2002).

2.6. Incorporation de l'ARNt^{Lys} et de la LysRS dans le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Lors de l'assemblage du VIH, l'ARNt^{Lys3} de l'hôte est empaqueté avec sa synthétase homologue, la LysRS, dans les virions (Cen et al., 2001). L'incorporation de la synthétase se fait par l'interaction avec la protéine virale GAG. Ce complexe binaire facilite ensuite l'incorporation de l'ARNt^{Lys} grâce à l'interaction, non productive, entre l'ARNt et la LysRS (Cen et al., 2004).

2.7. Implication dans le cancer du poumon

En examinant l'expression différentielle des gènes entre une lignée cellulaire du cancer du poumon et une lignée cellulaire épithéliale pulmonaire normale afin d'identifier les biomarqueurs du cancer du poumon, une sur-expression de la LeuRS cytosolique a été observée (Shin et al., 2008). Des expériences de « knock-down » de la LeuRS dans des cellules cancéreuses ont ensuite montré une diminution de la capacité de migration de la tumeur à travers les membranes et une tendance à former des colonies sur boîtes de culture. La LeuRS jouerait ainsi un rôle dans la migration et la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires évoquant alors son implication potentielle dans la biogenèse des tumeurs pulmonaires.

3. Paralogues des aminoacyl-ARNt synthétases et leurs fonctions

En plus des fonctions additionnelles attribuées aux aaRS décrites précédemment, le monde des aaRS se trouve encore élargi à une autre famille de protéines. En effet, certaines protéines ont été identifiées comme étant parentes aux aaRS grâce à la présence d'une homologie ou d'une identité de séquence avec les aaRS. Ces protéines paralogues sont le fruit d'une duplication des gènes codant pour les aaRS. Certaines de leurs fonctions sont détaillées dans le paragraphe suivant (revue par *e.g.* (Francklyn, 2005)).

3.1. Biogenèse d'acides aminés

La biogenèse de certains acides aminés implique des protéines qui possèdent des empreintes d'aaRS. Il s'agit notamment de l'AsnA d'*E.coli* et d'archéobactéries ainsi que de l'HisZ de *Lactococcus lactis* qui sont très semblables au cœur catalytique de l'AspRS de levure et de l'AsnRS eubactérienne (Nakatsu et al., 1998; Roy et al., 2003) ou de l'HisRS (Sissler et al., 1999), respectivement. Ainsi, l'acide aminé aspartique est activé par AsnA et va subir une transamidation pour produire l'acide aminé asparagine et l'HisZ intervient lors de la première étape de biosynthèse de l'histidine. Bien que ces deux protéines adoptent des structures très proches des domaines catalytiques de synthétases, aucune activité d'aminoacylation n'a été détectée.

3.2. Stimulation de l'ADN polymérase

La sous-unité γ de l'ADN polymérase mitochondriale de *Xenopus laevis* est une sous-unité accessoire qui augmente la processivité de l'enzyme dans certaines conditions physiologiques et qui intervient dans les mécanisme de réparation de l'ADN. Elle présente une homologie structurale avec le site catalytique de la GlyRS et a été caractérisée comme étant un paralogue de cette aaRS (Carrodeguas et al., 1999).

3.3. Modification d'ARNt

Il a été montré que chez *E. coli*, l'ARNt^{Asp} peut être aminoacylé en position 34 de la boucle anticodon en plus de l'aminoacylation classique. Ainsi, la protéine YadB, renommée glutamyl-Q ARNt^{Asp} synthétase d'après sa fonction, est responsable de la modification de l'ARNt^{Asp} par l'ajout d'un résidu Gln en position 34 de la boucle anticodon. Cette protéine est fortement similaire au cœur catalytique de la GluRS, mais ne présente pas le domaine de liaison à l'anticodon (Blaise et al., 2004; Dubois et al., 2004; Salazar et al., 2004).

4. Partenaires des aminoacyl-ARNt synthétases

Afin d'étendre leurs fonctions, les protéines établissent des partenariats entre elles à l'image des 232 complexes protéiques révélés chez la levure par une étude bioinformatique. Cette étude a amené Gavin et coll. à proposer des fonctions nouvelles pour pas moins de 344 protéines (Gavin et al., 2002). Une fois encore, les aaRS ne sont pas en reste et chez les mammifères, la levure, les eubactéries ou encore chez les archae, certaines d'entre elles sont retrouvées au sein de complexes multi-enzymatiques.

Deux complexes stables ont été trouvés chez un grand nombre de mammifères. Il s'agit du complexe « VEGA » qui associe la ValRS au facteur de traduction EF-1H (Motorin et al., 1991) et du complexe multi-synthétasique « MARS » qui regroupe à la fois des aaRS de classe I et II (IleRS, LeuRS, GlnRS, ArgRS, LysRS, AspRS et l'enzyme bipartite GluProRS) ainsi que les trois co-facteurs non-enzymatiques p18, p38 et p43 (Mirande et al., 1985; Cerini et al., 1991; Quevillon et al., 1999; Park et al., 2005)). Le complexe ValRS/EF-1H est constitué de deux ValRS associées à la forme lourde du facteur de traduction EF-1, lui-même composé de quatre sous-unités (EF-1 α , EF-1 β , EF-1 γ et EF-1 δ). Des informations sur les interactions entre les différents partenaires du complexe ont pu être extraites à partir de la structure obtenue par microscopie électronique (Jiang et al., 2005) et il est supposé que la formation de ce complexe serait un moyen de faciliter l'acheminement de l'ARNt aminoacylé au ribosome (Negrutskii et al., 1999). En effet, après aminoacylation de l'ARNt^{Val} par la ValRS, EF-1 α adresse l'ARNt^{Val} au ribosome ; ce complexe allierait ainsi deux étapes consécutives de la biosynthèse des protéines.

Des études de microscopie électronique ont permis de proposer un modèle d'interaction entre les neuf aaRS et les trois co-facteurs p18, p38 et p43 du complexe multi-synthétasique « MARS » (Wolfe et al., 2003). Ce complexe serait subdivisé en trois domaines formant un Y, le facteur p43 se trouvant au centre du complexe. À la base du Y se retrouvent les GluProRS, IleRS et LeuRS et chacune des branches se voit attribuée soit l'AspRS, MetRS et GlnRS soit les LysRS et ArgRS. Le rôle de ce complexe est encore mal compris, et son intérêt fonctionnel ne reste qu'hypothétique. Il pourrait améliorer l'efficacité et le contrôle de la traduction en canalisant le flux d'ARNt à aminoacyler dans des compartiments cellulaires ciblés ou pourrait servir de réservoir moléculaire pour le contrôle des activités non canoniques des synthétases qui le composent.

Chez *S.cerevisiae* un complexe entre la MetRS, la GluRS et Arc1p et chez l'archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicus* un complexe ternaire entre la LysRS, la ProRS et la LeuRS ont été découverts (Simos et al., 1996; Praetorius-Ibba et al., 2007). Il a été montré qu'Arc1p améliore l'activité d'aminacylation de chacune des synthétases engagées dans le complexe MetRS-GluRS-Arc1p et que le complexe ternaire LysRS-ProRS-LeuRS stimule l'aminacylation de l'ARNt^{Pro} et de l'ARNt^{Lys} chez *M. thermoautotrophicus*.

Certains organismes procaryotes ne possèdent pas d'AsnRS et/ou de GlnRS. Cette absence est palliée par une AspRS ou une GluRS non discriminante qui vont former respectivement l'Asp-ARNt^{Asn} ou le Glu-ARNt^{Gln}. L'acide aspartique ou l'acide glutamique est ensuite transformé en asparagine ou en glutamine par une transamidation. Cette réaction est prise en charge par une amidotransférase ARNt-dépendante (AdT) de structure trimérique (GatA, GatB et GatC). Notons que toutes les archae sont privées de GlnRS et que dans ce cas-là, la réaction de transamidation est prise en charge par une amidotransférase dimérique GatDE (Tumbula et al., 2000). La voie de formation de l'asparagine ARNt dépendante a été découverte chez l'archaea *Haloferax volcanii* et l'eubactérie *T. thermophilus* (Curnow et al., 1996; Becker & Kern, 1998). Très récemment, il a été montré chez *T. thermophilus* que l'AspRS non discriminante, l'ARNt^{Asn} et l'amidotransférase ARNt-dépendante GatCAB forment un complexe appelé « transamidosome » (Bailly et al., 2007). Enfin, la voie de formation indirecte de la glutamine a également été trouvée dans les mitochondries de plantes et s'étend également aux chloroplastes. En effet, il s'avère que la GluRS non discriminante et les trois sous-unités de l'AdT sont importées dans les deux organelles (Pujol et al., 2008).

Il est fortement probable que des études à venir, notamment celles centrées sur les fonctions alternatives des aaRS, seront à l'origine de découverte d'autres complexes multi-protéiques mettant en jeu des aaRS. Bien que la situation au sein des mitochondries de mammifères demeure pour le moment inconnue, l'implication de certaines de ses aaRS dans de tels complexes ne peut être exclue.

E. Le dysfonctionnement des systèmes d'aminocyclation mitochondriaux humains, au coeur de pathologies

La notion de « maladie mitochondriale » est apparue au cours des années 60 en référence à des affections liées à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, engendrant ainsi un déficit dans le couplage oxydation-phosphorylation et par conséquent dans la production d'ATP cellulaire (revue par *e.g.* (Desnuelle, 2003)). C'est un peu plus tard que les premières altérations de l'ADN mt ont été mises à jour et impliquées dans des pathologies humaines et qu'une délétion de plusieurs milliers de paires de bases de l'ADN mt a imposé le concept de maladie mitochondriale à transmission maternelle (Holt et al., 1988; Lestienne & Ponsot, 1988). Ces découvertes ont été le point de départ d'un nouveau champ d'investigation, à savoir celui de maladies liées aux altérations de l'ADN mt.

Les pathologies associées à l'altération de l'ADN mitochondrial sont à la fois nombreuses et très diverses (revue par *e.g.* (Yang et al., 2008)) et si certaines de ces affections ont un spectre clinique bien défini, avec des relations génotype-phénotype relativement claires et un diagnostic bien codifié, cette situation « idéale » est loin d'être la plus courante. En effet, bien souvent, chez un individu donné, une fonction tissulaire est plus particulièrement touchée, donnant lieu à des tableaux cliniques qui peuvent associer de façon variable diverses manifestations pathologiques, ou être dominés par une seule (ataxie, myopathie, cardiomyopathie, intolérance à l'effort, anémie sidéroblastique, ...) rendant impossible toute tentative de classification.

Les mutations de l'ADN mt s'expliquent par l'action de radicaux libres ROS (pour « Reactive Oxygen Species ») générés par un stress oxydant élevé auxquels s'ajoute un mécanisme de réparation de l'ADN inefficace (Allen & Raven, 1996; Pesole et al., 1999). De plus et à l'inverse des génomes mitochondriaux de plante ou de levure, le génome mt humain ne comporte pas d'introns, de ce fait seulement 5% de la molécule d'ADN est non codante (origine de répllication et région régulatrices de la transcription). On comprend alors aisément que la probabilité qu'une mutation touche une région codante est très élevée. Cependant, bien que les 22 gènes correspondant aux ARNt mitochondriaux ne représentent que 10% du génome mt humain, ils demeurent les cibles les plus touchées, et ce, par plus de 130 mutations (Brandon et al., 2005; Ingman & Gyllensten, 2006), projetant ainsi le dysfonctionnement de la machinerie traductionnelle au coeur des maladies mitochondriales

(revues par *e.g.* (Wallace, 1999; Florentz et al., 2003; Jacobs, 2003; Brandon et al., 2005; DiMauro, 2006; Shapira, 2006)).

La complexité des maladies mitochondriales liées à un dysfonctionnement de la biosynthèse des protéines est d'autant plus intensifiée par la double origine des macromolécules de la machinerie traductionnelle mitochondriale. Si tous les ARNt mt sont codés par le génome mt, tous leurs partenaires sont codés par le génome nucléaire et importés dans la mitochondrie. Ainsi, des mutations au sein du génome nucléaire viennent élargir la notion de maladie mitochondriale qui ne se trouve alors plus limitée aux mutations affectant son génome, ou à l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, mais qui est étendue aux mutations touchant les macromolécules impliquées dans l'expression de son génome.

Dans une première partie, nous allons explorer les pathologies liées aux mutations des gènes des ARNt puis nous allons étendre cette étude aux pathologies mitochondriales découlant de mutations intervenant dans les gènes des facteurs d'élongation, de protéines ribosomales et des aaRS mt.

1. Certaines mutations des ARNt ne sont pas sans conséquences...

Alors que certaines mutations dites polymorphiques contribuent uniquement à la diversité des séquences génomiques mt d'un individu à l'autre, d'autres mutations dites pathologiques vont être à l'origine de maladies. La relation génotype-phénotype consécutive aux mutations pathologiques intervenant dans les gènes des ARNt est très complexe. En effet, si une même mutation peut être la cause de différentes pathologies, une même pathologie peut être également liée à différentes mutations. Ceci peut être expliqué à la fois par une distribution aléatoire des ADN mt mutés parmi les différents tissus ainsi que par une co-existence en proportion variable au sein d'une même mitochondrie ou d'une même cellule d'ADN sain et d'ADN muté (hétéroplasmie). De plus, le phénotype d'une pathologie n'est exprimé qu'au-delà d'une certaine proportion d'ADN muté (effet de seuil). Ainsi, une étude récente a montré que dans le cas de la mutation A3243G de l'ARNt^{Leu(UUR)}, les patients présentant un taux de mutation de 50% dans leurs cellules musculaires exhibent une consommation d'oxygène réduite durant l'effort et une morphologie anormale de leurs fibres musculaires, alors qu'un taux de mutation de 65% au sein des cellules de pancréas ou de

l'oreille interne est corrélé à un diabète et un handicap auditif (Jeppesen et al., 2006). Cependant, en dépit de cette complexité, il demeure important de décrypter les conséquences biochimiques et moléculaires qui découlent des mutations des ARNt mitochondriaux.

Les mutations pathologiques des ARNt mt ainsi que les maladies qu'elles engendrent sont répertoriées sur les sites internet « mitomap » (www.mitomap.org) (Brandon et al., 2005) et « mamit » (mamit-trna.u-strasbg.fr) (Pütz et al., 2007). La superposition de l'ensemble des mutations sur une même structure en feuille de trèfle montre qu'elles touchent des positions très variées (Figure 11) et qu'il est très difficile d'anticiper leurs effets sur la structure ou encore la fonction de l'ARNt affecté (Florentz & Sissler, 2001).

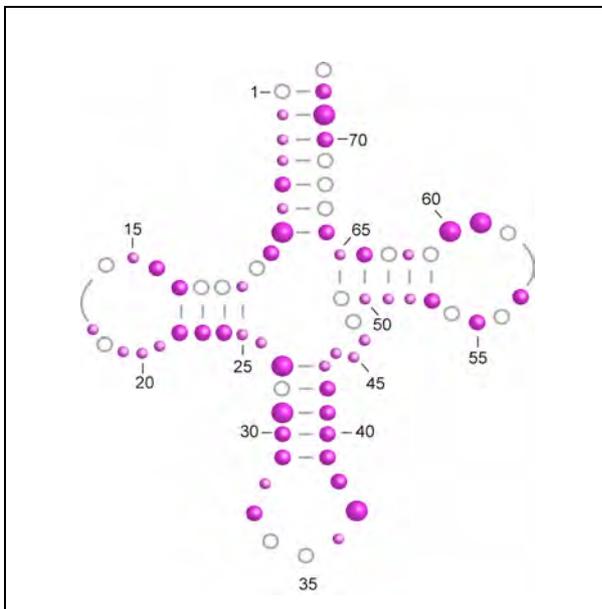


Figure 11. Distribution des mutations pathologiques sur la structure en feuille de trèfle de l'ARNt. La taille des ronds est proportionnelle à l'occupation des sites (Florentz & Sissler, 2001).

Si certaines de ces mutations affectent la mise en place de modifications post-transcriptionnelles (Brulé et al., 1998; Helm et al., 1999a; Yasukawa et al., 2000b; Kirino et al., 2004), d'autres affectent la stabilité (Hao & Moraes, 1997; Yasukawa et al., 2000a), la structure (Kelley et al., 2001; Wittenhagen & Kelley, 2002; Sohm et al., 2003; Wittenhagen et al., 2003; Bonnefond et al., 2008) ou encore la maturation en 3' (Levinger et al., 2001; Levinger et al., 2004b). Les mutations peuvent affecter la capacité d'aminocyclation *in vivo* comme il est reporté pour les syndromes mt les plus répandus, à savoir ceux de MELAS et MERFF. La mutation corrélée au syndrome MELAS touche l'ARNt^{Leu(UUR)} et engendre une diminution du taux de Leu-ARNt^{Leu(UUR)} de 50% (Börner et al., 2000; Chomyn et al., 2000). La mutation A4317G ciblant l'ARNt^{Ile} à l'origine d'une cardiomyopathie engendre une diminution des activités des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale du

muscle cardiaque des patients (Tanaka et al., 1990). L'impact supposé de cette mutation sur l'aminocyclation a alors été vérifié et confirmé *in vitro* (Degoul et al., 1998). En effet, des expériences d'aminocyclation menées sur des ARNt^{lle} transcrits *in vitro* muté ou sauvage ont montré une perte d'aminocyclation d'un facteur 4. Cependant une situation différente se présente dans le cas de la mutation MERFF A8344G de l'ARNt^{Lys}. Alors que seuls 40% de Lys-ARNt^{Lys} restent disponibles pour la traduction dans les mitochondries de malades (Enriquez et al., 1995), des études *in vitro* de capacité et d'efficacité d'aminocyclation, menées au laboratoire, n'aboutissent pas à des conclusions similaires (Sissler et al., 2004) et montrent que, *in vitro*, cette mutation n'interfère aucunement avec l'aminocyclation de l'ARNt^{Lys} transcrit *in vitro*. Ceci reflète la difficulté d'étude de l'impact des mutations pathologiques. La question des effets moléculaires de diverses mutations est décrite en détail dans les revues (Florentz et al., 2003; Levinger et al., 2004a).

2. Découverte récente des aminocyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines dans des pathologies

Alors qu'au cours des 20 dernières années, plus de 260 mutations pathologiques ont été recensées au sein des gènes des ARNt, des ARNm et des ARNr mt humains, ce n'est que très récemment que des maladies mitochondriales se sont trouvées associées à des mutations intervenant dans les gènes codant pour d'autres macromolécules de la machinerie de traduction mitochondriale, à savoir les facteurs de traduction EF-G1 (Coenen et al., 2004), EF-Ts (Smeitink et al., 2006) et EF-Tu (Valente et al., 2007) ainsi que la protéine ribosomale MRPS 16 (Miller et al., 2004).

Aucune aminocyl-ARNt synthétase mitochondriale n'avait été trouvée impliquée dans une pathologie jusqu'à la découverte par Scheper et coll. de l'implication de différentes mutations affectant le gène de l'aspartyl-ARNt synthétase (*DARS2*) dans une leucoencéphalopathie impliquant le tronc cérébral et la moelle épinière (Scheper et al., 2007). Celle-ci a été suivie très rapidement par la révélation d'une autre mutation affectant cette fois-ci le gène de l'arginyl-ARNt synthétase mt humaine et impliquée également dans une leucoencéphalopathie (Edvardson et al., 2007).

Dans le cas de l'ArgRS, la mutation pathologique induit la production d'une forme plus courte de l'ArgRS, produit de délétion de l'exon 2. Il a été montré chez les patients que

les activités des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire se trouvaient amoindries, alors que celle du complexe II (entièrement codé par le génome nucléaire) était stable. Ceci, combiné au rôle crucial des aaRS au sein de l'aminacylation et de la traduction mitochondriale, a naturellement poussé les auteurs de ce travail à étudier l'impact de cette mutation sur la biosynthèse des protéines chez les malades. Il a alors été démontré que la délétion de l'exon 2, induit une synthèse très faible et résiduelle de l'ArgRS de taille complète, ne permettant d'aminacyler qu'une faible proportion d'ARNt^{Arg}; la traduction mitochondriale s'en trouve affectée et est alors moins efficace.

La compréhension de l'impact des mutations pathologiques au sein du gène de l'AspRS mt s'est révélée être plus délicate et demeure encore incomplète. En effet, bien que certaines d'entre-elles soient localisées à la surface de dimérisation de la protéine ou touchent des résidus appartenant au domaine catalytique de l'AspRS, et que les capacités d'aminacylation des protéines recombinantes mutées, testées *in vitro*, soient réduites, l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale des patients n'est pas affectée. Les analyses des séquences génomiques des patients ont révélé que dans la majorité des cas, l'un des allèles *DARS2* porte une des mutations pathologiques, alors que l'autre présente une modification de séquence conduisant à un épissage inefficace de l'exon 3, qui induirait la synthèse à la fois d'un ARNm épissé et non fonctionnel et d'une faible proportion d'un ARNm sain. Il a été proposé que les patients présenteraient alors une quantité d'AspRS mt sauvage réduite mais apparemment suffisante pour maintenir la traduction mitochondriale à un taux comparable à celui rencontré en situation saine. La pathologie serait alors liée à un dysfonctionnement d'une ou plusieurs fonctions alternatives, encore inconnues de l'AspRS mt (Scheper et al., 2007).

3. Vers des thérapies des maladies mitochondriales

Les découvertes de plus en plus nombreuses de mutations affectant à la fois l'ADN mitochondrial et les gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales pressent la communauté scientifique dans la course à la découverte de molécules et de stratégies capables de pallier les dérégulations de fonctions mitochondriales qui en découlent (revues par *e.g.* (Murphy & Smith, 2000; Torchilin, 2006)).

Au vu du nombre plus qu'important de mutations affectant les gènes des ARNt mt, la recherche de solutions pour remédier à celles-ci n'est naturellement pas en reste.

Les « Peptide Nucleic Acids » (PNAs) sont des molécules mimant l'ADN dans lesquelles des résidus pyrimidine et purine sont liés entre eux par un squelette aminoéthyl (revue par *e.g.* (Corradini et al., 2007)). En plus d'être complémentaire à la fois à l'ADN et à l'ARN, cette structure est résistante aux nucléases ainsi qu'aux protéases. Couplés à l'ion triphénylphosphonium (TPP) capable d'importer diverses molécules à l'intérieur de la mitochondrie (Chinnery et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 2005), les PNAs pourraient alors s'apparier au génome mitochondrial muté et bloquer son expression. Ce concept a été testé afin de pallier la mutation A8344G du tRNA^{Lys} responsable du symptôme de MERFF. Un PNA de 11 résidus a été utilisé dans des tests de réplication *in vitro* soit sur de l'ADN sauvage soit sur un ADN muté et a inhibé à 75% la réplication de l'ADN muté (Muratovska et al., 2001). Ce PNA couplé à TPP a alors aussitôt été testé sur des lignées cellulaires de patients contenant de l'ADN à la fois sauvage et muté. Mais la prise en charge par les mitochondries du TPP-PNA n'a pas modifié le ratio ADN sauvage / ADN muté, montrant ainsi l'incapacité du PNA à inhiber la réplication *in vivo*. Bien que ces expériences n'aient pas aboutit au résultat escompté, elles ont malgré tout montré la capacité du TPP-PNA à être intégré par les mitochondries humaines *in vivo*. Le potentiel de cette molécule reste à être approfondi.

Les mutations pathologiques au sein de l'ADN mt peuvent créer un site de restriction unique, absent dans l'ADN sauvage. La stratégie alors utilisée pour détruire l'ADN muté serait d'importer une enzyme de restriction fusionnée à une séquence d'adressage mitochondrial. Bien que ce n'ait pas été encore appliqué à un ARNt mt, cette technique s'est révélée efficace pour la mutation T8399G de l'ADN mt à l'origine de la maladie NARP (pour « Neuropathy, Ataxia and Retinis Pigmentosa ») impliquant un dysfonctionnement du transport d'électron. Cette mutation ponctuelle crée un nouveau site *SmaI-XmaI*, absent dans l'ADN sauvage. L'enzyme de restriction *SmaI*, après avoir été importée dans des mitochondries de cellules en culture, a sélectivement dégradé l'ADN muté mais pas l'ADN sauvage, montrant ainsi son potentiel thérapeutique (Srivastava & Moraes, 2001). On peut aisément imaginer que cette technique pourrait également être employée si une mutation d'un gène d'ARNt introduisait un site de restriction unique.

Le génome mitochondrial code pour l'ensemble des ARNt mt et de ce fait aucun import d'ARNt codé par le génome nucléaire n'est nécessaire. Cependant, il a été démontré que les mitochondries humaines ont la capacité d'importer certains ARNt de levure (Entelis et al., 2001). Ceci a été mis à profit avec succès en complétant la mutation pathologique MERFF (ciblant l'ARNt^{Lys}) par un import de l'ARNt^{Lys} de levure (Kolesnikova et al., 2004). En effet, ces travaux ont montré qu'après être importé dans des mitochondries de cellules humaines en culture présentant la mutation MERFF, cet ARNt^{Lys} exogène est aminoacylé et participe à la biosynthèse des protéines mitochondriales, permettant ainsi de rétablir partiellement les fonctions mitochondriales de ces cellules malades. Plus récemment, il a été montré qu'après introduction du complexe d'import d'ARN (RIC, pour « RNA Import Complex ») du protozoaire *Leishmania* dans des mitochondries humaines, celles-ci ont la capacité d'importer des ARNt. Cette découverte appliquée à des cellules en culture présentant la mutation MERFF a dévoilé qu'après intégration de RIC, l'import de l'ARNt^{Lys} cytosolique permet de sauver les fonctions mitochondriales des cellules malades (Mahata et al., 2006).

OBJECTIFS

L'introduction de ce manuscrit a rappelé à quel point les ARNt et les aaRS, en plus d'être intimement liés au sein de la biosynthèse des protéines, présentent des caractéristiques spécifiques qui rendent leur étude d'autant plus intéressante. Ceci est tout particulièrement le cas pour les couples impliqués dans la traduction au sein de la mitochondrie humaine. Mon travail de thèse se partage en quatre parties et les différents objectifs qui l'ont guidé sont présentés dans ce qui suit.

La première partie est consacrée à une étude structurale des ARNt mitochondriaux humains ainsi qu'à l'impact d'une mutation pathologique sur la structure de l'ARNt^{Asp} mt humain. En effet, les originalités structurales des ARNt mt de mammifères et les questionnements qui en découlent génèrent un vaste domaine d'étude qui ne demeure que partiellement exploré. C'est pourquoi, afin d'enrichir les connaissances structurales déjà acquises précédemment sur d'autres ARNt mt de mammifères, les structures en solution de l'ARNt^{Asp} mt humain natif ainsi que de son transcrit *in vitro* vont être explorées. L'objectif de ce travail étant à la fois de comprendre le réseau d'interactions tertiaires régissant la structure tridimensionnelle de cet ARNt typique de la mitochondrie humaine et de construire un modèle de la structure 3D de l'ARNt^{Asp} mt humain.

Une mutation à l'origine d'une myopathie mitochondriale a été découverte au sein de l'ARNt^{Asp} mt humain et décrite chez une jeune fille présentant notamment une intolérance à l'exercice, une consommation réduite d'oxygène ainsi qu'une activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale diminuée. La diminution de l'activité des complexes I et IV soulève la possibilité d'un impact de la mutation sur la traduction mitochondriale (impliquée notamment dans la synthèse de sous-unités de ces deux complexes). Cet impact pourrait altérer la structure de l'ARNt^{Asp} mt humain muté. Cette hypothèse sera examinée par une étude structurale en solution comparative des ARNt mt humain sauvage et mutés, transcrits *in vitro*, complétée par une étude fonctionnelle de ces mêmes molécules en testant leur capacité à être aminoacylés *in vitro*.

La deuxième partie de mon travail de thèse concerne l'étude de l'AspRS mt humaine. Elle se divise en 3 chapitres, dont le premier est consacré à l'analyse d'inhibiteurs potentiels de l'AspRS mt humaine. Afin de pallier certaines maladies causées par des agents pathogènes et notamment les bactéries, la recherche de molécules, telles que les antibiotiques, qui toucheraient et anéantiraient des macromolécules clés des agents pathogènes, sans toucher leurs équivalents chez l'hôte, constituent actuellement un enjeu majeur de santé publique.

L'importance fondamentale des aaRS dans la vie de tout organisme a tout naturellement conduit à considérer ces protéines comme des cibles nouvelles d'antibiotiques. Alors que cette stratégie commence à porter ses fruits par la découverte de composés inhibant les synthétases bactériennes avec un effet minimal sur les synthétases cytosoliques humaines, aucune donnée concernant l'inhibition des aaRS mitochondriales humaines n'a encore été obtenue. Cependant, la majorité des aaRS mt humaines sont de type procaryote, ce qui laisse supposer qu'un antibiotique ayant comme cible première une aaRS bactérienne pourrait également toucher et neutraliser une aaRS mt humaine. Le potentiel de certains analogues d'adénylate de l'acide aspartique comme agents antibiotiques a été publié et a montré leur capacité à inhiber l'activité de certaines AspRS eubactériennes. L'étude de l'inhibition de l'activité de l'AspRS mt humaine par ces mêmes molécules sera entreprise dans le cadre d'une collaboration avec les équipes de J. Lapointe et R. Chênevert (Québec) et R. Giégé (Strasbourg).

Le deuxième chapitre de cette deuxième partie est dédié à l'exploration de nouvelles originalités de l'AspRS mt humaine. Un premier sous-chapitre pose la question du/des partenariats de cette protéine. La comparaison des activités des aaRS mt humaines avec celles de leurs homologues bactériennes ont révélé des efficacités catalytiques réduites. Ce phénomène pourrait soit refléter une situation biologique réelle, qui serait justifiée par la nécessité de synthétiser uniquement 13 protéines mitochondriales, soit indiquer un tout autre aspect des aaRS mt humaines. En effet, leurs constantes cinétiques ont été déterminées par des réactions d'aminocyclation *in vitro* laissant entrevoir qu'un ou plusieurs co-facteur(s), encore inconnus(s), pourrai(en)t manquer lors de ces tests. Par ailleurs, on ne connaît pas les partenaires protéiques des aaRS mitochondriales. Des expériences d'immunoprécipitation avec des anticorps anti-AspRS mt humaine seront définies et réalisées pour découvrir si l'AspRS mt humaine possède un ou plusieurs partenaires qui pourraient venir l'assister dans sa(ses) fonction(s).

Les études menées précédemment au laboratoire sur l'AspRS mt humaine ont laissé entrevoir qu'au delà de sa fonction d'aminocyclation, cette aaRS pourrait susciter de nouvelles explorations fonctionnelles qui font l'objet du deuxième sous-chapitre. En effet, lors du clonage de l'AspRS mt humaine, une étape de PCR sur une banque d'ADNc a révélé la présence d'une deuxième bande, de taille plus petite et correspondant potentiellement à un produit épissé de l'AspRS mt humaine, délétée ainsi de son exon 13 (appelé AspRS- Δ Exon13). Des travaux menés en collaboration avec l'équipe du Dr. M. Van der

Knaap (Amsterdam) sont venus corroborer cette découverte. Mes objectifs seront alors doubles. Tout d'abord des expériences de western-blot viendront définir si ce produit d'épissage de l'AspRS mt humaine a effectivement une réalité biologique, puis des clonages suivis par des sur-expressions de l'AspRS-ΔExon13 seront nécessaires pour explorer, *in vitro*, ses fonctions potentielles.

Enfin le dernier chapitre aborde l'AspRS mitochondriale et son implication dans une pathologie. En 2007, notre équipe de recherche a participé à la première mise en évidence d'une pathologie neurodégénérative liée à des mutations touchant une aaRS mt humaine. Ainsi, des mutations intervenant dans le gène de l'AspRS mt humaine sont la cause d'une leucoencéphalopathie. Ces mutations n'ayant pas d'effet négatif sur les activités des complexes de la chaîne respiratoire, cette découverte est venue « chatouiller » à nouveau l'hypothèse que l'AspRS mt humaine pourrait avoir une ou plusieurs fonctions alternatives encore inconnue(s). La compréhension de(s) origine(s) de cette pathologie est de ce fait d'autant plus captivante. Parmi toutes les mutations affectant l'AspRS mt, l'une touche un résidu localisé dans le signal d'adressage mitochondrial théorique de la protéine (S45G). Des études comparatives de co-localisation mitochondriale de l'AspRS mt humaine avec son signal d'adressage sauvage ou muté fusionnée à la GFP et des expériences d'import *in vitro* de ces mêmes molécules seront réalisées en collaboration avec L. Maréchal-Drouard (Strasbourg) et G. Scheper (Amsterdam). Ceci permettra dans un premier temps de compléter la caractérisation de l'AspRS mt humaine sauvage en étudiant son signal d'adressage, en découvrant sa localisation sub-mitochondriale ainsi que la séquence N-terminale de l'enzyme mature puis, dans un deuxième temps, de déterminer l'impact de la mutation pathologique sur l'adressage, l'import mitochondrial ainsi que le clivage du signal d'adressage afin d'apporter un élément supplémentaire dans le décryptage et la compréhension de l'une des origines de cette pathologie.

L'ensemble des travaux sont décrits dans les chapitres suivants sous forme de manuscrits soumis (ou prêts à être soumis) pour publication précédés de données introductives spécifiques. Le cas échéant, des résultats complémentaires seront présentés.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1

Analyse structurale en solution de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain et partenariat avec son AspRS homologue

Ce premier chapitre est consacré à une analyse structurale des ARNt mt de mammifères en prenant l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain comme modèle. Cette famille d'ARNt présente des particularités au niveau de leurs séquences primaires et structures secondaires qui a conduit à les considérer comme « bizarre ». Bien que des analyses théoriques et un nombre restreint d'expériences structurales (*e.g.* sondage en solution) aient été réalisés, de nombreuses questions restent en suspens. Un point particulièrement crucial concerne les règles de repliement tridimensionnel de ces ARNt dans lesquels les nucléotides clés impliqués classiquement dans les réseaux d'interactions tertiaires sont globalement absents. Afin d'enrichir ces données structurales, de comprendre les principes du repliement tridimensionnel des ARNt mt humains et de connaître les interactions qui les soutiennent, nous avons entrepris l'étude structurale par sondage enzymatique et chimique en solution de l'ARNt^{Asp} mt humain. Les résultats de cette analyse et les conclusions apportées sont présentées dans l'article n°1. Ils concernent l'ARNt^{Asp} natif extrait de cellules HeLa, ainsi que ce même ARNt produit par transcription *in vitro* et donc dépourvu de modifications post-transcriptionnelles.

Nous avons également tiré profit de l'existence d'une mutation dans l'ARNt^{Asp} corrélée à une pathologie afin de mieux cerner le réseau d'interaction tertiaire. En effet, les ARNt mt humains sont la cible de nombreuses mutations liées à des pathologies. Au sein de l'ARNt^{Asp}, deux mutations ont été répertoriées (Grasbon-Frodl et al., 1999; Seneca et al., 2005). Alors que la première, impliquée dans un cancer, cible la position 4 du bras accepteur, la deuxième, à l'origine d'une myopathie mitochondriale touche le résidu 9. Ce résidu se trouve dans le connecteur entre le bras accepteur et le bras D et grâce à une interaction avec la paire de base 12-23 (dans le bras D), il pourrait participer à l'établissement du réseau d'interaction tertiaire comme c'est le cas au sein des ARNt classiques. L'étude de l'impact de la mutation pathologique A9G sur la structure de l'ARNt^{Asp} mt humain a été mise à profit afin d'aborder l'implication de ce résidu (en partenariat avec la paire de base 12-23) dans le réseau. Le sondage en solution de différents ARNt^{Asp} mt humain sauvage et mutants transcrits *in vitro* (sondes enzymatiques S1 et V1) combiné à une analyse fonctionnelle de ces mêmes molécules a ainsi permis d'approcher cette interaction tout en explorant les impacts moléculaires de la mutation pathologique. Ceci est discuté dans l'article n°2.

J'ai également participé à un travail ayant pour problématique fondamentale la détermination des éléments d'identité d'aminacylation du système aspartate mitochondrial humain qui fait l'objet de l'article n°3 donné ci-dessous. J'ai tout particulièrement étudié l'incidence de la mutation du résidu C38 de la boucle anticodon sur la structure de celle-ci.

Enfin, le dernier travail de ce chapitre sera consacré à l'étude préliminaire d'une implication possible de l'ARNt^{Asp} mt humain dans la dégradation des ARNm, *via* une structure alternative. Le cheminement scientifique qui nous a amené à lier les ARNt mt humains aux microARN (miARN), ainsi que les résultats obtenus jusqu'à présent seront présentés dans cette dernière partie.

Avant de plonger au cœur de cette étude, il est important de rappeler la problématique structurale au sein de laquelle cette molécule s'inscrit, de mieux la connaître et de rappeler les connaissances concernant la reconnaissance spécifique entre l'ARNt^{Asp} et l'AspRS de divers organismes, à savoir les éléments d'identité des ARNt^{Asp} et les contacts entre ARNt^{Asp} et AspRS.

A. Introduction

1. Rappel des particularités structurales des ARNt mt de mammifères

Les principales caractéristiques des ARNt classiques ainsi que celles des ARNt mt de mammifères ont été présentées dans l'introduction générale de ce manuscrit (§ **B.1.**, figures 4 et 5). Les points cruciaux sont maintenant rappelés.

Les ARNt classiques présentent des caractéristiques structurales bien établies et très fortement conservées (revue par *e.g.* (Söll & RajBhandary, 1995)). Celles-ci incluent un repliement en feuille de trèfle aux domaines bien définis, la présence d'un certain nombre de nucléotides conservés en des sites stratégiques, et enfin, une structure tridimensionnelle en forme de « L » basée sur un réseau d'interactions tertiaires très précis et également conservé. Ce réseau de 9 interactions fait intervenir des nucléotides localisés dans les boucles D et T, d'une part, et d'autres localisés au cœur de la molécule (connecteur, bras D et région variable), d'autre part.

Les ARNt mt divergent plus ou moins fortement de ces ARNt classiques, avec le cas extrême concernant l'ARNt^{Ser(AGY)} mt dépourvu entièrement du domaine D. Une analyse théorique des structures secondaires des ARNt mt de mammifères a été entreprise au laboratoire afin de mieux comprendre leurs caractéristiques et d'initier leur étude structurale (Helm et al., 2000). Les résultats de cette analyse sont présentés dans les figures 5 et 6 de l'introduction et ont révélé qu'il existe deux types d'ARNt mt. Huit d'entre eux sont codés par

le brin léger du génome mt (ARNt lourds) et les quatorze autres sont codés par le brin lourd (ARNt légers). Chaque famille d'ARNt, à l'exception de celles des ARNt^{Ser(AGY)} (pour lesquels il manque la totalité du domaine D) et des ARNt^{Ser(UCN)} (pour lesquels il manque le connecteur 8), a une structure secondaire théorique en feuille de trèfle. Cependant, au sein d'une même famille, les boucles D et T exhibent une grande variation de taille. Ensuite, alors que les ARNt lourds sont riches en paires de bases G•U et pauvres en mésappariements, les ARNt légers sont pauvres en paire de base G•U et riches en mésappariement ce qui les a rattachés à la désignation d'ARNt dits « bizarre ». Enfin, l'ensemble des interactions classiques n'est pas retrouvé dans tous les ARNt mt humains. Aujourd'hui, des banques d'ARNt mt (Popadin et al., 2007; Pütz et al., 2007) et l'exploitation de celle des ARNt mt de mammifères (mamit-trna.u-strasbg.fr) permettent de mettre en exergue ces caractéristiques structurales.

Malgré leurs originalités, peu d'expérimentations ont été réalisées sur les ARNt mt de mammifères. La première structure d'ARNt mt de mammifère à avoir été approchée par sondage structural en solution est celle de l'ARNt^{Ser(UCN)} natif mt de bovin (Yokogawa et al., 1991). Cet ARNt est le moins divergeant par rapport aux ARNt classiques car il possède tous les signaux permettant un repliement 3D canonique. L'utilisation de sondes enzymatiques et chimiques a bien révélé une structure secondaire en feuille de trèfle et une conservation de la structure tridimensionnelle en « L ». La même approche a été entreprise pour étudier la structure de l'ARNt^{Phe} natif mt de bovin et a abouti aux mêmes conclusions avec cependant la révélation d'un réseau d'interactions tertiaires restreint par rapport à celui classiquement établi entre les boucles D et T (Wakita et al., 1994). La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a également été mise à profit pour aborder la structure de l'ARNt^{Ser(AGY)} natif mt de bovin dépourvu du domaine D (Hayashi et al., 1997) et a révélé un réseau d'interactions tertiaires original. Ces premiers travaux ont été enrichis par des études d'amplitude de biréfringence suggérant que l'angle formé par les branches acceptrices et anticodon du « L » des ARNt mt de mammifères les distingue également des ARNt canoniques (Frazer-Abel & Hagerman, 1999). En effet, alors que cet angle mesure 95° dans le cas de l'ARNt^{Phe} classique de levure, celui de l'ARNt^{Ser(AGY)} mt natif de bovin est de 120°. Enfin, une exploration comparative des structures d'ARNt mt humains natifs et transcrits *in vitro* des ARNt^{Lys} (Helm et al., 1998), ARNt^{Ile} (Levinger et al., 2003) et de ARNt^{Leu(UUR)} (Wittenhagen & Kelley, 2002; Sohm et al., 2003; Roy et al., 2005) ont confirmé un repliement secondaire en feuille de trèfle pour les molécules natives, mais également montré que celles transcrites *in vitro* peuvent

adopter des structures alternatives. Celles-ci peuvent correspondre soit à une tige boucle étendue dans le cas de l'ARNt^{Lys} (Helm et al., 1998) soit à une feuille de trèfle avec des bras D et anticodon ouverts dans le cas de l'ARNt^{Leu} (Sohm et al., 2003) (Figure 12).

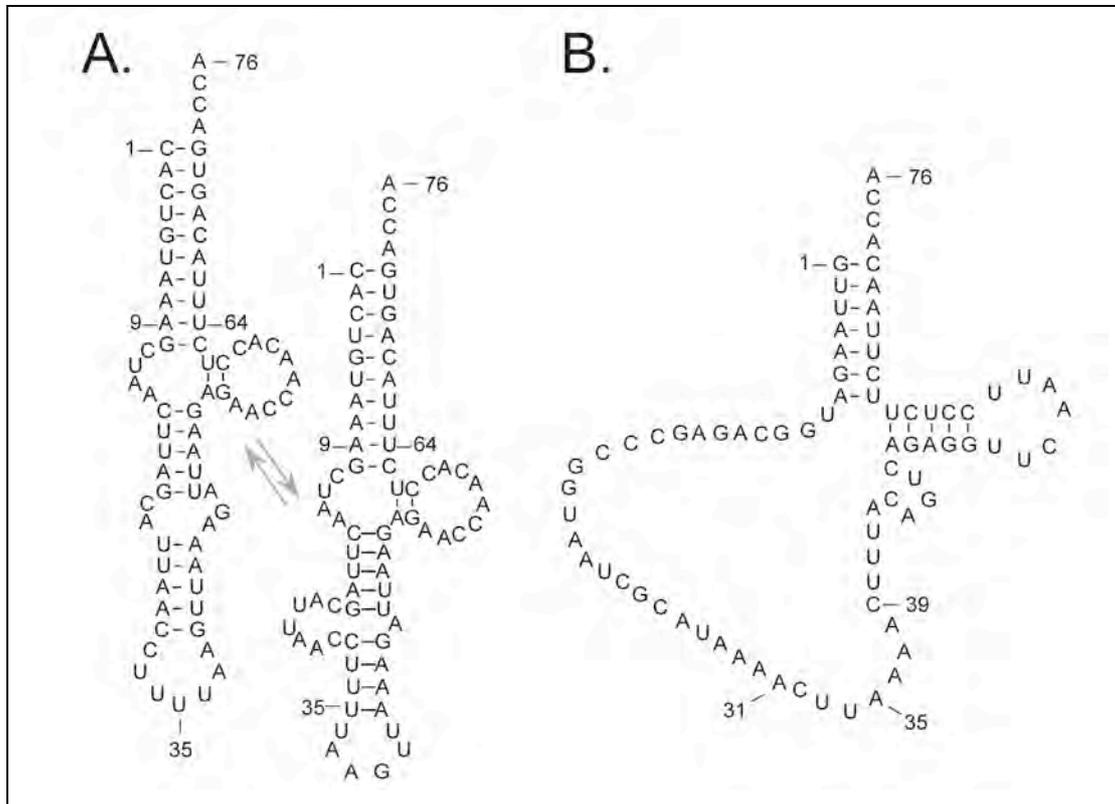


Figure 12. Présentation des structures alternatives des ARNt mitochondriaux humains transcrits *in vitro*. A. Structure en tige boucle étendue de l'ARNt^{Lys} (Helm et al., 1998). B. Structure avec un bras D et un bras anticodon ouvert de l'ARNt^{Leu} (Sohm et al., 2003).

Ces dernières analyses structurales n'ont pas abouti à des conclusions concernant les structures tridimensionnelles de ces molécules. C'est pourquoi, au vu des premiers indices de particularité des ARNt mt de mammifères mais surtout du manque d'informations concernant leur réseau d'interactions tertiaires et des interactions entre les boucles D et T, nous avons entrepris l'étude structurale par sondage en solution aussi bien de l'ARNt^{Asp} mt humain natif extrait de cellules HeLa que de l'ARNt^{Asp} mt humain transcrit *in vitro* (article n°1), les particularités de cet ARNt sont présentées dans le paragraphe suivant.

2. L'ARNt^{Asp} mitochondrial humain

L'analyse de la séquence de l'ARNt^{Asp} mt humain indique qu'il s'allie effectivement aux ARNt « bizarres » et à leurs particularités structurales (Figure 13A). Il est de petite taille (71 résidus contre 76 pour les ARNt^{Asp} classiques) et sa composition nucléotidique biaisée (29A, 7G, 24U et 11C) explique sa richesse en paires de bases « faibles » (16 A-U et G•U contre seulement 5 G-C). Des nucléotides importants, potentiellement impliqués dans les interactions tertiaires manquent également comme les résidus G18 et G19 et la séquence UUC (précurseur de la séquence de TΨC) au sein respectivement des boucles D et T. Enfin seulement 6, sur les 9 interactions tertiaires classiques, peuvent être prédites. Tout cela suggère que la structure de l'ARNt^{Asp} mt humain possède un réseau alternatif d'interactions tridimensionnelles ou alors que cet ARNt présente un plus petit nombre d'interactions pour former ce réseau. Par conséquent sa structure pourrait être plus flexible et moins stable que celles des ARNt classiques. La compilation des séquences d'ARNt mt de mammifères permet une analyse plus élargie à l'ensemble des ARNt^{Asp} mt de mammifères de 136 organismes (mamit-trna.u-strasbg.fr) (Pütz et al., 2007)). Ces ARNt ne partagent qu'un faible nombre de résidus conservés ou semi-conservés (purine, pyrimidine, Figure 13B). Ces nucléotides constituent très certainement des points stratégiques importants dans l'établissement des structures et fonctions des ARNt.

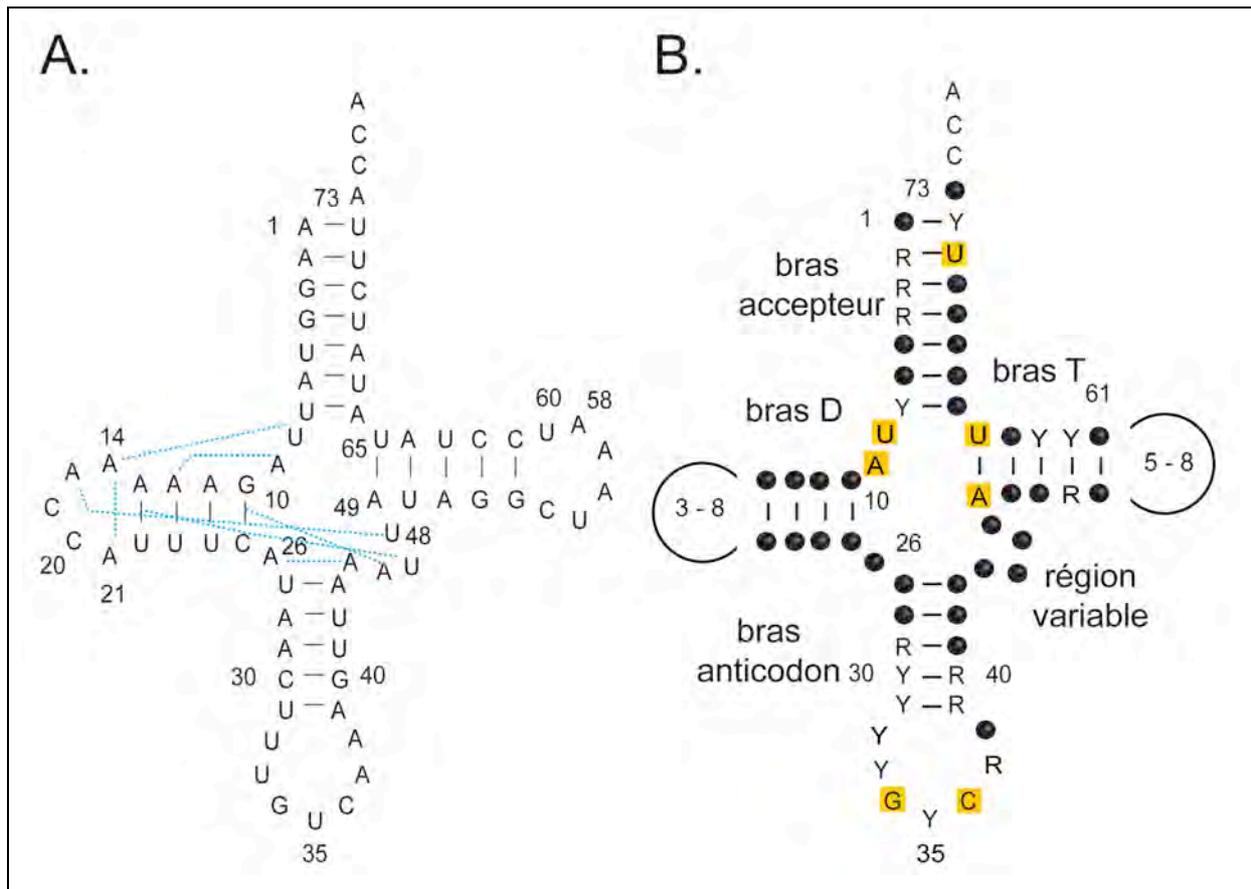


Figure 13. Structures secondaires des ARNt^{ASP} mitochondriaux de mammifères. A. Structure en feuille de trèfle de l'ARNt^{ASP} mt humain. Les interactions tertiaires théoriques sont représentées en bleu. **B.** Séquence consensus des ARNt^{ASP} mt de 136 mammifères. Les nucléotides rigoureusement conservés sont indiqués sur fond orange et les pyrimidines (Y) et purines (R) conservées sont précisées. Les variations de taille des boucles D et T sont indiquées. Les boules noires correspondent à une absence de conservation de séquence.

3. Interaction entre l'ARNt^{ASP} et l'AspRS

3.1. Les complexes ARNt^{ASP}/AspRS

Plusieurs approches expérimentales peuvent être envisagées pour étudier l'interaction entre un ARN et une protéine partenaire. L'empreinte en solution a été très largement utilisée pour de nombreux complexes, et tout particulièrement pour celui formé entre l'ARNt^{ASP} de levure et l'AspRS cytosolique correspondante (Romby et al., 1985; Rudinger et al., 1992). La résolution des structures cristallographiques des complexes formés entre l'ARNt^{ASP} et l'AspRS chez *S. cerevisiae* (Figure 14B) (Cavarelli et al., 1993) et *E. coli* (Eiler et al., 1999) a permis également d'apporter un regard structural sur les complexes d'aspartylation et de mieux comprendre comment les deux macromolécules interagissent. Ces structures ont montré que chaque monomère de l'AspRS interagit avec une molécule d'ARNt et leur exploitation a permis d'établir les zones de contact entre ces deux partenaires. Elles ont révélé

que l'enzyme est en contact avec l'ARNt^{Asp} du côté de sa région variable et se lie au niveau de l'anticodon et du sillon majeur de l'extrémité du bras accepteur de l'ARNt.

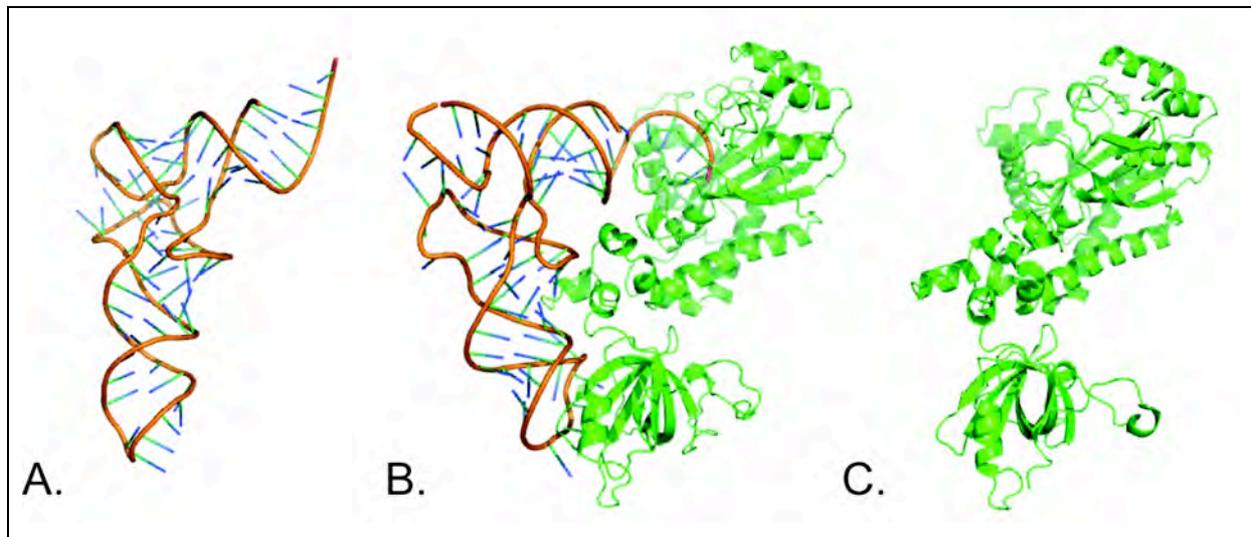


Figure 14. Structures cristallographiques des macromolécules partenaires de l'aspartylation chez *S. cerevisiae*. A. Structure de l'ARNt^{Asp} (Westhof et al., 1985). B. Structure du complexe formé par l'ARNt^{Asp} et l'AspRS (Ruff et al., 1992). Seul un monomère de l'enzyme interagissant avec son ARNt est représenté. C. Structure d'un monomère de l'AspRS sous forme non complexée (Sauter et al., 2000).

L'ensemble des structures cristallographiques obtenues pour le système aspartate de *S. cerevisiae* le rend particulièrement intéressant car nous disposons à la fois de la structure du complexe (Ruff et al., 1992) mais également de celles de chacun des partenaires seuls (Westhof et al., 1985; Sauter et al., 2000). Par conséquent, en plus d'avoir accès aux points de contact précis, la dynamique de leur partenariat est également mise en évidence (Figure 14). En effet, la formation du complexe induit des changements conformationnels tant au niveau de la protéine qu'au niveau de l'ARNt. Il s'agit d'un changement de l'orientation relative des domaines pour l'enzyme et d'une réduction de l'angle entre les branches acceptrice et de l'anticodon pour l'ARNt (110° pour la forme libre contre 95° au sein des complexes d'*E. coli* et de *S. cerevisiae*). De plus, l'interaction au niveau du domaine anticodon de l'ARNt induit des changements importants dans la boucle anticodon de l'ARNt^{Asp}. Alors que dans la structure mimant la forme libre de l'ARNt les bases de l'anticodon sont empilées (Westhof et al., 1985), dans la forme complexée elle sont complètement évasées vers la synthétase. Notons que la forme libre de l'ARNt^{Asp} n'a jamais été obtenue. L'empilement cristallin correspond en fait à un dimère d'ARNt^{Asp} interagissant par leurs anticodons.

Le complexe obtenu pour *E. coli* mérite une considération toute particulière au vu de la proximité d'identité de séquence entre son AspRS et l'AspRS mt humaine (40% d'identité

de séquence). Cette structure révèle que la plupart des interactions se font avec la boucle anticodon (du résidu C₃₂ au résidu C₃₈) d'une part, et l'extrémité 3' simple brin G₇₃C₇₄C₇₅A₇₆, d'autre part. Alors que ces interactions sont « bases-spécifiques », celles qui touchent l'hélice acceptrice (G₆, C₆₇G₆₈U₆₉U₇₀C₇₁C₇₂) impliquent le squelette ribose-phosphate de l'ARNt (revue par *e.g.* (Giegé & Rees, 2005)).

3.2. Éléments d'identité aspartate

Les éléments d'identité sont le résultat de la combinaison d'éléments positifs (déterminants), qui permettent la reconnaissance et l'aminocyclation par l'aaRS spécifique, et d'éléments négatifs (antidéterminants) qui empêchent toute aminocyclation par une synthétase non spécifique. Les notions/concepts établis pour les systèmes d'aminocyclation classiques sont exposés dans l'introduction générale de ce manuscrit (§ B.2.2., voir aussi pour revue *e.g.* (Giegé et al., 1998)). Ici, nous rappelons ce qu'il est connu pour les systèmes aspartate classiques.

À ce jour, les éléments d'identité aspartate de systèmes eucaryotiques (*S. cerevisiae*, (Pütz et al., 1991; Frugier et al., 1994; Ryckelynck et al., 2003)) et bactériens (*E. coli*, (Hasegawa et al., 1989; Nameki et al., 1992), *T. thermophilus*, (Becker et al., 1996)) ont été principalement étudiés par des approches *in vitro* et sont regroupés en deux catégories (Giegé et al., 1996). Les éléments d'identité majeurs, généralement conservés, se trouvent aux deux extrémités de l'ARNt et sont constitués de la base discriminatrice G73 et l'anticodon G34U35C36 et les éléments d'identité mineurs sont la paire de bases G10-U/C25 et le nucléotide C38. Notons également la contribution mineure de la paire de base G2-C71 dans le système d'*E. coli*. La force des éléments d'identité est différente en fonction du système étudié. En effet, la substitution de l'élément majeur U35 par un A35 induit une perte d'efficacité de 85 fois chez *S. cerevisiae* (Ryckelynck et al., 2003), de plus de 5000 fois chez *E. coli* (Nameki et al., 1992), et de 3.10⁵ fois chez *T. thermophilus* (Becker et al., 1996). De telles différences indiquent des réseaux d'interaction hydrogènes différents entre les nucléotides d'identité et les acides aminés de l'AspRS ou plus simplement renseignent sur l'importance fonctionnelle des groupements chimiques des résidus de l'identité (Giegé et al., 1996).

Ces jeux d'identité ont été vérifiés par leur transplantation dans des ARNt d'autres spécificités. Ainsi transformés, l'ARNt^{Phe} de levure et l'ARNt^{Gln} d'*E. coli* deviennent des substrats de l'AspRS de levure (Pütz et al., 1991; Frugier et al., 1994), l'ARNt^{Phe} de levure

substrat de l'enzyme de *T. thermophilus* (Becker et al., 1996) et les ARNt^{Val} et ARNt^{Asn} d'*E. coli* des substrats de l'AspRS d'*E. coli* (Nameki et al., 1992).

La question qui se pose est de savoir si ce jeu d'élément d'identité, très conservé, se retrouve dans les systèmes aspartate mt de mammifères, et tout particulièrement dans celui de l'homme. Ceci a fait l'objet d'une étude réalisée par Aurélie Fender lors de sa thèse et à laquelle j'ai participé. Les résultats montrent que ce jeu d'identité est dégénéré et sont présentés dans l'article n°3.

B. Structure en solution de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain

Article n°1

Enzymatic and chemical structure probing of human mitochondrial tRNA^{Asp}

M. Messmer, J. Pütz, C. Sauter, M. Sissler & C. Florentz

2008

Soumis pour publication à J. Mol. Biol.

Les structures primaires et secondaires des ARNt mitochondriaux de mammifères divergent de celles des ARNt classiques. Ceci est dû à une composition nucléotidique biaisée et à une grande variation de taille des boucles D et T. La non-conservation des nucléotides nécessaires à l'établissement du réseau d'interaction tertiaire classique pose la question de la nature des règles à l'origine de la structure tridimensionnelle en « L » de ces ARNt. Dans ce travail, nous présentons la cartographie de la structure en solution de l'ARNt^{Asp} mt humain à la fois natif purifié à partir de cellules HeLa et transcrit *in vitro* afin de définir les éléments 3D inhérents à cet ARNt. Le sondage en solution a été réalisé à l'aide de nucléases spécifiques des domaines simple brins (nucléase S1) et des domaines structurés (ribonucléase V1) et de sondes chimiques (DMS permettant de tester la réactivité des N3 des cytosines et DEPC permettant de tester la réactivité des N7 des adénosines). Alors que les données de sondage enzymatique et chimique correspondent à une structure unique pour l'ARNt natif, elles ont révélé un mélange de repliements pour l'ARNt transcrit *in vitro*. Concernant l'ARNt natif et ses nucléotides impliqués dans le cœur de la structure tridimensionnelle en « L », les résultats coïncident avec ceux déjà obtenus pour des ARNt classiques. Ceci nous a permis de construire un modèle de la structure de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain, basé sur l'existence de 5 interactions tertiaires formant le cœur de la structure. Nos données sont en faveur d'une absence d'interaction entre les boucles D et T qui sont privées des résidus G18G19 et U54U55C56. De ce fait, une liberté de l'angle formé par les deux branches de la molécule en « L » pourrait être permise. Les règles de repliement tridimensionnel de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain peuvent être élargies à d'autres ARNt^{Asp} d'autres mammifères bien que leurs séquences ne soient pas strictement conservées.

C. « Focus » sur l'interaction tertiaire 9-12-23 de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain

Article n°2

Pathology-related mutation A7526G helps understanding the 3D structural core in mammalian mitochondrial tRNA^{Asp}

M. Messmer, A. Gaudry, M. Sissler & C. Florentz

2008

Soumis pour publication à RNA

Les ARNt mitochondriaux (mt) humains sont des points chauds de mutations reliées à des pathologies. Pour le moment, plus de 130 mutations distribuées le long des 22 gènes des ARNt ont été corrélées à une variété de maladies neurodégénératives. Les études *in vitro* et *in vivo* menées sur un nombre restreint de ces mutations a révélé une mosaïque d'impacts moléculaires à la fois au niveau de la biogenèse de l'ARNt ou de ses fonctions. Les situations récurrentes sont une perturbation structurale initiale amenant un impact sur les enzymes impliquées dans la maturation, les modifications post-transcriptionnelles et/ou l'aminocyclation. Malgré leur implication dans des pathologies, les connaissances acquises sur la structure des ARNt mt de mammifères restent limitées. Les règles précises ainsi que le réseau d'interaction tertiaire nécessaires au repliement tridimensionnel sont dans la majorité des cas inconnus pour ces molécules déjà considérées comme bizarres au regard de leurs structures primaires et secondaires. Dans ce travail, l'impact de la mutation A7526G (A9G) au sein de l'ARNt^{Asp} mt humain induisant une myopathie est étudié d'un point de vue structural et fonctionnel. Les propriétés d'aminocyclation d'ARNt^{Asp} mt humains sauvage, mutant et de variants transcrits *in vitro* sont comparées, et leurs structures en solution sont analysées par sondage enzymatique. Les données acquises présentent un nouvel exemple d'un impact premier d'une mutation pathologique sur la structure. Par ailleurs, elles apportent une preuve expérimentale de l'existence d'une interaction tertiaire entre le résidu 9 du connecteur 1 et de la paire de base 12-23 du domaine D de l'ARNt^{Asp} mt humain. Des compilations de

banques de données montre une forte conservation des nucléotides à cette position au sein des ARNt mt de mammifères.

D. Identité « aspartate » de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain et structure

Article n°3

Loss of a primordial identity element for a mammalian mitochondrial aminoacylation system

A. Fender, C. Sauter, M. Messmer, J. Pütz, R. Giegé, C. Florentz & M. Sissler

2006

J. Biol. Chem., 281, 15980-6

Bien que les éléments d'identité majeurs aspartate, soient conservés au cours de l'évolution, l'analyse des séquences des ARNt mitochondriaux a laissé présager que cette conservation ne s'étendait pas aux systèmes mitochondriaux de mammifères. En effet, la séquence de l'ARNt^{Asp} mt humain (Figure 13A) ainsi que la séquence consensus des ARNt^{Asp} mt de mammifères (Figure 13B) révèlent que les éléments d'identité classiques majeur G73 et mineurs G2-C71 et C38 sont absents. Ils sont remplacés par A73, A2-U71 et A38. Par contre l'alignement de l'ensemble des séquences des ARNt^{Asp} mt de mammifères (mamit-trna.u-strasbg.fr) montre que la paire de base A49-U65 présente une conservation de 100% et la désigne comme un nouvel élément d'identité potentiel. La disparition des éléments d'identité propres au système aspartate est intrigante et distingue ce système mitochondrial des autres systèmes d'aspartylation déjà étudiés. Cela a motivé l'étude de l'identité du système aspartate mitochondrial humain par une analyse *in vitro* entreprise au laboratoire. Ce travail a été mené principalement par A. Fender dans le cadre de sa thèse. Il a consisté, d'une part, en une mutagenèse dirigée des positions clés dans l'identité aspartate classique ainsi que de celles de l'identité aspartate mitochondriale supposée et à la comparaison de la capacité d'aminoacylation *in vitro* de l'ARNt^{Asp} mt humain sauvage (molécule de référence, transcrite *in vitro*) à celle des molécules mutées (transcrites *in vitro*). D'autre part les résultats obtenus combinés à ceux d'une mutagenèse dirigée de l'AspRS ont révélé : (i) une dégénérescence de l'identité d'aspartylation mt humaine privée de la position 73 et restreinte uniquement à deux nucléotides : U35C36 et (ii) une adaptation de l'AspRS mt humaine en réponse à la

dégénérescence de son substrat en modifiant de façon subtile et ciblée son site actif permettant alors un relâchement des contacts locaux.

J'ai participé à ce travail en analysant d'un point de vue structural l'incidence de la mutation de la position 38. En effet, la mutation A38C apportant un des éléments d'identité aspartate classique, a amené un gain d'activité considérable. Mais, bien qu'ayant un effet sur les capacités d'aminacylation de l'ARNt^{Asp} mt humain, l'analyse comparative de la structure en solution (testée par sondes enzymatiques) des boucles anticodon des ARNt^{Asp} sauvages natif et transcrit *in vitro* et de l'ARNt^{Asp} transcrit *in vitro* présentant la mutation A38C a montré que celui-ci était dû à une restructuration de la boucle anticodon (après mutation) de l'ARNt transcrit *in vitro* et non à une perturbation de l'identité de cet ARNt.

E. MicroARN et ARNt mt humains, y aurait-il un lien ?

1. Les ARNt mt humains : de bons candidats pour être des miARN ?

L'analyse structurale de l'ARNt^{Asp} mt humain transcrit *in vitro* présentée dans l'article n°1 a révélé qu'en plus de posséder une structure secondaire en feuille de trèfle, cet ARNt pouvait également adopter un repliement en tige boucle (Figure 16). Il s'avère que cet ARNt n'est pas tout à fait un cas particulier car une structure en tige boucle a également été observée pour l'ARNt^{Lys} ((Helm et al., 1998), Figures 12 et 16). Cette structure alternative, observée dans le cas des transcrits *in vitro*, a jusqu'à présent été attribuée à l'absence de bases modifiées qui assistent l'établissement de la feuille de trèfle comme il a été montré pour la méthylation du nucléotide 9 de l'ARNt^{Lys} mt humain (Helm et al., 1998) et révélait ainsi un artefact structural apporté par les molécules synthétisées *in vitro*. Aucune fonction, différente de l'aminoacylation, n'avait alors jamais été supposée pour ces structures alternatives.

Cependant, Maniataki et Mourelatos ont montré, par des expériences de northern blot sur des ARN immunoprécipités avec la protéine Argonaute 2, que l'ARNt^{Met} mt humain se trouvait également dans le cytosol de cellules humaines en interaction avec cette protéine (Maniataki & Mourelatos, 2005). Argonaute 2 est une endonucléase qui clive spécifiquement des ARN complémentaires aux micro ARN (miRNA) ou aux « silencing » RNA (siRNA) (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004), au cours du mécanisme de régulation de l'expression des gènes, appelé ARN interférence. Lors de ce processus, des molécules d'ARN double brin, produites de manière endogène ou d'origine exogène, induisent une dégradation spécifique de molécules d'ARNm, inhibant ainsi l'expression de la protéine relative à ce dernier (Fire et al., 1998) (Figure 15). La cascade mécanistique de l'ARN interférence débute par la maturation, grâce à la protéine Dicer, d'un ARN double brin précurseur (~70 à 80 nucléotides) structuré en épingle à cheveux en un ARN régulateur de l'expression des gènes, appelé miARN (~21 à 26 nucléotides) (Grishok et al., 2001).

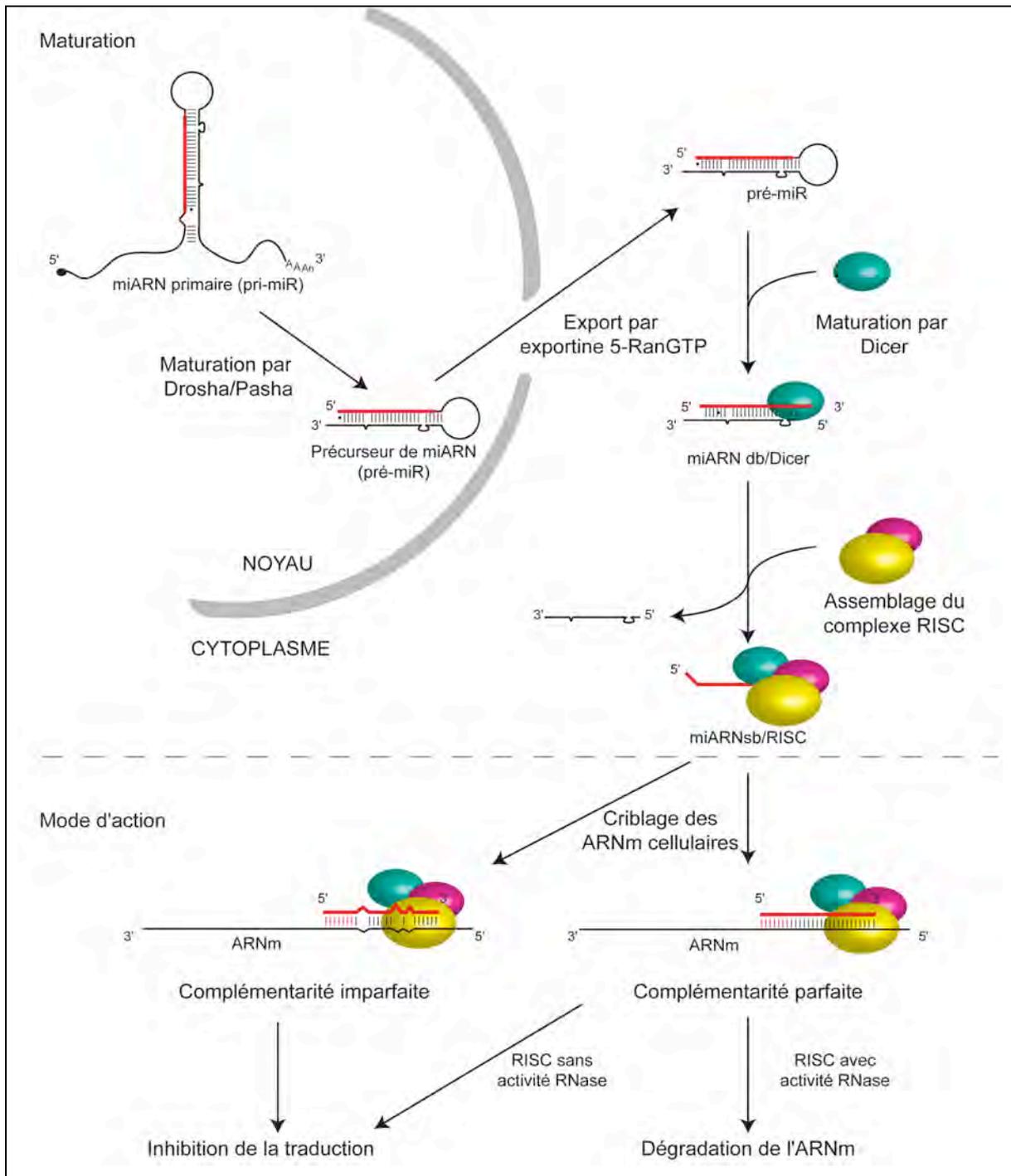


Figure 15. Biosynthèse, structure et mécanisme d'action des miARN. La séquence correspondant au miARN mature est représentée en rouge dans l'insert. Figure extraite du manuscrit de thèse de Michaël Ryckelynck (thèse soutenue en 2005).

La structure en épingle à cheveux des ARNt mt humains rappelle celles des ARN précurseurs des miARN (Figure 16). Ceci, combiné à la découverte de Maniatakis et Mourelatos, nous a amené à poser l'hypothèse d'un lien jusqu'alors insoupçonné entre les ARNt mitochondriaux et l'ARN interférence et à considérer ces ARNt comme candidats potentiels au clivage par Dicer. Cette nouvelle fonction présumée pourrait répondre à une problématique fondamentale posée par certaines mutations pathologiques qui, bien que

touchant des ARNt mt humains, n'affectent ni leur biosynthèse ni leur fonction dans l'aminocyclation. Elles seraient donc susceptibles d'affecter une fonction alternative qui pourrait peut-être être liée à l'ARN interférence.

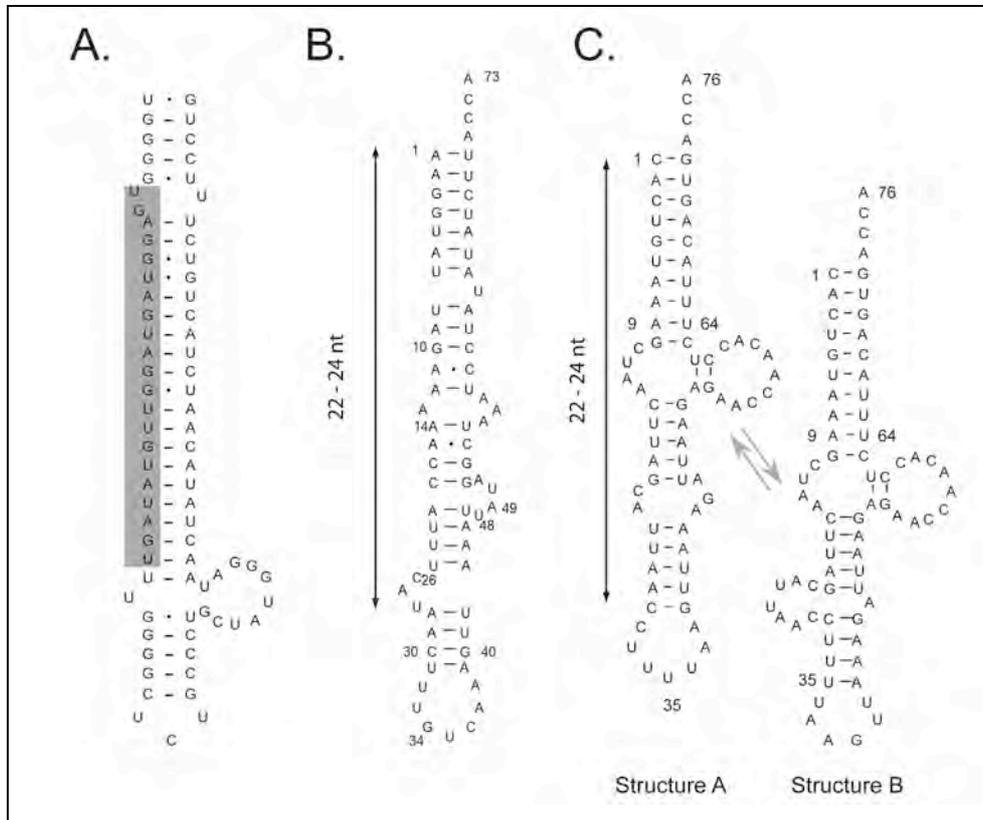


Figure 16. Structures en tige boucle de Let-7 et de deux ARNt mitochondriaux humains. A. Structure de Let-7 (Pasquinelli et al., 2000), substrat connu de Dicer. Le fragment de 22 nucléotides obtenus après coupure par Dicer est encadré en gris. B. Structure en épingle à cheveux de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain. C. Structures en épingle à cheveux de l'ARNt^{Lys} mitochondrial humain (Helm et al., 1998).

2. Maturation des ARNt mitochondriaux humains transcrits *in vitro* par Dicer

Afin de débiter l'étude de l'implication potentielle des ARNt mt humains dans le mécanisme de l'ARN interférence, nous avons décidé de soumettre ces molécules à la protéine Dicer humaine (don de F. Kolb et W. Filipowicz, Bâle), d'analyser les tailles des produits de digestion obtenus et le cas échéant de les comparer à celle du produit de digestion de l'ARN Let-7 (don de F. Kolb et W. Filipowicz, Bâle), substrat connu de Dicer et digéré en un fragment de 22 nt (Provost et al., 2002). La stratégie expérimentale ainsi que les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

3. Stratégie expérimentale

L'expérience de digestion par Dicer a été menée sur différentes molécules radiomarquées présentées dans la figure 16, d'après le protocole détaillé dans la partie Matériel et Méthodes. L'ARN Let-7 a été utilisé comme contrôle. L'expérience a également été étendue à un mutant de l'ARNt^{Lys} mt humain (ARNt^{Lys} K_{im}) (Helm et al., 1998) et à l'ARNt^{Asp} de levure, transcrits *in vitro*, qui ont tous deux une structure secondaire exclusivement en feuille de trèfle. Ces contrôles ont été réalisés afin de comparer les profils de coupure par Dicer des deux types de structures (épingle à cheveux/feuille de trèfle) et de vérifier, dans le cas échéant, que les produits de digestion de taille approchant 22 nt sont uniquement apportés par la structure en tige boucle. Enfin, différents temps d'incubation en présence de Dicer ont été testés et afin de différencier les coupures par Dicer des dégradations spontanées des ARNt mt humains engendrées par les sites de fragilité des dinucléotides CpA et UpA (Figure 17), des expériences contrôles sans Dicer ont été menées.

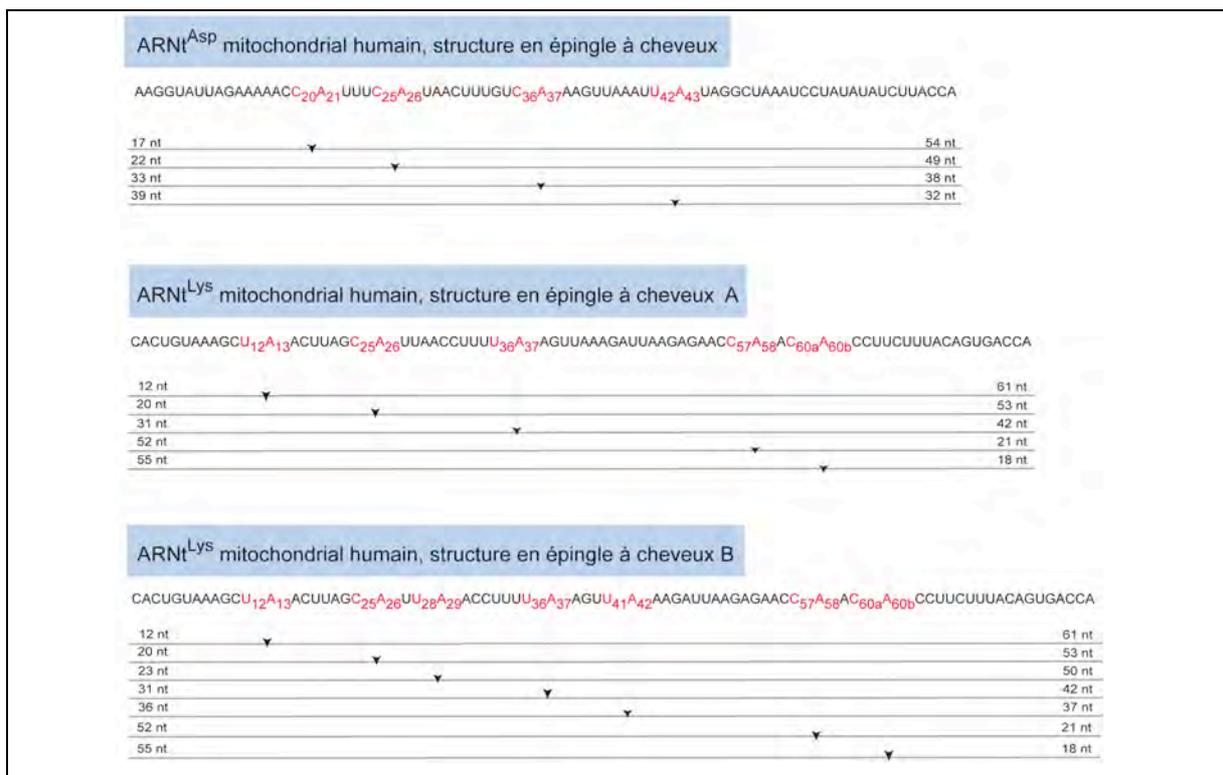


Figure 17. Représentation linéaire des sites de fragilité CpA et UpA au sein des structures en épingle à cheveux des ARNt^{Asp} et ARNt^{Lys} mitochondriaux humains. Les dégradations spontanées sont représentées par des flèches, et les tailles des fragments générés sont indiquées.

4. Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 18 et 19 et sont discutés dans le paragraphe ci-dessous.

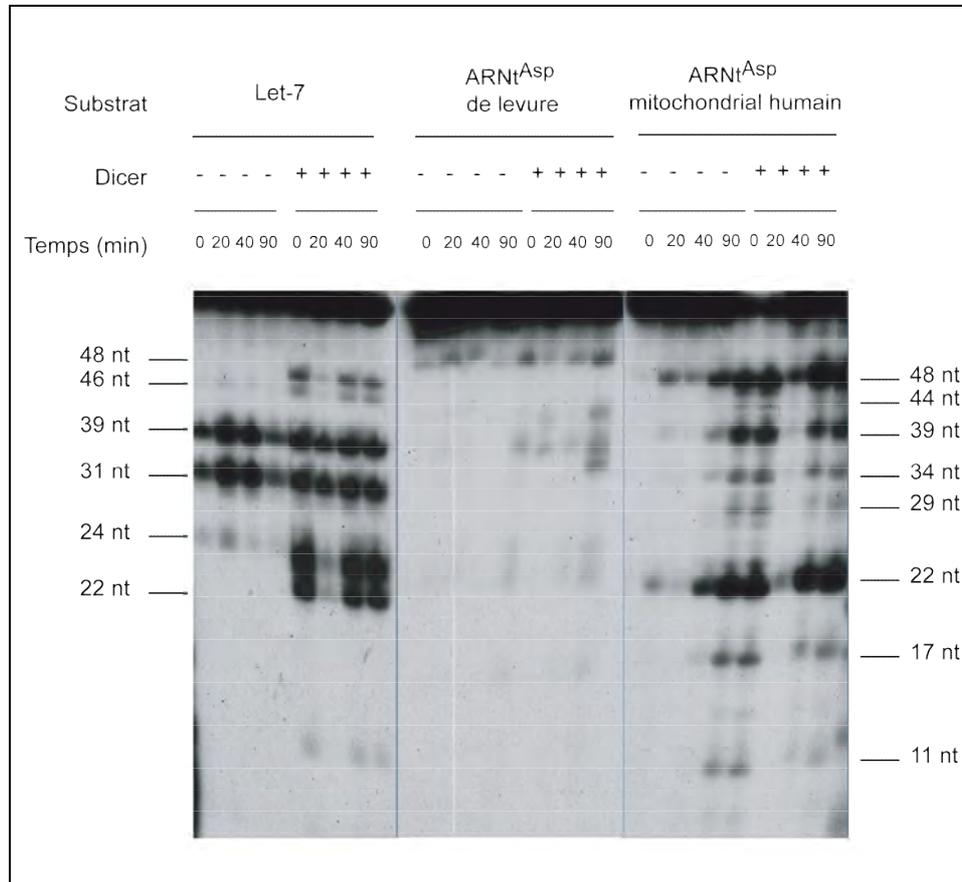


Figure 18. Coupure de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain par Dicer. Les tailles des produits de coupures sont indiquées à gauche pour Let-7 et à droite pour l'ARNt^{Asp} mt humain et ont été calculées sur la base des dégradations spontanées connues et observées pour l'ARNt^{Asp} mt humain (22, 39 et 48 nt) entre les dinucléotides CpA et UpA. L'absence (-) et la présence (+) de Dicer ainsi que les temps d'incubations sont indiqués en haut de la figure.

La digestion du substrat Let-7 par Dicer conduit à différents produits de clivage (Figure 18 et 19), avec cependant, deux produits de coupure majoritaire correspondant à des tailles de 22 et 24 nucléotides. Ils proviennent de deux clivages par Dicer en deux sites différents au sein de l'ARN Let-7 (Figure 18). Les bandes correspondant à des tailles de 31 et 39 nt sont retrouvées à la fois en absence et en présence de Dicer et correspondent à des dégradations spontanées (Figure 18). Enfin, les produits de taille 46 et 48 nt correspondent à des produits intermédiaires de clivage par Dicer, résultats d'une seule coupure à l'un des deux sites de clivage au sein de Let-7 (Figure 16). La taille de 22 nt, étant en accord avec le produit

de coupure déjà obtenu expérimentalement par (Provost et al., 2002), a permis de valider les différents résultats de cette expérience.

L'ARNt^{Asp} de levure ne conduit qu'à 4 produits de coupure d'intensité faible (par comparaison avec celles observées pour les autres substrats), toutes supérieures à 34 nucléotides (Figure 18). Ce résultat confirme que cette molécule en feuille de trèfle n'est pas substrat de Dicer.

L'interprétation des résultats obtenus pour l'ARNt^{Asp} mt humain est plus délicate. Tout d'abord, de nombreux fragments sont visibles tout au long du gel, dont un de 22 nt. Cependant ils sont également présents dans le contrôle en absence de Dicer (particulièrement bien visibles après 90 min d'incubation). Ils pourraient donc correspondre à une amplification de coupure non spécifique à Dicer. L'exploitation de la séquence de l'ARNt^{Asp} mt humain montre que les fragments de 22, 39 et 48 nt correspondent à des dégradations spontanées bien connues entre les résidus CpA et UpA. Deux interprétations sont possibles : soit le fragment de 22 nt correspond à une coupure par Dicer (car son intensité est plus forte que celui du contrôle sans Dicer) soit, il est le résultat d'une amplification des coupures naturelles, dues aux nombreux sites de fragilités CpA et UpA dans l'ARNt^{Asp}.

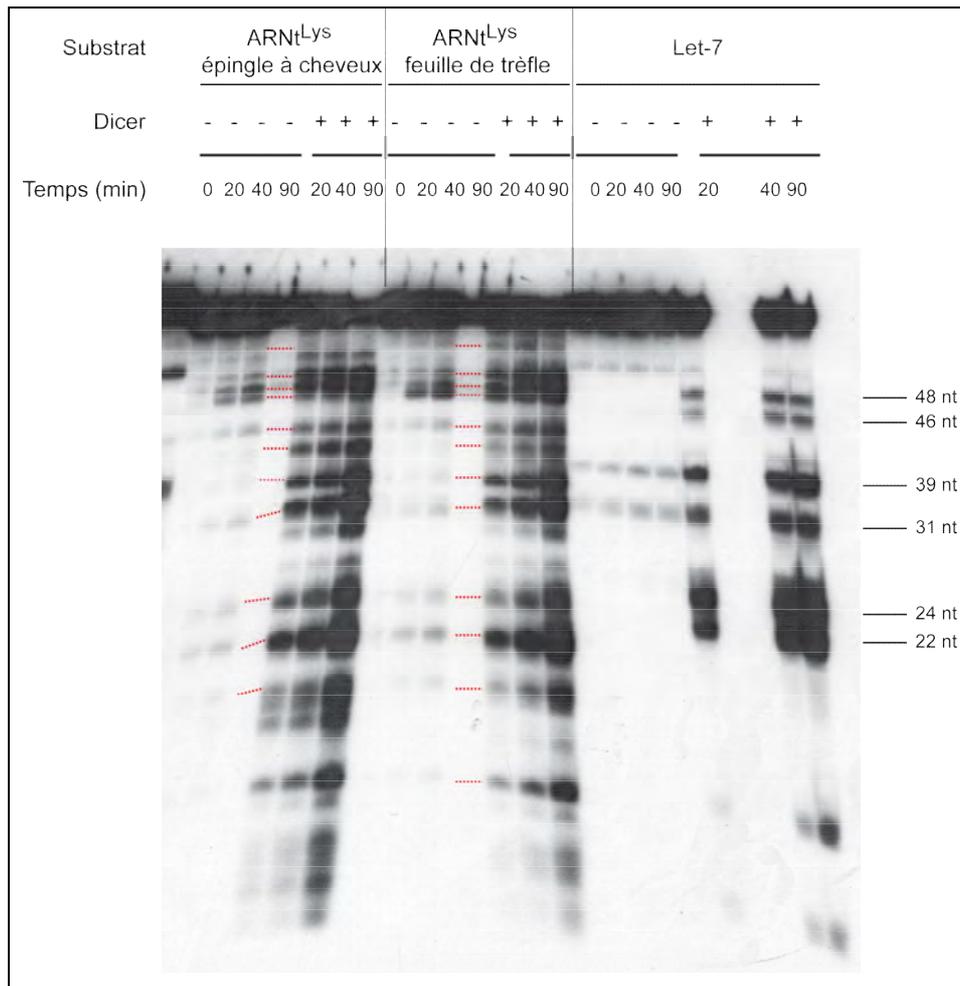


Figure 19. Coupure des ARNt^{Lys} mitochondriaux humains par Dicer. Les tailles des produits de coupures de Let-7 sont indiquées à droite. Celles-ci font référence à celles établies lors de l'expérience réalisées en parallèle de l'ARNt^{Asp} mt humain (Figure 15). L'absence (-) et la présence (+) de Dicer ainsi que les temps d'incubations sont indiqués en haut de la figure. Les pointillés rouges font la correspondance entre les bandes visibles en absence et en présence de Dicer.

L'ARNt^{Lys} sauvage humain transcrit *in vitro* ne se replie pas en feuille de trèfle mais en épingle à cheveux (Figure 16C). À l'inverse l'ARNt^{Lys} K_{im}, présentant une mutation au niveau du bras T empêchant un appariement avec le résidu 9, se replie principalement en feuille de trèfle (Helm et al., 1998). Pour les deux molécules, il existe cependant un équilibre entre ces deux conformations extrêmes en faveur de l'une ou de l'autre selon le cas (Helm et al., 1998). La figure 19 présente, pour le substrat Let-7, les profils d'hydrolyse typiques obtenus. Les deux ARNt conduisent à de nombreux fragments (*quasi* identiques dans les deux cas) en présence de Dicer. Bien que nettement plus intenses que dans les contrôles obtenus en absence de Dicer, il s'avère que tous les fragments sont déjà présents en absence de l'enzyme. Ceci rend l'interprétation des résultats difficile tout comme le cas présenté par l'ARNt^{Asp} mt humain car il n'est pas possible, en l'état, de distinguer les coupures spécifiques par Dicer (si elles existent) de celles qui seraient des amplifications d'hydrolyses spontanées aux sites de

fragilité intrinsèques aux ARNt mt. Enfin, les profils étant les mêmes pour les deux versions de l'ARNt^{Lys}, il n'y a *a priori* pas d'incidence de l'existence ou non d'une structure en tige boucle par rapport à une structure en feuille de trèfle.

Ces expériences ne nous permettent pas de conclure quant à une prise en charge des ARNt mt humains par Dicer. D'autres expériences sont maintenant à envisager afin de poursuivre l'étude de l'implication de ces ARN dans le processus de l'ARN interférence. Par exemple, à l'image de celle entreprise par Maniataki et Mourelatos, une immunoprécipitation de Dicer au sein de cellules humaines en culture (transfectées avec Dicer) permettrait de rechercher ensuite par Northern blot si cette protéine est accompagnée par des ARNt mt humains ou pas. Une autre expérience de Northern blot sur un extrait total d'ARN de cellules humaines pourrait s'avérer judicieuse afin de révéler la présence de petits fragments d'ARN de 20-25 nt dont les séquences correspondraient à des bouts d'ARNt mt humains suggérant alors que ceux-ci seraient effectivement des précurseurs de miARN.

Running title: Tertiary structure of human mitochondrial tRNA^{Asp}

**Solution structure of human mitochondrial tRNA^{Asp} revealed by enzymatic
and chemical probing**

Messmer Marie, Pütz Joern, Sauter Claude, Sissler Marie and Catherine
Florentz¹

Architecture et Réactivité de l'ARN, Université Louis Pasteur, CNRS, IBMC 15 rue René
Descartes, 67084 Strasbourg, France

* Corresponding author:

Catherine Florentz

UPR 9002 du CNRS - IBMC

15, Rue René Descartes

67084 Strasbourg Cedex

France

Tél: 33 3 88 41 70 59

Fax: 33 3 88 60 22 18

Email: C.Florentz@ibmc.u-strasbg.fr

Abstract

Primary and secondary structures of mammalian mitochondrial (mt) tRNAs are divergent from canonical tRNA structures due to high screws in nucleotide content and large size variability of D- and T-loops. Non-conservation of nucleotides necessary for establishment of the expected network of tertiary interactions gives rise to questions about the rules governing a functional L-shaped 3D structure. Here, we report the solution structure mapping of human mt-tRNA^{Asp} as an *in vitro* transcript and in its native form after extraction from HeLa cells, towards definition of 3D elements. Probing has been performed with nucleases specific for single-stranded domains (nuclease S1) or higher-ordered domains (ribonuclease V1) as well as with chemicals (DMS allowing probing of N3C; DEPC allowing probing of N7A).

While probing data fit with a single conformation of the native tRNA, they reveal a mixture of folds for the *in vitro* transcribed RNA. For native tRNA, results were concordant with those observed previously with the same structural probes on classical tRNAs in regard to reactivity of nucleotides involved in the core of the L-shaped 3D structure. This enabled the construction of a 3D model for human mt-tRNA^{Asp}, based on the existence of all classical tertiary interactions between the D-domain and the variable region forming the core of the structure. In regard to the corner of the L, our data favour the absence of interactions between D- and T- loops, which miss conserved residues. Accordingly, a freedom for the angle formed by the two branches of the L-shaped molecule is allowed. The 3D building rules for human mt-tRNA^{Asp} apply to mt-tRNA^{Asp} from many other mammals despite they are not strictly conserved.

Abbreviations: DMS, dimethylsulfate ; DEPC, diethylpyrocarbonate.

Keywords : mammalian mitochondria; tRNA; structure probing in solution; tertiary interactions, 3D modelling

Introduction

Transfer RNAs (tRNAs) constitute key molecules in protein biosynthesis in all living organisms. To fulfill their biological role, they have specific structural properties allowing peculiar interactions with several partners such as the cognate aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS), elongation factor, the mRNA or the ribosome. Presently, several thousands of tRNA sequences are known ¹. A vast majority of them can be folded into the canonical cloverleaf secondary structure, and furthermore into a three-dimensional functional L-shape (reviewed in *e.g.* refs. ^{2;3}). Transition from 2D to 3D structure is supported by nine tertiary interactions involving conserved and semi-conserved residues that are localized within the D- and the T-loops on one side, and within the core of the molecule (connector regions, D-stem and variable region), on the other side. The tertiary interaction network, conserved in bacteria, archae and eukaryotic cytosols, consists in hydrogen bounds between either two nucleotides at distance namely R15-Y48, G18-Ψ55, G19-C56, 26-44 and U54-A58, or three nucleotides, namely U8-A14-21, 9/12-23, 13-22/46 and 45/G10-Y25 ^{4;5;6;7} (reviewed in *e.g.* ref. ³).

A major unanswered question however concerns the 3D folding rules of mammalian mt tRNAs. Sequence comparison of these tRNAs allowed so far the description of typical characteristics of secondary structures and highlighted “bizarre” features ⁸. With the exception of tRNA^{Ser(AGY)} missing the full D-domain and tRNA^{Ser(UCN)} with an extended anticodon stem, mammalian mt-tRNAs present a global cloverleaf structure but with unprecedented size variations in both D- and T-loops and lack of a number of conserved and semi-conserved residues essential to the establishment of a classical tertiary interaction network. Only four families (tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Leu(CUN)}, tRNA^{Gln}, and tRNA^{Asn}) show strong conservation of all nine potential classical tertiary interactions, including those between the D- and T-loops, and may thus well fold into a canonical L-fold. For all other families, a gradual disappearance of the theoretical tertiary interactions is observed. Concerning extreme examples only three of the classical tertiary interactions can be predicted ⁸. Only a few of these tRNAs have been investigated experimentally in regard to their 3D structural features. These include the two atypical tRNA^{Ser(UCN)} ^{9;10} and tRNA^{Ser(AGY)} ¹¹ as evaluated by enzymatic and chemical structure probing in solution and tRNA^{Ser(AGY)} (missing the D-domain) for which a nuclear magnetic resonance (NMR) structure was established ¹¹. Additionally, transient electric birefringence experiments showed that the angle between the two branches of the “L” are more obtuse for these two tRNAs and for human mt-tRNA^{Lys} than for classical tRNAs (120°-140° as

compared to 70°-90° respectively) ^{12; 13}. In the single case of bovine tRNA^{Phe}, solution mapping experiments with enzymatic and chemical probes lead to 3D structural information on a moderately diverging "bizarre" mt-tRNA ¹⁴. The absence of conserved nucleotides G18G19 and T54ΨCG57 in the D- and T-loops respectively, leads to an absence of interaction between the corresponding domains at the corner of the expected "L". Otherwise, the presence of the 6 expected tertiary interactions within the core of the tRNA, is supported experimentally.

For a better understanding of the rules governing the folding of mammalian mt-tRNAs, we have tackled the case of the human mt-tRNA^{Asp} by structural mapping in solution with enzymatic and chemical probes. This tRNA has already been investigated in regard to its content in identity signals for specific aspartylation by human mt AspRS ¹⁵. This tRNA has a severely reduced number of such signals in comparison with tRNA^{Asp} from other kingdoms, with only two important elements in the anticodon triplet and the loss of the discriminator nucleotide G73, suggesting a strongly degenerated situation in mammalian mt aspartylation system ¹⁵. Knowledge on the degree of concomitant structural degeneration of the tRNA is worth investigation for a better understanding of tRNA structure/function evolution in mitochondria. Experiments were performed on both native tRNA extracted from HeLa cells, containing all the post-transcriptional modifications, and the corresponding *in vitro* transcript. Due to the difficulty of access to native human mt-tRNA, *in vitro* transcripts are expected to represent valuable tools for biochemical investigation of the mitochondrial translational machinery ¹⁶.

Herein, a cloverleaf structure was retrieved as secondary structure for the native tRNA^{Asp} while a combination of three conformations including the cloverleaf has been discovered for the *in vitro* transcribed RNA. In regard to 3D structure, reactivity towards structural probes in both the cloverleaves is in favor of the existence of an extensive network of interactions in the core of the L-shaped structure. Data fit with a 3D model built on the basis of *E. coli* tRNA^{Asp}. However, they are in support of a total absence of interactions between the D- and T-loops and suggest that the angle formed by the two branches of the L can undergo some variability. The relevance of the rules governing the 3D structure of human mt-tRNA^{Asp} to other mammalian mt tRNAs will be discussed.

Materials and Methods

Materials

Diethylpyrocarbonate (DEPC), aniline, hydrazine, TRI REAGANT®, 5'-biotinylated oligonucleotide and Streptavidin-coated beads were purchased from Sigma-Aldrich. Nuclease T1 was from Stratagene, nuclease S1 as well as ribonuclease V1 were from PIERCE. Dimethyl sulfate (DMS) was bought from Acros Organics. [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol) was from Amersham.

Purification of native mitochondrial tRNA^{Asp} from HeLa cell mitochondria

Native tRNA was prepared from HeLa cell mitochondria. Total mitochondrial tRNAs were extracted by using the TRI REAGANT® method following the manufacturer's procedure. Specific mitochondrial tRNA^{Asp} was isolated from total tRNAs as previously described in ^{17; 18} by hybridization to a 5'-biotinylated oligonucleotide bound to streptavidin coated beads and complementary to 34 nucleotides at the 5' end of the tRNA.

Production of mitochondrial tRNAs by *in vitro* transcription

Human mt-tRNA^{Asp} has been cloned previously ¹⁹. The corresponding synthetic gene contains a hammerhead ribozyme ²⁰ and tRNA sequence downstream the T7 polymerase promoter. A *Bst*NI site was inserted coincidental with the 3'-end of the tRNA sequence, which allows synthesis of tRNA ending with the expected CCA sequence. *In vitro* transcription was performed as described in ¹⁹ with adequate amounts of T7 RNA polymerase (purified according to ²¹). After phenol extraction, the transcript was purified on denaturing 12% polyacrylamide/8M urea gels, electroeluted and ethanol-precipitated.

Structural mapping in solution

Structural mapping of tRNAs was done using enzymatic (nuclease S1, specific to single stranded region and ribonuclease V1, specific to double or highly structured region) and chemical (DMS, specific to N3 of cytosine, DEPC, specific to N7 of adenine, and lead, specific for single stranded regions) probes. Labeling of the tRNA transcript 5'-end and the subsequent purification of tRNA molecules from polyacrylamide gels were carried out as described earlier ²². Before structural probing, transcripts were denatured by heating at 60°C in H₂O and slowly cooled down to room temperature.

Enzymatic probing. Digestion with nuclease S1 or ribonuclease V1 were performed as described in ²². Briefly, transcripts were incubated in 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 10 mM MgCl₂ and 25 mM KCl for 5 min at 25°C. For digestion with S1 nuclease, 1 mM ZnCl₂ was added. Reaction mixtures (10µl) contained 30,000 Cerenkov cpm of transcript supplemented with 2 µg of unlabeled *E. coli* total tRNA and either 12.8 U nuclease S1 or 3.6.10⁻² U RNase V1. Cleavage reactions were performed during 5 min at 25°C and were stopped by adding one volume of 0.6 M AcONa pH 5, 3 mM EDTA, and 0.1 mg/ml *E. coli* total tRNA followed by ethanol precipitation. For assignment of cleavage positions, alkaline ladders were performed by incubation of labeled transcripts (30,000 Cerenkov cpm) and 2 µg of total tRNA from *E. coli* in 50 mM NaHCO₃ pH 9, at 80°C for 8 min. Guanine ladders were obtained by incubation of labeled transcripts in 10 mM NaH₂(C₃H₅O(COO)₃) pH 4.5, 3.2 M urea, 0.4 mM EDTA and 2 µg of unlabeled *E. coli* total tRNA for 4 min at 60°C followed by the addition of 2 U T1 and a second incubation at 60°C for 4 min. The products of the probing reactions were analyzed on 12% polyacrylamide/8M urea denaturing gels. Controls without probes but supplemented with ZnCl₂ were run in parallel on each gel.

Lead (II) Acetate probing. Cleavage by Lead(II) Acetate probing was performed as described in ²³. Briefly, transcripts were incubated in 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 5 mM Mg(OAc)₂ and 50 mM K(OAc) for 10 min at 25°C. A freshly prepared Pb(OAc)₂ solution in water was added to final concentrations of 5 and 25 mM. Samples (10 µl) were incubated at 25°C for 5 min. Reactions were stopped by cooling on ice, adding EDTA to a final concentration of 33 mM and ethanol precipitated. Control without probe was run in parallel.

Chemical probing. Modification of N7 atoms of guanine residues and of N3 atoms of cytosine residues by dimethylsulfate (DMS), and modification of N7 positions of adenine by diethylpyrocarbonate (DEPC) were done according to established procedures ²⁴. Optimal concentration of chemicals and incubation times for mt-tRNA transcripts were chosen as described ²². Under native conditions, DMS reactions were for 10 min at 25°C in 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 5 mM MgAc, 50 mM KOAc and 2 mM β-mercaptoethanol. Semi-denaturing conditions were for 5 min at 25°C in 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 50 mM KOAc, 1 mM EDTA and 2 mM β-mercaptoethanol. Denaturing conditions were for 30 sec at 60°C in 50 mM HEPES-NaOH pH 7.5 and 1 mM EDTA. DEPC modification was as with DMS but incubation time were 10 and 20 min for native and semi-denaturing conditions and

5 sec for the denaturing one. Cleavage reactions were performed for 10 min in the dark at 60°C using 10 µl of a modified aniline solution (100 µl 1M aniline, 60 µl CH₃COOH and 930 µl H₂O). Concerning the DMS, the cleavage reaction was preceded by a second modification using 10 µl hydrazine 50% (v/v in water) for 5 min in the dark. Between all the modification and the cleavage steps, tRNAs were ethanol precipitated. All cleavage products were analyzed on denaturing polyacrylamide gels as described below.

Assignment of cleavage positions. Alkaline ladders were performed by incubation of labeled transcripts (30.000 Cerenkov cpm) and 2 µg of total tRNA from *E. coli* in 50 mM NaHCO₃ pH 9, at 80°C for 8 min. Guanine ladders were obtained by incubation of labeled transcripts in 10 mM NaH₂(C₃H₅O(COO)₃) pH 4.5, 3.2 M urea, 0.4 mM EDTA and 2 µg of unlabeled *E. coli* total tRNA for 4 min at 60°C followed by the addition of 2 U T1 and a second incubation at 60°C for 4 min. The products of the probing reactions were analyzed on 12% polyacrylamide/8M urea denaturing gels. Controls without probes but supplemented with ZnCl₂ were run in parallel on each gel.

Mt-tRNA^{Asp} 3D modeling

A 3D model of human mt-tRNA^{Asp} was built using *modeller*²⁵ on basis of the crystallographic structure of *E. coli* tRNA^{Asp} in complex with AspRS (PDB id: 1C0A)²⁶. Sequence changes as well as base and phospho-ribose backbone manipulations were performed with *O*²⁷. Energy minimization steps were performed with CNS²⁸. Figures were prepared with PyMol²⁹.

Results

1. Background

Figure 1 (A) recalls nucleotides involved in the network of tertiary interactions sustaining classical tRNA 3D structures (tRNAs from bacteria, archae, eukaryotic cytosol) (reviewed in ³). Nine interactions are present. Most of the network takes place in the core of the molecule, namely the D-arm and the variable region, involving nucleotides either pairwise at long-distance (*i.e.* R15-Y48, N26-N44 with R for purine, Y for pyrimidine, N for any nucleotide), or triples with a base-pair formed along the secondary structure and a single nucleotide at distance (*i.e.* 9/12-23, 13-22/46, 45/10-25), or nucleotides unrelated in the secondary structure (*i.e.* U8-A14-A21). Three further interactions involve the T- and D-loops, with one interaction within the T-loop (U54-A58) and two interactions bringing the two loops close to each other (G18-Ψ55, G19-C56), to form the elbow of the "L". Human mt-tRNA^{Asp} (Fig. 1B) deviates from canonical tRNAs by smaller D- and T-loops and by the lack of several conserved and semi-conserved residues essential to the establishment of the tertiary interaction network. Strategic nucleotides, especially nucleotides G18 and G19 in the D-loop, and nucleotides U54U55C56 of the T-loop are absent, leaving open the question of interaction between both loops. By analogy to classical tRNAs, potential tertiary interactions in the core of the 3D structure would include A15-U48, A26-A44, A9/A12-U23, A13-U22/U46, A45/G10-C25 and U8-A14-A21. From these, only 4 would be conserved when considering tRNA^{Asp} sequences from the full set of available mammalian mitochondria sequences ^{8; 30} (Fig. 1C). The existence of the triple interaction A9/A12-U23 has recently been confirmed, in the scope of investigation of the incidence of the myopathy-related mutation A7526G (A9G) on structure and aminoacylation properties of mt-tRNA^{Asp} ³¹.

Structure probing in solution is based upon the reactivity of RNA molecules towards chemicals or enzymes that have a specific target on RNA (reviewed in *e.g.* ^{32; 33; 34}). Probes are used under statistical conditions where less than one cleavage or modification occurs per molecule. In the present work, accessibility of the human mt-tRNA^{Asp} has been probed under native conditions by nucleases specific to single-stranded (nuclease S1) and double-stranded or structured regions (ribonuclease V1). While the use of these enzymatic probes allows deciphering of the overall secondary structure of the RNA, a more precise investigation at the atomic level involves the chemical probes dimethylsulfate (DMS), diethylpyrocarbonate (DEPC) and lead (Pb⁺⁺). DEPC modification at N7 position of adenine residues and DMS

modification at N3 position of cytosine residues can be detected by strand scission with aniline. If these atoms are accessible and reactive in the RNA 3D structure they become detected under native conditions. If they are involved in secondary or tertiary structural elements, they are non-reactive under native conditions but become detectable under semi-denaturing and fully denaturing conditions.

2. Enzymatic and chemical solution structure of the native human mitochondrial tRNA^{Asp}.

Probing experiments have been performed at 25°C, tRNA molecules were 5'-end or 3'-end labeled and cleavage fragments were revealed on denaturing 12% polyacrylamide gels. Representative autoradiograms of enzymatic cleavage of native tRNA^{Asp} are presented in Figure 2A and results of extensive probing with both enzymatic and chemical probes, are summarized on a cloverleaf structure (Fig. 2B). Control incubations without probes confirmed the intrinsic weakness of human mt-tRNAs at pyrimidine-A bounds as already described for tRNA^{Lys} 22 and tRNA^{Leu(UUR)} 35. All degradations are annotated on the autoradiograms as well as on the cloverleaf structure. For technical reasons, residues 1 to 10 and 74 to 76 could not be investigated.

Typical reactivity of native tRNA^{Asp} corresponds to strong cleavages by single-strand specific nuclease S1 all along residues 14 to 20 (correspond to the end of the theoretical D-stem and to the D-loop), residues 32 to 35 (anticodon loop), residues 44 and 45 (variable region) and residues 55 and 56 (T-loop), as well as cleavages by the double strand specific ribonuclease V1 all along nucleotides 28, 29 (anticodon stem), 43 (end of anticodon stem/entry of variable region), nucleotides 62 to 65 (T-arm) and nucleotides 69, 70 and 72 (acceptor arm). Significant alkylation by DMS under native conditions, as revealed by direct strand scission, is observed at the N3 position of residues C16 and C20 (D-loop), C36 (anticodon loop) and C54 (T-loop), whereas residues C26 (D-arm), C30 (anticodon arm) and C61 and C62 (T-arm) are not reactive under native conditions (not shown). These residues become fully reactive under denaturing conditions. Reactivities of adenines to DEPC under native conditions are strong for residues A21 (D-loop), A37 and A38 (anticodon loop), and A56 and A57 (T-loop), while residues A11 to A13 (D-arm), A28 and A29 (anticodon arm), and A49, A51 and A64 (T-arm) are not reactive. While the full set of these cleavage patterns is in agreement with loops and arms of a classical secondary cloverleaf structure, some additional reactivities have to be considered. Firstly, the phosphodiester bond 5' to nucleotide

C20 (D-loop) is cut by the ribonuclease V1. Unfortunately, the corresponding cleavage product co-migrates with the product of degradation between residues C20 and A21, therefore no conclusion about the involvement of residue C20 within a tertiary interaction can be proposed. Secondly, residues A12 and A13 (D-arm) are reactive towards the single-strand specific nuclease S1. Thirdly, N7 atoms of adenine located within loops (A14, A44, A45 and A58) or connector (A26) are not reactive to DEPC. These nucleotides are therefore candidates for an involvement in tertiary interactions.

3. Enzymatic and chemical solution structure of the *in vitro* transcribed human mitochondrial tRNA^{Asp}.

Probing experiments on *in vitro* transcribed mt-tRNA^{Asp} have been performed using the same enzymatic and chemical probes as for native tRNA, under similar conditions. In addition, reactivity to lead has been investigated. Representative autoradiograms are displayed in Figure 3A and the full set of reactivity under native conditions is summarized on the theoretical cloverleaf structure (Figure 3B). Control incubations without probes confirmed the intrinsic higher sensitivity of the *in vitro* transcribed mt-tRNA as compared to native tRNA extracted from human cells, at pyrimidine-A bounds (as already described^{8; 35}). These degradations are annotated along the autoradiograms as well as localized on the cloverleaf structure. As it was the case for the native tRNA, reactivities of residues 1 to 9 and 74 to 76 could not be observed.

Comparing the cleavage pattern of this molecule to the one of the native tRNA^{Asp}, same reactivities of residues A28 to C30, U32 to U41 and C61 to A73 towards enzymatic (nuclease S1 and ribonuclease V1) and chemical probes (DMS and DEPC) can be observed and are therefore compatible with a secondary cloverleaf structure. Reactivity of the variable region nucleotides to chemical probing (N7 of A44 and A45 are reactive to DEPC and A44 to U47 are sensitive to the lead) is also consistent with this secondary structure. However, the other nucleotides display a mixture of opposite reactivities. Thus, the D-arm contains information about structured but also opened region at once. A11 to A13 and U22 to U24 are cut by the double strand specific ribonuclease V1 but also by the single strand specific nuclease S1 and are sensitive to the lead probe. It should also be noticed that cleavages by the two latest single-strand specific probes are valid also for residues G10 and C25. Along the same trend, N7 atoms of residues A11 to A13 are reactive to DEPC. Two incompatible cleavage patterns within the theoretical D-loop are also observed. While N7A of adenine and

N3 of cytosine are reactive towards single-strand specific probes, nucleotides A14 to A21 are reactive to lead and nucleotide A14 to nuclease S1, ribonuclease V1 cuts can be observed for all the nucleotides belonging to the loop (A14 to A21). Two residues of the anticodon arm (U42 and A43) are reactive to the V1 (in agreement with the arm) but also to the lead. Additionally, N7 of A43 is reactive to DEPC. The T-arm is also concerned by these contradictions. Indeed, nucleotides A49 to A51 and C62 to A64 are cleaved by ribonuclease V1, N7 atoms of residues A49 and A64 as well as N3 atoms of residues C61 and C62, are not reactive towards chemical probes. Nevertheless, A49 and U50 are additionally sensitive to nuclease S1 and N7 of A51 is reactive to DEPC. Finally, reactivity of the N3 of C53 as well as the N7 of A55 and A56 towards the chemical probes, C53 to A55 towards the lead and A55 and A56 towards the nuclease S1 are in agreement with the T-loop. However, reactivity of N7 position of residue A58 to DEPC under semi-denaturing conditions and discrete cleavage by ribonuclease V1 of A55 are in agreement of an internal loop interaction (between A58 and C54).

Considering all these data, it can be concluded that the *in vitro* transcribed tRNA^{Asp} displays reactivities compatible with a mixture of alternative structures present simultaneously. Some reactivities are compatible with a secondary cloverleaf structure while others not. Figure 4 presents two possible alternative folds in addition to the cloverleaf, namely a cloverleaf with an open D-domain and an extended hairpin structure, for which reactivity to probes fits.

Discussion

I. Structural characteristics of *in vitro* transcribed tRNA^{Asp}

Enzymatic and chemical probing of the *in vitro* transcribed tRNA^{Asp} reflect the existence of a mixture of alternative structures. In addition to the expected classical cloverleaf, an alternative version with an unstructured D-domain fits with large nucleotide stretches cleaved by nuclease S1 or by lead, and reactivity to chemical probes under native conditions. A further alternative fold corresponds to an extended hairpin. In comparison to the initial cloverleaf, this structure maintains the 7 base-pairs of the acceptor stem and part of the anticodon domain. At opposite, the D- and T-domains are totally refolded and form numerous inter-domain base-pairs. The existence of multiple alternate structures of *in vitro* transcripts has already been observed for a few other human mt-tRNAs^{16; 36}. The first described case corresponds to mt-tRNA^{Lys} for which the *in vitro* transcript was initially estimated to not fold into a cloverleaf at all but rather into two alternative extended hairpins. Occurrence of a cloverleaf is dependent on the presence of modified nucleotides²². A single methyl group at position 9 (m1A9) is of major importance in this process. The methylation hinders base-pairing of nucleotide 9 with nucleotide 64 in the T-stem which can also be achieved by mutating A9 to C, or U64 to A or C. All these variants show cloverleaf-type probing patterns and are aminoacylated by human lysyl-tRNA synthetase while the wild-type transcript is not.^{37; 38} Single-molecule FRET analysis later revealed that the wild-type *in vitro* transcribed mt-tRNA^{Lys} does already exist in a conformational equilibrium between cloverleaf and hairpin structures and that methylation of residue A9 controls this equilibrium in favor of an active cloverleaf³⁹. Enzymatic and chemical probing experiments conducted on *in vitro* transcribed tRNA^{Ile}⁴⁰ and tRNA^{Leu(UUR)}^{35; 41; 42} confirmed the folding of these molecules into a secondary cloverleaf structure but further showed that they could additionally adopt alternative structures such as a cloverleaf with open D- and anticodon stems for the tRNA^{Leu(UUR)}³⁵. The corresponding likely "floppy" tertiary structure in regard to the anticodon arm of the expected L-shaped tRNA^{Leu(UUR)} becomes converted into a functional tRNA upon interaction with the cognate aminoacyl-tRNA synthetase⁴³. *In vitro* transcribed tRNA^{Tyr} preferentially folds into the cloverleaf²³. This is in-line with the ranking of human mt-tRNAs into two families according to the DNA-strand on which they are encoded, both strands being highly screwed in nucleotide composition⁴⁴. tRNA^{Tyr} is a G-rich, "heavy", human mt-tRNA and consequently

folds into a more stable structure than the highly A, U and C-rich "light" tRNAs including the above discussed tRNA^{Lys}, tRNA^{Ile} and tRNA^{Leu(UUR)} ⁸. The present data on human mt-tRNA^{Asp} solution structures are a new example demonstrating the intrinsic structural plasticity of "light" mt-tRNAs (primary sequence of tRNA^{Asp} contains 29A, 24U, 11C and 7G residues).

II. Structural characteristics of native human mt-tRNA^{Asp} extracted from HeLa cells

The enzymatic and chemical structure probing performed on native human mt-tRNA^{Asp} extracted from HeLa cells reveals a perfect fit between nucleotide reactivities and a cloverleaf 2D folding. The predicted stems (acceptor arm, D-, anticodon and T-stems) are reactive to ribonuclease V1 and non reactive to chemical probes. The predicted loops react the opposite, i.e. strong cleavages by nuclease S1 and important reactivity towards chemical probes. Interestingly however, there are also discrepancies between reactivities of some nucleotides or atomic positions within nucleotides according to their location in the secondary structure, allowing to tackle tertiary interactions.

Nucleotides within D- and T- loops deserve particular attention. In regard to the D-loop, all phosphodiester bonds are cleaved by single-strand specific nuclease S1, two major degradations occur between residues A15 and C16 and between residues C20 and A21; C16 and C20 are reactive to DMS modification on N3 atoms under native condition. N7 position of residue A21 is easily modified by DEPC under native conditions. Only N7 of residue A14 is protected against DEPC reactivity. The reactivity and accessibility of nucleotides within this loop exclude a possibility of interaction with another domain of the RNA. T-loop nucleotides are also very reactive to both enzymatic and chemical probes. Degradation between residues U55 and A56 is strong. Phosphodiester bonds 3' to residues U55 and A56 are accessible to single-strand specific nuclease S1; N3 C54, N7 A56 and N7A57 are reactive to DMS or DEPC under native conditions. Accordingly, the T-loop nucleotides are not protected against structural probes by any neighboring RNA domain. Altogether the present data exclude the possibility of D- and T-loop interaction in native human mt-tRNA^{Asp}. Non-reactivity of N7 of A58 likely reflects a staking with neighboring nucleotides C54 and/or U55. The absence of reactivity of N7 A14 fits with an interaction with residue U8 through a Hoogsteen interaction as in classical tRNAs ³. Further interaction of residue A14 with A21 is not supported experimentally, since N7 A21 is reactive to DEPC under native conditions.

The D-stem and variable region of mt-tRNA^{Asp} are rich in adenine residues. None of these adenines (A11 to A14, and A44 to A46) is reactive to DEPC under native conditions.

Accordingly, their N7 atoms are involved in a higher-order structure. They can be protected against DEPC either due to stacking to neighboring bases and/or due to hydrogen bonding in the scope of tertiary interactions. Non-reactivity of N7 A45 is in support with an involvement in the triple interaction G10-C25/A45 and non-reactivity of N7 A46 with an involvement in the triple A13-U22/A46. Non-reactivity of N7 of A26 and A44 is in agreement with their involvement in stacking. The existence of triple 9/12-23 has been previously supported experimentally, combining a structural and functional mutagenic approach³¹. Finally, there is no available experimental support for an interaction between residues 15 and 48.

In summary, chemical and enzymatic probing performed herein are concordant with those observed for classical tRNAs⁴⁵ and can be interpreted by at least five out of the 6 expected tertiary interactions taking place in the core domain of the tRNA, involving the D-domain and the variable region. A 3D graphics modeling of human mt-tRNA^{Asp}, on the basis of the crystallographic structure of *E. coli* tRNA^{Asp}²⁶, highlights the predicted interactions in the core of the molecule (Fig. 5). It also takes into account the absence of interactions between the D- and T-loops.

The present data come to the conclusion that the sole links between the acceptor branch and the anticodon branch of the L-shaped 3D structure of mt-tRNA^{Asp}, are restricted to the phosphodiester bonds between residues 7 and 8 on one hand, and 48 and 49 on the other hand (see Fig. 1). The angle formed by the two branches of the “L” is thus not defined in a strict way. This may be important for optimal adaptation of the partner macromolecules to fulfil the various aspects of mt-tRNA activity. Along this line, the tRNA structure remains to be defined during interaction with *e.g.* post-transcriptional modification enzymes, cognate aminoacyl-tRNA synthetase, or mito-ribosomal A, P, E-sites. Large plasticity of tRNA structure is required for each of these partnerships when classical tRNAs are considered, as for example with aminoacyl-tRNA synthetase⁴⁶, or with tRNA-guanine transglycosylase⁴⁷, or during its interaction with ribosome^{48; 49}. A more obtuse angle than in the case of a classical yeast cytosolic tRNA, was indeed measured for a few mt-tRNAs¹².

III. Evolution of mt-tRNA^{Asp} structures

Enzymatic and chemical structure probing in solution allowed to decipher distinctive characteristics of native and *in vitro* transcribed human mt-tRNA^{Asp}. While the native tRNA folds into a cloverleaf, the transcript exhibits a mixture of different structures as already observed for a few other human mt-tRNAs^{22; 35; 50}. This further illustrates the role of post-

transcriptional modifications in the achievement of functional molecules in human mitochondria. Contribution of post-transcriptional modifications to tRNA stability is well established with examples in different kingdoms of life^{51; 52}. The restricted number of such modifications in mitochondrial tRNAs¹ reflects their key importance.

In regard to the 3D fold of human mt-tRNA^{Asp}, the L-shaped structure is governed by an intricate network of interactions within the core of the molecule, and by the absence of any interaction between the D- and the T-loops. This rises concerns about the situation that occurs in other mammalian mt-tRNA^{Asp}. Figure 1C illustrates the most typical situation in this group of molecules, clearly in line with what is observed for mt-tRNA^{Asp} but with some modulations. Firstly, a large variability in D- and T-loop sizes is observed. A more detailed insight in the 136 available sequences (Mamit-tRNA database,³⁰) revealed 3 types of D-loop sequences (5'-AAA-3'; 5'-AAYYA-3'; 5'-AAYAA-3') and 3 types of T-loop sequences (5'-TGAAAAT-3'; 5'-TYAAAYY-3'; 5'-TTTAAAT-3'). Whatever the combination of the facing loops, no obvious possible interaction can be drawn. Secondly, the existence of 4 out of the 6 tertiary interactions is visible, with most typical sequences being A26-R44, G10-Y25/R45; A12-U23/A9; A13-U22/Y46. A more detailed analysis of the full set of interactions within tRNA^{Asp} families in different mammalian super-order/orders allows a fined tuned view (Fig. 6). In every case, conservation of nucleotides at defined position is significant (despite not being absolute), in support of a strong contribution of tertiary interactions within the core to drive the folding of mammalian mt-tRNA^{Asp}. Thus, structural weaknesses in regard to D-/T-loops interaction are not likely to be compensated within the tRNA itself. This is at opposite to various internal compensations observed in a number of highly bizarre tRNAs from animal mitochondria^{53; 54; 55}.

Altogether, the structural degeneracy observed here for mt-tRNA as compared to classical tRNA, concerning as well the D- and T-loop sequences as more subtly the core interactions, mirrors the functional degeneracy already observed in regard to aminoacylation identity elements¹⁵. Loosening of structural stringency is spreading towards all mammalian mt-tRNAs of other specificities than aspartate as established upon sequence analysis within a restricted number of organisms⁸. Loosening of functional stringency has already been observed in a few situations^{56; 57}. These weaknesses are becoming waged by partner macromolecules belonging to the translational machinery. Local mutation of aspartyl-tRNA synthetase in response to the loss of the major identity element G73 is an explicit demonstration of an adaptation in a complementary partnership¹⁵. Counterbalancing of mt-DNA encoded RNA degeneracy is also illustrated by adaptation of partner proteins. An

extended elongation factor exists specifically for the D-stem deprived tRNA^{Ser(AGY)} ⁵⁸ and a highly protein rich mito-ribosome compensated for restricted 12S and 16S rRNA sequences coded by the mt genome ⁵⁹. Detailed structural properties of mammalian mt-tRNAs of different specificities need still to be experimentally supported, to verify if the rules established herein for tRNA^{Asp} can be generalized, or if at opposite some tRNAs present alternative tertiary networks.

Acknowledgments

We are grateful to Joëlle Rudinger-Thirion for helpful advices. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Université Louis Pasteur Strasbourg, Association Française pour les Myopathies, ACI BCMS. MM was supported by a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

1. Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F. & Pütz, J. (2008). tRNAdb 2009: Compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* In press.
2. Giegé, R., Puglisi, J. D. & Florentz, C. (1993). tRNA structure and aminoacylation efficiency. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 45, 129-206.
3. Dirheimer, G., Keith, G., Dumas, P. & Westhof, E. (1995). Primary, secondary and tertiary structures of tRNAs. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function.* (Söll, D. & RajBhandary, U. L., eds.), pp. 93-126. Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC.
4. Kim, S. H., Suddath, F. L., Quigley, G. J., McPherson, A., Sussman, J. L., Wang, A. H. J., Seeman, N. C. & Rich, A. (1974). Three dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* 185, 435-440.
5. Robertus, J. D., Ladner, J. E., Finch, J. T., Rhodes, D., Brown, R. S., Clarck, B. F. C. & Klug, A. (1974). Correlation between three-dimensional structure and chemical reactivity of transfer RNA. *Nucleic Acids Res.* 1, 927-932.
6. Moras, D., Comarmond, M. B., Fischer, J., Weiss, R., Thierry, J.-C., Ebel, J.-P. & Giegé, R. (1980). Crystal structure of yeast tRNA^{Asp}. *Nature* 288, 669-674.
7. Westhof, E., Dumas, P. & Moras, D. (1985). Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA. *J. Mol. Biol.* 184, 119-145.
8. 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.
9. Yokogawa, T., Watanabe, Y., Kumazawa, Y., Ueda, T., Hirao, I., Miura, K. & Watanabe, K. (1991). A novel cloverleaf structure found in mammalian mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)}. *Nucleic Acids Res.* 19, 6101-6105.
10. Hayashi, I., Kawai, G. & Watanabe, K. (1998). Higher-order structure and thermal instability of bovine mitochondrial tRNA^{Ser(UGA)} investigated by proton NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 284, 57-69.

11. Hayashi, I., Yokogawa, T., Kawai, G., Ueda, T., Nishikawa, K. & Watanabe, K. (1997). Assignment of imino proton signals of G-C base pairs and magnesium ion binding: an NMR study of bovine mitochondrial tRNA^{Ser}_{GCU} lacking the entire D arm. *J. Biochem.* 121, 1115-1122.
12. Leehey, M. A., Squassoni, C. A., Friederich, M. W., Mills, J. B. & Hagerman, P. J. (1995). A noncanonical tertiary conformation of a human mitochondrial transfer RNA. *Biochemistry* 34, 16235-16239.
13. Frazer-Abel, A. A. & Hagerman, P. J. (1999). Determination of the angle between the acceptor and anticodon stems of a truncated mitochondrial tRNA. *J. Mol. Biol.* 285, 581-593.
14. Wakita, K., Watanabe, Y.-I., Yokogawa, T., Kumazawa, Y., Nakamura, S., Ueda, T., Watanabe, K. & Nishikawa, K. (1994). Higher-order structure of bovine mitochondrial tRNA^{Phe} lacking the 'conserved' GG and TΨCG sequences as inferred by enzymatic and chemical probing. *Nucleic Acids Res.* 22, 347-353.
15. Fender, A., Sauter, C., Messmer, M., Pütz, J., Giegé, R., Florentz, C. & Sissler, M. (2006). Loss of a primordial identity element for a mammalian mitochondrial aminoacylation system. *J. Biol. Chem.* 281, 15980-15986.
16. Levinger, L., Mörl, M. & Florentz, C. (2004). Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Research* 32, 5430-5441.
17. Yokogawa, T., Kumazawa, Y., Miura, K.-i. & Watanabe, K. (1989). Purification and characterization of two serine isoacceptor tRNAs from bovine mitochondria by using a hybridization assay method. *Nucleic Acids Res.* 17, 2623-2638.
18. 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.
19. Bonnefond, L., Fender, A., Rudinger-Thirion, J., Giegé, R., Florentz, C. & Sissler, M. (2005). Towards the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry* 44, 4805-4816.
20. 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.

21. Becker, H. D., Giegé, R. & Kern, D. (1996). Identity of prokaryotic and eukaryotic tRNA^{Asp} for aminoacylation by aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* 35, 7447-7458.
22. 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.
23. Bonnefond, L., Florentz, C., Giegé, R. & Rudinger-Thirion, J. (2008). Decreased aminoacylation in pathology-related mutants of mitochondrial tRNA^{Tyr} is associated with structural perturbations in tRNA architecture. *RNA* 14, 641-648.
24. Peattie, D. A. & Gilbert, W. (1980). Chemical probes for higher-order structure in RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4679-4682.
25. Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815.
26. Eiler, S., Dock-Bregeon, A. C., Moulinier, L., Thierry, J.-C. & Moras, D. (1999). Synthesis of aspartyl-tRNA^{Asp} in *Escherichia coli*-a snapshot of the second step. *EMBO J.* 18, 6532-6541.
27. Kleywegt, G. J., Zou, J. Y., Kjeldgaard, M. & Jones, T. A. (2001). Around O. In *International Tables for Crystallography* (Rossmann, M. G. & Arnold, E., eds.), Vol. F. *Crystallography of Biological Macromolecules*, pp. Chapter 17.1, pp. 353-356, 366-367. Kluwer Academic, Dordrecht (The Netherlands).
28. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* D54, 905-921.
29. DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. Delano Scientific (<http://www.pymol.org>), San Carlos, CA, USA.
30. Pütz, J., Dupuis, B., Sissler, M. & Florentz, C. (2007). Mamit-tRNA, a database of mammalian mitochondrial tRNA primary and secondary structures. *RNA* 13, 1184-1190.
31. Messmer, M., Gaudry, A., Sissler, M. & Florentz, C. (2008). Pathology-related mutation A7526G helps understanding the 3D structural core in mammalian mitochondrial tRNA^{Asp}. submitted.

32. Ehresmann, C., Baudin, F., Mougél, M., Romby, P., Ebel, J.-P. & Ehresmann, B. (1987). Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.* 15, 9109-9128.
33. Giegé, R., Helm, M. & Florentz, C. (1999). Chemical and enzymatic probing of RNA structure. In *Prebiotic Chemistry, Molecular Fossils, Nucleosides, and RNA*. (Söll, D., Nishimura, S. & Moore, P., eds.), Vol. 6, pp. 63-80. Pergamon, Oxford.
34. Brunel, C. & Romby, P. (2000). Probing RNA structure and RNA-ligand complexes with chemical probes. *Methods Enzymol.* 318, 3-21.
35. 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.
36. 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.
37. Helm, M., Giegé, R. & Florentz, C. (1999). A Watson-Crick base-pair disrupting methyl group (m¹A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA^{Lys}. *Biochemistry* 38, 13338-13346.
38. Sissler, M., Helm, M., Frugier, M., Giegé, R. & Florentz, C. (2004). Aminoacylation properties of pathology-related variants of human mitochondrial tRNA^{Lys} variants. *RNA* 10, 841-853.
39. Voigts-Hoffmann, F., Hengesbach, M., Kobitski, A. Y., van Aerschot, A., Herdewijn, P., Nienhaus, G. U. & Helm, M. (2007). A methyl group controls conformational equilibrium in human mitochondrial tRNA^{Lys}. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 13382-13383.
40. Levinger, L., Giegé, R. & Florentz, C. (2003). Pathology-related substitutions in human mitochondrial tRNA^{Ile} reduce precursor 3'-end processing efficiency in vitro. *Nucleic Acids Res.* 31, 1904-1912.
41. 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 Acid Res.* 31, 596-601.
42. Roy, M. D., Wittenhagen, L. M. & Kelley, S. O. (2005). Structural probing of a pathogenic tRNA dimer. *RNA* 11, 254-260.
43. Sohm, B., Sissler, M., Park, H., King, M. P. & Florentz, C. (2004). Recognition of human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} by its cognate leucyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.* 339, 17-29.
44. 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.
45. Romby, P., Moras, D., Dumas, P., Ebel, J.-P. & Giegé, R. (1987). Comparison of the tertiary structure of yeast tRNA^{Asp} and tRNA^{Phe} in solution. Chemical modification study of the bases. *J. Mol. Biol.* 195, 193-204.
46. Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J. C. & Moras, D. (1991). Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: Crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Asp}. *Science* 252, 1682-1689.
47. Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S. & Yokoyama, S. (2003). Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme. *Cell* 113, 383-394.
48. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D. & Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5Å resolution. *Science* 292, 883-896.
49. Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V. t., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R. & Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313, 1935-1942.
50. Wittenhagen, L. M. & Kelley, S. O. (2002). Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nat. Struct. Biol.* 9, 586-590.
51. Gustilo, E. M., Vendeix, F. A. & Agris, P. F. (2008). tRNA's modifications bring order to gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 11, 134-140.
52. Hayrapetyan, A., Seidu-Larry, S. & Helm, M. (2009). Function of modified nucleosides in RNA stabilization. In *DNA and RNA Modification Enzymes: Comparative Structure, Mechanism, Functions, Cellular Interactions and Evolution* (Grosjean, H., ed.), Vol. Chapter 37, in press. Landes BioSciences, USA.
53. Steinberg, S. & Cedergren, R. (1994). Structural compensation in atypical mitochondrial tRNAs. *Nature Struct. Biol.* 1, 507-510.
54. Steinberg, S., Gautheret, D. & Cedergren, R. (1994). Fitting the structurally diverse animal mitochondrial tRNAs^{Ser} to common three-dimensional constraints. *J. Mol. Biol.* 236, 982-989.
55. Steinberg, S., Leclerc, F. & Cedergren, R. (1997). Structural rules and conformational compensations in the tRNA L-form. *J. Mol. Biol.* 266, 269-282.

56. Lenhard, B., Orellana, O., Ibba, M. & Weygand-Durasevic, I. (1999). tRNA recognition and evolution of determinants in seryl-tRNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 27, 721-729.
57. Bonnefond, L., Frugier, M., Giegé, R. & Rudinger-Thirion, J. (2005). Human mitochondrial TyrRS disobeys the tyrosine identity rules. *RNA* 11, 558-562.
58. Ohtsuki, T., Sato, A., Watanabe, Y.-I. & Watanabe, K. (2002). A unique serine-specific elongation factor Tu found in nematode mitochondria. *Nature Structural Biology* 9, 669-673.
59. Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L. & Agrawal, R. K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* 115, 97-108.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Tertiary interaction networks in tRNAs. **A.** Canonical tRNA (*e.g.* bacterial, archaeal, eukaryotic cytosolic). Data are according to crystallographic structures ^{4; 5; 6; 7} (reviewed in *e.g.* ³). Nucleotide positions involved in the 9 tertiary interactions are indicated in bold. They are either strictly conserved, semi-conserved (Y for pyrimidine, R for purine) or not conserved (black dots) and bring together secondary structural domains (top) into an L-shaped 3D fold (bottom). Other strictly conserved or semi-conserved nucleotides are indicated in gray. Numbering is according to ¹. Residues 8, 9 and 26 are considered as connectors between domains. **B. Human mitochondrial tRNA^{Asp}** ⁴⁴. Predicted tertiary interactions are indicated in bold. Notice the small D- and T-loops and the absence critical nucleotides for long range interactions. **C. Most typical sequence for a mammalian mitochondrial tRNA.** The displayed secondary and 3D folds have been compiled under “Mamit-tRNA” data (<http://mamit-trna.u-strasbg.fr/>, ³⁰) by alignment of 136 sequences. Nucleotides in black and bold characters are strictly conserved. Those indicated in black are conserved to $\geq 90\%$. Dominance of a given nucleotide in $\geq 50\%$ and $\leq 90\%$ of sequences as well as semi-conservation (Y or R) is indicated in gray. Conservation $\leq 50\%$, is represented by open circles. Due to large size and sequence variations in D- and T-loops, no sequence conservation can be indicated. Four tertiary interactions can be predicted in the core of the molecule. In none of the mitochondrial tRNA^{Asp} sequences (**B** and **C**), an interaction between the D- and T-loops can be anticipated.

Figure 2. Solution structural mapping of human native mitochondrial tRNA^{Asp}, extracted from HeLa cells. **A.** Autoradiograms of typical polyacrylamide gels on which cleavage products of enzymatic mapping with ribonuclease V1 and nuclease S1. tRNA was either 5'-end (left panel) or 3'-end (right panel) labeled with [³²P]. C: control incubation in the absence of probes, L: alkaline degradation, T1: G-ladder under denaturing conditions, V1 and S1: cleavage in presence of either structural probes under native conditions (see Material and Methods). Numbering of nucleotides and theoretical secondary domains are given on both sides of the panels. Chemically fragile phosphodiester bonds at Y-A stretches are indicated in italics with the name of the 5'Y nucleotide. **B.** Reactivities to enzymatic and chemical (autoradiograms not shown) probes under native conditions presented on the theoretical cloverleaf secondary structure of mt-tRNA^{Asp}. For detailed legend, see inset. For enzymatic probes, the size of the arrows is proportional to cleavage intensity.

Figure 3. Solution structure probing of *in vitro* transcribed human mt-tRNA^{Asp}. **A.** Autoradiograms of typical polyacrylamide gels for enzymatic mapping with ribonuclease V1 and nuclease S1 (left panel), chemical probing with DEPC (central panel) and lead Pb(OAc)₂ (right panel). tRNA was 5'-end [³²P]-labeled and submitted to denaturation at 60°C and further renaturation before submission to probes under native conditions (Materials and Methods). C: control incubation in the absence of probes, L: alkaline degradation, T1: G-ladder under denaturing conditions, V1 and S1: cleavage in presence of either structural probes, N and SD in the central panel correspond to decreasing amounts of DEPC under native and semi-denaturing conditions respectively, two concentration of Pb(OAc)₂ have also been used. Numbering of nucleotides and theoretical secondary domains are given along the panels. Chemically fragile phosphodiester bonds at Y-A stretches are indicated in italics with the name of the 5'Y nucleotide. **B.** Theoretical secondary with all observed reactivities to probes. For detailed legend, see inset. For enzymatic probes, the size of the arrows is proportional to cleavage intensity.

Figure 4. *In vitro* transcribed human mt-tRNA^{Asp} exists under several conformations. Reactivity to enzymatic and chemical probes as determined in Figure 3 do not all fit with a cloverleaf fold and are in strong support of the existence of alternative conformations. Their sorting out reveals at least two alternative structures to the cloverleaf (A), namely a cloverleaf with an open D-stem (B) and extended, bulged hairpin (C).

Figure 5. Model of 3D structure of native human mt-tRNA^{Asp}. The model has been built on the basis of crystallographic structure of *E. coli* tRNA^{Asp} in complex with its cognate aspartyl-tRNA synthetase ²⁶. Nucleotides have been exchanged according to the mt-tRNA sequence, nucleotide 47 in the variable region has been removed, and D- and T-loops shortened and shaped so that no tertiary interaction can occur. The obtained model has further been submitted to an energy minimization step. **A.** Global view. **B.** and **C.** Detailed view on the core interactions. The six tertiary interactions found in classical tRNAs can take place in the model, in agreement with the chemical probing data collected herein. In **C**, the CCA-end points towards the reader. Figures are prepared with PyMol ²⁹. The color code is as following: A15-U48 / Magenta; U8-A14-A21 / Blue; U22-A13-U46 / Green; A9-U12-U23 / Yellow; G10-C25-A45 / Brown; A26-A44 / Red.

Figure 6. Core domains in mammalian mt-tRNA^{Asp} families. Sequences have been compiled in Mamit-tRNA ³⁰ at <http://mamit-trna.u-strasbg.fr/>. Organisms have been retrieved according to their phylogenetic classification within the web site. Sequences for 6 super-orders and 8 orders have been considered (the number of individual sequences is given in parenthesis). Strictly conserved nucleotides are indicated in black. Those that are semi-conserved are highlighted in gray as R (purine) or Y (pyrimidine). Non-conserved residues are indicated by dots.

Figure 1

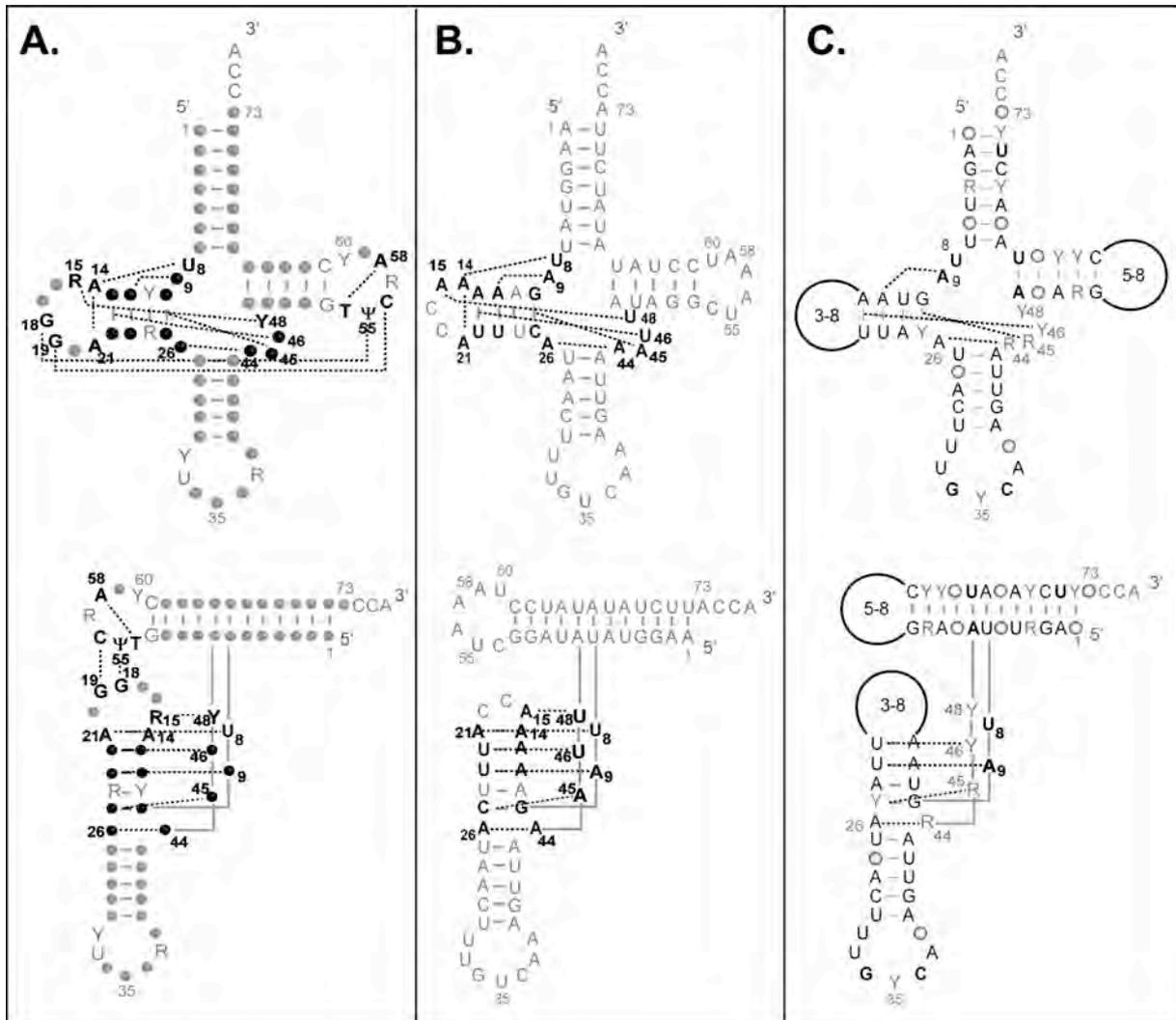


Figure 2

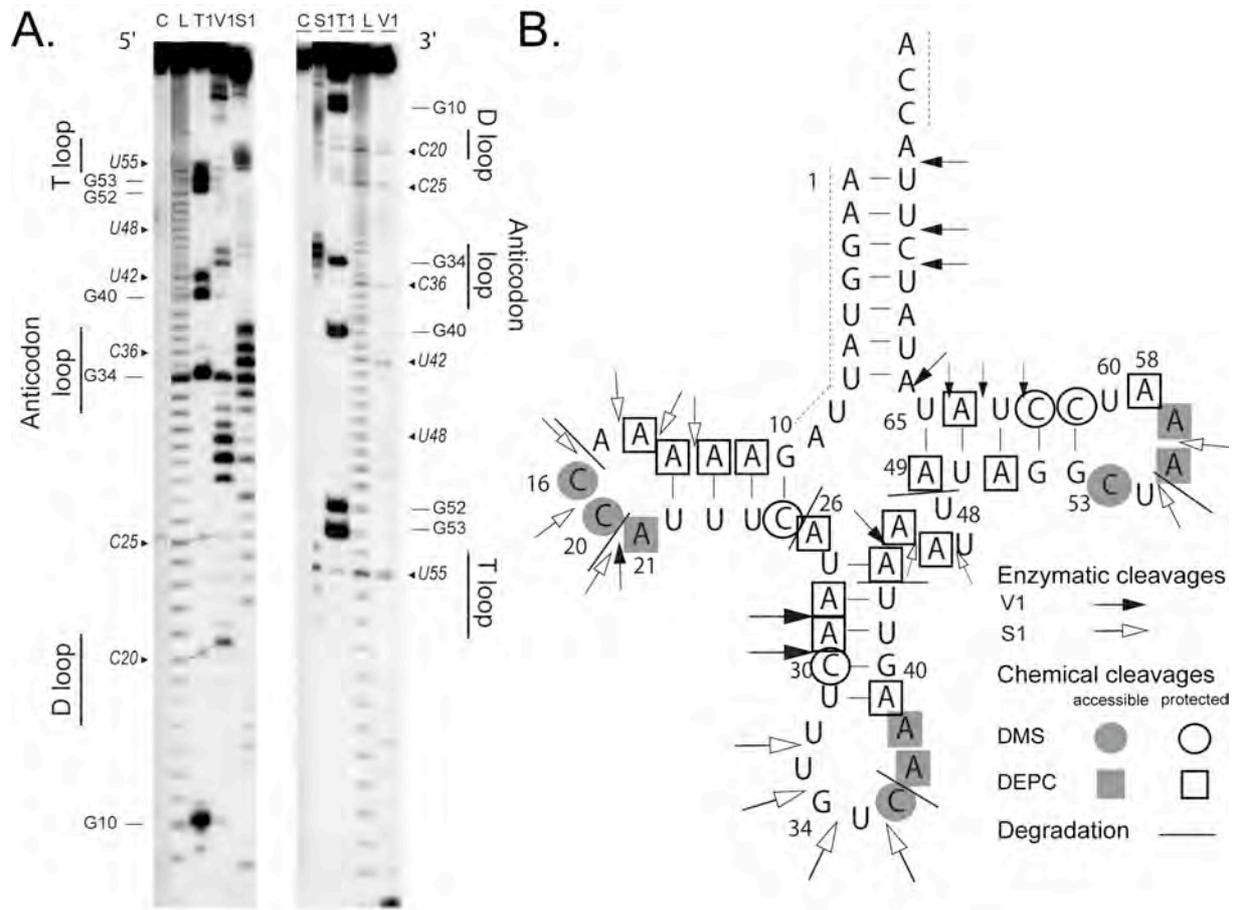


Figure 3

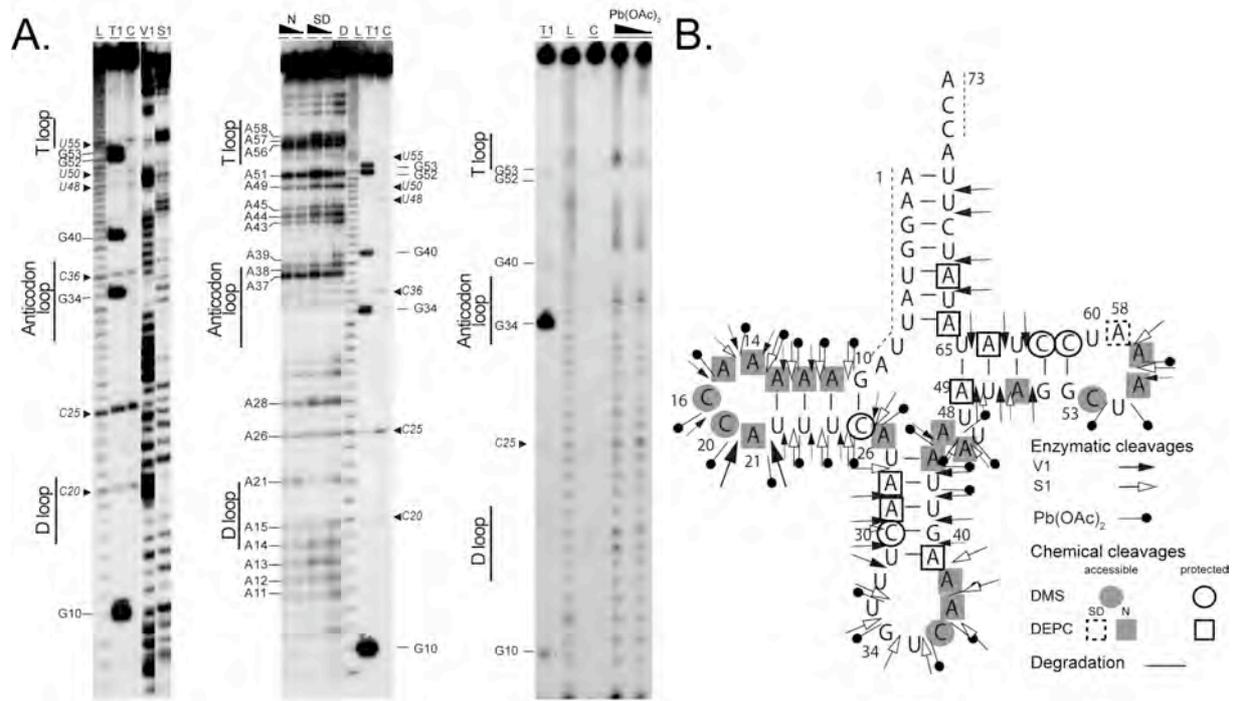


Figure 4

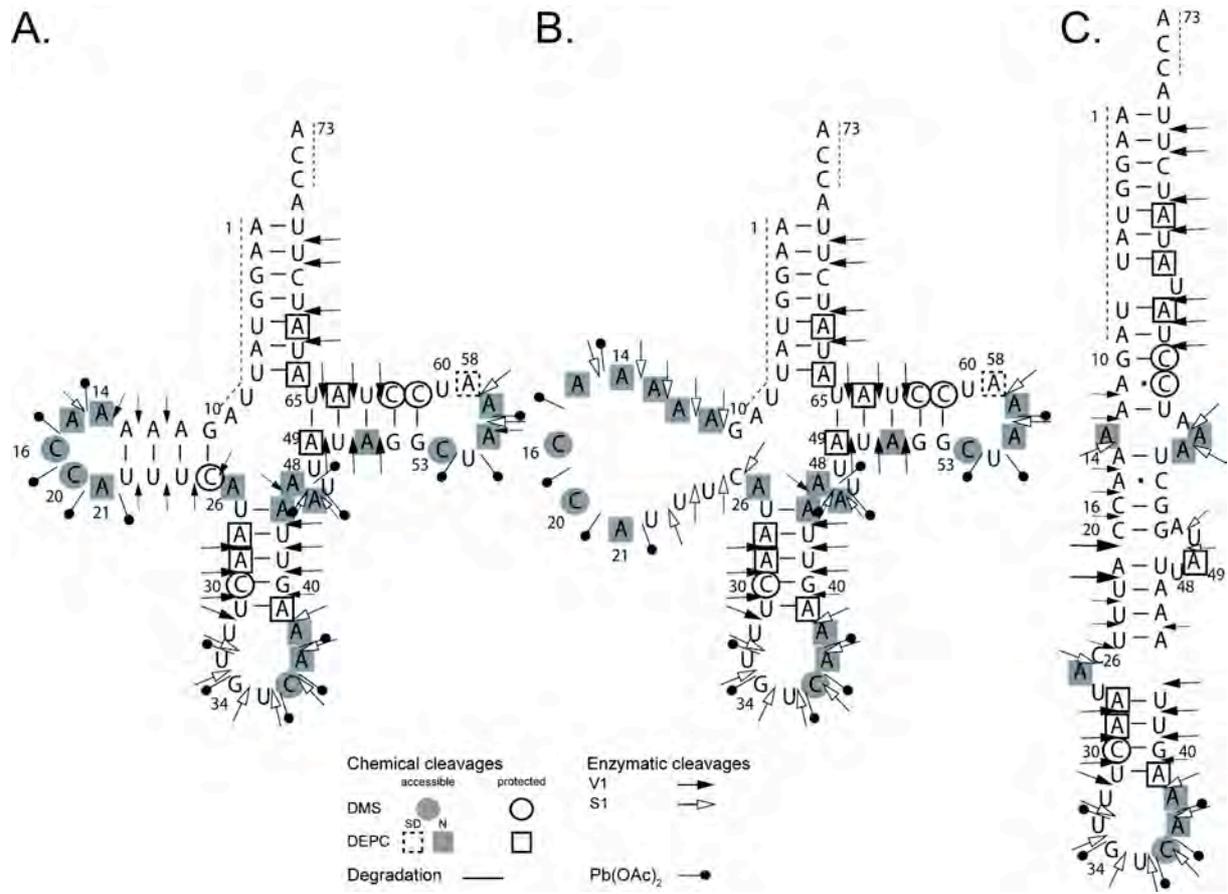


Figure 5

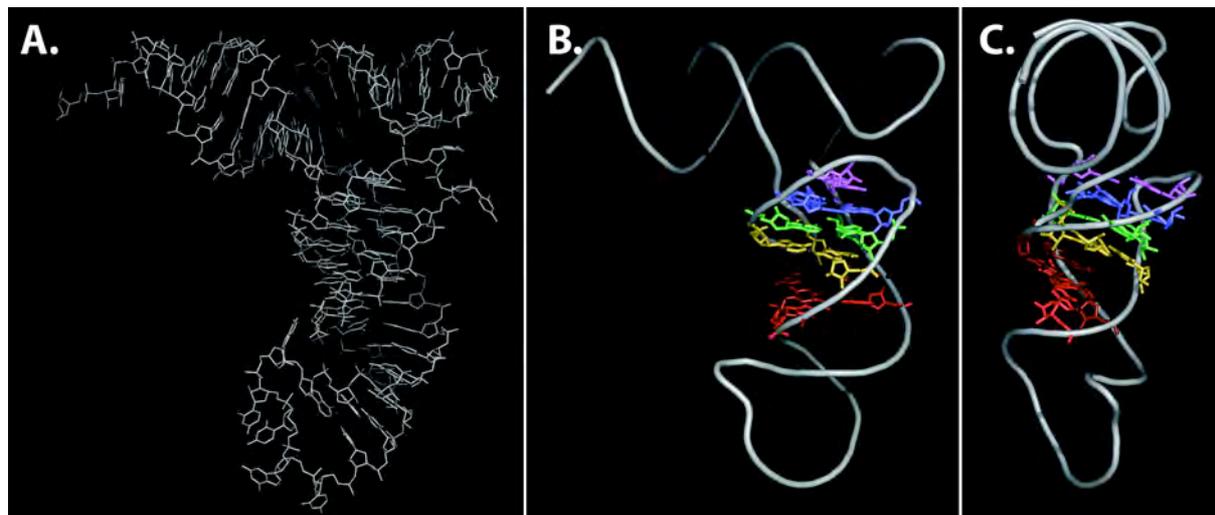
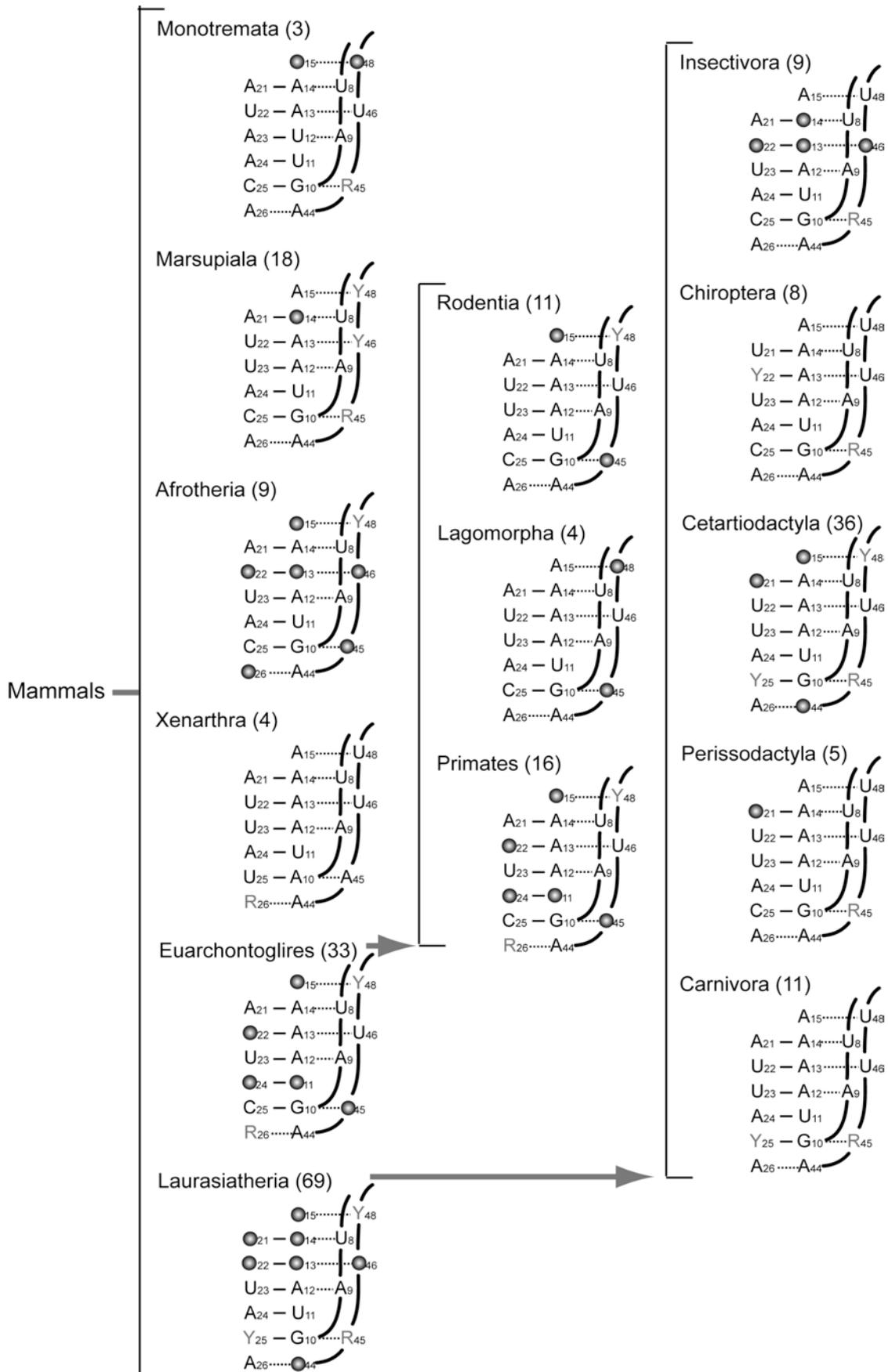


Figure 6



Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Pathology-related mutation A7526G (A9G) helps in the understanding of the 3D structural core of human mitochondrial tRNA(Asp)

MESSMER M, GAUDRY A, SISSLER M, FLORENTZ C.

RNA, 2009, vol. 15, N° 8, pages 1462-1468

Publication 2 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1261/rna.1626109>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Loss of a primordial identity element for a mammalian mitochondrial aminoacylation system

Aurélie FENDER, Claude SAUTER, Marie MESSMER, Joern PÜTZ, Richard GIEGE, Catherine FLORENTZ, Marie SISSLER

The Journal of Biological Chemistry, 2006, vol. 281, n° 23, pages 15980-15986

Publication 3 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M511633200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Chapitre 2

Étude de l'inhibition de l'AspRS mitochondriale humaine par des analogues d'adénylates

Les différences existant entre les sites actifs des aaRS eubactériennes et eucaryotes ont suggéré que ces macromolécules pourraient être des cibles de stratégies de lutte antibactérienne. L'équipe de Jacques Lapointe (Université de Laval, Québec) a montré que des analogues de l'adénylate Asp-AMP sont en effet des inhibiteurs compétitifs d'AspRS eubactériennes (*E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Etant donné que l'AspRS mt humaine est de type eubactérienne (Bonfond et al., 2005a), mon objectif a été, en plus de vérifier l'impact de ces analogues sur l'AspRS cytosolique (cyt) humaine, de contrôler leur effet sur l'enzyme mitochondriale humaine. J'ai réalisé ce travail dans le laboratoire du Dr. Jacques Lapointe dans le cadre d'une collaboration impliquant nos deux laboratoires (séjour de deux mois). Avant de présenter les résultats de ce travail, cette étude est replacée dans un contexte plus général. Ainsi l'introduction de ce chapitre présentera, dans une première partie, ce qui est déjà connu au sujet des aaRS comme cibles d'agents antibiotiques. Dans une deuxième partie, une attention spéciale sera portée aux AspRS de manière générale, et à l'AspRS mt humaine en particulier.

A. Introduction

1. Les aminoacyl-ARNt synthétases, des cibles de molécules antibiotiques

1.1. Pourquoi être à la recherche de nouveaux antibiotiques ?

De plus en plus de préoccupations se manifestent partout dans le monde du fait que certains organismes comme les eubactéries, les virus, les champignons et les parasites développent une résistance aux médicaments utilisés pour les combattre. Pour exemple, *S. aureus*, organisme responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales, est aujourd'hui résistant à la méthicilline et à la vancomycine (Hiramatsu et al., 1997a; Hiramatsu et al., 1997b). Les cibles des antibiotiques déjà existants ou potentiels sont des molécules impliquées dans la croissance cellulaire et peuvent être séparées en deux groupes : soit des molécules spécifiques à l'agent pathogène soit des molécules pour lesquelles un homologue est trouvé dans l'organisme hôte. Les antibiotiques du premier groupe ont l'avantage de ne pas interférer avec une étape biochimique de la cellule hôte. Pour exemple, les pénicillines agissent en inhibant la formation des liens inter-peptidoglycanes dans la paroi cellulaire eubactérienne (revue par *e.g.* (Miller, 2002)). La moitié β -lactame des pénicillines s'associe à

l'enzyme qui devrait se lier aux molécules de peptidoglycane des eubactéries et empêche ainsi la multiplication des eubactéries. Le deuxième groupe a l'avantage de présenter un nombre beaucoup plus important de cibles. Cependant afin d'éviter tout effet toxique secondaire, ces antibiotiques doivent avoir la capacité de différencier la cible pathogène de son homologue humain.

1.2. Les aminoacyl-ARNt synthétases, des cibles idéales...

Parmi toutes les macromolécules présentes dans l'ensemble des organismes, les composants de la machinerie traductionnelle sont les cibles les plus évidentes pour lesquelles les antibiotiques ont été développés (revue par (Schimmel et al., 1998)). Parmi elles, les sous-unités 30S et 50S du ribosome y occupent une place fondamentale, et les antibiotiques (comme les aminoglycosides, les tétracyclines et les macrolides) bloquent ainsi la synthèse protéique de l'agent pathogène. De manière générale, les cibles de nouveaux antibiotiques potentiels sont les protéines ribosomales, les ARNr, les facteurs de la traduction et les aaRS. Ainsi l'acide pseudomonique (ou mupirocine), molécule naturelle synthétisée par *Pseudomonas fluorescens* (Fuller et al., 1971), est un inhibiteur de l'IleRS des agents pathogènes Gram positif comme *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*, et Gram négatif comme *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoea* et *Neisseria meningitidis*. Cette molécule est active contre des souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline ou encore à la streptomycine (Casewell & Hill, 1985) avec une affinité 8000 fois plus forte pour l'IleRS eubactérienne que pour celle de mammifère (Hughes & Mellows, 1980). D'autres molécules naturelles ont également été mises en avant pour leur pouvoir d'inhibition d'aaRS. Il s'agit de la borrelidine dans le cas de la ThrRS (Nass et al., 1969; Paetz & Nass, 1973), de la furanomycine pour l'IleRS (Tanaka et al., 1969), de la granaticine pour la LeuRS (Ogilvie et al., 1975), de l'indolmycine pour la TrpRS (Werner et al., 1976), de l'ochratoxine A pour la PheRS (Konrad & Rösenthaller, 1977) et de la cispentacine pour la ProRS (Konishi et al., 1989). Bien qu'aucune de ces molécules inhibant la croissance cellulaire eubactérienne n'ait été développée et commercialisée pour diverses raisons, elles illustrent néanmoins la diversité des produits naturels qui ont été identifiés comme étant des inhibiteurs d'aaRS. À ce jour, un nombre conséquent de structures cristallographiques d'aaRS sont disponibles avec au moins un exemple pour chacune des 20 aaRS (revues par *e.g.* (Moras, 1992; Cusack, 1993; Giegé et al., 2008)) et le mécanisme ainsi que la chimie de la réaction d'amination sont maintenant bien compris. L'ensemble de ces informations rend le « design » de nouveaux

antibiotiques réaliste et leur synthèse chimique permettrait alors d'obtenir des molécules dont les structures seraient plus spécifiquement adaptées au coeur catalytique des aaRS que celles de composés naturels.

1.3. La structure des antibiotiques basée sur des intermédiaires réactionnels

Les synthèses d'antibiotiques les plus évidentes sont celles basées sur la structure des substrats et des intermédiaires réactionnels de l'aminacylation avec le but d'obtenir des composés suffisamment sélectifs envers l'aaRS de l'agent pathogène pour ne pas interférer avec la machinerie traductionnelle de l'hôte. De manière générale, une sélectivité au moins 100 fois supérieure pour la cible de l'agent pathogène par rapport à celle de l'hôte est acceptée (Schimmel et al., 1998). Les intermédiaires adénylates sont liés aux aaRS avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire (Schimmel & Söll, 1979). C'est pourquoi le potentiel de ces molécules à être des composés antibiotiques ne peut être mis en doute et un nombre conséquent d'analogues d'adénylate ont été synthétisés et testés. Citons par exemple les cas des analogues d'adénylate de l'IleRS (Pope et al., 1998; Crasto et al., 2003), de la MetRS (Lee et al., 2003), de la GluRS et de la GlnRS (Balg et al., 2007) et de l'AspRS (Bernier et al., 2005).

La découverte de molécules inhibant les AspRS d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* (Bernier et al., 2005) nous a particulièrement interpellé. Plusieurs analogues de l'adénylate Asp-AMP ont été synthétisés et il a notamment été montré que l'un d'entre eux (Asp-AMS) inhibe l'AspRS d'*E. coli* avec une constante d'inhibition (K_i) de 15 nM. L'affinité (K_M) de cette même enzyme pour son substrat naturel (Asp-AMP) est de 90 μ M. L'Asp-AMS pourrait ainsi être considéré comme un antibiotique potentiel en raison de l'affinité 6000 fois plus grande de l'enzyme eubactérienne pour cette molécule par rapport à son substrat naturel. Mon objectif a alors été d'analyser si ces molécules pourraient avoir des conséquences dramatiques sur les enzymes cytosoliques et mt humaines, clonées et purifiées au laboratoire. C'est dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire et ceux du Dr. Jacques Lapointe, du Dr. Robert Chênevert et du Dr. Richard Giegé que j'ai réalisé ce travail (séjour de 6 semaines, à Québec).

2. Organisation modulaire et structures des AspRS

Il existe actuellement plus de 500 séquences d'AspRS répertoriées (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) et de nombreuses informations à la fois fonctionnelles et structurales existent pour les trois règnes du vivant (archae, eucaryotes et eubactéries). Les AspRS, à l'image de la plupart des enzymes de classe II, sont homodimériques et l'association des deux sous-unités est médiée par une grande hélice α (dite de dimérisation) et implique des résidus conservés du motif 1 du site catalytique. Les différentes informations décrites dans ce qui suit sont issues en grande partie de la revue (Giegé & Rees, 2005).

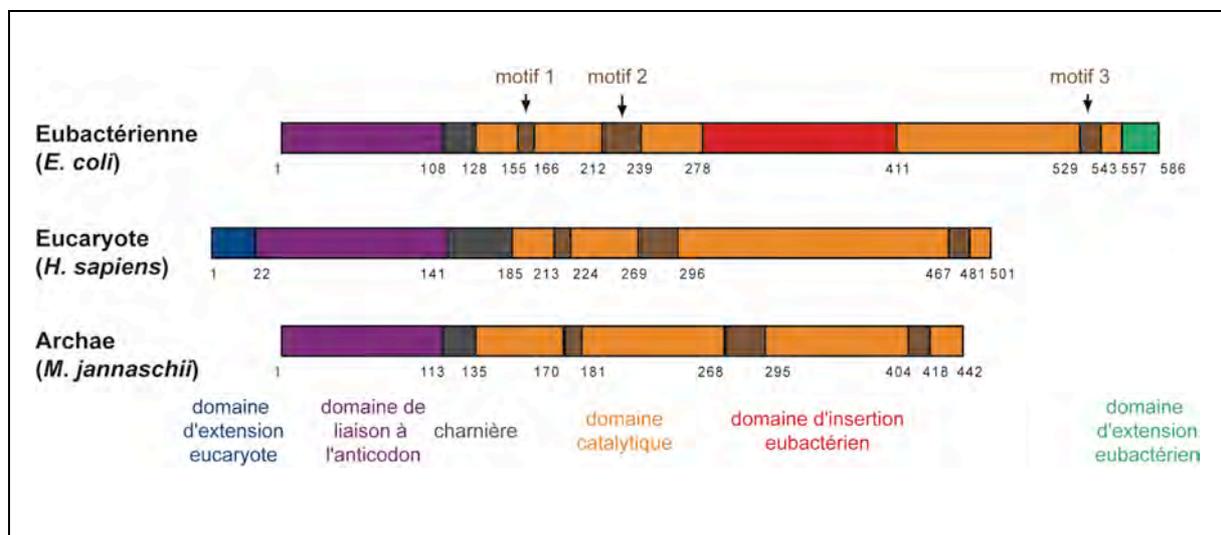


Figure 20. Organisation modulaire des AspRS eubactérienne, eucaryote et archaïque. La numérotation des acides aminés correspond à celles des AspRS des organismes donnés entre parenthèse. Chaque module structural est identifié par une couleur différente.

Alors que les AspRS ne partagent qu'une faible similarité de séquence, elles présentent une organisation modulaire commune (Figure 20) révélée par la comparaison de leurs structures tertiaires. Elles sont composées d'un domaine de liaison à l'anticodon et d'un domaine catalytique, liés entre eux par la région charnière. Les AspRS d'eucaryotes possèdent en plus un domaine d'extension en N-terminal alors que les enzymes eubactériennes possèdent des domaines d'insertion et d'extension (extrémité C-terminale) eubactériens.

Onze structures cristallographiques d'AspRS ont été résolues à ce jour et sont référencées sur le site de la «Protein Data Bank» (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb>). Ces structures ont été obtenues pour les enzymes libres ou en complexe, des trois règnes vivants : eubactéries (*E. coli* et *T. thermophilus*), archaie (*Pyrococcus kodakaraensis*) et eucaryotiques

(*S. cerevisiae*). Cinq de ces structures sont montrées (Figure 21), à savoir les AspRS d'*E. coli*, de *T. thermophilus*, de *P. kodakaraensis* et de *S. cerevisiae*. Les données correspondantes sont indiquées dans le tableau 5.

Organisme		Ligand	PDB	Référence	
Eubactéries	<i>E. coli</i>	Libre	1EQR	(Rees et al., 2000)	
		Complexe	ARNt ^{Asp} + adénylate	1COA	(Eiler et al., 1999)
	ARNt ^{Asp} de levure + adénylate		1IL2	(Moulinier et al., 2001)	
	<i>T. thermophilus</i>	AspRS-1 libre		1LOW	(Ng et al., 2002)
		complexe	adénylate	1G51	(Poterszman et al., 1994)
			ARNt ^{Asp} d' <i>E. coli</i>	1EFW	(Briand et al., 2000)
AspRS-2 libre		1N9W	(Charron et al., 2003)		
Archae	<i>P. kodakaraensis</i>	Libre	1B8A	(Schmitt et al., 1998)	
Eucaryotes	<i>S. cerevisiae</i>	Libre	1EOV	(Sauter et al., 2000)	
		Complexe	ARNt ^{Asp}	1ASY	(Ruff et al., 1991)
			ARNt ^{Asp} + ATP	1ASZ	(Cavarelli et al., 1994)

Tableau 5. Ensemble des données concernant les structures cristallographiques d'AspRS. Les données ont été extraites et complétées à partir de (Giegé & Rees, 2005).

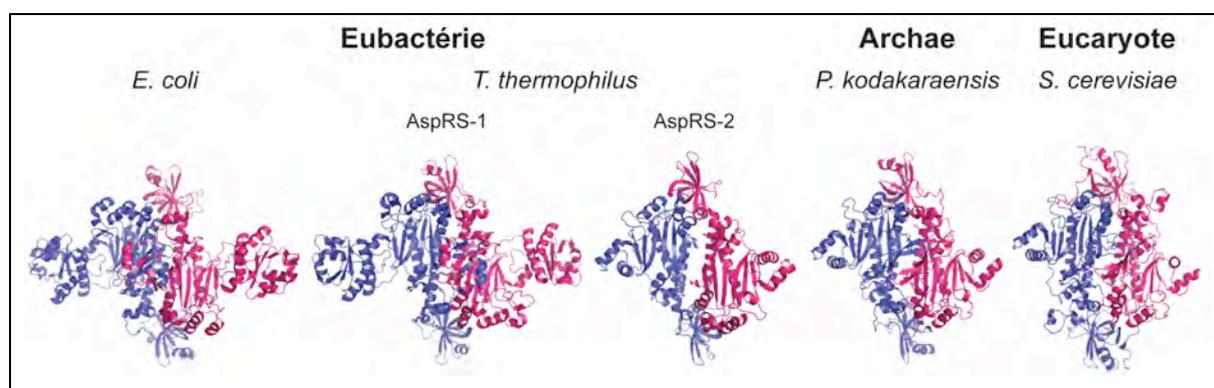


Figure 21. Structures cristallographiques d'AspRS des trois règnes du vivant. Les dimères d'AspRS (bleu et rose) sont sous une forme où les hélices α et brins β sont visibles. La figure a été générée en utilisant le programme PyMol (DeLano, 2002). Pour références, voir tableau 5.

Une analyse plus approfondie des structures cristallographiques révèle que le domaine catalytique est le domaine le plus large, autour duquel s'articulent les autres modules. Il possède un repliement commun à toutes les aaRS de classes II, à savoir un cœur composé d'un feuillet β de 6 brins antiparallèles entourés d'hélices α . Le site actif présente les signatures typiques des enzymes de classe II, et des résidus conservés du motif 1 sont impliqués dans la dimérisation des deux monomères. Le domaine de liaison à l'anticodon se situe dans la partie N-terminale. Il adopte un repliement de type OB-fold, composé d'un tonneau β de 5 brins avec une hélice α insérée entre les 3^{ème} et 4^{ème} brins. Ce repliement est

également trouvé dans les autres aaRS de sous-classe IIb (AsnRS et LysRS) et ces trois enzymes reconnaissent des anticodons possédant tous un U en position centrale.

Les AspRS eucaryotiques présentent une extension N-terminale. L'extension de l'AspRS de *S. cerevisiae*, composée des 70 premiers acides aminés est prédite pour se structurer en trois hélices (Agou et al., 1995). Cette extension n'est pas essentielle à l'aminocyclation, mais contient un motif de liaison à l'ARN riche en lysines et conservé dans les AspRS eucaryotiques et les autres aaRS de sous-classe IIb (AsnRS et LysRS). Ce motif interagit de façon spécifique avec le sillon mineur du bras anticodon de l'ARNt et augmente la stabilité du complexe ARNt/aaRS ainsi que l'efficacité d'aminocyclation (Frugier et al., 2000). Par l'intermédiaire de cette extension, l'AspRS est également capable de se lier en 5' de son propre ARNm et de réguler ainsi son expression (Frugier et al., 2005). Dans le cas de l'AspRS de rat, l'extension est nécessaire à l'association de l'enzyme au complexe multisynthétasique *in vivo* (Mirande et al., 1992). Dans le cas de l'enzyme cytoplasmique humaine son rôle dans la mise à disposition de l'Asp-ARNt^{Asp} pour le facteur d'élongation 1 α (EF-1 α) a été suggéré (Reed et al., 1994).

Les AspRS eubactériennes possèdent deux modules caractéristiques : un domaine d'insertion entre les motifs 2 et 3 du site actif et une extension dans leur partie C-terminale (Giegé & Rees, 2005). Chez *E. coli*, le domaine d'insertion eubactérien consiste en un feuillet β de 4 brins antiparallèles entouré d'un côté par 2 hélices α antiparallèles faisant face au site actif et de l'autre côté par de plus petites hélices faisant face au solvant (Delarue et al., 1994). À ce jour, la fonction de ce domaine demeure inconnue mais un repliement semblable, appelé « ferredoxine fold » a été également observé chez d'autres protéines comme la glutamine synthase (Almassy et al., 1986), la nucléoside diphosphate kinase (Janin et al., 2000), l'« histidine-containing phosphocarrier protein » (Delarue et al., 1994), ou encore la sous-unité B de la Glu-tRNA^{Gln} amidotransférase (GatB) (Wolf et al., 1999). La résolution de la structure cristallographique de l'AspRS d'*E. coli* a montré que deux hélices de ce domaine interagissent de manière indirecte avec le bras accepteur de l'ARNt *via* un réseau de liaisons hydrogènes formé par un ensemble de 20 molécules d'eau (Eiler et al., 1999) suggérant ainsi que ce domaine serait impliqué dans la stabilisation de l'interaction entre l'AspRS et l'ARNt^{Asp}. En plus de ce domaine, les enzymes eubactériennes sont caractérisées par la présence d'une extension C-terminale faisant partie de l'interface entre les deux monomères

de l'enzyme. En effet, la dimérisation implique notamment un petit feuillet β à deux brins présent dans cette extension.

3. L'AspRS mitochondriale humaine, une AspRS de type eubactérienne

3.1. Sa structure...

Le gène de l'AspRS mt humaine a été annoté au laboratoire ce qui a permis dans un premier temps de caractériser cette enzyme *in silico* (Bonfond et al., 2005a). Il a ainsi été découvert qu'à l'image de toutes les AspRS déjà connues, cette enzyme possède le motif 1 (...P...), motif 2 (...YRDE...) et motif 3 (...GGIALGLDRRLICLV...) et appartient, de ce fait, aux aaRS de classe II. Des alignements de séquences avec d'autres AspRS (figure 22) ont révélé que l'AspRS mt humaine partage 36 à 43 % d'identité de séquence avec les séquences d'AspRS eubactériennes, 32 % avec celle de l'AspRS mt de *S. cerevisiae* et moins de 23% avec les enzymes d'archae et cytosoliques d'eucaryotes. Ces alignements ont également montré que l'AspRS mt humaine possède (i) des résidus strictement conservés trouvés dans toutes les séquences d'AspRS connues (Giegé & Rees, 2005), notamment impliqués dans la liaison avec l'ATP ou avec l'ARNt et (ii) les domaines d'insertion et d'extension typiquement eubactérien. Cette enzyme est de type eubactérienne non seulement parce qu'elle partage un fort pourcentage d'identité avec l'enzyme d'*E. coli* mais aussi par la présence de ces deux domaines. L'AspRS mt humaine présente également une extension N-terminale qui a été identifiée *in silico* par deux programmes informatiques (Predotar (Small et al., 2004) et MitoProt (Claros, 1995)) comme pouvant être une séquence d'adressage mitochondriale. Des probabilités d'adressage mitochondrial de 0,816 (Predotar) et de 0,998 (MitoProt) ont été attribués aux 47 premiers acides aminés de sa séquence, et un site de clivage après le 47^{ème} résidu a été proposé par MitoProt pour générer l'enzyme mature.

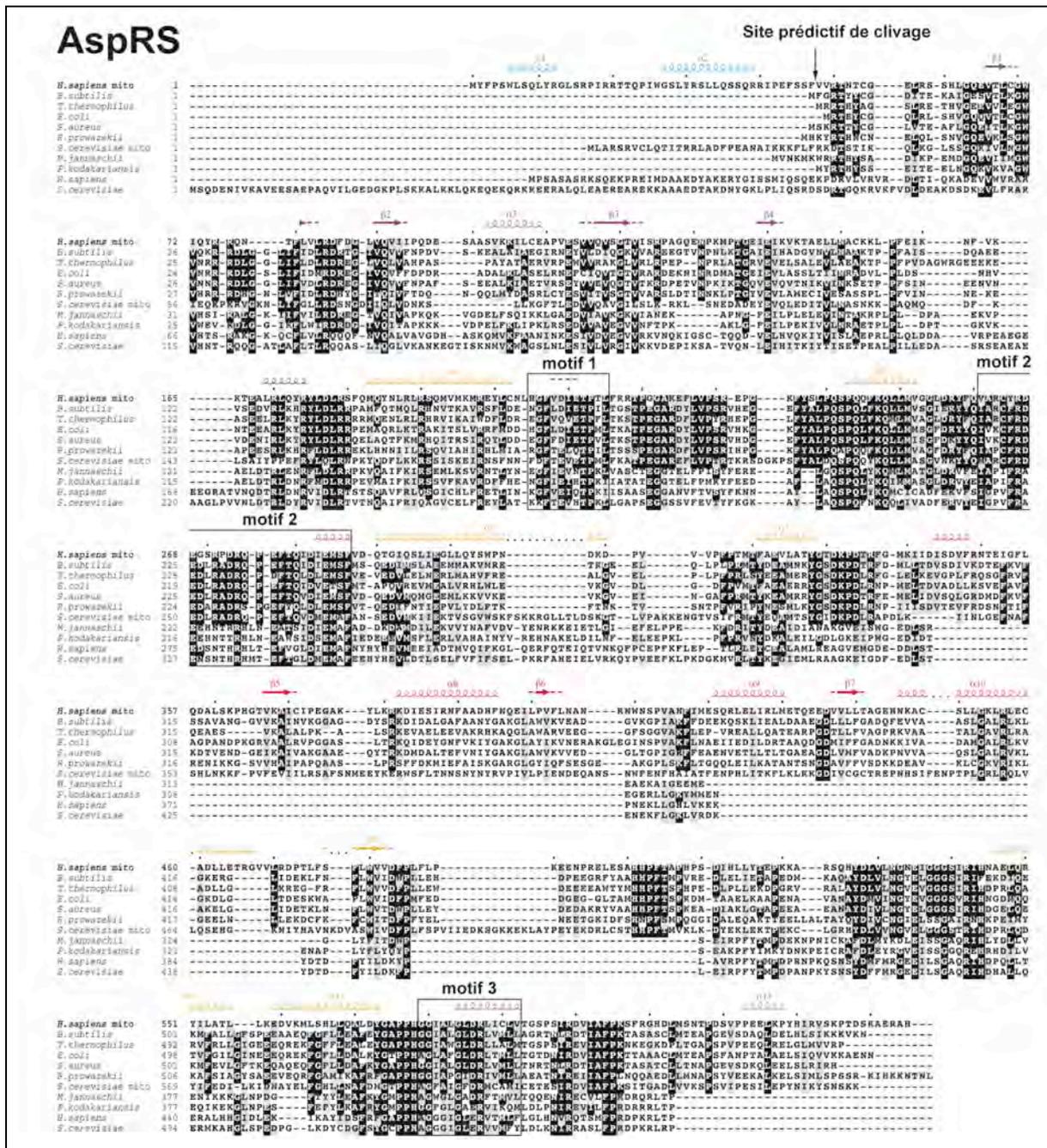


Figure 22. Alignement de séquences de l'AspRS mitochondriale humaine avec d'autres AspRS. Cet alignement de séquence a été réalisé avec le programme 3DCoffee (Poirot et al., 2004). Les résidus encadrés en noir et gris correspondent aux résidus strictement identiques ou homologues, respectivement. Les éléments de structure secondaire (hélices α et brins β) de l'AspRS mt humaine sont placés au dessus de la séquence et ont été prédits en utilisant le programme PredictProtein (Rost et al., 2004) et dessinés avec ESPrict (Gouet et al., 1999). Le code couleur est le même que celui utilisé dans la figure 20. Les trois motifs spécifiques aux aaRS de classe II sont encadrés et le site de clivage prédictif de la séquence d'adressage mitochondrial est indiqué par une flèche. Cette figure a été extraite de (Bonfond et al., 2005a).

Alors que les structures cristallographiques de la SerRS mt bovine (Chimmaronk et al., 2005), de la TyrRS (Bonfond et al., 2007) et de la PheRS (Klipcan et al., 2008) mt humaines ont été résolues très récemment, aucune structure d'AspRS mt de mammifère n'est disponible à ce jour. Cependant, un modèle de la structure de l'AspRS mt humaine a été

construit au laboratoire par Claude Sauter (Figure 23). Ce modèle a été construit grâce au programme *modeller* (Sali & Blundell, 1993) sur la base de la structure cristallographique du complexe AspRS/ARNt^{Asp} d'*E. coli* (code PDB : 1COA) (Eiler et al., 1999) et d'alignement de la séquences de l'AspRS mt humaine avec celle d'*E. coli*. La séquence d'adressage mitochondriale théorique n'y a pas été incluse et les chaînes principales et latérales des acides aminés ont été localement ajustées afin de permettre le « docking » de l'ARNt à l'image de ce qui est observé dans le complexe eubactérien. L'organisation modulaire ainsi que le modèle de la structure de l'AspRS mt humaine sont présentés dans la figure 23.

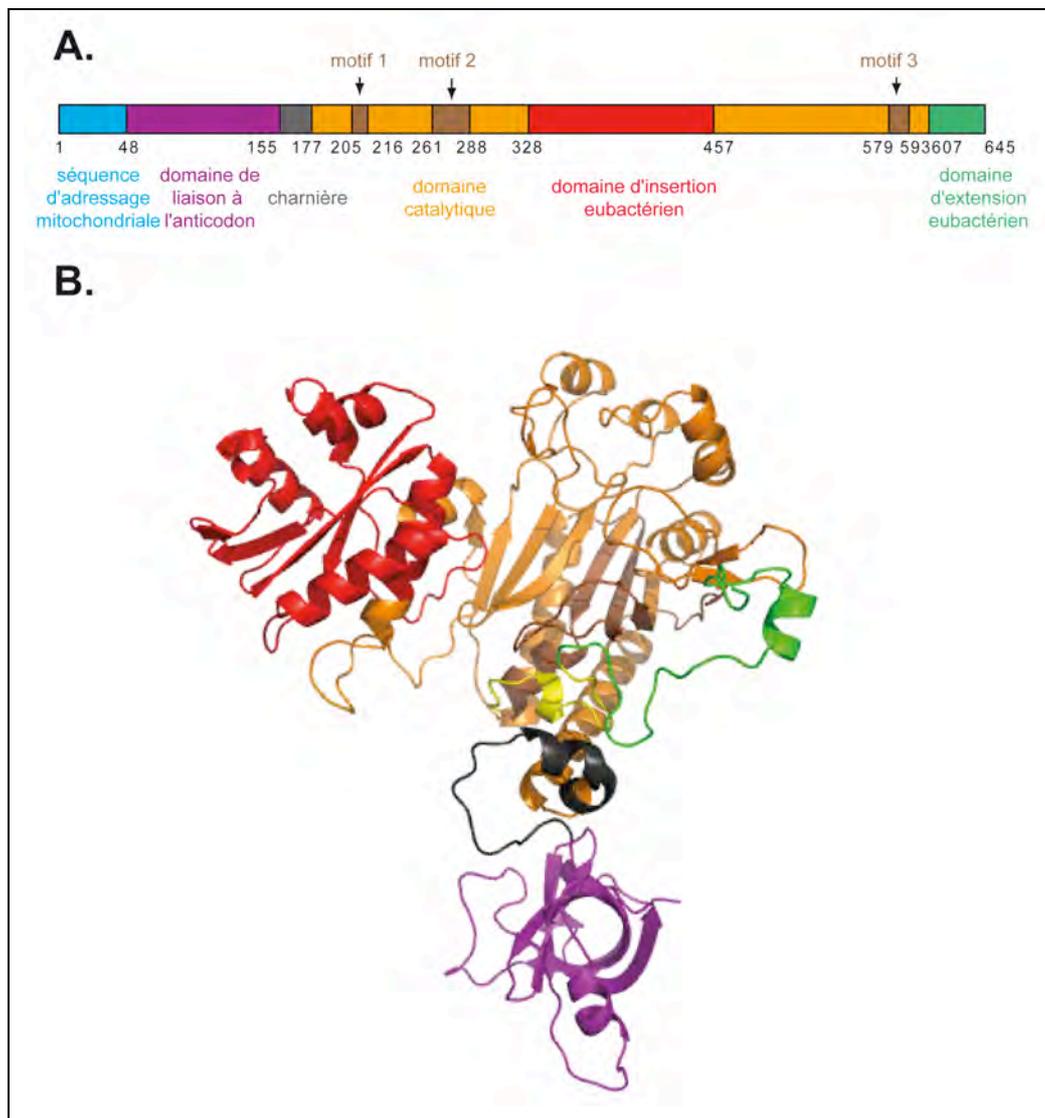


Figure 23. L'AspRS mitochondriale humaine : organisation modulaire et modèle de sa structure **A.** Organisation modulaire de l'AspRS mt humaine. Le code couleur est identique en A et B et correspond à celui de la figure 20. **B.** Modèle de la structure de l'AspRS mt humaine. Afin de simplifier la figure, seul un monomère de l'enzyme est représenté. La figure a été générée en utilisant le programme PyMol (DeLano, 2002).

3.2. Ses particularités d'aspartylation...

La caractérisation de l'AspRS mt humaine s'est étendue à certaines de ses propriétés biochimiques qui ont fait l'objet d'une grande partie du travail de thèse d'Aurélié Fender (thèse soutenue en 2005). La découverte du jeu d'éléments d'identité simplifié du système d'aspartylation mt humain (présentée dans le chapitre précédent) ne constitue qu'une des particularités de ce système d'aminacylation et de cette enzyme (Fender et al., 2006). En effet, à celle-ci s'ajoute une activité enzymatique réduite par rapport à l'enzyme d'*E. coli* (Bonnefond et al., 2005a).

Les paramètres cinétiques k_{cat} et K_M de l'AspRS mt humaines ont été déterminés à la fois sur l'ARNt^{Asp} d'*E. coli* et sur l'ARNt^{Asp} mt humain obtenu par transcription *in vitro* en raison de la difficulté à obtenir des quantités suffisantes d'ARNt^{Asp} natif mt. Ces mesures cinétiques sont présentées dans le tableau 6. Notons que les ARNt natifs d'*E. coli* sont de très bons substrats des aaRS mt et se substituent avantageusement d'un point de vue technique aux ARNt transcrits *in vitro* (Bullard et al., 1999; Bullard et al., 2000; Tolkunova et al., 2000; Spencer et al., 2004).

AspRS	ARNt	K_M (μM)	k_{cat} ($10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($10^{-3} \text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)	Activité enzymatique (nmole/mg/min)
mt humaine	ARNt ^{Asp} mt humain transcrit <i>in vitro</i>	0,13	10	77	-
	ARNt ^{Asp} <i>E. coli</i>	0,15	133	887	40
<i>E. coli</i>	ARNt ^{Asp} <i>E. coli</i>	0,7	2590	3700	4203

Tableau 6. Paramètres cinétiques des AspRS mitochondriale humaine et d'*E. coli*.

L'AspRS mt humaine reconnaît et aspartyle l'ARNt^{Asp} d'*E. coli* et l'ARNt^{Asp} mt humain transcrit *in vitro* avec des efficacités (rapport k_{cat}/K_M) de $887 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$ et de $77 \text{ s}^{-1}/\mu\text{M}$, respectivement (Bonnefond et al., 2005a). Bien que le deuxième ARNt soit le substrat homologue de l'AspRS mt humaine, la baisse d'efficacité de son aspartylation (facteur 10) par rapport à celui d'*E. coli* peut s'expliquer soit par une flexibilité structurale plus importante du substrat mitochondrial soit par une absence de modifications post-transcriptionnelles qui pourraient être des éléments d'identité.

Alors que la comparaison des efficacités d'aspartylation de l'AspRS d'*E. coli* ($3700 \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) et mt humaine ($887 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) révèle que l'enzyme mt humaine ne

présente une efficacité catalytique réduite que d'un facteur 4, la comparaison des activités enzymatiques de ces deux enzymes par le même substrat (ARNt^{Asp} d'*E. coli*) montrent que l'enzyme mt humaine est 100 fois moins active que son homologue eubactérienne (4200 nmoles/mg/min, pour l'AspRS d'*E. coli*, et 40 nmoles/mg/min, pour l'AspRS mt humaine).

B. Etude de l'inhibition de l'AspRS mitochondriale humaine par deux analogues d'adénylate

Article n°4

Peculiar inhibition of human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase by adenylate analogs

M. Messmer, S. Blais, C. Balg, R. Chênevert, L. Grenier, P. Lague, C. Sauter, M. Sissler, R. Giegé, J. Lapointe & C. Florentz

2008

Soumis pour publication à J. Mol. Biol.

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) mitochondriales (mt) humaines sont les enzymes qui estérifient les ARNt avec l'acide aminé correspondant et forment un jeu différent de protéines que celles impliquées dans la machinerie de traduction cytosolique. La plupart des aaRS mt sont de types eubactériennes au regard de leur séquence et de leur organisation modulaire. Cependant, comparées à ces dernières, les quelques aaRS mt étudiées jusqu'à présent ont des propriétés biochimiques et enzymologiques particulières comme une solubilité amoindrie, une activité spécifique affaiblie et un large spectre de substrats (ARNt de même spécificité mais d'organismes et de règnes différents). Dans ce travail, la sensibilité de l'aspartyl-ARNt synthétase (AspRS) mt humaine envers de petits analogues de substrat (adénylates non hydrolysables) connus pour être des inhibiteurs des AspRS d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* est évaluée et comparée à celles des AspRS cytosoliques (cyt) humaines et bovines. Le L-aspartol adénylate (aspartol-AMP) est un inhibiteur compétitif des AspRS mitochondriale et cytosoliques, avec des valeurs de K_i appartenant à la gamme du micromolaire (4 à 27 μ M pour les AspRS mt et cyt de mammifères). Le 5'-O-[N-(L-aspartyl)sulfamoyl]adenosine (Asp-AMS) est un inhibiteur compétitif 1000 fois plus puissant que l'aspartol-AMP envers l'enzyme mitochondriale (10 nM) et 100 fois moins compétitif que l'aspartol-AMP envers les AspRS cytosoliques humaine et bovine (300 nM). La plus forte sensibilité de l'AspRS mt humaine envers les deux inhibiteurs comparé aux enzymes bactériennes ou cytosoliques de mammifère n'est pas corrélée à une différence marquée entre

des éléments structuraux au sein des différents sites catalytiques. Ceci a été mis en évidence grâce à des expériences de « docking » et suggère que la raison viendrait de la dynamique réactionnelle. Les données présentées ici appellent à la prudence concernant la recherche de molécules antibactériennes dirigées contre les aaRS en raison des graves effets secondaires potentiels de ce type de molécules sur les aaRS mitochondriales humaines.

C. Perspectives

Les « docking » de l'adénylate, de l'aspartol-AMP et de l'Asp-AMS au sein des sites catalytiques des AspRS mt humaine et d'*E. coli* n'ont montré aucune différence concernant les résidus des enzymes contactant les substrats et n'expliquent pas la différence de réactivité entre ces deux AspRS envers ces molécules. Notons que lors du « docking », les structures des AspRS sont figées et les petits substrats se positionnent de manière optimale au sein des sites actifs. C'est pourquoi, l'explication pourrait très certainement venir de la dynamique des molécules au cours de la réaction qui n'est malheureusement pas observable par cette première étude structurale. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons comparé l'ensemble des acides aminés des AspRS mt humaine et d'*E. coli* qui sont impliqués directement ou indirectement dans la reconnaissance de l'ATP, de l'acide aspartique et dans la formation de l'adénylate (Eiler et al., 1999). L'identification d'un ou plusieurs résidus différents entre les deux AspRS serait alors une première piste dans l'exploration et la compréhension ce phénomène. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Substrat	Atome ou groupement chimique reconnu	AspRS <i>E. coli</i>	AspRS mt humaine
ATP	α -phosphate	Arg 217 (motif 2)	Arg 266
	γ -phosphate	Arg 537 (motif 3)	Arg 587
	cycle purine	Phe 229 (motif 2) et Arg 537	Phe 278
Acide aspartique	Reconnaissance générale	groupement α -carboxyle groupement α -aminé ferme le site actif quand l'acide aminé est présent	Arg 217 (motif 2) Ser 193 et Gln 195 Glu 171 (« flipping loop »)
		groupement α -aminé <i>via</i> H ₂ O	Arg 266 Ser 242 et Gln 244 Asp 282
	Reconnaissance de la chaîne latérale	groupe carboxylique de la chaîne latérale	Lys 198 et Arg 489
		chaîne latérale <i>via</i> des ponts salins	Lys 247 et Arg 542 Asp 282 et Glu 284
Formation de l'adénylate		Arg 217	Arg 266

Tableau 7. Acides aminés des AspRS d'*E. coli* et mitochondriale humaine impliqués dans la reconnaissance de l'ATP et de l'acide aspartique. Les informations concernant l'AspRS d'*E. coli* sont extraites de (Eiler et al., 1999).

L'observation de ce tableau révèle que tous les résidus sont identiques à l'exception de l'acide aminé Gly 221 (Glu 171 chez *E. coli*). Ce résidu est impliqué dans la fermeture du site

actif une fois l'acide aminé présent au sein de ce dernier et est ainsi engagé dans la dynamique de la réaction. Cette différence pourrait ainsi expliquer en partie le changement de réactivité de ces deux AspRS envers les mêmes substrats. Pour valider cette hypothèse, il serait nécessaire de muter les deux enzymes (mutation Glu171Gly au sein de *E. coli* et Gly221Glu au sein de l'AspRS mt humaine) et de mesurer le K_M des deux AspRS mutées pour l'acide aspartique.

La grande affinité de l'AspRS mt humaine pour l'Asp-AMS (K_i de 10 nM) pourrait aider à résoudre les problèmes rencontrés lors des essais de cristallisation de cette enzyme. En effet, les nombreuses mises au point de purification de l'AspRS mt humaine réalisées au préalable dans le laboratoire ont soulevé deux paramètres expérimentaux qui rendent la cristallisation de cette protéine difficile. D'une part, l'AspRS mt humaine ne peut être conservée que dans du tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (dans les autres tampons testés cette protéine précipite, (Bonfond et al., 2005a)), or de manière générale, lors des essais de cristallisation le tampon phosphate forme des cristaux de sels avec l'ion Mg^{2+} . D'autre part, même dans ce tampon phosphate, l'AspRS mt humaine présente une forte tendance à s'aggréger et la concentration maximale d'enzyme soluble qu'il est possible d'atteindre (< 2 mg/ml) n'est pas optimale pour réaliser des tests de cristallisation. Il s'avère que parmi les nombreuses structures cristallographiques des aaRS déjà résolues, beaucoup d'entre elles ont été obtenues en présence de l'adénylate ou d'un analogue d'adénylate au sein du site actif de l'enzyme (Giegé et al., 2008). En effet, souvent l'ajout de ce type de substrat aide à solubiliser et/ou à cristalliser les aaRS. C'est pourquoi, nous avons vérifié l'influence d'un analogue d'adénylate sur la solubilité de l'AspRS mt humaine. Dans ce sens nous avons entrepris de concentrer l'AspRS mt humaine fraîchement purifiée par centrifugation sur microcon 30 KDa (étape pendant laquelle l'enzyme habituellement s'agrège) en absence ou en présence d'un excès de 50 ou de 200 fois (molarité) d'Asp-AMS. La concentration en protéine a été évaluée par une mesure d'absorbance à 280 nm. La qualité des échantillons concentrés (état agrégé ou non, état polydisperse ou monodisperse) a ensuite été analysée par « Dynamic Light Scattering », (DLS). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 24.

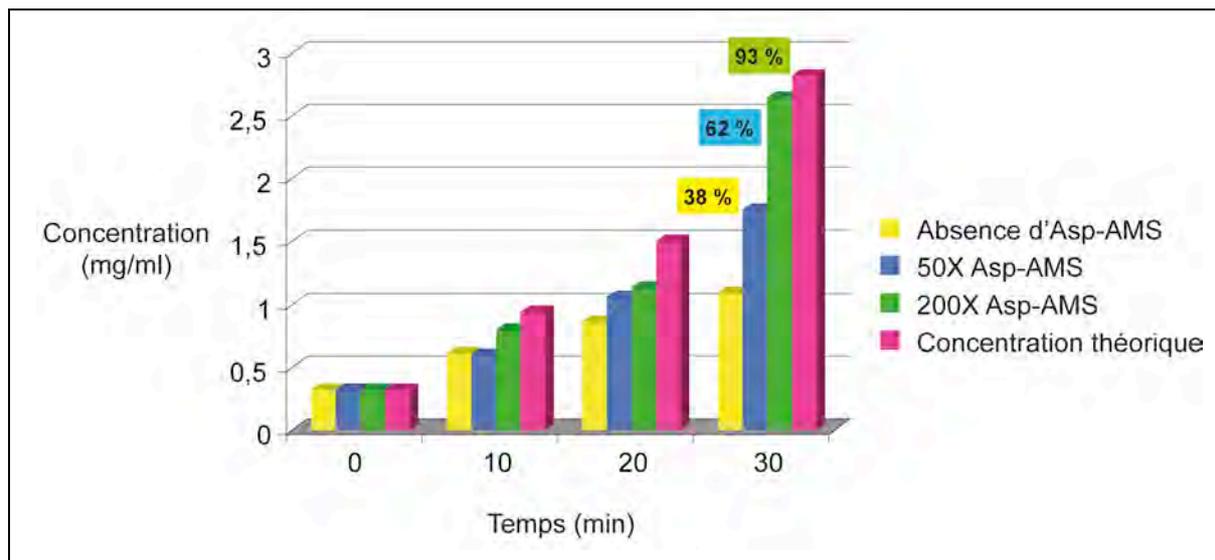


Figure 24. Influence de l'analogue Asp-AMS sur la solubilité de l'AspRS mt humaine. Les concentrations ont été effectuées en absence (jaune) ou en présence d'un excès de 50 fois (bleu) ou de 200 fois (vert) d'Asp-AMS. Ces concentrations sont directement comparables à celles théoriquement attendues (rose). Les concentrations finales des trois échantillons sont indiquées en pourcentage de la concentration finale théorique.

Après centrifugation, les volumes des échantillons ont été réduits de 9 fois. Comme la concentration initiale de l'AspRS mt humaine à l'issue de la purification est de 0,3 mg/ml, la concentration finale théorique attendue est 2,7 mg/ml (concentration d'un facteur 9). En absence d'Asp-AMS, la concentration finale atteinte est 1,1 mg/ml ; en présence d'un excès de 50 fois d'Asp-AMS, la concentration finale de la protéine est 1,8 mg/ml et en présence d'un excès de 200 fois d'Asp-AMS, la concentration finale a atteint 2,6 mg/ml. Il apparaît ainsi que l'ajout d'un excès d'Asp-AMS aide à solubiliser la protéine.

Notons que la même expérience a été réalisée en présence de la molécule Tyr-AMS (analogue du substrat naturel Tyr-AMP, résultats non présentés). L'ajout de Tyr-AMS ne permet pas de concentrer l'AspRS mt humaine montrant ainsi que l'addition de l'Asp-AMS assiste spécifiquement la solubilisation de la protéine.

Nous avons complété ces résultats encourageants par des analyses de DLS sur trois échantillons (avant concentration, après concentration en absence d'Asp-AMS et après concentration avec excès de 200 fois d'Asp-AMS). Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

AspRS mt humaine	Agrégats	Masse moléculaire apparente
Avant concentration	Oui, polydisperse	205 kDa (pour la population dominante)
Concentration sans Asp-AMS	Oui, polydisperse	205 kDa (pour la population dominante)
Concentration, excès de 200 fois d'Asp-AMS	Non, monodisperse	178 kDa

Tableau 8. Interprétation des résultats des expériences de « Dynamic Light Scattering » réalisées sur l'AspRS mt humaine. La masse moléculaire théorique d'un dimère d'AspRS mt humaine est de 136 kDa.

En absence d'Asp-AMS et après concentration, l'AspRS est toujours agrégée. Il y a présence de plusieurs populations de polymères d'AspRS avec une population majoritaire présentant une masse moléculaire apparente de 205 kDa (la masse moléculaire théorique d'un dimère d'AspRS mt humaine est de 136 kDa). Néanmoins, les analyses de DLS ont montré qu'en présence d'Asp-AMS, l'AspRS mt humaine ne se limite plus qu'à une seule population de protéines de masse moléculaire apparente de 178 kDa. Notons que la masse moléculaire apparente ne représente pas uniquement la masse moléculaire totale des acides aminés composant la protéine mais tient également compte de l'encombrement de la protéine. Ainsi la masse moléculaire apparente de 178 kDa pourrait très bien correspondre à celle d'un dimère d'AspRS mt humaine. La mesure de la concentration de l'AspRS combinée aux expériences de DLS a permis de montrer que l'Asp-AMS est une molécule extrêmement intéressante pour aider à la cristallisation de l'AspRS mt humaine.

Forts de ces résultats encourageants, nous avons préparé une solution d'AspRS mt humaine à 7 mg/ml contenant 1,3 mM d'Asp-AMS et entrepris des tests de cristallisation de la protéine en présence de l'analogue d'adénylate par diffusion de vapeur. Le principe est le suivant : dans une enceinte close, une goutte de solution (dans notre cas 50 nl à 150 nl) contenant la molécule à cristalliser (AspRS/Asp-AMS) ainsi que le tampon et l'agent cristallisant est mise à équilibrer contre un réservoir (volume de 70 µl à 1,5 ml) contenant le tampon et l'agent cristallisant à une concentration plus élevée que dans la goutte. L'équilibration des concentrations se fait par évaporation des composés volatiles (l'eau, par exemple) de la goutte vers le réservoir, jusqu'à ce que les tensions de vapeur au niveau des 2 compartiments soient identiques. Ainsi la goutte diminue de volume et ses composants se concentrent. Si les conditions sont favorables, la molécule est amenée à sursaturation (état hors équilibre) et cristallise. L'approche généralement utilisée consiste à tester un grand nombre de conditions au travers d'une matrice clairesemée, réunissant jusqu'à 96 combinaisons différentes de substances tampons, d'agents précipitants et d'additifs.

Après 3 jours, trois conditions ont donné des cristaux. La première correspond à une solution de 0,2 M de sulfate de lithium, 0,1 M d'acétate de sodium pH 4,5, 50% PEG 400 (w/v), la deuxième à 50 mM chlorure de calcium, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 20 % éthanol (v/v) et la troisième à 50 mM chlorure de calcium, 0,1 M Bis-Tris pH 6,5, 30 % PEG MME 550 (v/v). Cependant, il s'est avéré que ces trois cristaux étaient des cristaux de sels. Ceci s'explique probablement par le tampon de conservation de l'AspRS mt humaine utilisé qui contient du tampon phosphate qui a tendance à former des cristaux de sels avec le lithium ou le calcium (composants des solutions de cristallisation).

Maintenant qu'une solution pour pallier le problème de solubilité de l'AspRS grâce à l'utilisation de l'Asp-AMS a été trouvée, les conditions de conservation de l'AspRS devront être révisées afin de favoriser les chances de succès de cette enzyme.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Peculiar inhibition of human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase by adenylate analogs

Marie MESSMER, Sébastien P. BLAIS, Christian BALG, Robert CHÊNEVERT, Luc GRENIER, Patrick LAGÜE, Claude SAUTER, Marie SISSLER, Richard GIEGE, Jacques LAPOINTE, Catherine FLORENTZ

Biochimie, 2009, vol. 91, n° 5, pages 596-603

Publication 4 : pages 104-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.005>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Chapitre 3

À la découverte des nouvelles originalités pour l'AspRS mitochondriale humaine

Le travail réalisé par Aurélie Fender au cours de sa thèse a révélé certaines particularités et originalités fonctionnelles propres au système d'aspartylation mt humain qui ont été présentées dans l'introduction du chapitre 2. Dans ce qui suit, de nouvelles propriétés de ce système seront décrites.

A. À la recherche de protéines partenaires de l'AspRS mt et de sa caractérisation N-terminale

1. Introduction

L'étude fonctionnelle de l'AspRS mt humaine a révélé, à l'image de ce qui avait été observé pour les autres aaRS mt humaines jusqu'à présent étudiées, que son efficacité d'aminacylation (k_{cat}/K_M) est réduite par rapport à son homologue bactérienne. Son activité enzymatique (nombre de molécules de substrat transformées/min/mg d'enzyme) est 40 fois inférieure à celle de l'AspRS d'*E.coli* (Bonfond et al., 2005a). Une question fondamentale se pose alors. Ces activités réduites reflètent-elles une situation biologique particulière, motivée par la synthèse d'uniquement 13 protéines mitochondriales ? Ou alors les tests *in vitro* d'aminacylation ne reflèteraient-ils pas le manque d'un ou de plusieurs co-facteur(s) ou protéine(s) partenaire(s) jusqu'à présent inconnus ? En effet, comme nous l'avons souligné plus haut (§ D.4. de l'introduction), les activités d'aminacylation de certaines aaRS se trouvent stimulées par leur présence au sein de complexes multiprotéiques. Ceci est tout particulièrement le cas pour les complexes formés d'une part par la MetRS, la GluRS et Arc1p chez *S. cerevisiae* (Simos et al., 1996) et d'autre part par la LysRS, la ProRS et la LeuRS chez *M. thermoautotrophicus* (Praetorius-Ibba et al., 2007). Se pourrait-il alors qu'un ou plusieurs complexes impliquant des aaRS mt humaines existe(nt) également et qui améliorerai(en)t leur efficacité d'aminacylation ?

Un second argument en faveur d'un partenariat provient de la mise en évidence de l'implication de l'AspRS mt humaine dans une leucoencéphalopathie. Il a été suggéré qu'au-delà de sa fonction d'aminacylation, cette protéine pourrait posséder une ou plusieurs fonctions alternative(s) pour le moment inconnue(s) (Scheper et al., 2007). En effet, malgré la présence de l'AspRS mutée corrélée à une diminution d'activité catalytique, les activités des complexes de la chaîne respiratoire restent inchangées. Ceci montre que la traduction mitochondriale, et par conséquent l'activité de l'AspRS, ne sont pas suffisamment affectées pour perturber la synthèse des 13 protéines mt, sous-unités des complexes de la chaîne

respiratoire. Une autre fonction/partenariat de l'AspRS est donc à considérer pour expliquer l'impact moléculaire initial de la pathologie.

Par ailleurs, il a été montré que dans le cas de la LeuRS mt humaine, l'extrémité N-terminale de la protéine a une influence importante sur l'aminoacylation et que son activité se trouve affaiblie lorsqu'une partie de son signal d'adressage mitochondrial demeure en amont de sa séquence (Yao et al., 2003). Or la séquence N-terminale de l'AspRS mt humaine mature, basée sur des comparaisons de séquences avec d'autres AspRS (Bonfond et al., 2005a) n'est que prédictive (logiciels informatiques Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) (Small et al., 2004)) et MitoProt (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>) (Claros & Vincens, 1996)). Par conséquent, il ne peut être exclu que l'extrémité N-terminale de l'AspRS recombinante ne corresponde pas à la réalité biologique, ce qui pourrait expliquer son efficacité d'aminoacylation et son activité enzymatique réduite.

Ainsi, la caractérisation de l'extrémité N-terminale de l'AspRS mt de même que l'hypothèse d'un partenariat protéique méritent d'être explorées. Nous avons tenté de répondre aux deux questions simultanément en combinant des approches de co-purification de l'AspRS mt humaine et ses partenaires avec de la spectrométrie de masse et du séquençage N-terminal.

2. Premiers indices expérimentaux d'un partenariat protéique par une approche "pull-down"

Des expériences de « pull-down » réalisées (par Marie Sissler) avec l'AspRS mt humaine recombinante comportant un His-tag avaient révélé que la protéine p32 de la famille « Mitochondrial Acidic Matrix protein » (MAM) de fonction inconnue et de poids moléculaire de ~32 kDa était retenue par l'AspRS. Forts de cette première découverte, nous avons entrepris de chercher si l'AspRS mt humaine possédait d'autres partenaires en abordant cette question par des expériences de co-immunoprécipitation. Les mises au point expérimentales ainsi que les premiers résultats obtenus sont présentés dans ce qui suit.

3. Recherche de partenaires par co-immunoprécipitation

3.1. Stratégie expérimentale

L'immunoprécipitation est une technique basée sur l'interaction entre une protéine et son anticorps, la purification du complexe immun avec des protéines G et sa séparation sur SDS-PAGE. La stratégie expérimentale que nous avons employée dans le cas de l'AspRS est détaillée dans la partie Matériel et Méthodes et est rappelée ici brièvement. Une première incubation des protéines G avec les extraits bruts de cellules HeLa (obtenus par sonication des cellules) est réalisée afin d'éliminer les protéines interagissant de manière aspécifique avec celles-ci. Les étapes suivantes sont l'incubation des extraits cellulaires avec l'anticorps anti-AspRS (sérum de lapin anti-AspRS mt humaine, préparé localement par Aurélie Fender), la formation du complexe anticorps-antigène, la purification de ce complexe grâce aux protéines G (interaction avec anticorps) couplées à des billes d'agarose, la séparation de l'immunoprécipité sur SDS-PAGE 12% et enfin l'assignation des protéines immunoprécipitées par spectrométrie de masse.

3.2. Résultats préliminaires et optimisations

Les quantités adéquates et les ratios protéines G (à la fois pour les étapes de lavage et de purification du complexe immun) et de sérum ont été déterminés en utilisant l'AspRS mt humaine recombinante purifiée, sur-exprimée dans *E. coli*. Ces conditions ont ensuite été appliquées sur les extraits bruts de cellules HeLa. Les premiers résultats obtenus ont été encourageants tout en étant complexes. La figure 25 présente un gel typique obtenu et révèle qu'environ 30 protéines ont été immunoprécipitées. L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) d'une bande co-migrant avec l'AspRS mt humaine recombinante a révélé la présence de l'AspRS mt mature. Ainsi cette protéine est bien immunoprécipitée, montrant que les conditions de concentration en sérum par rapport à la quantité d'extrait mitochondrial utilisé étaient satisfaisantes pour permettre l'immunoprécipitation. Cependant, les nombreuses bandes protéiques observées à l'issue de l'expérience d'immunoprécipitation laissent supposer qu'un certain nombre d'entre elles étaient aspécifiques. Ceci a été confirmé par les données de spectrométrie de masse qui ont révélé que la plupart des protéines assignées étaient de localisation cytosolique ou même nucléaire (!).

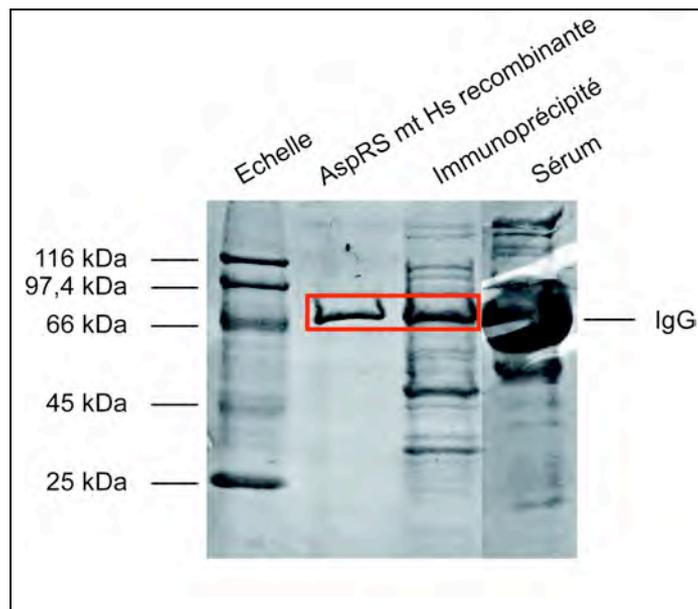


Figure 25. Gel SDS-PAGE 12% typique de co-immunoprécipitation. L'immunoprécipitation a été réalisée avec un sérum de lapin contenant des anticorps dirigés contre l'AspRS mt humaine sur des extraits bruts de cellules HeLa. L'AspRS mt humaine et la bande de l'immunoprécipité co-migrant avec elle sont encadrées en rouge. La chaîne lourde des anticorps est également indiquée.

Ensuite, certaines bandes n'ont pu être assignées en raison d'une non concordance entre les masses théoriques et expérimentales. Enfin, une protéine du sérum co-migre avec l'AspRS, laissant supposer que d'autres protéines du sérum pourraient "cacher" des protéines potentiellement importantes dans notre analyse.

Nous avons alors entrepris une optimisation systématique de la plupart des étapes du protocole afin de rendre les immunoprécipitations les plus spécifiques possible à l'AspRS mt humaine et d'éviter au mieux les contaminations aussi bien par les extraits de cellules HeLa que par des composés du sérum. Les points les plus importants sont présentés brièvement.

Les mises au point expérimentales ont tout d'abord concerné l'amélioration de la résolution de la séparation des protéines formant l'immunoprécipité. La séparation des protéines sur gel bi-dimensionnel alors envisagée s'est révélée adéquate pour éviter tout chevauchement de protéines et le résultat obtenu alors est illustré par la figure 26. Cette technique permet de séparer les protéines lors d'une première dimension selon leur point isoélectrique (pI) et lors d'une deuxième dimension selon leur masse moléculaire. Ce gel bi-dimensionnel illustre le résultat d'une immunoprécipitation au cours des mises au point expérimentales. L'AspRS mt humaine est à nouveau retrouvée (identifiée par spectrométrie de masse et indiquée par une flèche) mais sa taille (~ 55 kDa) est inférieure à celle théorique (69,6 kDa). Cette différence de taille pourrait s'expliquer par une dégradation de la protéine.

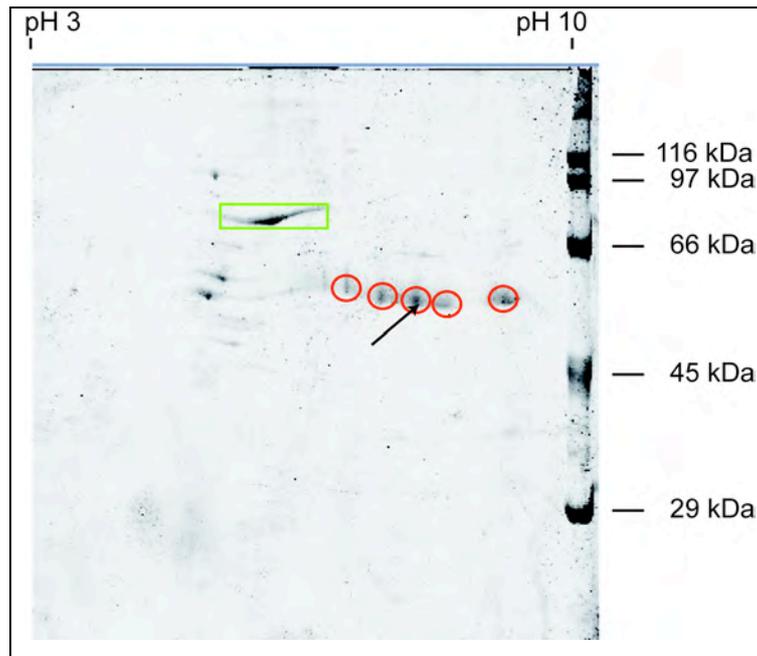


Figure 26. Séparation des protéines immunoprécipitées avec l'AspRS mt humaine sur gel bi-dimensionnel (1). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un sérum contenant des anticorps dirigés contre l'AspRS mt humaine sur un extrait brut de cellules HeLa. Le spot correspondant à l'AspRS mt humaine est indiqué par une flèche (assignation par spectrométrie de masse). Les spots entourés en rouge correspondent aux IgG, et celui encadré en vert correspond à la BSA. Les échelles de pH et des masses moléculaires sont indiquées.

La présence de BSA dans le tampon se traduit par une traînée d'intensité importante (encadrée en vert) qui pourrait masquer la présence d'autres protéines et rendre leur identification difficile. Ensuite, les IgG du sérum sont retrouvés dans plusieurs spots (entourés en rouge) et notamment dans celui contenant l'AspRS. Enfin, un nombre important de protéines accompagnent encore l'AspRS mt humaine. Ainsi, afin d'éliminer tout partenaire aspécifique mais également pour que l'AspRS immunoprécipitée soit la plus pure possible en vue de l'analyse de son extrémité N-terminale, les conditions de tampons, temps d'incubation, etc... ont été optimisées et des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés. Les IgG ont été liés de manière covalente à des protéines G couplées à des billes d'agarose (Sigma) (Murray et al., 2004), ceci en vue de se libérer des signaux apportés par le sérum à l'issue de l'immunoprécipitation. Enfin, un nouvel anticorps (commercial, Genosphere) dirigé contre le peptide $L_{486}FLPKEENPREL_{497}$ de l'AspRS mt humaine a été utilisé. Le peptide a été choisi sur la base du modèle de la structure de l'AspRS mt humaine pour être localisé dans une boucle de surface, et non impliqué dans la dimérisation de la protéine.

3.3. Premiers résultats

Les conditions expérimentales finales retenues pour les tests d'immunoprécipitation de l'AspRS mt humaine et la détection de partenaires protéiques sont décrites dans la partie Matériel et Méthodes. Le gel bi-dimensionnel présenté dans la figure 27, illustre le type de résultat obtenus après l'aboutissement des mises au point.

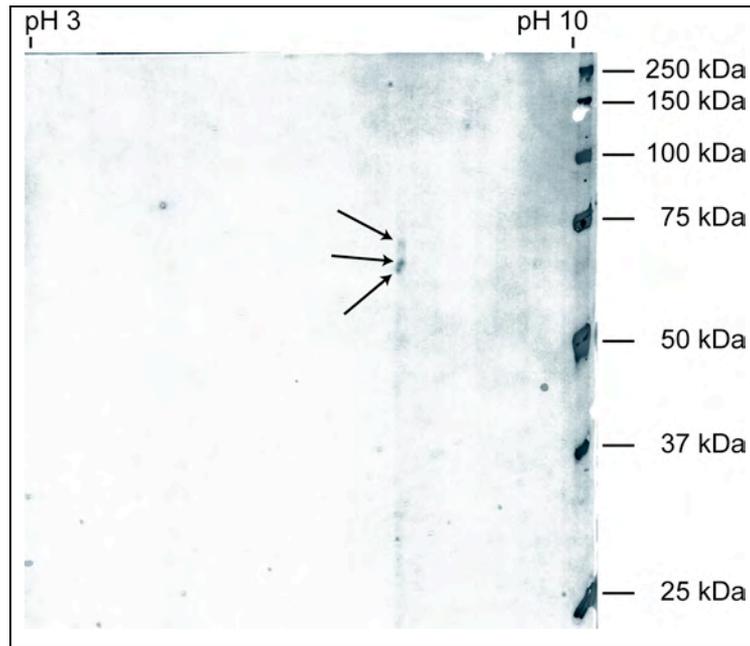


Figure 27. Séparation des protéines immunoprécipitées avec l'AspRS mt humaine sur gel bi-dimensionnel (2). L'immunoprécipitation a été réalisée avec un sérum contenant des anticorps dirigés contre le peptide L₄₈₆FLPKEENPREL₄₉₇ (Genosphere) sur un extrait brut de cellule HeLa. Les IgG du sérum ont été liés de manière covalente aux protéines G couplées aux billes d'agarose. Les trois spots observés sont indiqués par des flèches. Les échelles de pH et des masses moléculaires sont indiquées.

La coloration au bleu de coomassie conduit à la révélation de la présence de trois spots uniquement. La distance de migration des protéines correspondantes s'apparente à un poids moléculaire avoisinant 70 kDa. Rappelons que le poids moléculaire théorique de l'AspRS mt humaine est de 69,6 kDa. Le pHi avoisine également celui attendu pour l'AspRS mt, à savoir 7,6.

Les trois spots ont été découpés et donnés à analyser en spectrométrie de masse. Nous sommes en attente des résultats.

4. Conclusion et perspectives

Le gel de la figure 27 révèle qu'à l'issue de l'immunoprécipitation trois spots sont visibles (en cours d'analyse par spectrométrie de masse). On peut se demander, si la présence de seulement trois spots protéiques sur le gel bi-dimensionnel est artéfactuelle et décrit des conditions expérimentales trop stringentes ou révèle un partenariat transitoire que l'on n'aurait pu déceler. Toutes ces suppositions prouvent que les immunoprécipitations devront maintenant être poursuivies en jouant encore avec les conditions expérimentales (tampon, purification des mitochondries, ...). Si un ou plusieurs partenaires étaient alors repéré(s), des co-immunoprécipitations inverses (utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine initialement co-immunoprécipitée) devront être entreprises afin de vérifier si, à son tour, cette protéine est capable de co-immunoprécipiter l'AspRS mt humaine. Enfin la stratégie Tandem Affinity Purification tag (« TAP-tag ») pourrait également être envisagée afin de confirmer et de compléter les expériences d'immunoprécipitation (Drakas et al., 2005).

B. Etude du produit d'épissage alternatif de l'AspRS mitochondriale humaine

1. Introduction

L'anéantissement plus que déconcertant du dogme « 1 gène pour 1 protéine » a été renforcé par le séquençage complet du génome humain (identification de ~ 25 000 gènes) et a énoncé clairement la nécessité d'accroître la diversité protéique (estimée à ~ 150 000 protéines). Cet accroissement pourrait en partie être atteint en augmentant le réservoir d'ARNm. Les possibilités d'enrichir le transcriptome sont diverses et variées, l'une d'entre elles étant l'épissage alternatif des ARNm. Chez les eucaryotes supérieurs, les gènes qui codent les protéines sont constitués d'une succession de régions codantes « exons », et de régions non codantes « introns ». L'addition ou l'élimination d'exon(s) par l'épissage alternatif permet alors un brassage potentiellement massif de ceux-ci, contribuant alors à la démultiplication d'ARNm différents à partir d'un même gène (Boue et al., 2003). Bien que le taux exact d'ARNm humain subissant l'épissage alternatif reste en question, il est pour l'instant évalué à 60% (Modrek & Lee, 2002).

Alors que les aaRS humaines représentent, comme toute autre protéine, un réservoir potentiel de fonctions alternatives, jusqu'à présent un seul cas a été associé à un épissage alternatif. Il a, en effet, été montré que deux formes de TrpRS cytosoliques co-existent : une forme tronquée en N-terminal vient s'ajouter à la forme complète de l'enzyme (Tolstrup et al., 1995) et l'épissage alternatif de l'ARNm prive cette enzyme de ses 47 premiers acides aminés. La TrpRS tronquée obtenue a la capacité, en plus de son aptitude à aminoacyler les ARNt, d'inhiber le développement de vaisseaux sanguins (Otani et al., 2002; Wakasugi et al., 2002b). Cette activité angiostatique vient ainsi enrichir la diversité fonctionnelle des aaRS décrite dans le § **D.2.** de l'introduction de ce manuscrit. Un second exemple d'épissage alternatif d'un ARNm codant pour une aaRS concerne la CysRS cytosolique humaine. Cependant dans ce cas, la présence/absence d'un exon contrôle l'efficacité catalytique de la fonction d'aminocyclation de l'enzyme. Pour le moment, aucune activité nouvelle n'a pu être mise à jour pour ce produit d'épissage (Kim et al., 2000).

L'identification des dix gènes manquants des aaRS mt humaines effectuée au sein de mon laboratoire d'accueil (Bonfond et al., 2005a) a été entreprise en vue d'un clonage systématique et de l'analyse biochimique des relations structure/fonction. Au cours de ces clonages, les PCR réalisées sur une banque d'ADNc ont révélé la présence d'un ou plusieurs produits supplémentaires et de tailles inférieures à celles correspondant à l'amplification des régions codantes des aaRS ciblées. Après séquençage, il est apparu que ces produits correspondent également à leurs séquences, mais dans lesquelles les parties manquantes correspondent très précisément aux séquences d'un ou plusieurs exons entiers. L'objectif, alors, a été de vérifier la réalité biologique de ces produits d'épissage et de cerner leurs rôles.

Dans l'article ci-dessous, nous nous sommes focalisés sur le produit d'épissage alternatif de l'AspRS mt humaine. Nous avons démontré l'existence à la fois d'un ARNm épissé, présent dans les ARN totaux de tous les tissus humains étudiés, et de la protéine correspondante dans le muscle squelettique humain. Diverses stratégies de clonage ont été entreprises afin de surproduire la protéine et d'en déterminer, *in vitro*, la/les fonction(s) de ce variant. Malheureusement et à l'inverse de ce qui est observé pour l'AspRS mt entière, cette protéine, bien qu'exprimée dans des cellules bactériennes, reste non soluble. Des hypothèses quant (i) à l'influence de l'absence de ce domaine sur la structure/fonction de la protéine et (ii) au rôle du domaine manquant dans la protéine complète sont proposées. La découverte de variants d'épissage alternatif d'aaRSs mitochondriales confirme la contribution de

macromolécules constitutives, telles que les aaRS (« housekeeping proteins ») dans la diversité du protéome humain et élargit leur champs d'action du cytosol à l'organelle mitochondrie.

2. Etude d'un produit d'épissage alternatif de l'ARNm de l'AspRS mitochondriale humaine

Article n°5

Alternative splice-variants for human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases

**M. Messmer, G. Scheper, A. Gaudry, K. de Groot, M. Van der Knaap, C. Florentz
& M. Sissler**

2008

Soumis pour publication à Proc. Natl. Acad. Sci. USA

Le séquençage du génome humain a révélé que le nombre total de gènes ne permet pas d'expliquer la diversité fonctionnelle et structurale retrouvée au sein de protéines. Ceci est partiellement compensé par des événements d'épissage alternatifs qui agrandissent le réservoir d'ARN messagers (ARNm). Les aminoacyl-ARNt synthétases sont des enzymes constitutives qui, en plus d'être impliquées dans le processus de la traduction dans lequel elles aminoacylent spécifiquement les ARNt, exhibent une large variété de fonctions. Jusqu'à présent, uniquement deux cas de produits d'épissage d'aaRS cytosoliques ont été mentionnés. Ici, nous apportons des preuves de l'existence de plusieurs produits d'épissage d'aaRS mitochondriaux (mt). Des amplifications d'ADNc par PCR ont produit non seulement les séquences complètes de l'AspRS, de la ThrRS et de la LysRS, mais également leurs séquences dans lesquelles manquent un ou plusieurs exons. Des analyses plus approfondies ont révélé que l'ARNm de l'AspRS délété de l'exon 13 est co-amplifié avec l'ARNm complet à partir de transcriptomes de 20 tissus différents. Des expériences de qPCR ont montré que les ratios varient de 4 à 14%. L'existence de la protéine tronquée a été confirmée par des expériences de western-blot sur des mitochondries purifiées à partir de biopsies de muscle

squelettique humain. La pertinence de la co-existence du produit d'épissage alternatif avec l'AspRS complète reste à être résolue. À l'inverse de l'AspRS mt, la sur-production du produit d'épissage alternatif s'est révélée délicate. Le peptide correspondant à l'exon 13 est localisé dans le domaine d'insertion eubactérien, de fonction inconnue. Il est distant du domaine catalytique et du domaine de liaison à l'ARNt. La perte ou le gain de fonction sont discutées. Cette analyse propulse les aaRS mt en dehors de leur rôle stricte limité à la traduction mt sur la scène des produits d'épissage. Ceci les place comme de nouveaux acteurs agrandissant la diversité fonctionnelle du protéome mitochondrial.

3. Nouvelles perspectives

Bien que le doute sur la réalité biologique de l'AspRS-ΔExon13 ait été levé et son existence ainsi que sa localisation mitochondriale prouvés, les difficultés sérieuses rencontrées lors de sa sur-expression et de sa purification ne nous ont pas permis, à l'heure actuelle, d'établir sa fonction. D'autres alternatives sont maintenant à envisager afin de poursuivre l'exploration fonctionnelle de l'AspRS-ΔExon13.

3.1. Surproduction de la protéine recombinante et études fonctionnelles *in vitro*

Bien qu'il soit possible de surproduire et de purifier l'AspRS mt humaine ((His)₆-tag, clonée dans le vecteur pQE 70, souche Top 10 ou M15, purification en conditions natives), la production et la purification de l'AspRS-ΔExon13 se sont révélées jusqu'à présent vaines. Afin de pallier les problèmes rencontrés, de nombreuses tentatives de surproduction de l'AspRS-ΔExon13 ont été entreprises. Les différents paramètres de clonage, d'expression et de purification ainsi que les souches utilisées sont données dans le tableau 9.

Clonage	Souche	Expression	Purification
mt-AspRS-ΔExon13-(His) ₆ pQE 70	Top 10	12°C	Condition native
	Bi 21(DE3)RIL	+/- Triton X100	
	Rosetta 2	4 h	20 μM IPTG
	M 15	+/- Glucose	+/- MgCl ₂
OmpA-mt-AspRS-ΔExon13-(His) ₆ pQE 70		pH 6,1 à pH 7,5	+/- DTT
	PGK JE7 (protéines chaperonnes)	+/- Fructose	Condition dénaturante Chlorure de Guanidium 6M
	PGK JE8 (protéines chaperonnes)	+/- β-Me	Renaturation sur colonne ou par dialyses successives Chlorure de Guanidium 6M à 0 M
(His) ₆ -MBP-mt-AspRS-ΔExon13 pDEST	Arctic (protéines chaperonnes)	pendant la nuit	Condition dénaturante Urée 8M
		37°C	Renaturation sur colonne ou par dialyses successives Urée 8M à 0 M
peri-(His) ₆ -MBP-mt-AspRS-ΔExon13 pDEST			
			MES MOPS NaH ₂ PO ₄ KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
			1 mM IPTG

Tableau 9. Présentation des différentes conditions de surexpression et de purification de l'AspRS-ΔExon13. Ce tableau présente les différents plasmides, souches, températures, temps, concentration d'IPTG, pH, tampons et additifs utilisés lors des tests de surexpression de l'AspRS-ΔExon13. Les trois stratégies de purification qui ont été utilisées sont également indiquées.

Pour toutes les constructions, un (His)₆-tag a été fusionné à la protéine afin de faciliter sa purification sur une colonne d'affinité portant des ions nickel. Dans un premier temps, l'AspRS-ΔExon13 a été clonée dans le vecteur d'expression pQE 70 et exprimée selon les mêmes conditions que celles utilisées, avec succès, lors de la purification de l'AspRS mt humaine. Cependant, celles-ci se sont révélées infructueuses dans le cas de l'AspRS-ΔExon13 et c'est la raison pour laquelle nous nous sommes tournés vers d'autres alternatives présentées ici brièvement. Elles concernent :

- (i) L'utilisation des souches d'*E. coli* M15, B121(DE3)RIL et Rosetta 2 (leurs caractéristiques sont présentées dans la partie Matériel et Méthodes).
- (ii) L'assistance de protéines chaperonnes grâce à l'utilisation des souches PGK JE7, PGK JE8 et Arctic. Cette dernière souche possède deux protéines chaperonnes (Cpn 60 et Cpn 10) provenant d'une bactérie psychrophilique, permettant à *E. coli* de pousser à basse température (Ferrer et al., 2004).
- (iii) L'adressage de la protéine au périplasme, grâce à deux types de signaux fusionnés en N-ter de la protéine (« peri » (Nallamsetty et al., 2005) et « OmpA » (Hytönen et al., 2004)). Cette stratégie a déjà été mise à profit afin d'augmenter la solubilité de protéines riches en pont disulfure (Nallamsetty et al., 2005) (l'AspRSΔExon13 contient 10 cystéines).
- (iv) Tout le long de ces expériences, différentes conditions de culture et de solubilisation ont été testées (Tableau 9).

Parmi tous ces jeux de conditions, seulement trois ont abouti à une expression de la protéine. Alors que deux d'entre eux n'ont malheureusement pas conduit à l'obtention d'une protéine soluble, une condition mettant en jeu la souche Arctic, a permis d'obtenir l'AspRS-ΔExon13 soluble. Cependant, les deux protéines chaperonnes (Cpn 60 et Cpn 10) co-exprimées avec la protéine restent liées de manière irréversible à l'AspRS-ΔExon13 et empêchent toute investigation fonctionnelle de la protéine (éventuellement l'interaction de la protéine avec l'ARNt^{Asp}, si interaction il y a).

La surproduction de la protéine impossible pour le moment à partir de transformants d'*E. coli*, rappelle la toxicité d'un variant de l'AspRS d'*E. coli* totalement privé du domaine d'insertion eubactérien (G. Eriani, communication personnelle). Cependant, la détection de

l'existence de la protéine dans le muscle squelettique, laisse entrevoir qu'une stratégie d'expression dans des cellules eucaryotes pourrait être salvatrice. Nous avons alors tiré profit d'une série d'expériences impliquant l'expression transitoire de dérivés de l'AspRS mt dans des cellules humaines en culture (cellules HEK 293T, voir chapitre 4), pour vérifier si l'AspRS- Δ Exon13 pouvait également être exprimée dans ces cellules. Comme on peut l'observer dans la figure 28, les transfections de cellules HEK 293T avec une construction fusionnant le gène de l'AspRS- Δ Exon13 (précédé du signal d'adressage mitochondrial de l'AspRS mt humaine) à la GFP, conduit à l'expression d'une protéine viable dans des cellules humaines en culture. Ceci donne un espoir quant à l'obtention de la protéine recombinante dans des cellules de mammifère.

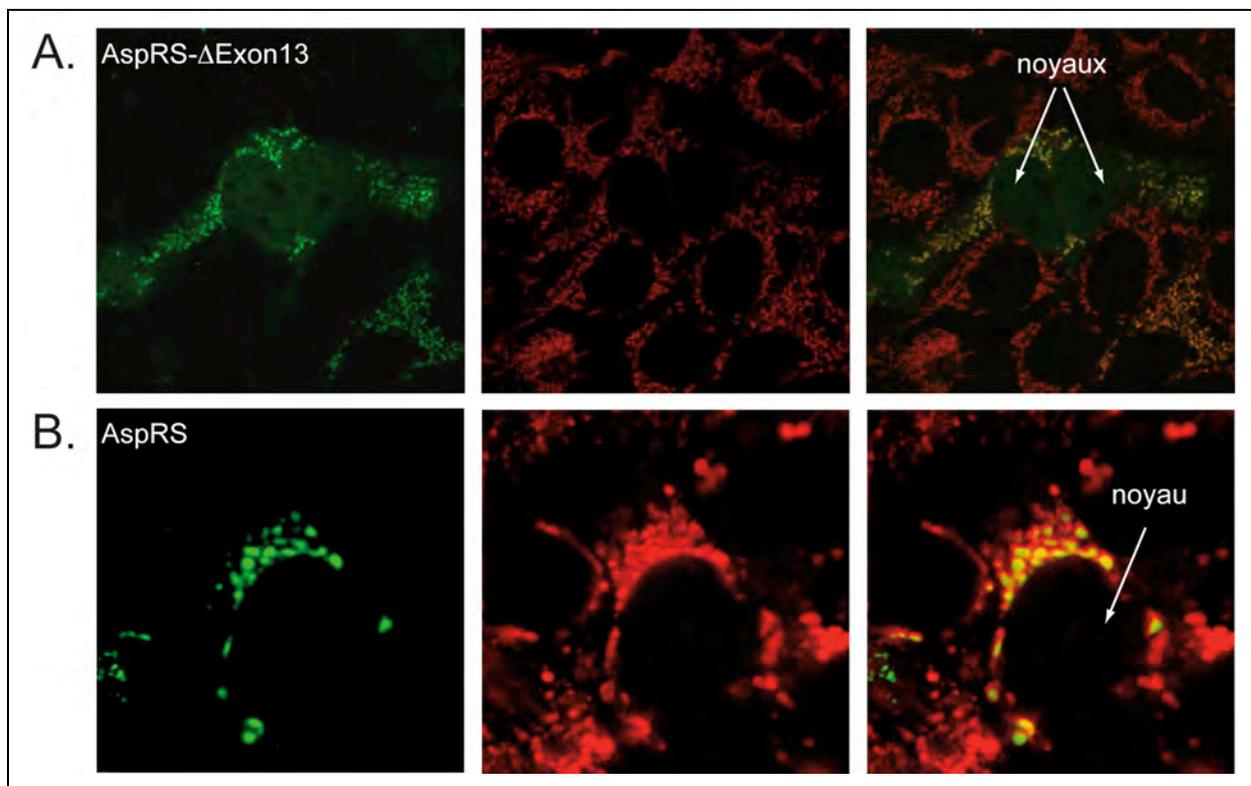


Figure 28. Expression de MTS-mt-AspRS- Δ Exon13 et MTS-mt-AspRS fusionnées à la GFP dans des cellules humaines. Les cellules HEK 293T ont été transfectées de manière transitoire avec des plasmides présentant la séquence d'adressage mitochondriale suivie soit par l'AspRS- Δ Exon13 (A.) ou l'AspRS mt humaine (B.) fusionnées à la GFP. Les photos de la colonne de gauche permettent de distinguer la fluorescence de la GFP, celles du milieu la fluorescence du marqueur mitochondrial Mitotracker Red CM-H₂XRos (Invitrogen) et celles de droite la superposition des images deux premières colonnes. Notons que l'échelle n'est pas la même entre les cellules de la ligne A et celles de la ligne B.

Si cette stratégie d'expression se révélait enfin fructueuse, de nombreux travaux biochimiques de caractérisation fonctionnelle de l'AspRS- Δ Exon13 pourraient être entrepris, et ceci de manière comparative à l'enzyme native. La capacité de ce produit d'épissage à

aminoacyler l'ARNt serait prioritairement examinée. Il serait plaisant de penser que l'AspRS mt humaine, déjà caractérisée, serait cantonnée à sa fonction d'aminoacylation et que l'AspRS-ΔExon13, protéine fraîchement découverte, viendrait agrémenter la mitochondrie humaine d'une ou plusieurs fonctions nouvelle(s). Cependant, l'épissage alternatif d'une part ne touche ni le domaine catalytique ni les domaines de liaison aux différents substrats, mais prive l'AspRS-ΔExon13 d'une partie du repliement ferredoxine (développé dans l'article n°5) pour lequel des fonctions distinctes de l'aminoacylation ont déjà été attribuées dans diverses protéines. L'AspRS mt humaine native, en revanche, possède la totalité de ce domaine ce qui pourrait évoquer l'idée que c'est elle qui serait l'ambassadrice de fonction(s) alternative(s), et que le variant serait l'enzyme à unique fonction d'aspartylation. Cependant, nous n'écartons nullement la possibilité que l'AspRS-ΔExon13 possède également une ou des fonction(s) alternative(s) à l'aminoacylation, semblable(s) ou distincte(s). Enfin, la distribution quantitative relative des deux ARNm et des deux protéines dans les tissus humains (excédent AspRS native/AspRS-ΔExon13) conduit à laisser la question de l'implication exclusive de l'une ou de l'autre dans l'aminoacylation tout à fait ouverte.

3.2. Vers les approches *in vivo*

D'autres stratégies doivent également être considérées afin de comprendre, *in vivo*, les propriétés du produit d'épissage alternatif. Nous avons montré dans le paragraphe précédent que l'AspRS-ΔExon13 fusionnée à la GFP est exprimée dans les cellules de mammifères. Ceci ouvre la voie à de nouvelles stratégies afin de découvrir la ou les fonctions de cette protéine. Des expériences de co-immunoprécipitation et de TAP-tag pourraient ainsi être envisagées afin de découvrir la perte ou le gain de partenaires protéiques (Drakas et al., 2005). Des expériences d'ARN interférence (siARN) permettraient d'éteindre spécifiquement l'ARNm codant pour l'AspRS entière, celui codant pour l'AspRS délétée, ou encore d'éteindre simultanément les deux. Cela se ferait en ciblant les siARN précisément sur un domaine de l'exon 13, sur la jonction exon 12/exon 14 ou sur ces deux régions simultanément. Ces alternatives aux expériences *in vitro* auraient l'avantage d'aborder l'implication de l'AspRS-ΔExon13 à la fois dans la traduction mitochondriale mais également dans des fonctions distinctes de l'aminoacylation. Elles constitueraient les premières pistes dans l'établissement de sa fonction, en déterminant par exemple, si son expression est vitale pour la cellule et si l'extinction de son gène pourrait avoir une influence quelconque sur la

croissance des cellules, la morphologie des mitochondries, les activités des complexes de la chaîne respiratoire ou encore la synthèse protéique mitochondriale.

Dans le cadre de la recherche d'une fonction de la protéine AspRS- Δ Exon13, notons que les approches de fluorescence, combinées à la microscopie confocale, ont permis d'aborder la question de la localisation subcellulaire du variant d'épissage qui semblait de prime abord évidente et mitochondriale. Cependant, un résultat inattendu a alors été observé. Il est décrit dans le paragraphe suivant.

3.3. Localisation subcellulaire de l'AspRS- Δ Exon13 au niveau du noyau ?

3.3.1. Observations inattendues en microscopie confocale

Au cours des premières expériences de transfection de cellules humaines avec une construction fusionnant le gène de l'AspRS- Δ Exon13 précédé du signal d'adressage mitochondrial de l'AspRS mt humaine à la GFP, un résultat tout à fait étonnant a été obtenu. L'observation par microscopie confocale de ces cellules a montré, pour certaines d'entre elles, qu'une localisation nucléaire de l'AspRS- Δ Exon13 venait s'ajouter à sa localisation mitochondriale. En effet, on peut très nettement faire cette observation sur les images présentées dans la figure 28A. La cellule en division (au centre de l'image) présente une fluorescence qui en plus de co-localiser avec celle du Mitrotracker (spécifique aux mitochondries) se trouve également au sein du noyau de la cellule. Cette même observation peut être vérifiée dans 2 à 3% des cellules analysées. Notons cependant que la fusion de l'enzyme native à la GFP et l'observation en microscopie confocale des cellules transfectées n'ont révélé aucune cellule présentant un indice d'une localisation nucléaire pour cette protéine (Figure 28B). Bien que la localisation nucléaire et, de ce fait la découverte d'une fonction distincte à l'aminoacylation au sein de la traduction mitochondriale pour le variant de l'AspRS mt soit attrayante, cette observation ne demeure que préliminaire et reste maintenant à confirmer.

3.3.2. Données bioinformatiques

Une analyse de la séquence peptidique de l'AspRS mt humaine laisse présager que l'hypothèse d'une localisation nucléaire, en sus de la localisation mitochondriale, pourrait

s'avérer pertinente. En effet, nous avons recherché la présence de signaux de localisation nucléaire et/ou de trafic noyau/cytosol dans la séquence de l'AspRS mt native. Ceci a été réalisé en utilisant le programme de prédiction PSORT II, (<http://wolfsort.org>). L'AspRS mt contient les résidus P₅₁₉KKARSQ₅₂₅ qui comprennent une séquence consensus d'import nucléaire (de type Pat7). Cette séquence commence par un résidu proline (en gras), et doit contenir trois résidus basiques (Lysine ou Arginine, en gras) sur les quatre qui suivent (Nakai & Kanehisa, 1992; Hicks & Raikhel, 1995). Un signal d'export nucléaire a également été recherché, et les résidus L₄₇₉WVDFPLFL₄₈₈, codés par l'exon 14, comprennent une séquence consensus d'export nucléaire de type « leucine-rich ». Celle-ci est définie par un peptide de type Φ -X₍₂₋₃₎- Φ -X₍₂₋₃₎- Φ -X- Φ , où Φ correspond à un résidu hydrophobe, le plus fréquemment un résidu leucine et X correspond à n'importe quel acide aminé (Hutten & Kehlenbach, 2007).

La localisation de ces séquences au sein du modèle de structure 3D de l'AspRS mt humaine est représentée dans la figure 29. Les deux séquences se placent en dehors de l'exon 13 et sont donc présentes aussi bien dans l'AspRS mt native que dans le variant d'épissage alternatif délété de l'exon 13. Les deux protéines devraient donc être retrouvées dans le noyau. Cependant ceci n'a pas été constaté au cours des expériences effectuées jusqu'à présent et pourrait s'expliquer soit par un caractère totalement artificiel de nos résultats, soit par un passage nucléaire furtif et un export nucléaire actif perturbé par l'épissage de l'exon 13, rendant ainsi la localisation nucléaire détectable exclusivement pour le variant d'épissage.

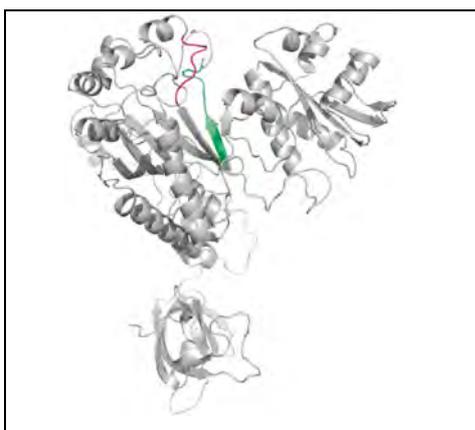


Figure 29. Localisation des signaux d'import et d'export nucléaire théoriques sur le modèle de la structure de l'AspRS mitochondriale humaine. La séquence d'import P₅₁₉KKARSQ₅₂₅ est visualisée en rose, celle d'export nucléaire L₄₇₉WVDFPLFL₄₈₈ est visualisée en vert.

Ces premières données ouvrent la voie à une multitude d'expériences. Il serait par exemple intéressant de fusionner la séquence théorique d'import nucléaire découverte pour l'AspRS mt et l'AspRS- Δ Exon13 à la GFP pour vérifier sa capacité à guider des protéines vers le noyau. Des mutations au sein de la séquence d'export ou encore l'utilisation

d'inhibiteurs de l'export nucléaire pourraient venir enrichir ces observations afin de confirmer ou d'infirmer la localisation partiellement nucléaire non seulement de l'AspRS- Δ Exon13 mais également de l'AspRS mt humaine, ouvrant la voie alors à de nouvelles fonctions alternatives pour les synthétases jusque-là considérées comme "mitochondriales".

3.3.3. Présence plus large de signaux d'adressage et d'export nucléaire dans les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines

On peut alors se demander si l'AspRS est la seule aaRS mt humaine à posséder (au moins d'un point de vue théorique) les signaux d'adressage et d'export nucléaire, ou si ceci est plus général. Le tableau 10 révèle que l'AspRS mt n'est pas un cas particulier puisque d'autres aaRS mt humaines présentent l'un ou les deux types de signaux. Ceci rappelle alors la localisation nucléaire déjà rapportée pour les aaRS cytosoliques d'eucaryotes (Schimmel & Wang, 1999; Nathanson & Deutscher, 2000; Galani et al., 2001).

Classe	aaRS	Signal d'import	Signal d'export
I	CysRS	-	-
	IleRS	pat4 : PKRR , pat7: PKRRSCQ	-
	LeuRS	-	-
	MetRS	pat4: RHRR	LDEELPDLSV
	ValRS	(pat7: PISRRNR)	(LSSLQLELSKL)
	TrpRS	-	-
	TyrRS	-	-
	ArgRS	-	-
	GluRS	-	-
II	ProRS	-	-
	SerRS	-	(LEIGEKLDI)
	ThrRS	-	-
	HisRS	-	LEGLGDLKL, (LGDLKLLFEYL), LKLLFEYLTL
	AspRS	pat7: PKKARSQ	LWVVDFFLFL
	LysRS	pat7: PGKTKKG , bipartite: RRGDIIGVQGNPGKTKK	(LEKALGMKLPETNL)
	AsnRS	-	(LEERLARSGLTEV)
	PheRS	pat7: PSRKKGD	(LERLAMLYDI)
	AlaRS	-	(LGLPLDMVELML)
	GlyRS	-	-

Tableau 10. Séquences théoriques d'import et d'export nucléaire dans les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines. Les séquences d'import ont été prédites par le programme PSORT II, <http://wolfsort.org>. La séquence d'import pat4 est définie par une suite de 4 résidus basiques (lysine ou arginine) ou trois acides aminés basiques précédés par un résidu histidine ou proline. La séquence pat7 commence par une proline et doit être suivie par une séquence contenant trois résidus basiques (Lysine ou Arginine, en gras) sur quatre. La séquence bipartite est constituée de deux résidus basiques puis de 10 résidus correspondant à n'importe quel acide aminé suivi enfin par un segment de cinq résidus composés au moins de trois résidus basiques (Nakai & Kanehisa, 1992; Hicks & Raikhel, 1995). Les séquences d'export présentées ont été prédites par le programme NetNES 1.1, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES> (la Cour et al., 2004). Les résidus montrés par le programme comme étant ceux qui participent au signal d'export sont représentés en gras. Certains des motifs trouvés dans les séquences des synthétases mitochondriales correspondent rigoureusement à la définition des séquences consensus alors que d'autres sont proches. Dans ces cas, les séquences sont entre parenthèse.

4. Conclusions et perspectives

Bien que l'étude de l'AspRS- Δ Exon13 se soit heurtée à des difficultés considérables lors des tentatives d'expression et de purification de cette protéine dans *E. coli*, les solutions envisagées dans des cellules de mammifères semblent prometteuses. La localisation possible de l'AspRS- Δ Exon13 dans les noyaux donne une direction toute nouvelle à l'exploration de sa ou ses fonctions. Celle(s)-ci pourrai(en)t également concerner l'AspRS mt humaine native. Le potentiel de localisation nucléaire de cette protéine vient croiser le chemin des expériences de co-immunoprécipitation décrites en début de ce chapitre. En effet, certaines des protéines co-immunoprécipitées avec l'AspRS mt native semblaient de prime abord aberrantes mais sont désormais à reconsidérer. Il s'agit de protéines nucléaires engagées dans la régulation du métabolisme de l'ARNm. Une d'entre elles est impliquée dans la synthèse de l'ARNm : «ATP dependant RNA helicase A » (Nakajima et al., 1997; Anderson et al., 1998). Une autre est impliquée dans la traduction et l'export nucleo-cytosolique de l'ARNm : « Heterogeneous ribonucleoprotein A2/B1 » (Kwon et al., 1999; Munro et al., 1999). Et une dernière est impliquée dans l'épissage de l'ARNm : « Heterogeneous ribonucleoprotein A1 » (Mayeda & Krainer, 1992). Bien qu'il faille bien évidemment considérer l'ensemble de ces résultats avec beaucoup de précautions, l'association de ces protéines avec l'AspRS, combinée à l'existence de signaux de localisation et d'export nucléaire de l'AspRS mt humaine nous font penser que ces premiers résultats doivent être approfondis. Dans un premier temps, la co-immunoprécipitation de l'AspRS mt humaine avec les protéines mentionnées précédemment doit être confirmée. Si tel est le cas, ceci amènera dans un deuxième temps l'étude de l'interaction de l'AspRS avec celles-ci et ouvrira la porte à l'exploration d'une fonction nucléaire.

Alternative splice-variants for human mitochondrial tRNA synthetases

Marie Messmer¹, Gert Scheper², Agnès Gaudry¹, Koen de Groot², Marjo Van der Knaap²,
Catherine Florentz^{1*} and Marie Sissler¹

¹ Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Louis Pasteur, F-67084 Strasbourg, France.

² Department of Pediatrics and Child Neurology, Vrije University Medical Center, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

*, To whom correspondence should be addressed. E-mail: C.Florentz@ibmc.u-strasbg.fr.

Phone: +33(0)3 88 41 70 59.

Abstract

Human genome sequencing revealed that the total number of genes in human does not account for the structural and functional diversity required among proteins. This is partly compensated by alternative splicing events, which expand the messenger RNA (mRNA) reservoir. Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) are housekeeping enzymes involved in the process of translation where they aminoacylate specific tRNAs, but exhibit also a growing range of novel functions. So far two cases of alternative splice-variants were reported, concerning human cytosolic aaRSs. Here, we present evidences for the existence of multiple splice-variants of human mitochondrial (mt) aaRSs. PCR amplification of total cDNA yielded not only full-length amplicons of mt-AspRS, -ThrRS and -LysRS, but also sequences missing exactly one or more exons. Further examination revealed that a mRNA for mt-AspRS, lacking exon 13, was co-amplified with the full-length mRNA from transcriptomes of 20 tissues. The ratios vary from 4 to 14% as demonstrated by quantitative PCR. The existence of the truncated protein was confirmed by western blotting on purified mitochondria extracted from skeletal muscle biopsy.

The biological relevance of this splice-variant alongside the full-length mt-AspRS remains to be solved. In contrast with mt-AspRS, overproduction of soluble splice-variant protein proved to be challenging. The peptide corresponding to exon 13 is located within the so-called eubacterial insertion domain, of unknown function. It is distant from the catalytic and tRNA interaction sites. Loss or gain of function are hypothesized. The present study propels mt-aaRS out of their strict housekeeping roles onto the stage of alternative splice-variants theater as potential new contributors to a widened

functional diversity in the mitochondrial proteome.

Introduction

A striking and puzzling piece of information has emerged from the achievements of the Human Genome Project and recent technological advances in gene annotation: the number of genes discovered does not correspond to the complexity of the organism. The postulated number of genes has been repeatedly revised down from primary predictions of at least 100,000 to current values being about 20,000-25,000 (1). This number is thought to be well below to the one required to carry out all diverse structural and functional needs of a human cell. One way to enlarge protein diversity is by increasing the diversity of the messenger RNAs (mRNAs) reservoir. Molecular strategies to achieve this include DNA recombination and RNA editing, alternative polyadenylation or alternative splicing (reviewed in 2, 3). Alternative splicing enables exon shuffling and mostly leads to specific expression of transcripts at a precise time in a given tissue (4). Eukaryotic cells widely use alternative splicing with the most striking reported example concerning *Drosophila melanogaster* *Dscam* gene, which pre-mRNA can be reshaped into over 38,000 different isoforms (5). In humans, the proportion of mRNA submitted to alternative splicing remains under consideration, with an estimation of 35% (6, 7) presently re-evaluated up to 60% (3).

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) are housekeeping enzymes involved in the essential process of translation of the genetic information from mRNA into proteins. In every cell and organelle, each of the 20 aaRSs esterifies specifically its corresponding tRNA(s) with the correct amino acid, which is then transferred to the growing peptide chain on

the ribosome. AaRSs have been explored during past decades to unravel their structural and functional peculiarities (reviewed in 8-11). Interestingly, aaRSs or products of related genes were found to exhibit novel roles, in addition to - or instead of - aminoacylation, highlighting them as a reservoir of alternate activities (reviewed in 11-14). Examples of enzymes that display *per se* an alternative function concern autocatalytic splicing of group I intron by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial (mt) LeuRS (15, 16) and *Neurospora crassa* mt-TyrRS (17); gene expression regulation by *Escherichia coli* AlaRS (18), *E. coli* ThrRS (19), human GlnRS (20) and yeast AspRS (21); cytokine activity modulating angiogenesis by human truncated TrpRS (22, 23) and TyrRS (24). Another example concerns CysRS, for which the presence (in the testis) or the absence (in other tissues) of an elongation factor-associating domain (encoded by exon 2) modulates the activity of the enzyme. Enhanced activity may be required to supply cysteinylated-tRNA for the synthesis of cysteine-rich testis protein such as metallothionein (25). Functional diversity is further enriched when closely related aaRS paralogs are considered (reviewed in 26). These proteins have emerged from duplication of aaRS-encoding genes but their roles differ from aminoacylation. They were found as actors in *e.g.* amino acid biosynthesis (27, 28), enhancement of processivity of mt DNA synthesis (29) and post-transcriptional tRNA modification (30, 31). Among the above-mentioned examples, solely truncated human TrpRS and CysRS are derived from alternative splicing, leaving so far under-explored the possibilities that other tRNA synthetase variants exist and have additional functions.

Protein biosynthesis occurs within mitochondria and is committed in human to the production of 13 proteins, all sub-units of the respiratory chain complexes. Human mitochondria possess their own specific set of aaRSs, which are in charge

of aminoacylation of the 22 mt-encoded tRNAs. The contribution of these proteins to functional diversity within the mitochondrial proteome is still unmapped. Human mt aaRSs are encoded by the nuclear genome, translated within the cytosol and imported into the organelle *via* the mitochondrial targeting sequence (MTS) (reviewed in 32). Their genes differ from the ones encoding cytosolic-addressed aaRSs (cyt-aaRSs)(33), with the exception of GlyRSs and LysRSs. Mt-GlyRS and cyt-GlyRS are translated from two different initiation codons within a same mRNA, resulting in two proteins that possess (mt-GlyRS), or not (cyt-GlyRS), a MTS (34, 35). After import and removal of the MTS, mt-GlyRS is the same protein as cyt-GlyRS. Two alternative splice variant mRNAs encode mt-LysRS and cyt-LysRS. Inclusion of exon 2 within the primary transcript introduces the MTS leading to the synthesis of mt-LysRS (36). After processing of the mitochondrial enzyme, both LysRSs differ by a few amino acids on their N-terminus. This single mt-aaRS-related alternative splicing event interferes with the sub-cellular localization of the protein but does not affect its function.

Here, we report the discovery of alternative splice variants for 4 human mt-aaRS mRNAs and an initial characterization of the mt-AspRS- Δ Exon13 mRNA, derived from the mt-AspRS sequence missing exon 13, and its corresponding protein. It is shown that both full-length and spliced mRNAs co-exist in every tested human tissue and that both full-length and spliced proteins are present in mitochondria. While the full-length mt-AspRS has been previously biochemically characterized after over-expression in *E. coli* (33), the splice variant mt-AspRS- Δ Exon13 showed resistance to any bacterial expression strategy. Hypotheses about the possible roles of the protein in human mitochondria are presented. The existence of splice variants within a family of ancillary housekeeping

proteins opens new possibilities to widen the protein repertoire in human cells.

Materials and Methods

Materials

Purified oligonucleotides for PCR amplification of either mt-AspRS sequence or mt-LysRS, mt-ThrRS and mt-GluRS sequences were from Prologo (Boulder, CO) or Structural Biology and Genomics Platform (IGBMC, Illkirch), respectively. Oligonucleotides for PCR amplification of the region spanning exon 13 of mt-AspRS mRNA and primers for quantitative PCR were obtained from Invitrogen. Human cDNA library was a kind gift from F. Martin (Strasbourg). Cloning vectors pDEST-(His)₆-MBP, pDEST-peri-(His)₆-MBP, pCR2.1® and pCDNA3.1/CT-GFP-TOPO® have been purchased from Invitrogen, and pQE70 from Qiagen. *E. coli* strains M15, ArcticExpress, PGKJE7 and PGKJE8 were gifts from L. Maréchal-Drouard (Strasbourg), M. Mörl (Leipzig) and M. Frugier (Strasbourg), respectively. One Shot Top10 cells were from Invitrogen and BL21-derived “Rosetta 2” cells from Novagen. Antibody directed against peptide L₄₈₆FLPKEENPREL₄₉₇ of mt-AspRS and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody were from Genosphere and Amersham Biosciences, respectively. Immobilon-P transfer membrane has been purchased from Millipore. Dynazyme EXT polymerase has been procured from Finnzymes. Recombinant mt-AspRS was purified as in (33). Purified mitochondria from a human skeletal muscle biopsy were a generous gift from A. Lombès (Paris).

Methods

PCR amplification of mt-aaRS sequences and sequencing

Mitochondrial aaRS coding sequences were amplified from a human cDNA library using Dynazyme EXT polymerase. Primers for PCR were designed to amplify

precisely the mature enzymes, *i.e.* deprived of the mitochondrial targeting sequence at their N-terminus. For mt-AspRS, fresh PCR products were directly used for cloning into pCR2.1® following the TA Cloning Kit protocol (Invitrogen). After transformation of One Shot TOP10 *E. coli* cells, plasmid DNA was purified and sequenced (33). For mt-LysRS, mt-ThrRS and mt-GluRS, primers introduced *attB* recombination sites allowing for cloning into GATEWAY entry vectors. Vectors were amplified and sequenced (IGBMC Cloning Platform) (37).

RT-PCR of mt-AspRS in different tissues

cDNA synthesis and quantitative PCR was carried out essentially as described in (38). Total cDNA was made from RNA from 20 different tissues (FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel, Ambion). PCR amplification of the region including exon 13 was carried out with primers AGTAAGCCCCATGGAACTGTG (in exon 11, forward) and GACTTTAGCCTTGGGGAAGC (in exon 17, reverse). Quantitative PCR primers CAGCTGAGCTTCTGAATGCCTG (forward) and TGCAACCGAAGAGCCTCTGTT (reverse) recognize both full-length and alternatively spliced mt-AspRS mRNA. Primer AGCTGACCATTTAATCAGTGCTCTT (forward) spans the exon12-exon14 boundary in the Δexon13 variant and was used in combination with primer AAAGAGAACAGAGTGGGGTCA (reverse). The values that were obtained for each tissue were corrected for GAPDH mRNA levels and relative expression level of the Δexon13 variant was calculated using the ΔΔCt method.

Western blotting.

Western-blotting experiments have been performed on 5 μg of recombinant over-expressed mt-AspRS as well as on 100 μg equivalent protein concentration of crude extract from mitochondria purified from

human skeletal muscle biopsies. Recombinant mt-AspRS and skeletal muscle mitochondria were resuspended in Laemmli buffer and both samples were resolved on a 12% SDS-polyacrylamide gel, transferred to an Immobilon-P transfer membrane during 1 hour at 10 volts and probed with a 1:500 dilution of an antibody directed against mt-AspRS. Primary antibody was then detected by a 1:5000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody.

Cloning of mt-AspRS-ΔExon13

Cloning of mt-AspRS-ΔExon13-(His)₆ in pQE70. PCR amplification was done as described above. The fragment containing the expected gene was purified by gel electrophoresis, eluted and inserted into the expression vector pQE70. The resulting vector was named pQE70-mt-AspRS-ΔExon13.

Cloning of OmpA-mt-AspRS-ΔExon13-(His)₆ in pQE70. Mt-AspRS-ΔExon13 sequence was extended by stepwise elongation PCR to include the OmpA signal-encoding region following the protocol described in (39). The DNA fragment encoding mt-AspRS-ΔExon13 was amplified from pQE70-mt-AspRS-ΔExon13 by PCR using Dynazyme EXT polymerase. Fresh PCR product was cloned into pCR2.1® following the TA Cloning Kit protocol (Invitrogen) and subsequently processed as described above. The resulting vector is named pQE70-OmpA-mt-AspRS-ΔExon13.

Cloning of (His)₆-MBP-mt-AspRS-ΔExon13 and peri-(His)₆-MBP-mt-AspRS-ΔExon13 in pDEST. To produce pDEST-(His)₆-MBP-mt-AspRS-ΔExon13 and pDEST-peri-(His)₆-MBP-mt-AspRS-ΔExon13, mt-AspRS-ΔExon13 gene was amplified by PCR and introduced into pDEST-(His)₆-MBP and pDEST-peri-(His)₆-MBP vectors, respectively following the protocol described in (40).

PCR was performed using Dynazyme EXT polymerase, and the DNA fragment encoding mt-AspRS-ΔExon13 was amplified from pQE70-mt-AspRS-ΔExon13.

Expression and purification of recombinant proteins

Numerous combinations of plasmids and *E. coli* strains were tested to over-express recombinant proteins. Transformants of *E. coli* TOP10 harboring pQE70-mt-AspRS-ΔExon13 were cultured in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 100 μg/ml ampicillin. Transformants of *E. coli* PGK JE7 harboring pQE70-mt-AspRS-ΔExon13 were cultured in LB medium supplemented with 100 μg/ml ampicillin, 100 μg/ml chloramphenicol and 2mg/ml L-arabinose. Transformants of *E. coli* PGK JE8 harboring pQE70-mt-AspRS-ΔExon13 were cultured in LB medium supplemented with 100 μg/ml ampicillin, 100 μg/ml chloramphenicol and 50 μg/ml tetracycline. Transformants of *E. coli* M15 harboring pQE70-mt-AspRS-ΔExon13 or pQE70-OmpA-mt-AspRS-ΔExon13 were cultured in LB medium supplemented with 100 μg/ml ampicillin and 25 μg/ml kanamycin. Transformants of *E. coli* BL21 derivative “Rosetta 2” and BL21(DE3)RIL harboring pQE70-mt-AspRS-ΔExon13, pDEST-(His)₆-MBP-mt-AspRS-ΔExon13 or pDEST-peri-(His)₆-MBP-mt-AspRS-ΔExon13 were cultured in LB medium supplemented with 100 μg/ml ampicillin and 100 μg/ml chloramphenicol. Transformants of *E. coli* ArcticExpress harboring pDEST-(His)₆-MBP-mt-AspRS-ΔExon13 or pDEST-peri-(His)₆-MBP-mt-AspRS-ΔExon13 were cultured in LB medium supplemented with 100 μg/ml ampicillin and 20 μg/ml gentamycin. When the culture density reached an absorbance A₆₀₀ of 0.4-0.6, 20 μM to 1 mM of IPTG was added to induce protein expression and the cultivation was then continued at several temperatures ranging from 12°C to 37°C for an additional time

varying between 3 hours to over-night. The cells were collected by centrifugation (1,700g) and frozen at -20°C until being analyzed.

Cells (from 20 ml cultures) were resuspended in 2 ml of one of the 7 different buffers (**B1** to **B7**, see below). The suspension was sonicated on ice, three times during 30 seconds at 120 volts (Ultrasons Annemasse, France). The resulting crude extract was clarified by centrifugation (15,000g) at 4°C during 15 minutes. Aliquots from crude extracts, supernatants and pellets were analyzed on 12 % SDS-PAGE and were visualized by coomassie staining. Diverse purifications were attempted on 2 liters of cell cultures by classical affinity chromatography and as previously described (33). When necessary, attempts to remove chaperon proteins were performed by increasing NaCl concentration to 0.5 M and/or by using 15% (v/v) isopropanol or 0.5% (v/v) Triton x100.

B1: 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole and 10 % glycerol; **B2:** 100 mM MES, pH 6.1, 250 mM NaCl, 0,1 % triton, 10 mM β-mercaptoethanol and 10 % glycerol; **B3:** 100 mM MOPS, pH 7.0, 250 mM NaCl, 0,1 % triton, 10 mM β-mercaptoethanol and 10 % glycerol; **B4:** 100 mM NaH₂PO₄, pH 7.2, 250 mM NaCl, 0,1 % triton, 10 mM β-mercaptoethanol and 10 % glycerol; **B5:** 100 mM MOPS, pH 7.0, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 10 % glycerol; **B6:** 100 mM Tris-HCl, pH 8.1, 250 mM NaCl, 0,1 % triton, 10 mM β-mercaptoethanol and 10 % glycerol; **B7:** 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.5, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10 mM β-mercaptoethanol and 10 % glycerol.

Results

1. Splice-variant mRNAs of human mitochondrial aaRSs

To clone coding sequences of the human mt-AspRS, mt-GluRS, mt-LysRS

and mt-ThrRS, these regions were amplified by PCR, from a human cDNA library. Forward and reverse oligonucleotides were designed according to previous gene annotation (33) and in order to match sequences coding for mature proteins, *i.e.* without their MTS. In addition to PCR products of expected sizes, one or two shorter DNA fragment(s) were amplified in 3 out of the 4 cases. One additional fragment was obtained for mt-AspRS (Fig. 1A) and mt-LysRS (not shown), and two additional fragments were obtained for mt-ThrRS (not shown). All PCR products were sequenced and the three full-length sequences of mt-AspRS, mt-LysRS and mt-ThrRS have been found, as reported in (33, 37). The additional PCR fragment obtained for mt-AspRS contains the same coding sequence as the full-length synthetase, but with a gap of 153 nucleotides, corresponding to exon 13 (Fig. 1B). The removal of exon 13 does not affect the downstream reading frame. The full coding sequence is thus shortened leading to a theoretical protein of 547 instead of 598 amino acids. Similarly, additional PCR product obtained with mt-LysRS specific oligonucleotides corresponds to mt-LysRS coding sequence missing exons 4 and 5 (258 nucleotides out of 1827). The two PCR products co-amplified with the full-length mt-ThrRS sequence miss exon 8 (147 nucleotides out of 2034) or exon 8 and 9 (246 nucleotides) (Fig. 1B). For each of the 4 new sequences, gaps correspond exactly to predicted exons. The potential alternative splice-variants discovered for human mt-AspRS, mt-LysRS, and mt-ThrRS are schematically represented in Figure 1C. No experimental support was found for a splice-variant of GluRS. However, EST sequences analyses favor the existence of such a variant. It misses exon 9 (Fig. 1C) which sequence overlaps with the oligonucleotide chosen for PCR amplification.

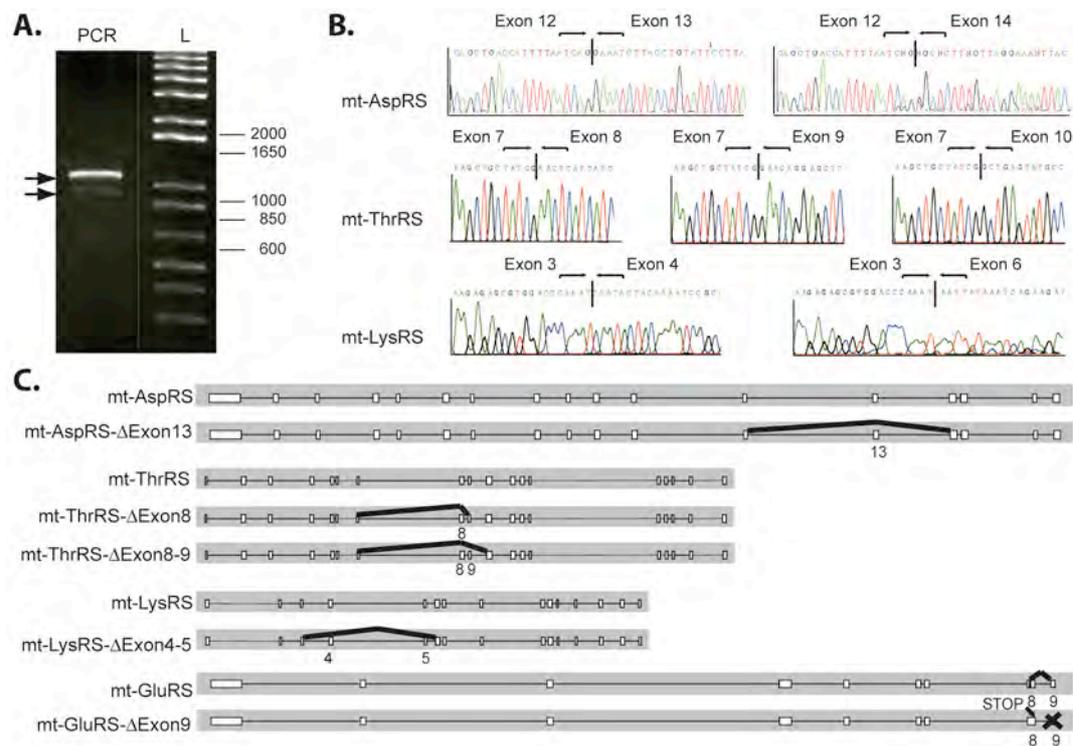


Figure 1: Alternative splice-variants mRNAs for human aminoacyl-tRNA synthetases. **A.** Two PCR products of mt-AspRS-coding sequences are amplified from a human cDNA library (shown with arrows). L stands for molecular weight ladder. **B.** Sequencing of PCR amplified products reveal unexpected exon junctions. **C.** Scheme of mRNA organizations for 4 human mt-aaRSs.

2. Human tissues contain two alternative splice variants of mt-AspRS mRNAs

The region of mt-AspRS containing exon 13 was amplified with specific primers and total cDNA derived from total mRNA extracted from 20 human tissues. As seen in Figure 2, each of the investigated tissue contains two bands. Sequence analysis, like in Fig. 1 shows that the highest band corresponds to mt-AspRS mRNA, the lowest to mt-AspRS- Δ Exon13 mRNA. In every analyzed tissue, the full-length mRNA is present in larger amounts. The mRNA levels were measured by quantitative PCR using two primer sets, one that detects both the full-length and the Δ exon13 variant mRNAs, and one that is specific for the splice variant. In this latter set, one of the primers spans the exon12-exon14 boundary and will only recognize the mRNA when exon 13 is absent. The splice variant was present in a range of 4%

to 15% (Table 1), with the highest level in skeletal muscle (15%).

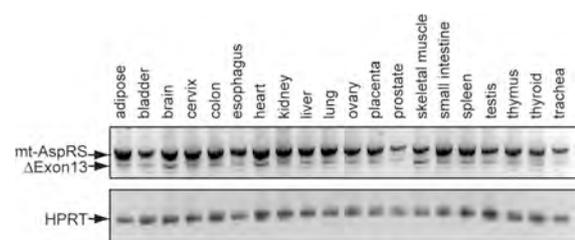


Figure 2: Both mRNAs coding for human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase full-length and splice-variant are expressed in different human tissues. PCR reactions using total cDNA from 20 different human tissues as template were carried out as described in Materials and Methods. Bands corresponding to full length and Δ exon13 mt-AspRS mRNAs (indicated with arrows) were analyzed by agarose-gel electrophoresis (upper panel). Control PCR reactions with primers for HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) were included (lower panel).

Table 1. Expression of mt-AspRS- Δ exon13 mRNA in different tissues

Tissue	Ct		Δ Ct		$\Delta\Delta$ Ct	% Δ exon13
	mt-AspRS	mt-AspRS/GAPDH	Δ exon13	Δ exon13/GAPDH		
Adipose	19,47	6,66	30,32	10,85	4,19	5,50
Bladder	19,03	8,68	31,63	12,60	3,92	6,61
Brain	17,98	8,91	30,22	12,24	3,33	9,97
Cervix	19,62	7,63	31,46	11,84	4,21	5,40
Colon	19,35	7,57	30,73	11,38	3,81	7,14
Esophagus	19,40	8,71	32,77	13,37	4,66	3,97
Heart	17,04	8,65	29,24	12,20	3,55	8,54
Kidney	18,58	6,97	29,32	10,74	3,77	7,32
Liver	18,56	8,34	30,95	12,39	4,05	6,02
Lung	19,42	7,16	30,44	11,03	3,87	6,86
Ovary	20,05	7,21	31,77	11,72	4,51	4,38
Placenta	20,50	7,22	32,17	11,67	4,45	4,57
Prostate	22,95	7,6	34,51	11,56	3,96	6,42
Muscle	17,58	9,89	30,19	12,61	2,72	15,16
Intestine	19,35	7,33	31,43	12,08	4,75	3,72
Spleen	20,99	6,95	31,65	10,66	3,71	7,66
Testes	19,92	6,87	29,62	9,69	2,82	14,12
Thymus	19,93	7,1	30,32	10,39	3,29	10,24
Thyroid	19,56	7,38	31,36	11,80	4,42	4,66
Trachea	20,27	7,97	32,96	12,69	4,72	3,79

3. Mt-AspRS- Δ Exon13 protein is present in mitochondria

The existence of the protein corresponding to the splice-variant (mt-AspRS- Δ Exon13) was investigated by western blot. This experiment was performed on a crude lysate of purified mitochondria extracted from a human skeletal muscle biopsy, using an antibody directed against peptide L₄₈₆FLPKEENPREL₄₉₇. This peptide sequence is present in both full-length and splice-variant proteins. Design of the peptide was done according to the crystallographic structure of the *E. coli* AspRS protein (41) that shows that this peptide sequence is located on the surface of the protein. Noticeably, *E. coli* AspRS structure is thought to be a good model since this protein shares more than 40 % of sequence identity with human mt-AspRS (33). Two bands are revealed in the mitochondrial extract (Fig. 3). The highest molecular weight band (~ 68 kDa) co-migrates with the recombinant mt-AspRS (69.6 kDa) and is, therefore, the

endogenous full-length mt-AspRS. The lowest molecular weight band (~ 62 kDa) is consistent with the expected size of mt-AspRS- Δ Exon13 having been processed after import in the mitochondria (62.0 kDa).

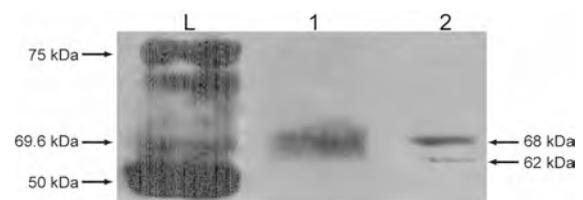


Figure 3: *In vivo* detection of mt-AspRS- Δ Exon13 protein. Western blot experiments have been performed using antibodies directed against peptide L₄₈₆FLPKEENPREL₄₉₇. L: for molecular weight ladder; 1: recombinant mt-AspRS over-expressed in *E. coli* (5 μ g); 2: crude extract of human skeletal muscle biopsy mitochondria (100 μ g of proteins as determined by Bradford assay). Values at left correspond to theoretical molecular weights. Values at right are experimental.

The intensity of this band is 12% (measured with QuantityOne, Biorad) of the combined intensities. In the absence of

cytosolic extract of human tissues, an alternate localization of the protein could not be tested.

4. *In vitro* characterization of mt-AspRS-ΔExon13

In order to structurally and functionally characterize mt-AspRS-ΔExon13 *in vitro*, the corresponding cDNA was cloned into pQE70 expression vector and expressed in *E. coli* TOP10 strain according to the same procedure which successfully leads to recombinant full-length mt-AspRS (33). However, this strategy was repeatedly unsuccessful, at the stage of the expression of the protein. To solve this problem, many cloning strategies were explored, playing with different tags, strains, and growing conditions, as listed below.

For every construct, a (His)₆-tag was added to facilitate the purification of the corresponding protein on an immobilized-Ni²⁺ affinity column. In some cases the maltose binding protein (MBP) was fused to the N-terminus of mt-AspRS-ΔExon13. This fusion protein is known to assist the folding of insoluble proteins (40). Mt-AspRS-ΔExon13 variant constructs were expressed either in *E. coli* cytosol or periplasm (with the assistance of the “peri” (40) or the “ompA” (39) secretion signals). Targeting proteins to the periplasm has already been shown to enhance the solubility of molecules that contain disulfide bonds (Mt-AspRS-ΔExon13 exhibits 10 cystein residues) that are toxic in the bacterial cytosol.

Multiple bacterial strains were tested to try to overcome over-expression and solubilization problems. Assays were performed with *E. coli* Top10, M15, BL21 derivatives (“Rosetta 2” and BL21(DE3)RIL). The assistance of chaperone proteins by using *E. coli* PGK JE7, PGK JE8 and ArticExpress was also tried. The latter strain possesses two chaperones (Cpn60 and Cpn10) from a psychrophilic bacterium, allowing *E. coli* to grow at low temperatures (42).

All along, different cell growth conditions were investigated, with incubation temperatures varying from 12°C to 37°C, incubation times varying from 3 hours to overnight, and IPTG concentrations from 20 μM to 1 mM. LB medium in some cases was supplemented with 20% (w/v) sucrose and six different solubilization buffers were tested. All of these solutions contained different combinations of the following components: buffers (50-100 mM MES, MOPS, NaH₂PO₄ or KH₂PO₄/K₂HPO₄) with pHs from 6.1 to 7.5, KCl or NaCl (250 or 300 mM), Triton X100 (0.1 %), β-mercaptoethanol (10 mM), DTT (1mM), glycerol (10 %), MgCl₂ (10 mM) and imidazole (20 mM).

Among these different sets of conditions, only three resulted in expression. Two of them failed to yield soluble protein, while the final condition using the ArticExpress strain did. Unfortunately, the two chaperones co-expressed in this strain remain non-reversibly bound to the over-expressed mt-AspRS-ΔExon13 and will sterically hinder interaction with tRNA (data not shown).

Discussion

Splice-variants of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases co-exist in a large set of human tissues

During the cloning process of several human mt-aaRSs, an initial set of 4 splice-variant mRNAs has been discovered for 3 enzymes. Sequencing of the PCR products from a human cDNA library, unambiguously revealed the precise absence of one or two exons within mt-aaRS mRNAs. One variant was revealed for mt-AspRS and mt-LysRS and two variants for mt-ThrRS. As a consequence of the approach to clone full-length proteins, only cDNA variants with the same 5' end 3' sequences could possibly be obtained. Alternatively spliced mRNAs containing completely different exons at their ends could therefore not be amplified.

Such an additional variant was found on a bioinformatic approach for mt-GluRS. The variant mt-AspRS- Δ Exon13 was further characterized and the presence of the alternatively spliced mRNA was verified. RT-PCR revealed indeed the co-existence of both full-length and shortened mRNAs in 20 different tissues. The variant was, furthermore, also detected in immortalized lymphoblast cell lines (data not shown). The splice variant was revealed with three different primer sets, showing that its presence is unlikely to be a PCR artifact. The splice-variant mRNA could be of considerable importance since it corresponds to at least to 4% of the total mt-AspRS mRNAs and reaches 15% in skeletal muscle. The quantitative variations from one tissue to another could represent tissue-dependent importance of each of the variants. However, no simple correlation between expression ratios and tissue specificity appears so far. The presence of mt-AspRS- Δ Exon13 mRNA in all tissues is surprising since splice-variants are usually expressed in a tissue-specific and/or temporal manner (4).

To address the question about the possible biological role/use of the smaller mt-AspRS variant protein, we have first verified that the mRNA is indeed translated into a viable protein. Western blotting was performed on mitochondria purified from a skeletal muscle biopsy (tissue with the highest ratio of mt-AspRS- Δ Exon13/mt-AspRS mRNAs). Besides the full-length mt-AspRS (68 kDa), a smaller protein of 62 kDa, the expected size for the splice-variant protein, was detected. Thus, both proteins co-exist in human skeletal muscle mitochondria. It is likely that all the other human tissues that possess both mRNAs contain also both proteins, but this was not further tested. The expression level of the mt-AspRS- Δ Exon13 protein (approximately 15% of total mtAspRS (analyzed using ImageJ, NIH) corresponded well with the mRNA level of the splice variant (13%) in muscle tissue.

Towards unraveling mt-AspRS- Δ Exon13 function(s)

Sequence comparisons of human mt-AspRS with other AspRSs revealed that this organelle enzyme exhibits the typical insertion (aa 328 – 456) and C-terminal extension (aa 607 – 645) domains, which indicate its eubacterial nature (33). Mt-AspRS and *E. coli* AspRS are closely related enzymes with a same organization and 43% amino acid identity (33). Figure 4A shows the organization of mt-AspRS and localization of exon 13. This exon is in the middle of the so-called eubacterial insertion domain of the synthetase. This domain is present between motif 2 and motif 3 of the catalytic site (reviewed in 43). Removal of the 153 nucleotides corresponding to exon 13 in the mRNA leads to the absence of aminoacids 398 – 448 in mt-AspRS and does not cause a downstream frame-shift.

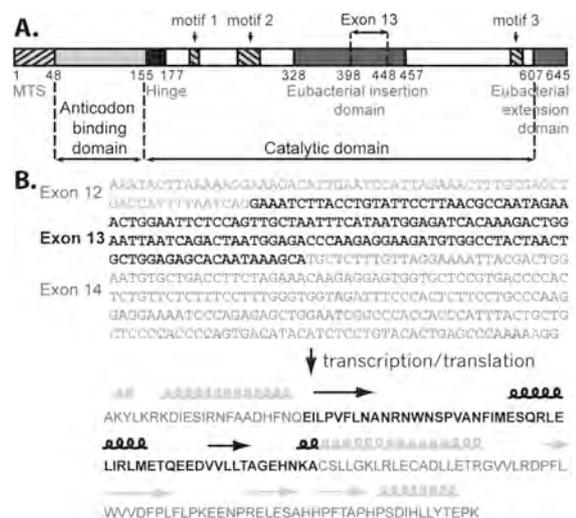


Figure 4: Sequence and predictive secondary structure of mt-AspRS protein.

A. Modular organization of full-length human mt-AspRS. Structural modules and the region encoded by exon 13 are indicated. MTS stands for Mitochondrial Targeting Sequence **B.** Secondary structure prediction. Nucleotide sequence of exons 12 to 14 and sequence of the corresponding translated region. Structure elements displayed above the sequence (α -helices and β -strands) have been predicted using PredictProtein (50) and drawn with ESPript (structure 2D) (51).

Accordingly, full-length and spliced mt-AspRSs differ only by the presence or absence of 51 amino acids within the bacterial insertion domain.

Localization of the region encoded by exon 13 on the crystallographic structure of *E. coli* AspRS (41) shows that it is distant from both the catalytic domain and from the anticodon binding domain of the synthetase (Fig. 5A). However, two helices (α_1 and α_2 , Fig. 5) were shown to interact indirectly with the tRNA acceptor stem *via* a network of hydrogen bonds built up by a shell of more than 20 water molecules (41). Excision of the peptide sequence corresponding to exon 13 occurs at the extremities of well-defined structural domains (Fig. 4B).

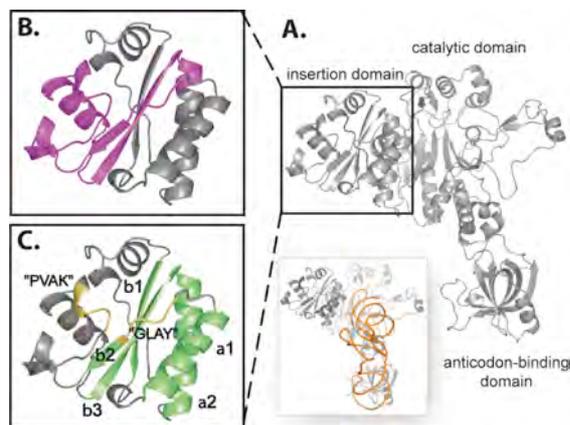


Figure 5: Eubacterial insertion domain of aspartyl-tRNA synthetase.

A. Crystallographic structure of *E. coli* AspRS in its complexed form with tRNA^{Asp} (41). Principal domains are indicated. For simplicity, only one AspRS monomer is shown. **B.** The region encoded by exon 13 (which correspond to aa 348 – 402 in *E. coli* AspRS) is highlighted in magenta. **C.** The *E. coli* ferredoxin-like fold is colored in green and its composing structural elements are indicated ($\beta, \alpha, \beta, \beta, \alpha$). Signature motifs “GLAY” and “PVAK” found to be well conserved in eubacterial AspRSs (see text) are colored in yellow. All structures have been drawn using PyMol (52).

It would unlikely to be the cause of gross disruption of the enzyme structure since the start and the end of the peptide are

adjacent in the 3D structure of the full-length enzyme and concentrated in the single eubacterial insertion sub-domain (Fig. 5A, B). All these data suggest that alternative-splicing may *a priori* not engender a totally reshaped protein but a protein with a structurally perturbed and a partially deleted insertion domain.

The possible functional properties of mt-AspRS- Δ Exon13 are most intriguing. As a first possibility, the classical functional properties of an aaRS have to be considered. None of the residues involved in either catalysis or in the direct binding of mt-AspRS substrates are affected, so it is unlikely that the aminoacylation activity of the spliced-variant protein would be abolished. However, the presence in human mitochondria of two synthetases with the same specificity, both active in aminoacylation, is unexpected and raises the question whether the enzyme may have perturbed or even new aminoacylation properties. A further immediate question concerns the possibility of heterodimer formation involving one monomer of full-length mt-AspRS and one of mt-AspRS- Δ Exon13, and which would be the related properties? It could be that the splice variant represents a negative regulator of the full-length enzyme. If heterodimers are inactive, the amount of splice variant could regulate the amount of active enzyme. To investigate the catalytic properties of mt-AspRS- Δ Exon13, overexpression of recombinant protein was undertaken to compare its basic functional properties, such as adenylate synthesis and tRNA (mis)aminoacylation, with the ones of the full-length enzyme. While full-length mt-AspRS has previously been produced in *E. coli* (33), overexpression assays did not yield soluble mt-AspRS- Δ Exon13. Despite several different expression strategies that were tested, including different vectors, host strains, induction conditions, and solubilization buffers of the expressed protein, no soluble protein could be obtained. Attempts to express a variant of

E. coli AspRS deleted of the whole eubacterial insertion domain also led to very poor growth of the corresponding transformed bacteria and to no expression of the expected AspRS (G. Eriani, personal communication).

As already mentioned, deletion of exon 13 deprives the protein of a part of the eubacterial insertion domain. Consequently, a total or partial loss of functional properties linked to this domain can be expected. Unfortunately, the function(s) of this domain has/have not yet been deciphered in bacterial AspRSs but exploration of topology conservation leads to some hints (reviewed in 43). Composed by more than 130 residues, this domain consists of a four-stranded β -sheet surrounded by two anti-parallel α -helices on the side facing the active-site core, and smaller helices on the side facing the solvent (44). A similar fold, called the ferredoxin fold has been observed in other proteins, in particular glutamine synthase (45), nucleoside diphosphate kinase (46), histidine-containing phosphocarrier protein (HPr, implicated in phosphate binding and phosphorylation) (44), or in many nucleotide or polynucleotide-binding proteins. In *E. coli* AspRS (Fig. 5A.), the ferredoxin-like fold is made up of a three-stranded β -sheet ($\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2$). Also, the crystallographic structure of *E. coli* AspRS with its substrates as deposited at the PDB (accession number 1CO1, 41) has revealed that an adenosine monophosphate molecule (AMP) binds this domain. The presence of this AMP may be either an artifact of crystallogenesis or suggestive of a biological role reminiscent of the polynucleotide-binding property of the ferredoxin fold.

New functions could be foreseen, for example through gain or loss of partnerships within the insertion domain. Analysis of the amino acid content of exon 13 peptide reveals that this domain is very rich in asparagine residues compared to the full-length protein (11,8% versus 3,7% respectively). The peptide is rather acidic

(pI 4,64) with a high content in glutamic acid (7 out of 51 aa, *i.e.* 13,7% versus 43 out of 598 aa, *i.e.* 7,2% for the full-length protein). Interestingly, sequence alignments of bacterial, eukaryal and mitochondrial AspRSs revealed the striking conservation of two motifs within the insertion domain (47) (Fig. 5B.). Incorporation of additional sequences, among which the human mitochondrial sequence, confirms the following statements. Motif "PVAK" is well-conserved among all sequences ("P₃₆₇VAK₃₇₀" in *E. coli* AspRS, and "P₄₁₉VAN₄₂₂" in human mt-AspRS). The second motive is sub-group specific with a G(L,I) Φ (Y,W,F) signature motif (where Φ stands for hydrophobic residue) for eubacterial sequences ("G₃₄₈LAY₃₅₁" in *E. coli* AspRS), or a E(V,I)LP signature motif for mitochondrial sequences ("E₃₉₈ILP₄₀₁" in human mt-AspRS). As these two blocks are particularly well-conserved, a specific selection pressure may have been exerted on these regions towards important catalytic mechanisms or interactions with partners that would be specific to each of the sub-groups studied. These motives are lost in the splice-variant mt-AspRS- Δ Exon13.

Finally, it has to be envisioned that mt-AspRS- Δ Exon13 could have acquired unprecedented functions for an aaRS, *i.e.* not related to the presently defined structure. As an initial attempt to verify this possibility, a bioinformatic screen has been applied. tBlastN has been used to search for sequence homologies (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) within translated nucleotide databases using peptide sequences of the insertion domain as protein queries. However, no hits other than mt-AspRSs from various organisms were found. Deciphering additional/new functions for splice-variants is a general challenge and in most instances, experiments that address functional differences between protein isoforms have still to be performed (2). To solve the question for mt-AspRS- Δ Exon13,

it will be important to also fully characterize the full-length protein including the function of the eubacterial insertion domain, and defining *in vivo* partnerships of both proteins. Success in expression and purification of the protein in (mammalian) cells would greatly help in getting answers to these questions. Differential RNA interference experiments may identify the mRNA, which encodes the aaRS involved in protein synthesis.

Outlook

We report here the first examples of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetase splice-variants, at the level of RNA as well as at the level of the corresponding protein. mRNA variants have been revealed by experimental procedures for mt-AspRS, mt-LysRS and mt-ThrRS. An additional example of alternative splicing that concerns mt-GluRS, has been revealed by EST sequence analyses. Human mitochondria contain at least the mt-AspRS variant. While initial characterization could be achieved for mt-AspRS- Δ Exon13, numerous concerns are remaining unsolved such as the function but also the intriguing over-all and varying relative expression levels of both proteins between tissues. Detailed analysis of mt-LysRS, mt-GluRS and mt-ThrRS variants awaits further experimentation. However, we believe that these discoveries are likely to be the initial ones of a larger series. It is very likely that additional splice-variants will be discovered for other human (or other eukaryote) mt-aaRSs, which propels mt-aaRSs out of their strict housekeeping roles onto the stage of alternative splice-variants theater. A bioinformatic search for mt-AspRS- Δ Exon13 mRNAs in mammalian mitochondria led to a positive hit for the ape *Pan troglodytes* but was negative for *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, and *Gallus gallus*.

The potentially widened diversity of aaRS related proteins, within the

mitochondrial proteome, opens many new and unprecedented routes of investigation within this organelle. These may help to understand fundamental pathways such as translation, energy synthesis and other metabolic routes but also important processes where mitochondria are involved such as apoptosis or ageing, and more and more disorders including *e.g.* cancer, neurodegeneration and diabetes (48, 49).

Acknowledgments

Aurélie Fender is acknowledged for cloning mt-AspRS- Δ Exon13 sequence into pCR2.1 vector, and Magali Frugier and Luc Moulinier for constructive discussions. Anne Lombès, Franck Martin, Mario Mörl, Magali Frugier and Laurence Maréchal-Drouard are thanked for gifts of material. We are grateful to Gilbert Eriani and Luc Moulinier for sharing unpublished results. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Louis Pasteur Strasbourg (ULP), Association Française contre les Myopathies (AFM), the Prinses Beatrix Fonds and the Optimix Foundation for Scientific Research. M.M. was supported by a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

1. Consortium. IHGS (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-945.
2. Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 17:100-107.
3. Modrek B, Lee C (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* 30:13-19.
4. Boue S, Letunic I, Bork P (2003) Alternative splicing and evolution. *Bioessays* 25:1031-1041.
5. Celotto AM, Graveley BR (2001) Alternative splicing of the *Drosophila* Dscam pre-mRNA is

- both temporally and spatially regulated. *Genetics* 159:599-608.
6. Mironov AA, Fickett JW, Gelfand MS (1999) Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res* 9:1288-1293.
 7. Hanke J, Brett D, Zastrow I, Aydin A, Delbrück S, Lehmann G, Luft F, Reich J, Bork P (1999) Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception? *Trends Genet* 15:389-390.
 8. Cusack S (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr Opin Struct Biol* 7:881-889.
 9. Arnez JG, Moras D (1998) in *RNA structure and function*, eds. Simons RW & Grunberg-Manago M (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) 35:465-494.
 10. Giegé R, Sissler M, Florentz C (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* 26:5017-5035.
 11. Ibba M, Francklyn C, Cusack S (2005) *The aminoacyl-tRNA synthetases*. (Landes Biosciences, Georgetown, TX).
 12. Martinis SA, Plateau P, Cavarelli J, Florentz C (1999) Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. *EMBO J* 18:4591-4596.
 13. Francklyn C, Perona JJ, Pütz J, Hou Y-M (2002) Aminoacyl-tRNA synthetases: Versatile players in the changing theater of translation. *RNA* 8:1363-1372.
 14. Park SG, Ewalt KL, Kim S (2005) Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends Biochem Sci* 30:569-574.
 15. Herbert CJ, Labouesse M, Dujardin G, Slonimski P (1988) The NAM2 proteins from *S. cerevisiae* and *S. douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases, and are involved in mRNA splicing. *EMBO J* 7:473-483.
 16. 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.
 17. Akins RA, Lambowitz AM (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.
 18. Putney SD, Schimmel P (1981) An aminoacyl-tRNA synthetase bind to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. *Nature* 291:632-635.
 19. Romby P, Caillet J, Ebel C, Sacerdot C, Graffe M, Eyermann F, Brunel C, Moine H, Ehresmann C, Ehressman B, Springer M (1996) The expression of *E. coli* threonyl-tRNA synthetase is regulated at the translational level by symmetrical operator-repressor interactions. *EMBO J* 15:5976-5987.
 20. Schray B, Knippers R (1991) Binding of human glutaminyl-transfer RNA synthetase to a specific site of its messenger RNA. *Nucleic Acids Res* 19:5307-5312.
 21. Frugier M, Ryckelynck M, Giegé R (2005) tRNA-balanced expression of a eukaryal aminoacyl-tRNA synthetase by an mRNA-mediated pathway. *EMBO Rep* 6:860-865.
 22. Wakasugi K, Slike BM, Hood J, Otani A, Ewalt KL, Friedlander M, Cheresh DA, Schimmel P (2002) A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:173-177.
 23. Otani A, Slike BM, Dorrell MI, Hood J, Kinder K, Ewalt KL, Cheresh D, Schimmel P, Friedlander M (2002) A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:178-183.

24. Wakasugi K, Schimmel P (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* 284:147-150.
25. Kim JE, Kim KH, Lee SW, Seol W, Shiba K, Kim S (2000) An elongation factor-associating domain is inserted into human cysteinyl-tRNA synthetase by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 28:2866-2875.
26. Francklyn C (2005) in *Aminoacyl-tRNA synthetases*, eds. Ibba M, Francklyn C & Cusack S (Landes Biosciences, Georgetown, TX) 25:285-297.
27. Nakatsu T, Kato H, Oda J (1998) Crystal structure of asparagine synthetase reveals a close evolutionary relationship to class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Nature Struct Biol* 5:15-19.
28. Sissler M, Delorme C, Bond J, Ehrlich SD, Renault P, Francklyn C (1999) An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic role in histidine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8985-8990.
29. Carrodegua JA, Kobayashi R, Lim SE, Copeland WC, Bogenhagen DF (1999) The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol* 19:4039-4046.
30. Blaise M, Becker HD, Keith G, Cambillau C, Lapointe J, Giegé R, Kern D (2004) A minimalist glutamyl-tRNA synthetase dedicated to aminoacylation of the tRNA^{Asp} QUC anticodon. *Nucleic Acid Res* 32:2768-2775.
31. Salazar JC, Ambrogelly A, Crain PF, McCloskey JA, Söll D (2004) A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7536-7541.
32. Sissler M, Pütz J, Fasiolo F, Florentz C (2005) in *Aminoacyl-tRNA synthetases*, eds. Ibba M, Francklyn C & Cusack S (Landes Biosciences, Georgetown, TX) 24:271-284.
33. Bonnefond L, Fender A, Rudinger-Thirion J, Giegé R, Florentz C, Sissler M (2005) Towards the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry* 44:4805-4816.
34. 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.
35. Mudge SJ, Williams JH, Eyre HJ, Sutherland GR, Cowan PJ, Power DA (1998) Complex organisation of the 5'-end of the human glycine tRNA synthetase gene. *Gene* 209:45-50.
36. Tolkunova E, Park H, Xia J, King MP, 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.
37. Sissler M, Lorber B, Messmer M, Schaller A, Pütz J, Florentz C (2008) Handling mammalian mitochondrial tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases for functional and structural characterization. *Methods (Special issue on « Aminoacyl-tRNA synthesis »)* 44:176-189.
38. van Kollenburg B, van Dijk J, Garbern J, Thomas AA, Scheper GC, Powers JM, van der Knaap MS (2006) Glia-specific activation of all pathways of the unfolded protein response in vanishing white matter disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:707-715.

39. Hytönen VP, Laitinen OH, Airene TT, Kidron H, Meltola NJ, Porkka EJ, Hörhä J, Paldanius T, Määttä JA, Nordlund HR, Johnson MS, Salminen TA, Airene KJ, Ylä-Herttuala S, Kulomaa MS (2004) Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. *Biochem J* 384:385-90.
40. Nallamsetty S, Austin BP, Penrose KJ, Waugh DS (2005) Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci* 14:2964-2971.
41. Eiler S, Dock-Bregeon AC, Moulinier L, Thierry J-C, Moras D (1999) Synthesis of aspartyl-tRNA^{Asp} in *Escherichia coli*-a snapshot of the second step. *EMBO J* 18:6532-6541.
42. Ferrer M, Chernikova TN, Timmis KN, Golyshin PN (2004) Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* 70:4499-4504.
43. Giegé R, Rees B (2005) in *Aminoacyl-tRNA Synthetases.*, eds. Ibba M, Francklyn C & Cusack S (Landes Bioscience, Georgetown, TX) 19:210-226.
44. Delarue M, Poterszman A, Nikonov S, Garber M, Moras D, Thierry J-C (1994) Crystal structure of a prokaryotic aspartyl-tRNA synthetase. *EMBO J* 13:3219-3229.
45. Almasy RJ, Janson CA, Hamlin R, Xuong NH, Eisenberg D (1986) Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* 323:304-309.
46. Janin J, Dumas C, Morera S, Xu Y, Meyer P, Chiadmi M, Cherfils J (2000) Three-dimensional structure of nucleoside diphosphate kinase. *J Bioenerg Biomembr* 32:215-225.
47. Moulinier L (1997) Thesis. Université Louis Pasteur, Strasbourg.
48. Taylor RW, Turnbull DM (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6:389-402.
49. Shapira AHV (2006) Mitochondrial disease. *The Lancet* 368:70-82.
50. Rost B, Yachdav G, Liu J (2004) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* 32.
51. Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15:305-308.
52. DeLano WL (2002) (Delano Scientific <http://www.pymol.org>), San Carlos, CA, USA).

Chapitre 4

Le signal d'adressage mitochondrial de l'AspRS mitochondriale humaine

Alors que les deux chapitres précédents étaient consacrés à l'exploration fonctionnelle de l'AspRS mt humaine mature, le dernier chapitre de ce manuscrit se focalise sur l'enzyme prémature encore dotée de son signal d'adressage mitochondrial (« Mitochondrial Targeting Sequence », MTS) au niveau de son extrémité N-terminale. Cette séquence a pour fonctions d'acheminer la protéine du cytosol vers la mitochondrie, de conduire l'import à travers les complexes translocateurs et d'assister la maturation de la protéine. Les MTS sont constitués habituellement d'une vingtaine à une cinquantaine d'acides aminés, ne partagent pas d'identité de séquences, sont enrichis en résidus basiques, hydroxyles et hydrophobes et ont la capacité de former des hélices α amphiphiles (revue par (Pfanner & Geissler, 2001)). L'analyse du MTS théorique de l'AspRS mt humaine nous a ainsi permis de contrôler le rôle de cette séquence dans le transport de l'enzyme du cytosol vers la mitochondrie, de vérifier le site de clivage de ce signal après import dans l'organelle et d'analyser l'impact d'une mutation localisée au sein du MTS théorique et impliquée dans une leucoencéphalopathie (Scheper et al., 2007). La première partie de ce chapitre sera consacrée à l'AspRS prémature en situation saine alors que la deuxième partie sera dédiée à la recherche des répercussions moléculaires de la mutation liée à l'encéphalopathie, et ainsi de contribuer à identifier les origines possibles de la pathologie. Cette deuxième partie fait l'objet de l'article n°6.

A. À la découverte du signal d'adressage de l'AspRS mitochondriale humaine

À l'origine de ce travail, le signal d'adressage mitochondrial de l'AspRS mt humaine n'était que théorique et avait été prédit par les logiciels Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html> (Small et al., 2004)) et MitoProt (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html> (Claros & Vincens, 1996)). La probabilité d'adressage de l'AspRS mt vers la mitochondrie est respectivement 0,816 et 0,998 (en fonction du logiciel utilisé) et un site de clivage potentiel a été défini après l'acide aminé 47. Comme il est présenté dans la figure 30, ce site de coupure potentiel est cohérent avec l'alignement des séquences d'AspRS et la séquence de l'AspRS mt humaine mature débuterait (à quelques acides aminés près) comme les autres AspRS eubactériennes. Cependant, à l'exception de cette analyse, rien ne permettait d'affirmer que cette séquence peptidique était nécessaire et suffisante à l'import de l'AspRS au sein de la mitochondrie. C'est pourquoi nous avons exploré l'habileté de cette séquence d'une part à guider l'AspRS

vers les mitochondries et d'autre part à assister son import et sa maturation dans cette organelle.

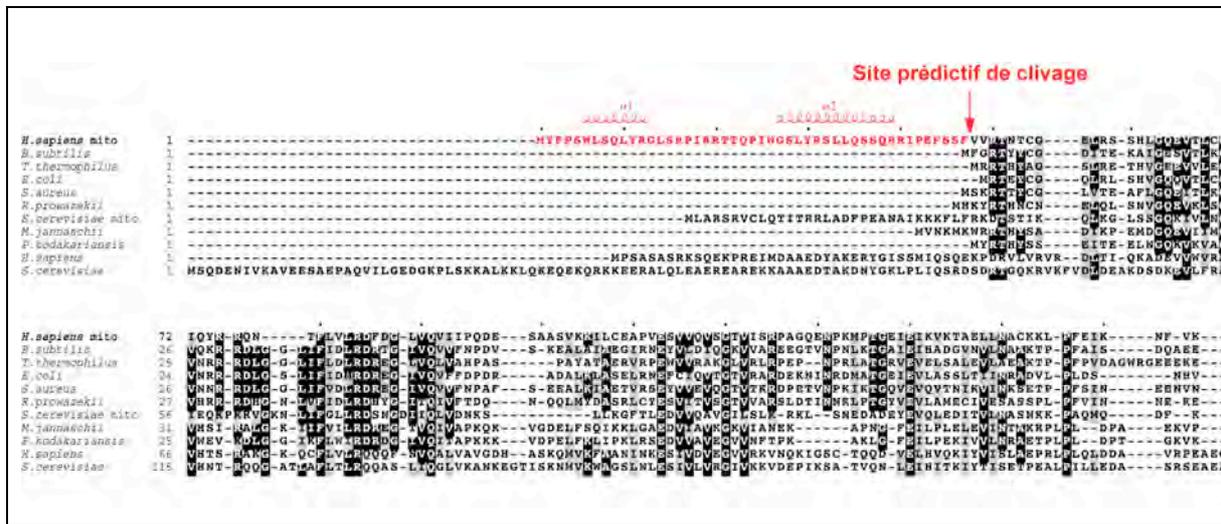


Figure 30. Séquence d'adressage théorique de l'AspRS mitochondriale humaine. L'alignement de séquences a été réalisé avec le programme 3DCoffee (Poirot et al., 2003). Les éléments de structure secondaire (hélices α) de l'AspRS mt humaine sont placés au dessus de la séquence et ont été prédits en utilisant le programme PredictProtein (Rost et al., 2004) et dessinés avec ESprict (Gouet et al., 1999). Les résidus encadrés en noir et gris correspondent aux résidus strictement identiques ou homologues, respectivement. La séquence d'adressage théorique de l'AspRS mt humaine ainsi que le site de clivage prédictif sont indiqués en rouge.

1. Le MTS théorique est-il vraiment le signal d'adressage de l'AspRS ?

1.1. Permet-il de guider l'AspRS mitochondriale humaine vers les mitochondries ?

1.1.1. Principe

Nous avons vérifié que ce signal est nécessaire et suffisant pour conduire l'AspRS aux mitochondries par transfection de cellules humaines HEK 293T avec différentes constructions fusionnées à la GFP (Figure 31) puis visualisation de la fluorescence par microscopie confocale.

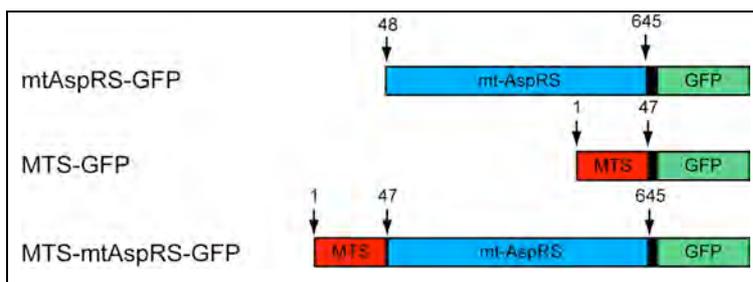


Figure 31. Présentation des variants de l'AspRS mitochondriale fusionnés à la GFP. La première construction contient l'AspRS sans son MTS théorique, la deuxième au MTS théorique de l'AspRS et la dernière au MTS théorique suivi de l'AspRS mt humaine.

L'ensemble des techniques utilisées étant présentées dans la partie Matériel et Méthodes, seul le principe des expériences réalisées est présenté brièvement dans ce qui suit.

- (i) Les séquences codantes des différentes constructions ont été clonées dans le vecteur pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO®. Ce vecteur est compatible avec la transfection de cellules humaines et exprime les protéines fusionnées à la GFP en leur extrémité C-terminale.
- (ii) Des cellules humaines HEK 293T (3×10^5 cellules) ont été cultivées sur des lamelles dans des puits de 35 mm de diamètre.
- (iii) À semi-confluence, les cellules ont été transfectées (méthode classique de transfection par phosphate de calcium) avec 500 ng de plasmide portant l'une des trois constructions présentées dans la figure 26.
- (iv) Après 36 h d'incubation, le marqueur mitochondrial Mitotracker Red CM-H₂XRos, permettant de marquer spécifiquement les mitochondries, a été ajouté.
- (v) L'expression transitoire des protéines fusionnées à la GFP a été observée en microscopie confocale (Plateforme de Microscopie et d'Imagerie, IBMP, Strasbourg) à différentes longueurs d'ondes (excitation/émission à 395/475 nm de la GFP et 579/599 nm pour le Mitotracker Red CM-H₂XRos).

1.1.2. Résultats

Comme cela est visible dans la figure 32, toutes les constructions qui contiennent le MTS co-localisent avec les mitochondries alors que le signal émis par la protéine mtAspRS-GFP (où le MTS est absent) reste diffus dans le cytosol. Ces expériences prouvent que le MTS identifié *in silico* est nécessaire à l'acheminement de l'AspRS vers la mitochondrie. Le signal cytosolique correspondant à la protéine mtAspRS-GFP indique qu'il n'y a pas de signal de localisation mt interne à la séquence AspRS-GFP. Ce résultat permet d'affirmer que le MTS est suffisant à l'acheminement de l'AspRS vers la mitochondrie.

La résolution des images obtenues par microscopie confocale permet uniquement de statuer sur la localisation des protéines au niveau des mitochondries, mais ne permet pas de distinguer une protéine se trouvant à la surface ou à l'intérieur de la mitochondrie. C'est pourquoi des expériences complémentaires ont été nécessaires afin de prouver que le MTS, en plus d'amener l'AspRS aux mitochondries, assiste également son import et sa maturation.

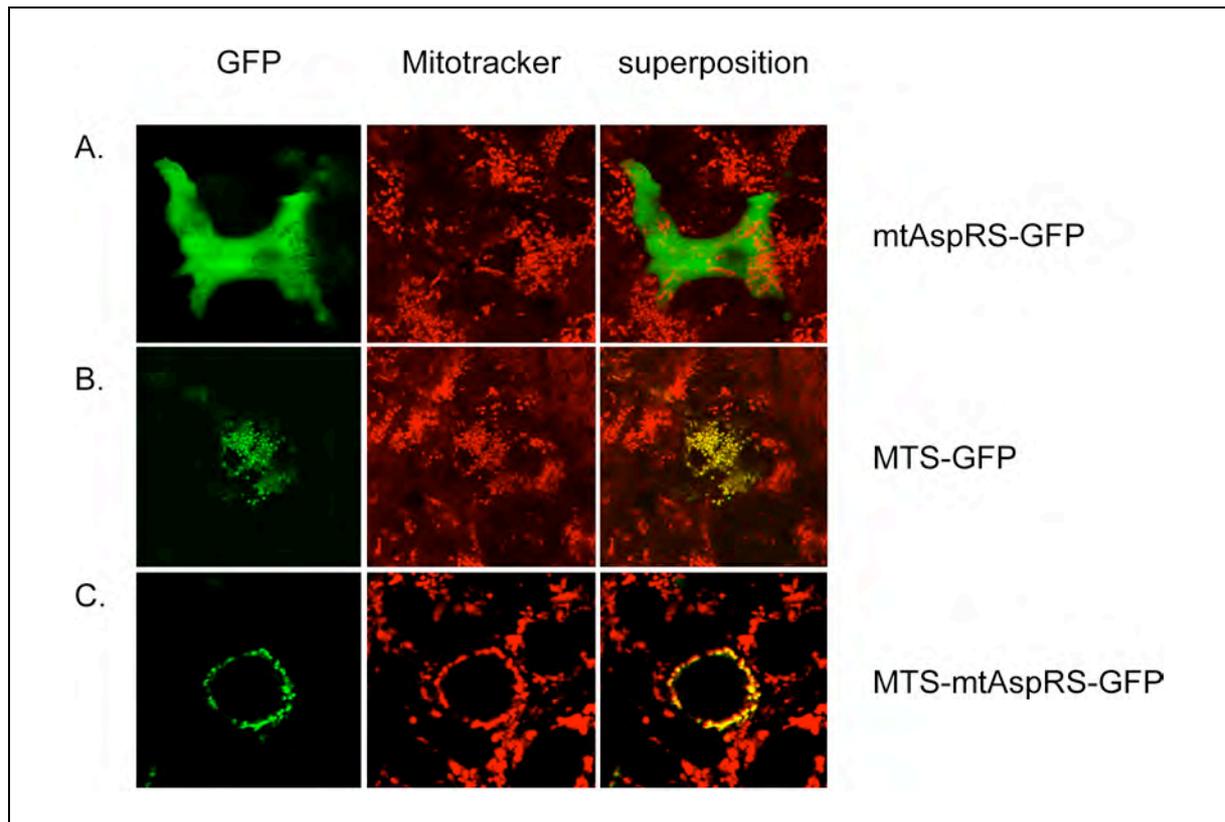


Figure 32. Expression transitoire de mtAspRS-, MTS- et MTS-mtAspRS- fusionnés à la GFP dans des cellules humaines. Les cellules HEK 293T ont été transfectées de manière transitoire avec des plasmides présentant la séquence de l'AspRS mt humaine (A.), du MTS (B.) ou du MTS suivie de l'AspRS mt humaine (C.) fusionnés à la GFP. Les photos de la colonne de gauche permettent de distinguer la fluorescence de la GFP, celles du milieu la fluorescence du marqueur mitochondrial Mitotracker Red CM-H₂XRos (Invitrogen) et celles de droite la superposition des images des deux premières colonnes.

1.2. Permet-il l'import de l'AspRS mt humaine dans les mitochondries ?

Nous avons entrepris de vérifier l'import et la maturation de l'AspRS mt humaine par une approche d'import *in vitro* dans des mitochondries purifiées et avons bénéficié des conseils avisés du Dr. L. Maréchal-Drouard (IBMP, Strasbourg) dans le cadre d'une collaboration.

1.2.1. Principe et expérience témoin

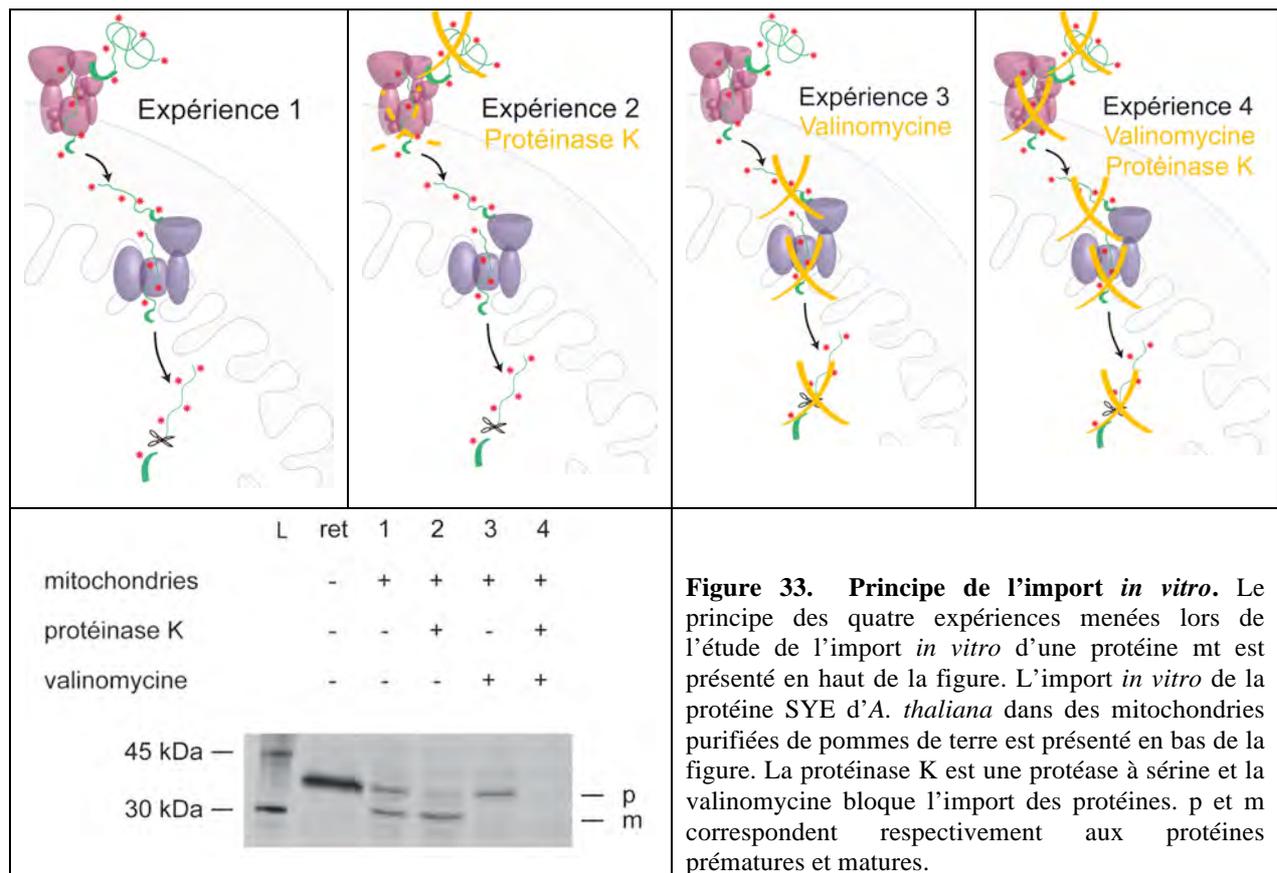
À nouveau, seul le principe de l'expérience sera présenté ici et les détails des expériences sont indiqués dans la partie Matériel et Méthodes correspondante.

- (i) **Préparation des protéines radiomarquées.** Les différentes constructions ont été clonées dans le vecteur pCR2.1® en aval du promoteur de la T7 ARN polymérase. La séquence de KOZAK (GNNATGG-3') a été ajoutée en 5' de la séquence codante afin

de rendre le plasmide compatible avec le système de transcription/traduction couplée « TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System » (Promega). Les plasmides ont été transcrits et traduits *in vitro* (TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System) en présence de [³⁵S]-méthionine et l'efficacité de la réaction a été vérifiée par migration des produits de transcription/traduction sur SDS-PAGE 10 %, séchage du gel de polyacrylamide et révélation des protéines radiomarquées par autoradiographie.

- (ii) **Purification des mitochondries.** Les mitochondries ont été purifiées à partir de cellules de pommes de terre par centrifugation différentielle (basse vitesse 1600g et haute vitesse 16000g) et purifiées sur gradient de Percoll.
- (iii) **Import *in vitro*** (le paragraphe suivant présentera plus en détail cette expérience) a été réalisée en présence des mitochondries fraîchement purifiées.
- (iv) **Analyse des lysats mitochondriaux.** Après import, migration des lysats mt sur SDS-PAGE 10%, séchage du gel et révélation des protéines radiomarquées par autoradiographie. Notons que seule la protéine radiomarquée est visible.

Une expérience témoin effectuée avec la protéine SYE correspondant aux 81 premiers acides aminés de la GluRS d'*A. thaliana* (comportant le MTS de cette aaRS) fusionnés à la GFP (238 acides aminés) (Pujol et al., 2007) a été menée en parallèle de toutes nos expériences. Les résultats obtenus (Figure 33) sont considérés comme un contrôle positif permettant de valider les conditions expérimentales utilisées par la suite. Cette expérience détaillée ci-dessous permet d'illustrer davantage le principe de l'import (Figure 33). Quatre conditions expérimentales sont menées en parallèle sur des mitochondries purifiées (ici, pommes de terre). Notons qu'après chaque expérience d'import, les mitochondries sont re-purifiées sur coussin de sucrose afin d'éliminer les protéines radioactives non incorporées dans les mitochondries.



- (i) La piste « ret » (pour réticulocyte) correspond à la protéine prémature, produit direct de la transcription/traduction *in vitro*.
- (ii) La première expérience (piste 1) consiste à mettre la protéine radiomarquée en présence des mitochondries. Deux bandes sont visibles. Celle de masse moléculaire la plus élevée co-migre avec le produit de transcription/traduction *in vitro* et correspond à la protéine prémature. La bande la plus basse présente une taille qui correspond à celle de la protéine maturée.
- (iii) La deuxième expérience (piste 2) consiste à nettoyer la surface des mitochondries après la réaction d'import par un traitement à la protéinase K et permet de visualiser les protéines importées. Notons que dans les mitochondries de pommes de terre, seule une proportion des protéines importées sont maturées (Pujol et al., 2007). Deux bandes sont visibles : une bande majoritaire, dont la masse moléculaire correspond à celle de la protéine mature et une bande minoritaire dont la masse moléculaire coïncide avec celle de la protéine prémature.
- (iv) La troisième expérience (piste 3) consiste à pré-traiter les mitochondries à la valinomycine. Ce traitement a pour effet de bloquer le transport de la protéine

prémature (Duchêne et al., 2005). Une bande unique est visible et co-migre avec le produit de transcription/traduction.

- (v) La quatrième expérience (piste 4) consiste à traiter les mitochondries à la protéinase K et à la valinomycine. Dans ces conditions, ni la protéine mature, ni la protéine prémature ne sont visibles.

1.2.2. Import *in vitro*

Au cours de nos travaux, deux constructions ont été testées et sont présentées dans la figure 34. Nous avons choisi de ne prendre que la partie N-terminale l'AspRS mt humaine afin que la masse moléculaire finale de la protéine prémature soit inférieure à 40 kDa. Ainsi la résolution du SDS-PAGE 10 ou 12% sera suffisante pour observer une différence de masse moléculaire entre les protéines prémature et maturée (théoriquement délétion de 47 acides aminés). Il s'agit soit des 313 premiers acides aminés de l'AspRS mt humaine (notée (313aa)mtAspRS), soit des 100 premiers acides aminés fusionnés à la séquence de la GFP (notée (100aa)mtAspRS-GFP). Les masses moléculaires théoriques des protéines prématures (+) et maturées (-) sont donnés dans cette figure également. Notons que pour la deuxième construction ((100aa)mtAspRS-GFP), la GFP n'a été ajoutée que pour augmenter la taille du variant et obtenir une protéine dont la taille totale avoisinerait 35-40 KDa et non pour visualiser une quelconque fluorescence.

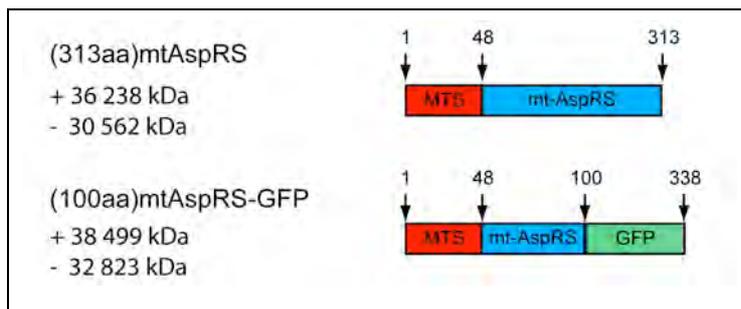


Figure 34. Présentation des variants de l'AspRS mitochondriale. La première construction correspond au MTS théorique (47 acides aminés) suivi des 266 premiers acides aminés de l'AspRS mature et la deuxième au MTS théorique suivi des 52 premiers acides aminés de l'AspRS mature fusionnés à la GFP (238 acides aminés). Les tailles des protéines prématures (+) et maturées (-) sont indiquées.

Dans des mitochondries purifiées de pommes de terre

Nous avons choisi dans un premier temps d'étudier l'import *in vitro* de l'AspRS mt humaine dans des mitochondries purifiées de pommes de terre pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le processus et les mécanismes d'import *in vitro* de protéines mt a été largement étudié pour les systèmes végétaux et les connaissances sont très avancées sur ces systèmes (Duchêne et al., 2005; Pavlov et al., 2007; Pujol et al., 2007; Rokov-Plavec et al., 2008)). Ensuite, l'exploitation du système végétal (achat de pommes de terre) permet de purifier une quantité importante de mitochondries par rapport au système humain (culture de cellules). Enfin, l'import de protéines humaines n'a jamais été étudié dans des mitochondries végétales. Pourtant, il a déjà été montré que l'import *in vitro* hétérologue (protéines de levure dans des mitochondries purifiées de pomme de terre (Chaumont et al., 1990)) est possible.

Les mitochondries ont été purifiées à partir de pommes de terre selon le protocole détaillé dans la partie Matériel et Méthodes et les résultats obtenus pour les deux variants de l'AspRS sont présentés dans la figure 35 et discutés ensemble.

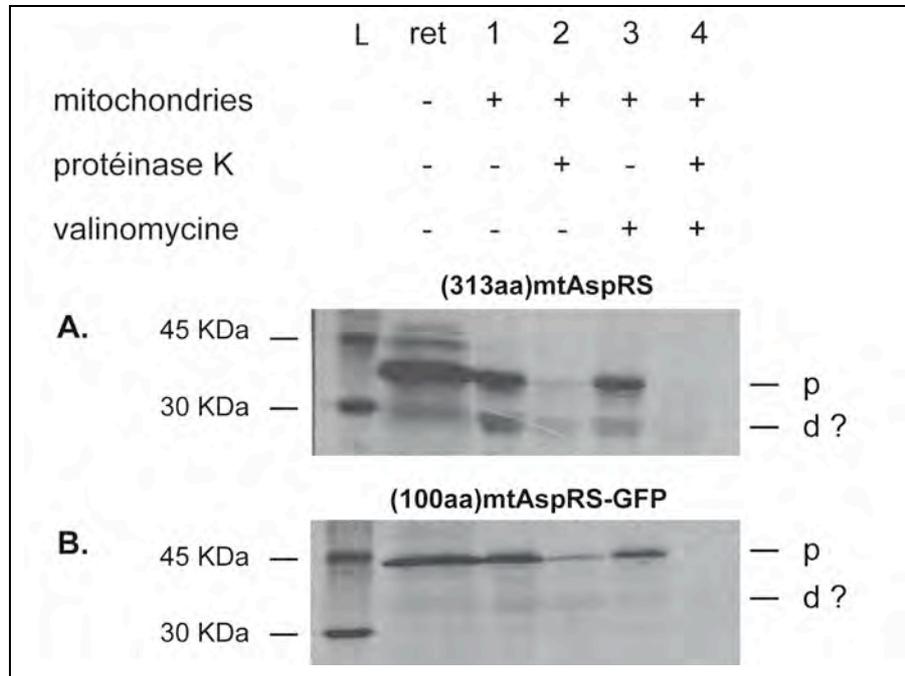


Figure 35. Import *in vitro* des variants de l'AspRS mt humaine dans des mitochondries purifiées de pommes de terre. A. Import du variant (313aa)mtAspRS. **B.** Import du variant (100aa)mtAspRS-GFP. L'échelle de masse moléculaire est indiquée. p correspond à la protéine prématrice et d à des dégradations.

Soulignons que dans le cas de la protéine (313aa)mtAspRS, le produit de transcription/traduction *in vitro* n'est pas propre et présente, en plus de la protéine prématrice,

plusieurs contaminants de masses moléculaires supérieures et inférieures. Ce phénomène est également observable dans le cas (100aa)mtAspRS-GFP, mais à un degré moindre. Les protéines prématures sont nettement visibles dans les pistes 1 et 3, une proportion non négligeable subsiste dans les pistes 2. Cependant, aucune bande pouvant être désignée comme protéine mature n'est clairement visible. En effet, les bandes de taille inférieure sont présentes dans l'ensemble des pistes et sont très certainement des produits de dégradation. Cependant, un doute subsiste pour la construction (313aa)mtAspRS (Figure 35A) puisqu'une deuxième bande peut être visible au sein des pistes 1, 2 et 3 en dessous de la bande correspondant au produit de dégradation. Or l'action de la valinomycine (piste 3) est de bloquer l'import. Il ne peut donc pas s'agir de la protéine mature. En conclusion, la présence des protéines prématures dans les pistes 2 et 3 indique que l'import a lieu dans les mitochondries de pommes de terre. Mais l'absence de protéine mature dans les pistes 1 et 2 montre que l'étape de maturation de l'AspRS mt humaine ne se fait pas. Au vu de ces résultats, il apparaît que le système hétérologue (protéine humaine/mitochondries de pommes de terre) présente des limites. Il est fort probable que les processus de maturation dans les systèmes végétaux soit différent de ceux du système humain.

Les résultats obtenus se sont révélés encourageants, cependant l'utilisation du système végétal ne semble pas être optimal. C'est pourquoi nous avons décidé d'entreprendre la même étude sur des mitochondries fraîchement purifiées à partir de cellules HEK 293T.

Dans des mitochondries purifiées de cellules humaines

Les conditions optimales pour étudier l'import *in vitro* de l'AspRS mt humaine dans des mitochondries purifiées à partir de cellules humaines sont présentées dans la partie Matériel et Méthodes. Notons que pour réaliser une série d'expériences sur les deux variants de l'AspRS et sur la protéine contrôle d'*A. thaliana*, 600 µg de mitochondries de cellules HEK 293T ont été nécessaires (8,6.10⁸ cellules HEK 293T, 10 boîtes de culture 10 cm de diamètre). La figure 36 présente les résultats obtenus pour les expériences d'import *in vitro* du variant (313aa)mtAspRS et de la protéine SYE d'*A. thaliana* menées en parallèle (contrôle).

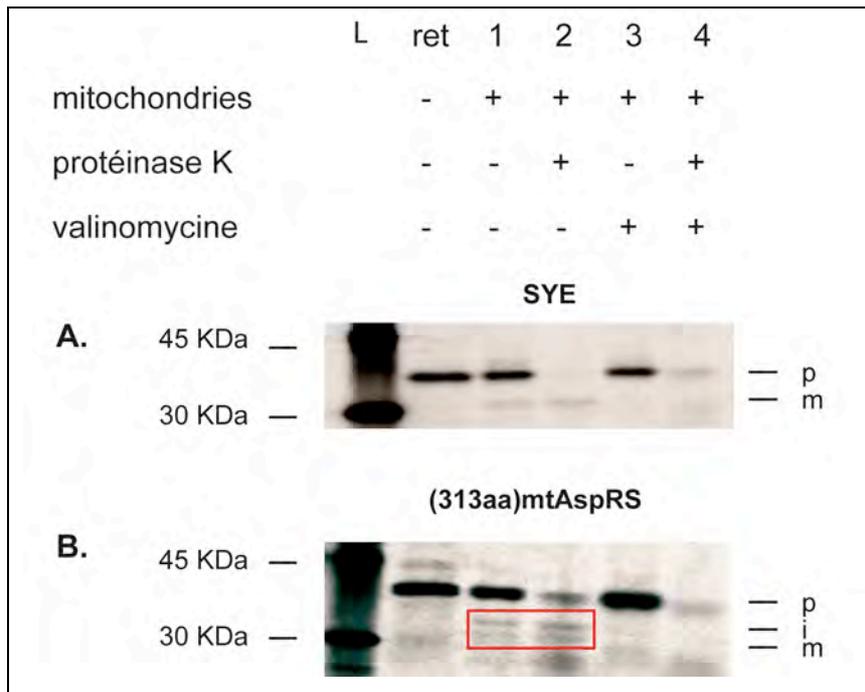


Figure 36. Import *in vitro* de protéines mitochondriales dans des mitochondries purifiées à partir de cellules HEK 293T. A. Import de la protéine SYE d'*A. thaliana*. **B.** Import de la protéine (313aa)mtAspRS. L'échelle de masse moléculaire est indiquée. p correspond à la protéine prématrice, m à la protéine mature et i à la protéine intermédiaire. Les formes intermédiaire et mature du variant de l'AspRS après import sont encadrées en rouge.

L'expérience réalisée sur les mitochondries purifiées de cellules HEK 293T avec la protéine SYE (Figure 36A) présente le même profil que celui obtenu lors de l'expérience réalisée sur les mitochondries purifiées de pommes de terre (Figure 28). Ce résultat indique que les conditions expérimentales ainsi que les mitochondries humaines purifiées sont adéquates à cette expérience d'import *in vitro*. Pour la construction (313aa)mtAspRS le profil est très semblable à celui observé pour SYE avec la présence de formes prématures dans les pistes 1 et 3. La protéine est clairement maturée (bande visible avec une masse moléculaire avoisinant les 30 kDa, proche de celle théoriquement attendue de 30,5 kDa), ceci uniquement dans les pistes 1 et 2. Cette bande disparaît lorsque les mitochondries sont traitées à la valinomycine (pistes 3 et 4). Notons cependant que toutes les protéines importées ne sont pas maturées (protéine prématrice dans la piste 2). L'ensemble de ces résultats montre que l'import et la maturation des protéines SYE et (313aa)mtAspRS ont bien lieu dans des mitochondries purifiées de cellules humaines. Soulignons qu'une deuxième bande est visible (Figure 31B, notée « i ») ; nous reviendrons plus tard sur sa présence.

Les expériences d'import *in vitro* réalisées sur des mitochondries purifiées de cellules HEK 293T ont permis de confirmer que la séquence théorique identifiée *in silico* permet, en

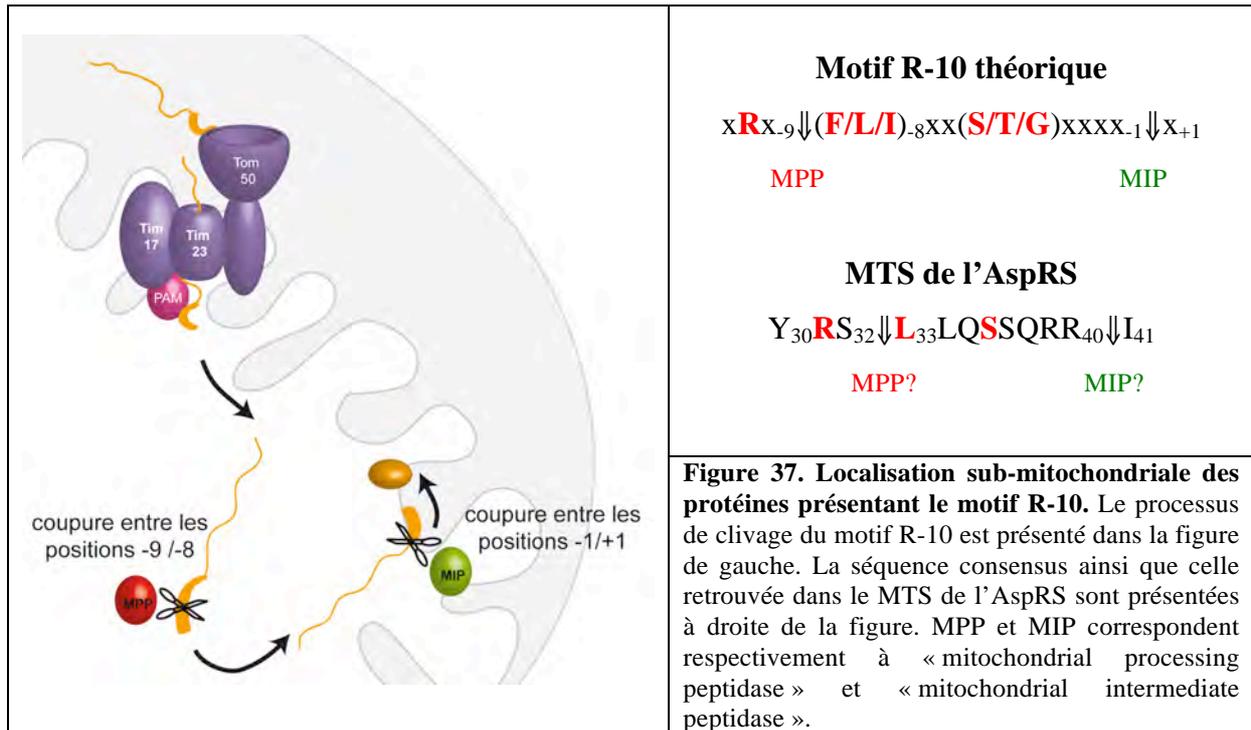
plus de guider l'AspRS mt humaine aux mitochondries, de contribuer à son import et à sa maturation.

2. Localisation de la traduction mitochondriale au niveau des membranes internes ?

L'expérience d'import *in vitro* de l'AspRS mt humaine nous a confirmé que la partie N-terminale de l'AspRS correspond à une séquence d'adressage mt. Mais celle-ci, combinée à l'analyse de la séquence peptidique du MTS, nous a également apporté des indices permettant, d'une part, de nous rapprocher de l'hypothèse d'une traduction mitochondriale de mammifère localisée au niveau des membranes internes (§ A.4. de l'introduction, (Liu & Spremulli, 2000; Suzuki et al., 2007)) et d'autre part d'affiner la détermination du site du clivage du MTS.

2.1. Exploitation des résultats d'import *in vitro* de l'AspRS mitochondriale humaine

L'expérience d'import *in vitro* du variant (313aa)mtAspRS a révélé, après import, deux bandes correspondant à des produits de maturation de la protéine, alors qu'une bande unique était attendue. Ainsi, en plus de la bande correspondant au produit de maturation attendu (30,5 kDa), une deuxième bande de masse moléculaire plus élevée est également décelable (encadré rouge, figure 36). Ce profil de coupure est typique des protéines localisées au niveau de la membrane interne mt (Nett & Trumpower, 1996). D'après la littérature, ce profil est observé en réponse à un motif appelé R-10 : $xR_{x-9}\downarrow(F/L/I)_{.8}xx(S/T/G)_{xxxx.1}\downarrow_{x+1}$ (revues par (Pfanner & Geissler, 2001; Gakh et al., 2002)). Les MTS comportant ce motif sont clivés selon un processus en deux étapes (Figure 37). La première étape est catalysée par la « mitochondrial processing peptidase » (MPP) qui coupe entre les résidus -8 et -9 et la deuxième par la « mitochondrial intermediate peptidase » (MIP) entre les résidus -1 et +1 (Kalousek et al., 1988; Nett et al., 1998).



L'analyse de la séquence peptidique du MTS de l'AspRS mt humaine montre la présence de la séquence $Y_{30}RS_{32}\downarrow L_{33}LQSSQRR_{40}\downarrow I_{41}$ qui correspond au motif R-10 (les résidus conservés sont indiqués en gras). Ainsi, la bande dont la taille est la plus élevée correspondrait au produit issu de la première étape de clivage et celle dont la taille est la plus faible au produit de maturation final, après les deux étapes de clivage. Grâce à la présence de ce motif, l'AspRS mt humaine pourrait ainsi être relocalisée au sein de la membrane interne.

2.2. Présence plus large du motif R-10 dans les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines

On peut alors se demander si l'AspRS est la seule aaRS mt humaine à posséder ce motif R-10 ou si ce motif est retrouvé de manière plus générale au sein des autres aaRS. Le tableau 11 révèle que l'AspRS n'est pas un cas particulier puisque 10 autres aaRS mt humaines présentent ce même motif. Ceci viendrait appuyer l'hypothèse d'une traduction mt au niveau de la membrane interne mt proposée précédemment au vu de la localisation au niveau de ce sous-compartiment du ribosome (Liu & Spremulli, 2000) ainsi que du facteur d'élongation EF-Tu (Suzuki et al., 2007). Notons que la traduction mt humaine est responsable de la synthèse d'uniquement 13 protéines, toutes composantes des complexes de la chaîne respiratoire localisés au sein de la membrane interne. La localisation de la traduction mt au niveau de ce sous-compartiment semble alors logique. Les autres aaRS qui ne

possèdent pas de manière évidente un motif R-10 possèdent soit le motif R-3 ($xRx\downarrow(F/L/I)xx(S/T/G)xxxx\downarrow$), soit le motif R-2 ($xRx\downarrow x(S/x)$) (revue par *e.g.* (Gavel & von Heijne, 1990)), soit aucun motif consensus. Les motifs R-3 et R-2 sont retrouvés pour les protéines localisées au niveau de la matrice. Il n'est pas exclu alors qu'un complexe protéique encore inconnu, mettant en jeu notamment ces dernières aaRS mt humaines, aurait comme fonction de guider ces dernières vers la membrane interne. La figure 38 présente les composants de la machinerie traductionnelle mitochondriale soupçonnés d'être localisés au niveau de la membrane interne ainsi que les aaRS mt ne possédant pas de motif R-10 et qui par conséquent sont supposées être localisées au sein de la matrice mt.

aaRS mt humaine	motif	Nouvelle prédiction de séquence N-terminales correspondant aux signaux d'adressage mitochondriaux
AspRS		MYFPSWLSQLYRGLSRPIRRTTQPIWGS LYRS LLOSSORR IPEFSSF
IleRS		SLWGTPLRPLCPSPGWQGAT KRL LVR SVSGA SNHQPNNSNGRYRDTVLLPQTSFPMKLLGRQ
LeuRS		MASVWQRLGFYASLL KRQ LNGG PDVI KWERRVIPGCTRS
MetRS		TMLRTSV LRL LGR TGASR
TrpRS		MALHSMRKARERWSF IRA LHK GSAAA PALQKDSKKRVFSGIQPTGI
TyrRS	R-10	MAAP ILRS FSWGR WSG TLNLSVLLPLGLRKA
ProRS		MEGLLTRCRALPALATCSRQLSGYVPCRFFHCAPRR RR LLSR VFQ
LysRS		MLTQAAVRLVRGSLRKTSWAEWGH RE LRLG QLAP
AsnRS		MLG YRC LLRS VRFQ
AlaRS		MAASVAAAARR LRA IRRS PAWR GLSHRPLSSEPPAAKASAVRAAFLNFFRDRHGHRLVPSASVPRG
GlyRS		MLRAGGARFRRHPLWTAQ RR LMPS RPV LLRGARAALLLPPRLRLARPSLLRRLSAAASCAPISLPAAASRSS
ThrRS		MALYQRWRCLRLQGLQACRLHTAVVST PPRWL AER LGLF
HisRS	R-3	MPLLGL PRAW ASLL SQLLRPPCASCTGAVRCQ
PheRS		MVGSAL RRG AHAY VYLVSKASHISRGHQHQAWSRPP
CysRS	R-2	MLRTRGPGLGPPLLQAALGLGRAGWHWP GRA ASG GRGRAWLQPTGRETGVQVYNSLTGRK
ValRS		M PHL PLASFRPPFWGLRHSRGL PRF HS VS
ArgRS		MACGFRRAIACQLSRV
GluRS	?	MAALLRRLQREPSAASGRPVGRR
SerRS		MAASMARRLWPLLTRRGFRP

Tableau 11. Nouvelle prédiction de séquence N-terminales correspondant aux signaux d'adressage mitochondriaux des aaRS mitochondriales humaines. Le motif R-10 correspond à la séquence consensus $xRx\downarrow(F/L/I)xx(S/T/G)xxxx\downarrow$, le motif R-3 à $xRx(Y/x)\downarrow(S/A/x)x$ et le motif R-2 à $xRx\downarrow x(S/x)$ (Gavel & von Heijne, 1990). Les acides aminés impliqués dans les motifs sont soulignés, et les résidus conservés sont indiqués en rouge. Les séquences correspondant au signal d'adressage mitochondrial théorique évaluées par les logiciel Predotar (Small et al., 2004) et MitoProt (Claros & Vincens, 1996) sont indiqués en gras. Les séquences additionnelles faisant partie des nouveaux MTS sont indiquées en caractère normal.

Notons que pour la MetRS, la ProRS et l'AsnRS, le MTS reste identique à celui prédit par MitoProt et Predotar. De nouveaux sites de clivage sont prédits pour l'AspRS, l'IleRS, la LeuRS, la TrpRS, la TyrRS, l'AlaRS, la GlyRS, la ThrRS, l'HisRS, la PheRS, la CysRS et la

ValRS. Ces sites sont localisés plus en amont dans la séquence du MTS prédite auparavant. Enfin, le MTS de la LysRS est rallongé de 17 acides aminés.

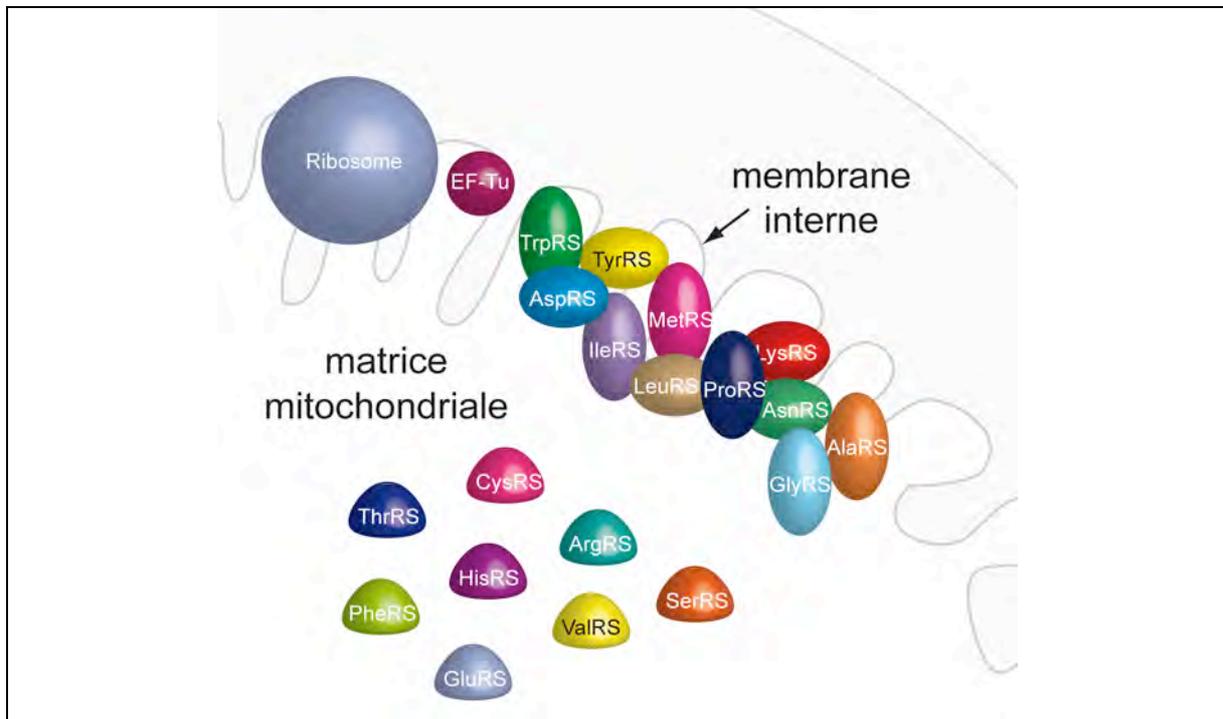


Figure 38. Vue schématique de la localisation mitochondriale de certains composants de la machinerie traductionnelle mt humaine. L'ordre et les liens entre les protéines sont factices.

3. Conclusions et perspectives

Les expériences de transfection de cellules HEK 293T combinées aux expériences d'import *in vitro* ont permis de montrer que les 47 premiers acides aminés de la séquence N-terminale de l'AspRS mt humaine comprennent son signal d'adressage mitochondrial. Cependant, l'import *in vitro* et l'analyse de la séquence de l'AspRS ont affiné cette étude et ont révélé la présence du motif R-10 (Y₃₀RS↓LLQSSQRR₄₀↓I) au sein de sa séquence N-terminale. Il semblerait alors que le MTS de l'AspRS se limiterait à ses 40 premiers acides aminés et non à 47. Afin de confirmer ce résultat, plusieurs expériences sont nécessaires. Ainsi, par exemple :

- (i) Il faudra cloner ces 40 premiers acides aminés en amont de la GFP selon le même principe que l'expérience présentée dans le § 1.1. de ce chapitre. La localisation cellulaire de la fluorescence de la GFP permettra alors de confirmer ou non que cette séquence est suffisante au transport de l'AspRS mt humaine vers les mitochondries.

- (ii) Le séquençage N-terminal de la bande correspondant à la protéine mature à l'issue de l'expérience d'import *in vitro* permettrait l'identification des résidus suivant immédiatement le site de clivage. Notons que ce séquençage ainsi que celui des spots issus de l'immunoprécipitation (chapitre 3) sont en cours et nous sommes en attente des résultats.
- (iii) Des expériences d'import *in vitro* avec la construction (313aa)mtAspRS au sein de laquelle les résidus consensus R31, L33 et/ou S36 du motif R-10 seraient mutés permettrait de confirmer l'implication de ces résidus et par extension de ce motif dans l'import et la maturation de l'AspRS mt humaine.

Enfin, l'éventualité que le MTS de l'AspRS mt humaine se limite à ses 40 premiers acides aminés pourrait être salvatrice d'une part pour les problèmes de solubilité rencontrés lors de la purification de l'AspRS mt humaine (présentés dans l'article n°4) et d'autre part pour les difficultés de production de l'AspRS- Δ Exon13 rencontrées jusqu'à présent (présentées dans l'article n°5). En effet, que ce soit pour l'AspRS mt humaine ou l'AspRS- Δ Exon13, les séquences choisies pour cloner ces protéines débutent toutes deux par le codon codant pour l'acide aminé valine en position 48. Les reclonages des séquences codantes pour ces deux protéines sont maintenant à considérer en débutant leur séquence par le codon codant pour l'acide aminé Isoleucine en position 41. Les deux protéines correspondantes rallongées de 7 acides aminés pourraient peut-être être soit plus solubles, dans le cas de l'AspRS mt humaine, soit permettre la surexpression et induire une meilleure solubilité, dans le cas de l'AspRS- Δ Exon13. Dans le cas de l'AspRS mt humaine, la protéine pourrait peut-être être plus active puisque les séquences N-terminales des aaRS mt humaines sont connues pour influencer leurs activités d'aminacylation avec l'exemple de la LeuRS mt humaine dont l'activité se trouve affaiblie lorsqu'une partie de son signal d'adressage mitochondrial demeure en amont de sa séquence (Yao et al., 2003).

B. Etude d'une mutation au sein du MTS théorique de l'AspRS mitochondriale humaine liée à une leucoencéphalopathie

Il a été montré par Scheper et coll. que des mutations au sein de l'AspRS mt humaine sont à l'origine d'une leucoencéphalopathie (Scheper et al., 2007). L'une d'entre elles touche l'acide aminé Sérine en position 45, converti en Gly (mutation S45G). Sa localisation au sein de la séquence d'adressage mitochondrial théorique a motivé l'étude de son impact à la fois sur le guidage de l'AspRS vers les mitochondrie, son import et sa maturation. Les résultats obtenus font l'objet de l'article n°6.

Article n°6

Non-processing of a mitochondrial protein is a cause of leukoencephalopathy

**M. Messmer, L. Maréchal-Drouard, G. Scheper, M. Van der Knaap, C. Florentz
& M. Sissler**

2008

Soumis pour publication à Proc. Natl. Acad. Sci. USA

Les mitochondries produisent la réserve d'ATP de la cellule et sont, de ce fait, considérées comme étant les centrales énergétiques des cellules eucaryotes. Parmi l'ensemble des protéines nécessaires à leur fonctionnement, seulement 13 sont codées par le génome mitochondrial (mt), alors que les autres, à l'image des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) sont codées par le génome nucléaire et importées dans la mitochondrie. Ce n'est que très récemment, qu'une variété de mutations au sein des gènes codant les mt aaRS ont été montrées comme étant impliquées dans des pathologies. L'une d'entre elles (Ser₄₅ en Gly₄₅) est localisée au sein de la séquence d'adressage mitochondriale (MTS) de l'aspartyl-ARNt synthétase (mt AspRS) et est impliquée dans une leucoencéphalopathie. Le MTS porte l'information nécessaire à l'acheminement, l'import ainsi qu'à la maturation des protéines mt dans la mitochondrie. Cette dernière étape est essentielle à la libération d'une protéine mature, repliée et fonctionnelle. Alors que des mutations au sein de MTS ont déjà été montrées

comme empêchant l'acheminement ou l'import et conduisant à des pathologies humaines, un seul cas de défaut de maturation a uniquement été présumé être à l'origine d'une pathologie. Dans ce travail, les conséquences du changement Ser₄₅ en Gly₄₅ à la fois sur le guidage, l'import et la maturation de l'AspRS mt ont été explorées à l'aide de constructions fusionnées à la GFP et d'expériences d'import *in vitro*. Nous montrons ici que l'AspRS mutée est correctement acheminée et importée dans la mitochondrie mais n'est pas maturée une fois présente à l'intérieur de l'organelle. Ceci empêche la nouvelle re-localisation de l'enzyme au niveau de la membrane interne, localisation également découverte lors de ce travail. Par conséquent, dans ce cas présent, il s'agit d'un défaut de maturation et non d'import d'une protéine mt qui est à l'origine d'une pathologie.

**Non-processing of a mitochondrial protein is a cause of
leukoencephalopathy**

Marie Messmer¹, Laurence Maréchal-Drouard², Gert Scheper³, Marjo Van der Knaap³,
Catherine Florentz¹ and Marie Sissler^{1*}

¹ Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Louis Pasteur, F-67084 Strasbourg, France.

² Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Louis Pasteur, F-67084 Strasbourg, France.

³ Department of Pediatrics and Child Neurology, Vrije University Medical Center, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

*, To whom correspondence should be addressed. E-mail: M.Sissler@ibmc.u-strasbg.fr.
Phone: +33(0)3 88 41 70 57.

Summary

Mitochondria produce the bulk of the cell's ATP and are therefore the power stations of eukaryotes. Among all the proteins required to their functions, only 13 are encoded by the mitochondrial genome, while all the other ones, as the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases (mt-aaRS), are encoded by the nuclear genome and imported into the mitochondria. It is only recently that a variety of mutations in mt-aaRS genes have been shown to be involved in diseases, one of them (Ser₄₅ to Gly₄₅) is localized within the mitochondrial targeting signal (MTS) of the mt aspartyl-tRNA synthetase (mt-AspRS) and involved in a leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation (LBSL). MTS manages targeting, mt-import as well as processing of mt-proteins, a step that is required to release mature, folded and functional proteins upon entry into mitochondria. Whereas mutations within MTS have already been shown to hamper mt-protein targeting or import leading to human diseases, they only have been assumed once to be involved in a pathology related to a deficient processing. Here, consequences of the Ser₄₅ to Gly₄₅ change have been investigated on mt-targeting, import, and processing of mt-AspRS using GFP-fusion constructs and *in vitro* import assay. We show that mt-AspRS is properly addressed to and imported into mitochondria, but not processed once inside mitochondria. This hampers the newly discovered re-localization of the enzyme along inner mt membrane. Accordingly, maturation-rather than import- defect of a mt-protein is the origin of the disorder.

Introduction

Leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation (LBSL) is an autosomal recessive disease, most often manifesting in early childhood. It has been defined

based upon a highly characteristic constellation of abnormalities in magnetic resonance imaging and spectroscopy (1). Over time, patients develop progressive cerebellar ataxia, spasticity, and dorsal column dysfunction, sometimes accompanied by a mild cognitive deficit or decline. Several mutations in *DARS2*, encoding the mitochondrial (mt) aspartyl-tRNA synthetase (mt-AspRS), have been correlated with LBSL (2). This is the first example of the involvement of a mitochondrial aaRS in pathologies. Two other cases have been described so far: missense mutations in *GARS*, coding for the cytosolic and mt glycyl-tRNA synthetase (3, 4), and a deleterious mutation in *RARS2* gene, coding for the mt arginyl-tRNA synthetase (5).

The crucial role of aaRSs in protein biosynthesis, alongside transfer RNAs (tRNA), highlights the dramatic consequence of a non-functional, mutated enzyme. Indeed, in every cell and organelle, each of the 20 aaRSs specifically esterifies its corresponding tRNAs with the correct amino acid, which is then transferred to the growing peptide chain. Mammalian mitochondria possess their own translation machinery, which is devoted to the synthesis of only 13 proteins, all subunits of respiratory chain complexes. While 22 tRNAs and 2 rRNAs are encoded by the mt-genome, all other macromolecules needed for protein biosynthesis are encoded by nuclear genes and, thus, are imported from the cytosol. Moreover, consecutively to the compilation of the full set of human mt-aaRS genes, it has been shown, with two exceptions, that mt and cytosolic aaRSs are encoded by two different sets of genes (6).

In the present work, we have examined the consequences of the Ser₄₅ to Gly₄₅ (S45G) change that was reported for LBSL. Ser₄₅ is located within the predicted 47aa N-terminal mt targeting sequence (MTS) (6). Mutation at this location could perturb the targeting function of the MTS in localizing the enzyme into mitochondria

or affect the cleavage of the MTS upon entry into mitochondria by mt-processing peptidase (MPP). This cleavage is required to release a functional mt protein (reviewed in (7)). The repercussions of the S45G amino acid change on the targeting of mt-AspRS to mitochondria have been explored using transfected cells that transiently express the GFP-fused wild-type or mutant variant of mt-AspRS. In addition, import and maturation effectiveness have been determined by *in vitro* import assays using purified human mitochondria with radio-labeled wild-type and mutant mt-AspRS. The impact of the pathology-related mutation will be discussed in regard of processing rather than another step of mitochondrial targeting. New data on sub-mitochondrial location of mt-AspRS will be brought.

Materials and Methods

Cloning. A fragment encoding MTS-mt-AspRS corresponding to the full length open reading frame of mt-AspRS including the MTS was cloned as a HindIII-AgeI digested PCR fragment into pEGFP-N1 (Clontech) (pEGFP-N1-DARS2 plasmid). The nucleotide change corresponding to p.Ser45Gly was introduced using the Stratagene Quikchange kit and appropriate primers (pEGFP-N1-(S45G)-DARS2 plasmid). Subsequently, appropriate DNA fragments were amplified by PCR from the resulting vectors and introduced into the pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO® vector (Invitrogen) following the manufacturer's procedures. The same pcDNA3.1 vector was used to introduce the MTS sequence upstream the GFP coding sequence by hybridization, PCR amplification, and ligation of appropriate primers. Vectors expressing truncated enzyme (amino acids 1-313), called (313aa)mtAspRS and S45G(313aa)mtAspRS, were generated by PCR amplification of the appropriate DNA fragments and introduction into the pCR@2.1 vector (Invitrogen) in an orientation allowing their transcription

from the T7 promoter and following the manufacturer's procedures. Concerning the last two vectors, a Kozak consensus sequence (5'-GCCATG-3') has been introduced during the PCR step to allow translation of the desired protein. Plasmid expressing the 81 first aa of *A. thaliana* mt-GluRS upstream the 238 aa of the GFP sequence has been prepared previously (8).

Cell culture and visualization of the mt-AspRS-GFP fusion protein variants. HEK 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C, in a 10% CO₂ humidified incubator. HEK 293T cells were seeded onto coverslips into 35 mm tissue culture dishes at a density of 3×10⁵ cells per dish. At semi-confluence, cells were transiently transfected by the calcium phosphate method with 500 ng of plasmids. After 36h, Mitotracker Red CM-H₂XRos (Invitrogen) was added to the growth media to a final concentration of 100 nM for 30 min. Images were obtained using confocal microscopy as previously described (9, 10).

Human mitochondria purification. HEK 293T cells were harvested from 10 cm tissue culture dishes by trypsinisation, centrifuged for 10 min at 300 rcf at 25°C and the pellets washed twice in 5 mM HEPES-KOH pH 7.5, 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM EDTA, 0.5% BSA and 2 mM β-mercaptoethanol. Cells were resuspended in 15 ml of the same buffer and broken in a warring blender (3 rounds of blending for 10 sec, highest speed). The cell lysate was centrifuged for 5 min at 1,500 rcf and the supernatant was centrifuged again for 5 min at 1,500 rcf until no pellet was detectable. The supernatant was then centrifuged for 25 min at 20,500 rcf. The supernatant was discarded and the pellet of mitochondria washed twice in the import buffer (10 mM HEPES-KOH pH 7.5, 25 mM sucrose, 75

- gc.scheper 2/7/08 10:13
Supprimé: KOSAK
- gc.scheper 2/7/08 10:35
Mis en forme: Police :12 pt, Anglais
- gc.scheper 2/7/08 10:35
Mis en forme: Police :12 pt, Non souligné, Anglais (E.U.)
- gc.scheper 2/7/08 10:35
Mis en forme: Police :12 pt, Anglais
- gc.scheper 2/7/08 10:46
Supprimé: with either MTS-GFP, mtAspRS-GFP, MTS-mtAspRS-GFP or MTS(S45G)-mtAspRS-GFP fusion constructs.
- gc.scheper 2/7/08 13:50
Supprimé: Materials
- gc.scheper 2/7/08 13:50
Mis en forme: Police :Italique
- gc.scheper 2/7/08 13:50
Mis en forme: Police :12 pt, Gras, Italique, Anglais (E.U.)
- gc.scheper 2/7/08 13:49
Supprimé: Transient expression in HEK 293T cells and GFP fluorescence were visualized
- gc.scheper 2/7/08 13:50
Supprimé: by
- gc.scheper 2/7/08 13:50
Supprimé:
In vitro import into isolated mitochondria
Cloning. Two MTS-mtAspRS derivatives have been produced (see Fig. 3) and their sizes chosen to be 36 kDa (to allow measurable size differences between precursor and mature proteins). MTS-1/2mtAspRS and MTS(S45G)-1/2mtAspRS constructs correspond to amino acid (aa) 1 to 313 of MTS-mtAspRS, the second one containing in addition the S45G mutation.
To produce MTS-1/2mtAspRS and MTS(S45G)-1/2mtAspRS plasmids, the appropriate DNA fragments were amplified from pEGFP-N1-DARS2 or pEGFP-N1-(S45G)-DARS2 by PCR and introduced into the pCR@2.1 vector (Invitrogen) in such a direction that they could be transcribed from the T7 promoter. During the PCR step, a KOSAK sequence 5'-GCCATGG-3' (underlined) and a stop codon 5'-TGA-3' (underlined as 5'-TCA-3' in reverse primer) have been introduced with the forward (5'-GCCATGGCGTACTTCCTTC-3') and the reverse primers (5'-TCACCACAGGATCTTTGTCATTGGG-3'), respectively, to allow in vitro translation of the desired proteins. As described above, Pfu Turbo and Dynazyme Ext enzymes have been used for PCR and for non-templated 3'-A addition.
- gc.scheper 2/7/08 10:07
Supprimé: Plasmids pEGFP-N1-DARS2 and
- gc.scheper 2/7/08 10:36
Supprimé: to
- gc.scheper 2/7/08 10:43
Supprimé: [
- gc.scheper 2/7/08 10:43
Supprimé:]
- gc.scheper 2/7/08 10:43
Supprimé:

mM sorbitol, 100 mM KCl, 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7.5, 0.05 mM EDTA, 5 mM MgCl_2) and kept on ice. Concentration of mitochondrial proteins was measured by a Bradford assay, using BSA as reference protein.

In vitro transcription and translation assay. *In vitro* synthesis of proteins in the presence of $[^{35}\text{S}]$ -methionine (1000 Ci/mmol, Amersham) was carried out with the TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) following the manufacturer's procedures.

Import and processing assay into human mitochondria. Import of $[^{35}\text{S}]$ -labeled fusion proteins into freshly purified human mitochondria was performed as previously described (11). Briefly, after purification, the concentration of mitochondria was adjusted to 2 mg/ml in the reaction mixture 10 mM HEPES-KOH pH 7.5, 25 mM sucrose, 75 mM sorbitol, 100 mM KCl, 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7.5, 0.05 mM EDTA and 5 mM MgCl_2 . Five μl of $[^{35}\text{S}]$ -labeled fusion proteins (directly from *in vitro* transcription/translation reaction) were then added to 25 μl of the mitochondria suspension. The volume was then adjusted to 50 μl with the import buffer supplemented with 2 mg/ml BSA, 4 mM malate, 2 mM ATP and 2 mM of methionine (included to avoid labeling of newly synthesized proteins). The reaction mixture was incubated for 30 min at 37°C. Mitochondria were further isolated on a 27% (w/v) sucrose cushion and the pellets lysed in 10 μl of SDS-PAGE loading buffer. The mitochondrial lysates were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. When indicated, valinomycin was included in the reaction mixture to 2 μM . In other assays, proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the incubation mixture after the import assay, and the samples were incubated at room temperature for 10 min before the washing and lysis steps.

Results

GFP-fusion proteins co-localize with mitochondria

The pathology-related amino acid change S45G occurs within the predicted MTS. To investigate the possible influence of this mutation on the targeting of the mt-AspRS to mitochondria, wild-type or mutated sequence has been fused upstream the GFP one. Both constructions have been transiently expressed in HEK 293T cells, and fluorescence has been visualized by confocal microscopy.

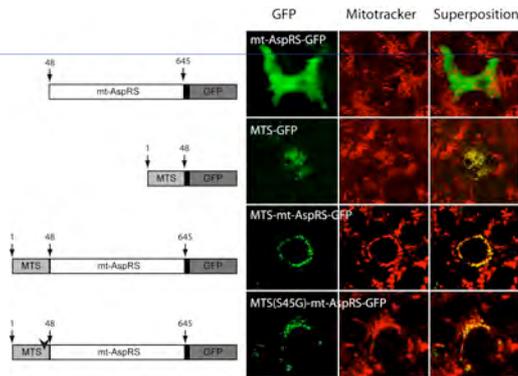


Figure 1. Subcellular localization of GFP-fused mt-AspRS derivatives within human HEK 293T cells. Schematic representations of the 4 GFP-fused constructions are given in the left-hand side of the figure. These include full-length (1-645 aa) or partial (1-48 or 48-645 aa) sequence of mt-AspRS. Position of the mutation Ser₄₅ to Gly₄₅ is highlighted with an arrowhead. The plasmids coding for these sequences have been transiently transfected into HEK 293T cells and the GFP-fluorescence has been visualized by confocal microscopy (right-hand side of the picture). Images are false-color maximum projections from a confocal microscope. The green channel (left) shows GFP fluorescence, the red channel (middle) the one from the mitochondrial marker (Mitotracker Red CM-H₂XRos); in right, the two channels are superimposed. To be noticed, integrity of nuclei after transient expression of MTS-mt-AspRS-GFP or MTS(S45G)-mt-AspRS-GFP in HEK 293T cells has been verified by staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). For both transfections, nuclei appear normal (not shown).

gc.scheper 2/7/08 10:44

Supprimé: The mt-AspRS derivative precursors (MTS-50aa-GFP, MTS(S45G)-50aa-GFP, MTS-1/2mtAspRS, MTS(S45G)-1/2mtAspRS) were synthesized i

gc.scheper 2/7/08 10:24

Supprimé:

gc.scheper 2/7/08 10:45

Supprimé: with

gc.scheper 2/7/08 10:24

Supprimé: -

gc.scheper 2/7/08 13:52

Supprimé: ;

gc.scheper 2/7/08 13:52

Supprimé: i

gc.scheper 2/7/08 13:52

Supprimé: w

gc.scheper 2/7/08 13:52

Supprimé: to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a

gc.scheper 2/7/08 13:53

Supprimé: the

As shown in figure 1, both proteins (MTS-mt-AspRS-GFP and MTS(S45G)-mt-AspRS-GFP) co-localized with the mitochondrial-specific marker Mitotracker Red CM-H₂XRos. This shows that, concerning the leading of the protein to the mitochondria, the mutated version of the MTS behaves in the same way than the wild-type one. Therefore, the mutation Ser₄₅ to Gly₄₅ does not interfere with the targeting of the protein to the organelle. As controls, a variant lacking the MTS was present throughout the cytosol and a variant displaying only the MTS co-localized with the mitochondrial specific marker (Fig. 1).

Import of proteins into human mitochondria and maturation

In vitro import experiments have been performed using two constructions. The first one, (313aa)mtAspRS, corresponds to the 313 first amino acids of human MTS-mt-AspRS and the second one, named S45G(313aa)mtAspRS corresponds to the same protein including the Ser₄₅ to Gly₄₅ mutation. As a control, the (81aa)mtGluRS-GFP construction (81 first amino acids of *A. thaliana* mt-GluRS upstream the sequence of GFP) has been used in parallel (8). The sizes of these constructions have been chosen in order to obtain a gap in molecular weight between pre-mature and mature proteins that is resolvable on a 12% PAGE. [³⁵S]-methionine-labeled proteins produced by *in vitro* transcription/translation assay (TNT@T7 coupled reticulocyte lysate system) have been incubated for 30 min with mitochondria purified from HEK 293T cells, a duration sufficient to cover the full process of import and maturation (12). These mitochondria were treated or not with proteinase K and/or valinomycin. Proteinase K has been used to digest any remaining proteins attached to the mt outer membrane, and the un-coupler valinomycin to inhibit mitochondrial protein import (13). After the experiment, mitochondria have been further isolated on

27% (w/v) sucrose cushion, mt lysates have been loaded on SDS-PAGE, and radio-labeled proteins have been visualized by autoradiography (Fig. 2).

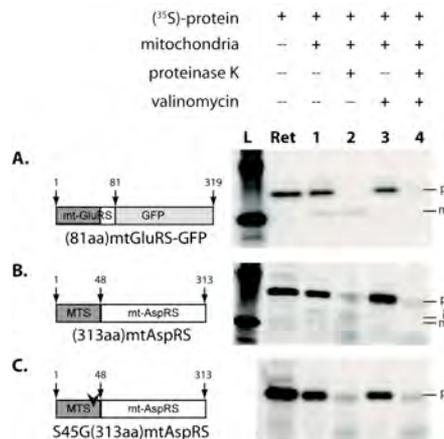


Figure 2. *In vitro* import experiments within mitochondria purified from human HEK 293T cells. Experiments have been performed with three constructions: **A.** As a control, the (81aa)mtGluRS-GFP construction (81 first amino acids of *A. thaliana* mt-GluRS upstream the sequence of GFP) (8). **B.** (313aa)mtAspRS corresponds to the 313 first amino acids of human MTS-mt-AspRS. **C.** S45G(313aa)mtAspRS corresponds to (313aa)mtAspRS including the Ser₄₅ to Gly₄₅ mutation. *In vitro* transcription/translation products (-p-, lane Ret) were incubated in the presence of mitochondria and were partially processed into smaller polypeptide(s) (-m- and -i-, lane 1), which correspond to the proteins upon cleavage of the targeting sequences. The addition of proteinase K to the import medium reduced the signals corresponding to the pre-proteins but did not affect the signals corresponding to the processed proteins that were protected by mitochondrial membranes (lane 2). The addition of valinomycin, which is known to inhibit mitochondrial protein import, prevented the formation of the processed proteins (lanes 3 and 4). In these conditions, all radioactive signals were digested by proteinase K (lane 4), showing that the signal observed in lane 2 represented genuine imported protein.

As it is shown in figure 2, the [³⁵S]-methionine-labeled precursor proteins (lane Ret), corresponding to the control (Fig. 2A) and to the wild-type (313aa)mtAspRS (Fig. 2B) have been imported into the mitochondria. Indeed, processed products of expected sizes (30.2

kDa and 30.5 kDa, respectively) are visible (lanes 1 and 2). Both are resistant to the treatment of the mitochondria with proteinase K (lanes 2), but sensitive to valinomycin (lanes 3 and 4). Although these patterns are consistent with a typical mitochondrial import reaction (13-15), two observations were made. Firstly, after import and maturation a proportion of pre-mature MTS-mt-AspRS still co-exists with the processed protein (Fig. 2B, lane 2). Since the control experiment (Fig. 2A, lane 2) has demonstrated that protein degradation by proteinase K was efficient, the visible/remaining pre-mature protein corresponds to either protein during its import process, or protein resulting from a slower maturation process. Secondly, two maturation products are observed for the wild-type mt-AspRS (labeled -m- and -i- in figure 2B, lanes 1 and 2). Such a pattern is a classical *in vitro* signature of the processing of mt-proteins localized within the inner membrane (16).

Influence of Ser₄₅ to Gly₄₅ mutation on import and maturation steps has been investigated using the S45G(313aa)mtAspRS construction. Figure 2C reveals that the mutated protein has also been imported into mitochondria (lanes 1 and 3). Strikingly, the amino acid change inhibits the maturation of the protein, as none of the two bands corresponding to the wild-type maturation products were visible (Fig. 2C, lanes 1 and 2).

Discussion

Mutation Ser₄₅ to Gly₄₅ impairs maturation of mt-AspRS inside mitochondria

MTS is well-known to fulfill three sequential functions that are first to address protein to mitochondria, then to conduct protein import *via* membrane translocators, and finally to be cleaved by peptidases inside mitochondrial matrix. Altogether, these steps lead to the release of mature and functional mt-proteins (reviewed in

e.g. (17-20). In addition, the amino acid sequence of the MTS contains information concerning sub-mitochondrial location (review in (21)). Therefore mutation in this peptide may affect any of the above-mentioned steps. Previously, it has been shown that Ser₄₅ to Gly₄₅ mutation within MTS from mt-AspRS is one of the mutations related to leukoencephalopathy (2). Here, we show that mutation does not affect the leading of the protein since GFP-fused mt-AspRS, with or without the Ser₄₅ to Gly₄₅ mutation, co-localize with mitochondria. Further, performing *in vitro* import assays, we have proven that import is also not affected, and most importantly, we have demonstrated that mutation impairs maturation once the protein is inside mitochondria.

Putative consequences of MTS-mt-AspRS maturation defect

Possible effect of maturation impairment is not likely to be on mitochondrial translation process. Indeed, mitochondrial complexes activities were found to be normal [in patient-derived fibroblasts or lymphoblasts](#) (2) suggesting that synthesis of sub-units of the respiratory chain complexes, reach the required minimum threshold. Noteworthy, [sequence analysis performed on LBSL patients](#) revealed that in addition to Ser₄₅ to Gly₄₅ missense mutation found in one allele encoding the mt-AspRS, the second allele displays a mutation involving a stretch of T and C residues just upstream the exon 3. This was predicted to partially affect the splicing of this exon, leading to the production of both unproductive and a proportion (apparently sufficient) of wild-type functional enzyme.

Deciphering the possible outcomes of the presence of non-maturated MTS-mt-AspRS inside mitochondria is important. In a healthy situation, processing of the protein occurs before- and is required for- its handling by chaperones that will assist its folding (7, 22). It is also needed for its sub-mitochondrial re-location. It has been

gc.scheper 2/7/08 11:55

Supprimé: y

gc.scheper 2/7/08 14:52

Supprimé: ing

gc.scheper 2/7/08 11:57

Supprimé: a few amount of the

shown that a non-maturated protein is thermally less stable in mt-matrix and degraded faster than the wild-type protein (23). Hence, a first hypothesis as to the consequence of mutation Ser₄₅ to Gly₄₅ would be that non-maturated MTS-mt-AspRS could be unfolded as well, unstable, and degraded.

Alternatively, the maintenance of MTS could lead to peculiar properties of the protein. Indeed, this peptide displays additional positive charges and likely folds into an amphiphilic α -helix. Therefore, mt-AspRS still containing a MTS may exhibit/lose possible partnership(s) or possible alternative function(s) that are so far unknown. Interestingly, aaRSs (of cytosolic location) were shown to have functions other than their classical ability to aminoacylate tRNAs (24, 25). Supporting this view, a derivative of mt-AspRS, product of an alternatively spliced mRNA has been recently identified (Messmer *et al.*, to be published elsewhere).

Finally, defect of maturation may modify sub-mitochondrial localization of mt-AspRS. Indeed, data presented here show that the wild-type MTS-mt-AspRS is targeted to-, imported into- and processed inside- mitochondria. Interestingly, in addition to the expected maturated mt-AspRS, the *in vitro* maturation process revealed an intermediate form of mt-AspRS. This pattern is a classical *in vitro* signature of inner membrane mt-proteins processing (15, 16), in response to a so-called « R-10 motif » (xR₋₁₀x₋₉↓(F/L/I)₈xx(S/T/G)xxxx₋₁↓x₊₁, reviewed in (7). This motif is characterized by the presence of a bulky hydrophobic residue and an arginine at position -8 and -10 respectively, and allows mt-precursor proteins to be processed in two sequential steps (26, 27). The first cleavage between aa₋₉ and aa₈ by the mitochondrial processing peptidase (MPP) unveil a signal for inner membrane location. Once at the right place, the protein is subsequently cleaved between aa₋₁ and aa₊₁ by the mitochondrial

intermediate peptidase (MIP). A corresponding sequence (YRS₃₂-L₃₃LQSSQRR₄₀-I₄₁) is found within MTS of mt-AspRS suggesting maturation sites by MPP after residue Ser₃₂ and by MIP after residue Arg₄₀. Our experimental results have shown the presence of both the intermediate and the maturated mt-AspRS within mitochondria. Thus mt-AspRS is located along the mt inner membrane. This supports the hypothesis that mt-translation would occur on (or close to) mt-inner membrane, a place where other translation actors have already been observed (mammalian mt-elongation factor EF-Tu (28) and mt-ribosome (29)). Mutation Ser₄₅ to Gly₄₅ affects a residue located very close to the above-mentioned signature sequence and cleavage sites, which may hamper the recognition by one of the peptidases and prevent re-location towards the inner membrane.

Outlook

Mt-targeting, import, processing as well as folding and trans-locating of mt-proteins depend on information encoded within the imported protein. Investigation of the pathology-related mutation Ser₄₅ to Gly₄₅ in mt-AspRS brought us two major outcomes. We show for the first time that a human mt-aaRS possesses the signature motif to become addressed to the inner membrane. It will now be interesting to further explore localization of the other mt-aaRSs in order to draw an updated view on mt translation machinery. In regard of understanding the pathology, it could be suspected that different inaccuracies in MTS functions ultimately result in a disease state in humans. Although, many examples of abnormal mt-targeting and mt-protein import correlated with human disease have been described (30-33), the processing deficiency of a mt-protein has been only assumed once to be involved in a systemic mitochondrial encephalomyopathy (34). Therefore, our study is providing strong evidences that the non-processing of a human mt-protein may

gc.scheper 2/7/08 11:26
Supprimé: All together, co-localization of GFP-fused MTS-mtAspRS with mitochondria and *in vitro* maturation process of wild-type (wt) MTS-mtAspRS, demonstrate that

gc.scheper 2/7/08 11:26
Supprimé: this protein

gc.scheper 2/7/08 11:25
Supprimé: leaded

gc.scheper 2/7/08 11:26
Supprimé: mitochondria

gc.scheper 2/7/08 12:22
Supprimé: -

gc.scheper 2/7/08 11:29
Supprimé: by,

be as well an origin to mitochondrial human diseases

Acknowledgments

Nizar Saad is acknowledged for the preparation of the vector expressing MTS-GFP, and Jérôme Mutterer for confocal microscopy imaging (Microscopy and Imaging Platform, IBMP, Strasbourg). We are grateful to Jean-Christophe Paillart, Nina Entelis and Ivan Tarassov for gifts of material and advices for cell culture. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Louis Pasteur Strasbourg (ULP), Association Française contre les Myopathies (AFM), the Prinses Beatrix Fonds and the Optimix Foundation for Scientific Research. M.M. was supported by a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

1. van der Knaap MS, van der Voorn P, Barkhof F, Van Coster R, Krägeloh-Mann I, Feigenbaum A, Blaser S, Vles JS, Rieckmann P, Pouwels PJ (2003) A new leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and high lactate. *Ann. Neurol.* 53:252-258.
2. Scheper GC, van der Kloot T, van Andel RJ, van Berkel CG, Sissler M, Smet J, Muravina TI, Serkov SV, Uziel G, Bugiani M, Schiffmann R, Krägeloh-Mann I, Smeitink JA, Florentz C, Coster RV, Pronk JC, van der Knaap MS (2007) Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* 39:534-539.
3. Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A, Lee-Lin SQ, Jordanova A, Kremensky I, Christodoulou K, Middleton LT, Sivakumar K, Ionasescu V, Funalot B, Vance JM, Goldfarb LG, Fischbeck KH, Green ED (2003) Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am. J. Hum. Genet.* 72:1293-1299.
4. Xie W, Nangle LA, Zhang W, Schimmel P, Yang XL (2007) Long-range structural effects of a Charcot-Marie-Tooth disease-causing mutation in human glycyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:9976-9981.
5. Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O, Gomori JM, Tarassov I, Einbinder T, Saada A, Elpeleg O (2007) Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 81:857-862.
6. Bonnefond L, Fender A, Rudinger-Thirion J, Giegé R, Florentz C, Sissler M (2005) Towards the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry* 44:4805-4816.
7. Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592:63-77.
8. Pujol C, Maréchal-Drouard L, Duchêne AM (2007) How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J. Mol. Biol.* 369:356-367.
9. Peeters NM, Chapron A, Giritch A, Grandjean O, Lancelin D, Lhomme T, Vivrel A, Small I (2000) Duplication and quadruplication of Arabidopsis thaliana cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J. Mol. Evol.* 50:413-423.
10. Mollier P, Hoffmann B, Debast C, Small I (2002) The gene encoding Arabidopsis thaliana mitochondrial ribosomal protein S13 is a recent duplication of the gene encoding plastid S13. *Curr. Genet.* 40:405-409.
11. Fernandez-Silva P, Martinez-Azorin F, Micol V, Attardi G (1997) The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *EMBO J.* 16:1066-1079.
12. Hammen PK, Waltner M, Hahnemann B, Heard TS, Weiner H (1996) The role of positive charges and structural segments in the presequence of rat liver aldehyde dehydrogenase in import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271:21041-21048.
13. Duchêne AM, Giritch A, Hoffmann B, Cognat V, Lancelin D, Peeters NM, Zaepfel

- M, Marechal-Drouard L, Small ID (2005) Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:16484-16489.
14. Hartl FU, Schmidt B, Wachter E, Weiss H, Neupert W (1986) Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell* 47:939-951.
 15. van Loon AP, Schatz G (1987) Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'sorting' domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. *EMBO J.* 6:2441-2448.
 16. Nett J, Trumppower B (1996) Dissociation of import of the Rieske iron-sulfur protein into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria from proteolytic processing of the presequence. *J Biol Chem.* 271:26713-26716.
 17. Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279:14473-14476.
 18. Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76:723-749.
 19. Baker MJ, Frazier AE, Gulbis JM, Ryan MT (2007) Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol.* 17:456-464.
 20. Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep.* 9:42-49.
 21. Gavel Y, von Heijne G (1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng.* 4:33-37.
 22. Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366.
 23. Mukhopadhyay A, Yang CS, Wei B, Weiner H (2007) Precursor protein is readily degraded in mitochondrial matrix space if the leader is not processed by mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 282:37266-37275.
 24. Park SG, Ewalt KL, Kim S (2005) Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends Biochem. Sci.* 30:569-574.
 25. Park SG, Schimmel P, Kim S (2008) Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:11043-11049.
 26. Kalousek F, Hendrick J, Rosenberg L (1988) Two mitochondrial matrix proteases act sequentially in the processing of mammalian matrix enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:7536-7540.
 27. Nett J, Schagger H, Trumppower B (1998) Processing of the presequence of the *Schizosaccharomyces pombe* Rieske iron-sulfur protein occurs in a single step and can be converted to two-step processing by mutation of a single proline to serine in the presequence. *J Biol Chem.* 273:8652-8658.
 28. Suzuki H, Ueda T, Taguchi H, Takeuchi N (2007) Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu. *J. Biol. Chem.* 282:4076-4084.
 29. Liu M, Spremulli LL (2000) Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J. Biol. Chem.* 275:29400-29406.
 30. Danpure CJ, Cooper PJ, Wise PJ, Jennings PR (1989) An enzyme trafficking defect in two patients with primary hyperoxaluria type 1: peroxisomal alanine/glyoxylate aminotransferase rerouted to mitochondria. *J. Cell. Biol.* 108:1345-1352.
 31. Davey KM, Parboosingh JS, McLeod DR, Chan A, Casey R, Ferreira P, Snyder FF, Bridge PJ, Bernier FP (2006) Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition. *J. Med. Genet.* 43:385-393.
 32. Takakubo F, Cartwright P, Hoogenraad N, Thorburn DR, Collins F, Lithgow T, Dahl HH (1995) An amino acid substitution in the pyruvate dehydrogenase E1 alpha gene, affecting mitochondrial import of the precursor protein. *Am. J. Hum. Genet.* 57:772-780.
 33. MacKenzie JA, Payne RM (2007) Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1772:509-523.
 34. Huckriede A, Agsteribbe E (1994) Decreased synthesis and inefficient mitochondrial import of hsp60 in a patient with a mitochondrial encephalomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1227:200-206.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ma thèse a été de contribuer à la compréhension structurale et fonctionnelle des systèmes d'aminoacylation mt humains. Ceux-ci mettent en jeu le couple ARN de transfert/aminoacyl-ARNt synthétase. Les ARNt et les aaRS ont fait l'objet de très nombreuses études au cours des dernières décennies, de sorte qu'à ce jour de multiples données concernant les relations structure/fonction de ces macromolécules dans les trois règnes du vivant sont disponibles. Cependant, les systèmes d'aminoacylation mitochondriaux de mammifères restent très peu connus, ce qui est un handicap majeur tant d'un point de vue de la connaissance fondamentale et de l'évolution des machineries traductionnelles que de la compréhension de très nombreuses pathologies. Par ailleurs, la mitochondrie est au cœur de questions de plus en plus nombreuses concernant par exemple l'apoptose, le vieillissement, le cancer ou encore les maladies neurodégénératives comme Alzheimer. Ce n'est qu'au vu d'un nombre toujours grandissant de pathologies liées à des mutations dans les gènes d'ARNt mitochondriaux (mt), et plus récemment dans des protéines de la machinerie traductionnelle mitochondriale, que ces systèmes ont été considérés avec une attention grandissante. L'équipe de C. Florentz a initié un programme de caractérisation des relations structure/fonction des systèmes d'aminoacylation mitochondriaux humains et d'étude d'impact moléculaires des mutations liées à des pathologies. Dans ce qui suit, nous allons tout d'abord présenter les diverses conclusions concernant l'ensemble des travaux réalisés, puis discuter les perspectives qui en découlent. Les conclusions présentées concernent, d'une part, les propriétés structurales de l'ARNt^{Asp} mt humain et fonctionnelles (enzymologiques) de l'AspRS mt humaine, dans le cadre stricte de leurs activités au sein de la machinerie de traduction mitochondriale et d'autre part, des propriétés tout à fait nouvelles attribuées à ces deux molécules.

A. Conclusions

1. L'ARNt^{Asp} et l'AspRS au sein de la traduction mitochondriale

1.1. Structure de l'ARNt^{Asp} mitochondrial humain

Nous avons entrepris d'enrichir les données structurales, encore peu nombreuses, des ARNt mt humains afin de comprendre les principes de leur repliement tridimensionnel et de connaître les interactions qui les soutiennent. Nous avons choisi de répondre à ces interrogations par sondage enzymatique (sondes S1 et V1) et chimique (DMS et DEPC) en

solution de l'ARNt^{Asp} mt humain, pris comme ARNt mt humain modèle. Nous avons mené ces expériences sur l'ARNt^{Asp} natif extrait de cellules HeLa grâce à l'utilisation d'un oligonucléotide antisens et biotinylé. Nous avons également entrepris le sondage en solution sur le même ARNt mais produit par transcription *in vitro* et donc dépourvu de modifications post-transcriptionnelles. En effet, les transcrits d'accès relativement simple permettent également l'étude de variants à volonté. Il est donc important de savoir dans quelle mesure un ARNt transcrit *in vitro* est équivalent à un ARNt natif.

Les expériences menées sur l'ARNt^{Asp} natif ont montré que cet ARNt adopte un repliement secondaire en feuille de trèfle et que son repliement tridimensionnel en « L » est soutenu par 6 des 9 interactions tertiaires classiques. Il s'agit des interactions U8-A14-A21, A9-[A12-U23], [G10-U25]-A45, [A13-U22]-A46, et A26-A44 situées au cœur de la molécule. La boucle T présente aussi l'interaction C54-A58. Par contre, les boucles D et T ont présenté une grande accessibilité à la fois à la sonde enzymatique S1 (spécifique des zones simple brin) et à la sonde chimique DEPC (permettant de révéler les N7 des adénines). L'ensemble de ces réactivités montrent que, à l'opposé des ARNt classiques, les boucles D et T de l'ARNt^{Asp} mt humain n'interagissent pas l'une avec l'autre. Les informations structurales acquises lors de l'étude de la molécule transcrite *in vitro* rejoignent celles mentionnées au sujet de l'ARNt natif mais sont complétées par l'observation que le transcrit *in vitro* présente, en plus de la structure en feuille de trèfle, des repliements alternatifs notamment en tige boucle. Ces nouveaux exemples de structures alternatives d'ARNt mt transcrits *in vitro* confirment l'importance fondamentale des bases modifiées dans le repliement des ARNt mt humains et/ou suggèrent l'existence de fonctions alternatives pour les ARNt mt structurés en épingle à cheveux.

Afin de mieux cerner le réseau d'interaction tertiaire de l'ARNt^{Asp}, nous avons également tiré profit de l'existence d'une mutation corrélée à une pathologie au sein de cet ARNt. Cette mutation (A7526 G) est à l'origine d'une myopathie mitochondriale et touche le résidu 9. Ce résidu se trouve dans le connecteur entre le bras accepteur et le bras D. Nous avons abordé son implication (en partenariat avec la paire de bases 12-23) dans le réseau d'interaction tertiaire potentiel par le sondage en solution de différents ARNt^{Asp} mt humain sauvage et mutants transcrits *in vitro* combiné à une analyse fonctionnelle de ces mêmes molécules, en parallèle de l'étude structurale globale de cet ARNt (discutée plus haut). Nous avons montré que la mutation du résidu 9 provoque une modification subtile de la structure tridimensionnelle de l'ARNt (rapprochement des boucles D et T et relâchement du bras

anticodon) qui par ricochet affecte l'efficacité catalytique de la réaction d'aspartylation. L'analyse de ce mutant pathologique a confirmé l'existence de l'interaction triple A9-[A12-U23] dans le réseau d'interactions tertiaires de l'ARNt^{Asp} mt humain. La compilation de l'ensemble des séquences des ARNt^{Asp} mt de mammifères disponibles dans la banque d'ARNt mt mamit (<http://mamit-trna.u-strasbg.fr/>) a généralisé la présence de cette interaction au sein de l'ensemble des ARNt^{Asp} mt de mammifères.

L'ensemble de ces données structurales a donné lieu à la construction d'un modèle de la structure tridimensionnelle de l'ARNt^{Asp} mt humain (C. Sauter). Ce modèle a été construit à partir de la structure cristallographique de l'ARNt^{Asp} d'*E. coli* en prenant en compte les réactivités de l'ARNt mt humain aux sondes chimiques et enzymatiques et montre clairement que (i) l'ARNt^{Asp} mt humain adopte un repliement tridimensionnel en L, (ii) les boucles D et T n'interagissent pas l'une avec l'autre et (iii) son réseau d'interaction tertiaire est composé des interaction triples U8-A14-A21, A9-[A12-U23], [G10-U25]-A45, [A13-U22]-A46, A26-A44 et C54-A58.

1.2. L'AspRS mitochondriale humaine est très sensible à des inhibiteurs, analogues de substrats

L'équipe de Jacques Lapointe (Université de Laval, Québec) a montré que des analogues de l'adénylate Asp-AMP (aspartol-AMP et Asp-AMS) sont des inhibiteurs compétitifs d'AspRS bactériennes (*E. coli* et *P. aeruginosa*). Étant donné que les sites actifs des AspRS eubactériennes et eucaryotes sont différents, nous avons pensé que ces enzymes pourraient être des cibles d'agents antibiotiques et nous avons vérifié l'impact de ces analogues sur l'AspRS mitochondriale humaine. Ceci a été réalisé en mesurant les constantes d'inhibition K_i des deux analogues pour la réaction d'aspartylation. Pour comparaison, les analogues ont également été testés sur l'AspRS cytosolique humaine. Cette analyse enzymologique est en défaveur de l'utilisation des molécules aspartol-AMP et l'Asp-AMS comme antibiotiques puisqu'il s'est avéré que ces deux analogues de l'Asp-AMP inhibent plus fortement l'AspRS mt humaine que les enzymes eubactériennes (même inhibition en présence de l'Asp-AMS, inhibition 10 fois plus importante avec l'aspartol-AMP). Ainsi, dans l'hypothèse que ces analogues seraient aptes à traverser la membrane mt, des effets secondaires non négligeables pourraient survenir.

L'approche enzymologique a également révélé une différence de réactivité vis-à-vis du substrat naturel (aspartate) entre l'enzyme mt humaine (K_M de 1,5 μM) et celle d'*E. coli* (K_M de 90 μM). Celle-ci était tout à fait inattendue compte tenu de la forte conservation des résidus au sein du site actif entre ces deux enzymes. Le « docking » de l'adénylate au sein des sites catalytiques des enzymes mt humaine et d'*E. coli* n'a montré aucune différence concernant les résidus des enzymes contactant les substrats et n'a pas expliqué la différence de réactivité entre ces deux AspRS envers ces molécules. Cependant, lors de ce « docking », les structures des AspRS ont été maintenues figées alors que les petits substrats sont libres de mouvement et se positionnent de manière optimale au sein des sites actifs. Ainsi, cette différence pourrait très certainement provenir de la dynamique de la réaction non observable par cette étude. Nous avons alors comparé l'ensemble des acides aminés des AspRS mt humaine et d'*E. coli* qui sont impliqués directement ou indirectement dans la reconnaissance de certains de ses substrats (ATP et acide aspartique) et dans la formation de l'adénylate. Cette analyse a montré que tous les résidus sont identiques à l'exception de l'acide aminé Gly 221 (Glu 171 chez *E. coli*). Ce résidu est impliqué dans la fermeture du site actif une fois l'acide aminé présent au sein de ce dernier et est ainsi engagé dans la dynamique de la réaction. Cette unique différence pourrait ainsi expliquer en partie le changement de réactivité de ces deux AspRS envers les mêmes substrats.

Dans un tout autre cadre, la découverte du fort pouvoir d'inhibition de l'Asp-AMS envers l'AspRS mt humaine a été mise à profit afin de pallier les problèmes de solubilité de l'enzyme rencontrés à l'issue de sa purification. En présence d'un excès de 200 fois d'Asp-AMS (molarité), il est possible d'atteindre une concentration de 7 mg/ml pour l'AspRS mt et de passer d'une population d'enzyme polydisperse à une population monodisperse. Ceci est très prometteur en vue de la cristallisation de la protéine.

2. Originalités structurales et fonctionnelles

2.1. Implication des ARNt mitochondriaux humains dans une nouvelle fonction ?

L'analyse structurale de l'ARNt^{Asp} mt humain transcrit *in vitro* a révélé qu'en plus de posséder une structure secondaire en feuille de trèfle, cet ARNt pouvait également adopter un repliement en tige boucle. Cette structure alternative, observée également pour d'autres ARNt mt humains transcrits *in vitro*, a pour le moment été attribuée à l'absence de bases modifiées

qui assistent l'établissement de la feuille de trèfle ou stabilisent leur structure tridimensionnelle et révélait un artefact structural apporté par les molécules synthétisées *in vitro*. Aucune hypothèse attribuant une fonction distincte à l'aminacylation, n'avait jamais été proposée pour ces structures alternatives. Cependant, Maniataki et Mourelatos ont montré qu'une protéine (Argonaute 2) impliquée dans le mécanisme de régulation de l'expression des gènes par ARN interférence interagit avec l'ARNt^{Met} mt humain (Maniataki & Mourelatos, 2005). La structure en épingle à cheveux des ARNt mt humains rappelle celles des ARN précurseurs des miARN ce qui nous a amené à poser l'éventualité d'un lien nouveau entre les ARNt mitochondriaux et l'ARN interférence. Cette possibilité a été explorée en soumettant l'ARNt^{Asp} ainsi que l'ARNt^{Lys} mt humains transcrits *in vitro* (l'ARNt^{Lys} adopte également une structure en tige boucle) à la protéine Dicer humaine. Nous avons analysé les tailles des produits de digestion obtenus et les avons comparés à celle du produit de digestion de l'ARN Let-7, substrat connu de Dicer et digéré en un fragment de 22 nt. Cependant, nous avons dû faire face à une limitation des ARNt mt humains transcrits *in vitro* qui présentent une très grande fragilité et des dégradations spontanées au niveau des dinucléotides CpA et UpA. Parmi les 4 et 7 produits issus de dégradations spontanées de l'ARNt^{Asp} de l'ARNt^{Lys}, un fragment de 22 nucléotides (ARNt^{Asp}) et un de 23 nucléotides (ARNt^{Lys}) sont générés. Néanmoins, la présence de ces deux fragments, en absence ou en présence de Dicer, ne nous a pas permis de distinguer un produit de coupure spécifique par Dicer de l'ARNt^{Asp} et/ou de l'ARNt^{Lys} mt humains d'un produit de dégradation.

2.2. L'AspRS mitochondriale humaine a-t-elle des partenaires protéiques ?

L'étude fonctionnelle de l'AspRS mt humaine a révélé que son efficacité d'aminacylation (k_{cat}/K_M) est réduite par rapport à son homologue bactérienne. Ceci a également été observé pour les autres aaRS mt humaines jusqu'à présent étudiées. Son activité enzymatique (nombre de molécules de substrat transformées/min/mg d'enzyme) est 40 fois inférieure à celle de l'AspRS d'*E.coli* {Bonfond, 2005 #7116}. Une question fondamentale se pose alors. Ces activités réduites reflètent-elles le manque d'un ou de plusieurs co-facteur(s) ou protéine(s) partenaire(s) jusqu'à présent inconnus ? Un second argument en faveur d'un partenariat provient de la mise en évidence de l'implication de l'AspRS mt humaine dans une leucoencéphalopathie. En effet, malgré la présence de l'AspRS mutée dont l'activité catalytique est diminuée, mais surtout dont le repliement et la localisation sub-mitochondriale sont probablement affectés, les activités des complexes de la

chaîne respiratoire restent inchangées. Ceci montre que la traduction mitochondriale, et par conséquent l'activité de l'AspRS, ne sont pas suffisamment affectées pour perturber la synthèse des 13 protéines mt, sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Une autre fonction/partenariat de l'AspRS est donc à considérer pour expliquer l'impact moléculaire initial de la pathologie.

Nous avons abordé cette question en cherchant si l'AspRS mt humaine possède d'autres partenaires par des expériences de co-immunoprécipitation. Les quantités adéquates et les ratios protéines G (à la fois pour les étapes de lavage et de purification du complexe immun) et de sérum ont été déterminés en utilisant l'AspRS mt humaine recombinante purifiée, sur-exprimée dans *E. coli*. Ces conditions ont ensuite été appliquées sur les extraits bruts de cellules HeLa. Tout au long des expériences, nous avons entrepris une optimisation systématique de la plupart des étapes du protocole afin de rendre les immunoprécipitations les plus spécifiques possible à l'AspRS mt humaine. Les mises au point expérimentales ont concerné : (i) les conditions de tampons, temps d'incubation, et inhibiteurs de protéases, (ii) la liaison covalente des IgG à des protéines G couplées à des billes d'agarose afin de se libérer des signaux apportés par le sérum à l'issue de l'immunoprécipitation et (iii) l'amélioration de la résolution de la séparation des protéines formant l'immunoprécipité sur gel bi-dimensionnel.

Les conditions expérimentales finales retenues pour les tests d'immunoprécipitation de l'AspRS mt humaine et la détection de partenaires protéiques ont révélé la présence de trois spots. La distance de migration des protéines correspondantes s'apparente à un poids moléculaire avoisinant 70 kDa (le poids moléculaire théorique de l'AspRS mt humaine est de 69,6 kDa). Le pHi avoisine également celui attendu pour l'AspRS mt, à savoir 7,6. Ces spots sont en cours d'analyse par spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

2.3. Nouvelle(s) localisation(s) sub-cellulaire(s) de l'AspRS mt humaine

2.3.1. Localisation à proximité de la membrane interne

L'analyse du signal d'adressage mitochondrial théorique (MTS, correspondant aux 47 premiers acides aminés) de l'AspRS mt humaine a permis de vérifier son rôle dans le transport de l'enzyme du cytosol vers la mitochondrie et de vérifier le site de clivage de ce signal après import dans l'organelle.

Dans un premier temps, nous avons montré que ce signal est nécessaire et suffisant pour conduire l'AspRS aux mitochondries par transfection de cellules humaines HEK 293T avec différentes constructions fusionnées à la GFP puis visualisation de la fluorescence par microscopie confocale. Puis, dans un deuxième temps, nous avons vérifié son rôle dans l'import et la maturation de l'enzyme par une approche d'import *in vitro* dans des mitochondries purifiées dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. L. Maréchal-Drouard (IBMP, Strasbourg). Cette deuxième étude a confirmé que la partie N-terminale de l'AspRS correspond à une séquence d'adressage mt et qu'elle permet l'import et la maturation de la protéine.

L'ensemble de ces analyses a également apporté des indices permettant, d'une part, de nous rapprocher de l'hypothèse d'une traduction mitochondriale de mammifère localisée au niveau des membranes internes (hypothèse émise lors de la découverte de la localisation des ribosomes et du facteur d'élongation EF-Tu mitochondriaux de mammifères au niveau de ce sous-compartiment par Liu et al., 2000 et Suzuki et al., 2007), et d'autre part, d'affiner la détermination du site du clivage du MTS. En effet, l'analyse de la séquence peptidique du MTS de l'AspRS mt humaine a montré, au sein du MTS, la présence de la séquence $Y_{30}RS_{32}\downarrow L_{33}LQSSQRR_{40}\downarrow I_{41}$ qui correspond au motif R-10 ($xRx_{-9}\downarrow(F/L/I)_{-8}xx(S/T/G)xxxx_{-1}\downarrow x_{+1}$). Ce motif (clivé en deux étapes par deux peptidases différentes) est retrouvé dans le MTS des protéines localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Après import *in vitro*, deux produits de maturation de l'AspRS mt sont observés : l'un correspond à la protéine mature (issue des deux coupures) et l'autre à un produit intermédiaire (issu de la première coupure). La présence du motif R-10 a aussi été retrouvée au sein des MTS théoriques de 10 autres aaRS mt humaines. Il s'agit de l'IleRS, la LeuRS, la TrpRS, la TyrRS, l'AlaRS, la GlyRS, la MetRS, la ProRS, l'AsnRS et la LysRS. Grâce à la présence de ce motif, onze aaRS mt humaines pourraient ainsi être relocalisées au sein de la membrane interne. La découverte de ce motif suppose également que le MTS de l'AspRS mt humaine ne correspond pas aux 47 premiers acides aminés mais se limite à ses 40 premiers résidus.

2.3.2. Localisation nucléaire des aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales humaines ?

Au cours d'expériences de transfection de cellules humaines avec une construction fusionnant le gène d'un variant de l'AspRS (AspRS mt humaine délétée de l'exon 13) précédé du signal d'adressage mitochondrial de l'AspRS mt humaine à la GFP, un résultat tout à fait inattendu a été obtenu. L'observation par microscopie confocale de ces cellules a montré, pour certaines d'entre elles, qu'une localisation nucléaire de l'AspRS venait s'ajouter à sa localisation mitochondriale. Cette observation a été complétée par une analyse de la séquence peptidique de l'AspRS mt humaine. Nous avons recherché la présence de signaux de localisation nucléaire et/ou de trafic noyau/cytosol dans la séquence de l'AspRS mt native. Ceci a été réalisé en utilisant le programme de prédiction PSORT II, (<http://wolfsort.org>). L'AspRS mt contient les résidus **P**₅₁₉**KKARSQ**₅₂₅ qui comprennent une séquence consensus d'import nucléaire (de type Pat7, ce motif commence par un résidu proline (en gras), et doit contenir trois résidus basiques (Lysine ou Arginine, en gras) sur les quatre qui suivent). Un signal d'export nucléaire a également été recherché, et les résidus **L**₄₇₉**WVDFPLFL**₄₈₈, codés par l'exon 14, comprennent une séquence consensus d'export nucléaire de type « leucine-rich ». Celle-ci est définie par un peptide de type Φ -X₍₂₋₃₎- Φ -X₍₂₋₃₎- Φ -X- Φ (où Φ correspond à un résidu hydrophobe, le plus fréquemment un résidu leucine et X correspond à n'importe quel acide aminé). Cependant, bien qu'une localisation nucléaire (impliquant une fonction distincte à l'aminocyclation au sein de la traduction mitochondriale) pour l'AspRS mt soit intéressante, cette observation ne demeure que préliminaire.

3. Découverte et caractérisation d'un premier produit d'épissage alternatif d'une aaRS mitochondriale humaine

Au cours du clonage de l'AspRS, les PCR réalisées sur une banque d'ADNc ont révélé la présence d'un produit supplémentaire et de taille inférieure à celle correspondant à l'amplification des régions codantes de l'AspRS mt humaine. Après séquençage il est apparu que la partie manquante correspond très précisément à la séquence de l'exon13 (travail réalisé par Aurélie Fender, thèse soutenue en 2005). Le peptide codé par l'exon 13 est localisé au sein du domaine d'insertion eubactérien de l'enzyme, distinct du domaine catalytique.

L'objectif, alors, a été de vérifier la réalité biologique de ce produit d'épissage et de cerner son rôle.

Nous avons démontré l'existence à la fois d'un ARNm épissé, présent dans les ARN totaux de tous les tissus humains étudiés, et de la protéine correspondante (AspRS- Δ Exon13) par des expériences de western-blot réalisées sur des mitochondries purifiées à partir de biopsies de muscle squelettique humain (don d'Anne Lombès, Institut de myologie, Paris). Diverses stratégies de clonage ont été entreprises afin de surproduire la protéine et d'en déterminer, *in vitro*, la/les fonction(s) de ce variant. Celles-ci concernent : (i) l'utilisation de différentes souches d'*E. coli* (Top 10, M15, B121(DE3)RIL et Rosetta 2), (ii) l'assistance de protéines chaperonnes grâce à l'utilisation des souches PGK JE7, PGK JE8 et Arctic, (iii) l'adressage de la protéine au périplasma, grâce à deux types de signaux fusionnés en N-ter de la protéine (« peri » et « OmpA ») afin d'augmenter la solubilité de la protéine et (iv) différentes conditions de culture et de solubilisation (temps, température, pH, DTT, Triton X100...). Malheureusement cette protéine reste pour le moment insoluble rendant l'étude de sa/ses fonction(s) difficile(s).

D'autres aaRS mt humaines sont concernées par un ou plusieurs phénomènes d'épissage alternatif. Il s'agit de la LysRS (épissage des exons 4 et 5, situés dans le domaine de liaison à l'anticodon), de la ThrRS (épissage de l'exon 8 ou des exon 8 et 9, situé à la jonction entre le domaine catalytique et le domaine d'édition) et de la GluRS (épissage de l'exon 9). La découverte de ces produits d'épissages alternatifs d'aaRS mt humaines suggère que ces enzymes, pourraient posséder en plus de leur activité d'aminocyclation, d'autres fonctions qui restent maintenant à découvrir.

4. Les fonctions alternatives de l'ARNt^{Asp} et de l'AspRS : le chaînon manquant à la compréhension des pathologies mitochondriales ?

Pour la majorité des pathologies liées aux ARNt et des aaRS mt humains, la raison moléculaire primaire est connue (mutation au sein de leurs gènes) mais le lien avec la pathologie n'est pas compris. En effet, même si la fonction d'aminocyclation est affectée dans certains des cas étudiés, d'autres étapes comme par exemple la vie de l'ARNt peuvent être affectées également. Cependant, aucune corrélation directe ne peut être décrite dans la plupart des cas entre ce/ces défaut(s) et les phénotypes. L'étude de la mutation S45G, intervenant au sein du MTS théorique de l'AspRS humaine et à l'origine d'une leucoencéphalopathie, que nous avons réalisé rappelle encore ce phénomène.

Nous avons montré, par la technique d'import *in vitro*, que lorsque l'AspRS mt humaine possède cette mutation (portée par un seul allèle), la protéine est acheminée vers les mitochondries, est importée mais n'est pas maturée. La conséquence de la non maturation d'une protéine mt est double : elle n'est probablement pas repliée en protéine active et n'est certainement pas acheminée vers le bon compartiment sub-mitochondrial (membrane interne). C'est pourquoi, nous avons avancé l'hypothèse que, suite à cette mutation, l'AspRS est soit non fonctionnelle soit dégradée. Cependant, il a été supposé précédemment par Scheper et coll. que l'expression du second allèle sain compense l'AspRS mutée puisque l'impact de la mutation ne touche pas la traduction mitochondriale et que ce n'est donc pas la fonction d'aminocyclation de l'AspRS qui est affectée (Scheper et al., 2007). C'est pourquoi la raison de la pathologie se trouve très certainement ailleurs et pour l'instant demeure ignorée. Il est par conséquent justifié de proposer que l'AspRS mt humaine possède une fonction alternative qui pour le moment demeure inconnue.

Il est très certain que toutes les nouvelles découvertes concernant la localisation sub-cellulaire, les nouveaux partenariats, les fonctions alternatives... vont aider à mieux comprendre et à établir des corrélations entre le génotype et le phénotype des pathologies mt humaines liées aux mutations intervenant au sein des gènes des ARNt et des aaRS. Par exemple, si l'implication de l'ARNt^{Asp} mt humain dans la régulation de l'expression des gènes en tant que miARN dont nous avons discuté plus haut se révélait exacte, il faudrait bien entendu vérifier l'impact des mutations pathologiques sur cette nouvelle fonction.

B. Perspectives

Les perspectives qui découlent de l'ensemble de ces conclusions sont nombreuses. Elles se placent au sein de trois grands domaines qui sont la connaissance fondamentale de la machinerie de traduction mitochondriale humaine (et par extension des mammifères), l'exploitation des fonctions alternatives des ARNt et aaRS mt humains et la compréhension moléculaire des pathologies liées à des mutations ciblant ces acteurs de la traduction mitochondriale. Certains développements se placeront implicitement à l'interface de deux, voire même de l'ensemble des trois domaines (Figure 39).

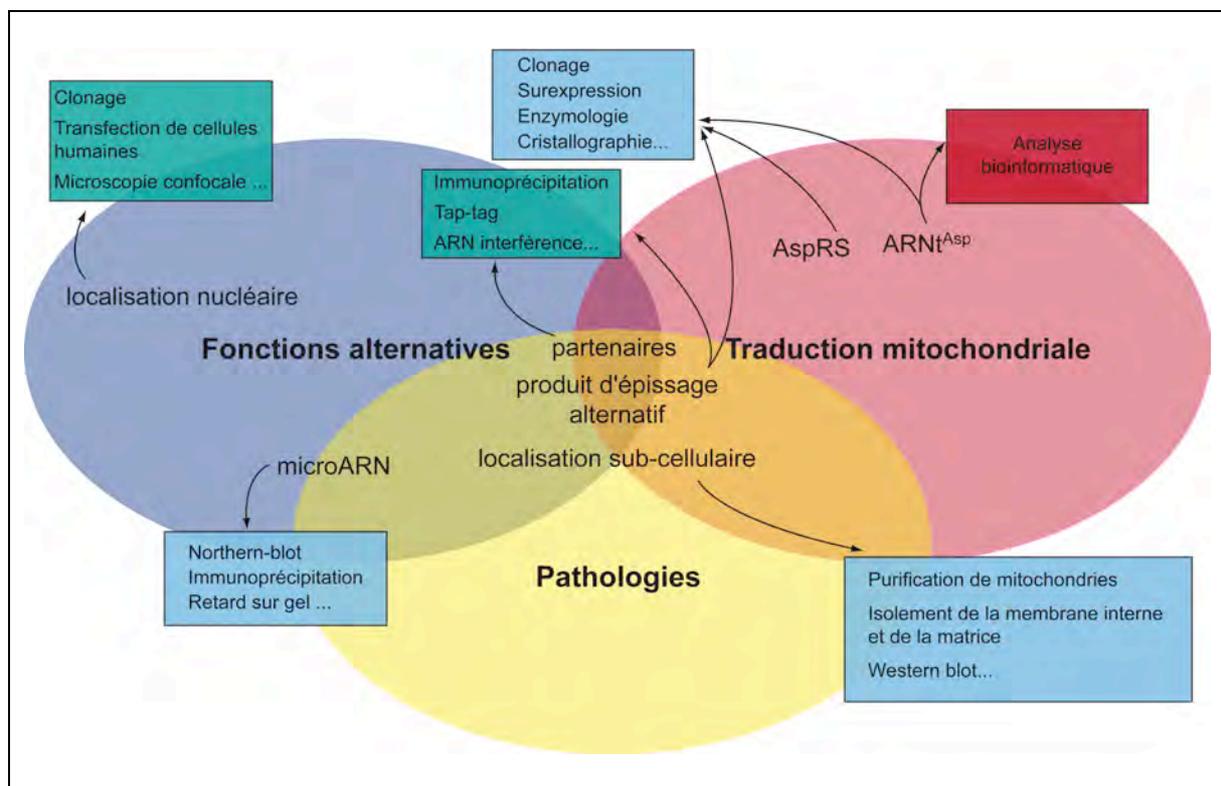


Figure 39. Perspectives de mon travail de thèse : grandes thématiques et approches expérimentales. Les approches *in vivo* sont détaillées dans les rectangles verts, les approches *in vitro* sont détaillées dans les rectangles bleus et les approches bioinformatiques dans le rectangle rouge.

1. Traduction mitochondriale

... caractérisation biochimique grâce à un reclonage efficace

Nous savons maintenant que le site prédictif de maturation de l'AspRS mt (et d'autres aaRS mt) est erroné. Nous avons cloné jusque-là une phase de lecture légèrement incorrecte en vue de la sur-expression et de caractérisations biochimiques et structurales diverses. La protéine correspondante présente une faible activité enzymatique et est peu soluble. Pour

comprendre si l'efficacité d'aspartylation mt humaine est réellement plus faible que celle des systèmes eubactériens et tenter de pallier les problèmes d'expression, il faudra cloner à nouveau la protéine en débutant sa séquence par le codon codant pour l'acide aminé Isoleucine en position 41 (position identifiée par le motif R-10) au lieu de l'acide aminé Valine en position 48. La nouvelle protéine rallongée de 7 acides aminés pourrait avoir des propriétés différentes de celles observées jusqu'alors. Si cette stratégie porte ses fruits, elle pourra tout d'abord être appliquée à la surproduction rapide de variants de l'AspRS mt (mutants ponctuels et produit d'épissage alternatif). L'un des mutants ponctuels concerne l'AspRS mt humaine portant la mutation Gly221Glu. Il sera réalisé afin d'expliquer le changement de réactivité des AspRS mt humaine et d'*E. coli*, pourtant si proches, envers le même substrat et de valider l'hypothèse proposant que la différence de réactivité pourrait très certainement venir de la dynamique de la réaction. Il sera nécessaire de muter les deux enzymes (mutation Glu171Gly au sein de *E. coli* et Gly221Glu au sein de l'AspRS mt humaine) et de mesurer le K_M des deux AspRS mutées pour l'acide aspartique. Le variant d'épissage alternatif concerne l'AspRS- Δ Exon13 et son reclonage pourra peut-être pallier les problèmes rencontrés lors de sa surproduction. Enfin, cette alternative de clonage pourra aussi être appliquée à toutes les autres aaRS mt pour lesquelles des problèmes similaires de surproduction ont été rencontrés et ouvrir la porte à de nombreuses approches de caractérisation biochimique de ces protéines.

... structures à haute résolution

Bien que nous disposions de modèles des structures tridimensionnelles de l'AspRS et de l'ARNt^{Asp} mt humains, celles-ci devraient maintenant être résolues par cristallographie. La cristallographie des ARNt mt humains s'est révélée jusqu'à présent infructueuse pour deux raisons. La difficulté d'obtenir des quantités d'ARNt mt humain natif conséquentes constitue la première limitation expérimentale. Par ailleurs des tentatives de cristallisation d'ARNt mt transcrits *in vitro* réalisées au laboratoire se sont révélés stériles en raison de la fragilité accrue de ces molécules et la mise à jour d'une structure alternative. Celle-ci est liée à l'absence de bases modifiées et à leur forte proportion de dinucléotides CpA et UpA qui sont très sensibles aux hydrolyses spontanées. Cependant, la synthèse chimique d'ARNt avec leurs bases modifiées rendent la cristallisation de ces molécules à nouveau envisageable et permettrait dans le cas de l'ARNt^{Asp} mt humain de compléter et d'enrichir l'étude de sondage enzymatique et chimique en solution.

Concernant l'AspRS mt humaine, nous avons montré que l'ajout d'Asp-AMS aide à sa solubilisation et qu'un reclonage pourrait être bénéfique. Il faut cependant améliorer les conditions de conservation de l'enzyme en utilisant un tampon compatible avec les essais de cristallisation. Il serait judicieux de tirer profit des nouvelles techniques de cristallogenèse tel que la cristallographie en gel (Sauter et al., 2002). Ceci permettrait d'obtenir des structures cristallographiques à très haute résolution et d'obtenir par exemple des images extrêmement précises de la fixation de l'adénylate au sein du site actif.

2. Fonctions alternatives

... organisation supramoléculaire des aaRS mitochondriales

La recherche des partenaires potentiels de l'AspRS mt humaine doit être poursuivie mais la technique d'immunoprécipitation doit encore être approfondie. En effet, la présence de seulement trois protéines après immunoprécipitation peut révéler deux choses. Ceci reflète soit une situation biologique réelle soit des conditions d'immunoprécipitation trop stringentes. Si d'autres conditions d'immunoprécipitation révélaient la présence de protéines potentiellement partenaires de l'AspRS mt humaine, il faudrait alors réaliser l'immunoprécipitation inverse avec des anticorps dirigés contre la protéine initialement immunoprécipitée afin de constater si l'AspRS mt humaine est à son tour immunoprécipitée ou non. La stratégie de Tap-tag pourrait également être utilisée. Il faut néanmoins préciser que cette technique appliquée à la mitochondrie s'avère challengeuse au vu de la faible quantité de protéines mt comparé à l'ensemble des protéines cytosoliques. L'assignation des protéines interagissant avec l'AspRS par spectrométrie de masse pourrait ainsi s'avérer délicate.

... localisation sub-mitochondriale

La localisation sub-mitochondriale au niveau de la membrane interne de l'AspRS mt humaine pourrait être approchée en purifiant des mitochondries de cellules humaines, en isolant la membrane interne de la membrane externe et de la matrice et en réalisant une expérience Western-blot avec des anticorps anti-AspRS. Il sera intéressant de vérifier une telle localisation pour les autres aaRS mt.

... *ARNt / microARN*

L'implication des ARNt mt humains dans l'ARN interférence peut être continuée selon plusieurs stratégies. Tout d'abord l'interaction entre les ARNt et Dicer pourrait être vérifiée par la technique de retard su gel. Cette technique permettrait d'étudier si l'interaction entre ces deux macromolécules est spécifique. Ensuite l'immunoprécipitation de Dicer suivie d'une expérience de Northern-blot sur l'immunoprécipité en utilisant des sondes complémentaires aux séquences des ARNt mt humains pourrait également contribuer à cette étude. Enfin, des expériences de Northern-blot en utilisant ces mêmes sondes sur des petits ARN purifiés de cellules humaines montrerait si dans ces cellules il y a existence de petits ARN dérivés des ARNt qui pourraient être générés suite à un clivage par la protéine Dicer.

... *variants d'épissage des aaRS*

Dans le cadre de la recherche de la fonction de l'AspRS- Δ Exon13, des techniques comme l'immunoprécipitation ou le Tap-tag peuvent être envisagées. À celles-ci s'ajoute la technique d'extinction du gène codant pour cette protéine par ARN interférence. Cette stratégie permettrait d'éteindre spécifiquement ce gène et constituerait les premières pistes dans l'établissement de sa fonction, en déterminant par exemple, si son expression est vitale pour la cellule et si l'extinction de son gène pourrait avoir une influence quelconque sur la croissance des cellules, la morphologie des mitochondries, les activités des complexes de la chaîne respiratoire ou encore la synthèse protéique mitochondriale.

La fonction de l'AspRS- Δ Exon13 pourrait également être approchée de manière *in vitro*. Des activités potentielles au sein de l'aminocyclation, du « mischarging » ou encore dans l'« editing » seraient explorées en priorité. Le problème de surexpression et de solubilité de l'AspRS- Δ Exon13 doit cependant être résolu. L'utilisation d'un gène synthétique, produit spécifiquement afin que les codons de l'ARNm correspondent aux ARNt naturellement présents dans l'hôte et que l'ARNm n'adopte pas une structure secondaire empêchant la traduction de la protéine, pourrait être envisagée. L'emploi de systèmes d'expression différents d'*E. coli* comme baculovirus ou encore des cellules de mammifères constitue également une alternative non négligeable.

3. Pathologies

Toutes les connaissances qui découleront de ces projets scientifiques comme la localisation sub-mitochondriale, les fonctions alternatives ou encore les partenaires, contribueront à l'enrichissement des connaissances fondamentales concernant la traduction mitochondriale mais seront également exploitées afin de mieux comprendre les pathologies mitochondriales et d'élucider leurs relations génotypes-phénotypes. En effet, rien que la découverte de la localisation des aaRS mt humaines à proximité des membranes nous amènera à considérer l'étude de ces protéines de manière différentes et nous appréhenderons leur étude dans un contexte maintenant membranaire. Enfin, les effets des mutations liées à des pathologies et touchant l'ARNt^{Asp} et l'AspRS seront analysés à la fois au sein de l'aminocyclation mais également au niveau de leur partenariat et de leurs fonctions alternatives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abramochkin, G. and Shrader, T.E. 1995. The leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase. Overexpression and characterization of substrate recognition, domain structure, and secondary structure. *J Biol Chem* **270**: 20621-20628.
- Agou, F., Yang, Y., Gesquière, J.C., Waller, J.P. and Guittet, E. 1995. Polyanion-induced α -helical structure of a synthetic 23-residue peptide representing the lysine-rich segment of the N-terminal extension of yeast cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **34**: 569-576.
- Allen, J.F. and Raven, J.A. 1996. Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J Mol Evolution* **42**: 482-492.
- Almassy, R.J., Janson, C.A., Hamlin, R., Xuong, N.H. and Eisenberg, D. 1986. Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* **323**: 304-309.
- 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. and Young, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465.
- Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Nakajima, T., Wolpin, E.S. and Parvin, J.D. 1998. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet* **19**: 254-256.
- Arnez, J. and Cavarelli, J. 1997. Structure of RNA-binding proteins. *Q Rev Biophys* **30**: 195-240.
- Arts, G.-J., Fornerod, M. and Mattaj, I.W. 1998. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Current Biol* **8**: 305-314.

B

- Bailly, M., Blaise, M., Lorber, B., Becker, H.D. and Kern, D. 2007. The transamidosome: a dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Mol Cell* **28**: 228-239.
- Balg, C., Blais, S., Bernier, S., Huot, J., Couture, M., Lapointe, J. and Chênevert, R. 2007. Synthesis of beta-ketophosphonate analogs of glutamyl and glutaminyl adenylate, and selective inhibition of the corresponding bacterial aminoacyl-tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem* **15**: 295-304.
- Barends, S., Bink, H.H., van den Worm, S.H.E., Pleij, C.W. and Kraal, B. 2003. Entrapping ribosomes for viral translation: tRNA mimicry as a molecular trojan horse. *Cell* **112**: 123-129.

- Becker, H.D., Giegé, R. and Kern, D. 1996. Identity of prokaryotic and eukaryotic tRNA^{Asp} for aminoacylation by aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* **35**: 7447-7458.
- Becker, H.D. and Kern, D. 1998. *Thermus thermophilus* - a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12832-12837.
- Beddoe, T. and Lithgow, T. 2002. Delivery of nascent polypeptides to the mitochondrial surface. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 35-39.
- Bernier, S., Akochy, P., Lapointe, J. and Chênevert, R. 2005. Synthesis and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitory activity of aspartyl adenylate analogs. *Bioorg Med Chem* **13**: 69-75.
- Beuning, P.J. and Musier-Forsyth, K. 1999. Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. *Biopolymers* **52**: 1-28.
- Bhattacharyya, S. and Adhya, S. 2004. The complexity of mitochondrial tRNA import. *RNA biol* **1**: 84-88.
- Blaise, M., Becker, H.D., Keith, G., Cambillau, C., Lapointe, J., Giegé, R. and Kern, D. 2004. A minimalist glutamyl-tRNA synthetase dedicated to aminoacylation of the tRNA^{Asp} QUC anticodon. *Nucleic Acid Res* **32**: 2768-2775.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C. and Pfanner, N. 2008. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* **9**: 42-49.
- Bonnefond, L., Fender, A., Rudinger-Thirion, J., Giegé, R., Florentz, C. and Sissler, M. 2005a. Towards the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry* **44**: 4805-4816.
- Bonnefond, L., Florentz, C., Giegé, R. and Rudinger-Thirion, J. 2008. Decreased aminoacylation in pathology-related mutants of mitochondrial tRNA^{Tyr} is associated with structural perturbations in tRNA architecture. *RNA* **14**: 641-648.
- Bonnefond, L., Frugier, M., Giegé, R. and Rudinger-Thirion, J. 2005b. Human mitochondrial TyrRS disobeys the tyrosine identity rules. *RNA* **11**: 558-562.
- Bonnefond, L., Frugier, M., Touzé, E., Lorber, B., Florentz, C., Giegé, R., Sauter, C. and Rudinger-Thirion, J. 2007. Crystal structure of human mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase reveals common and idiosyncratic features. *Structure* **15**: 1505-1516.
- Börner, G.V., Zeviani, M., Tiranti, V., Carrara, F., Hoffmann, S., Gerbitz, K.D., Lochmuller, H., Pongratz, D., Klopstock, T., Melberg, A., Holme, E. and Paabo, S. 2000. Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients. *Hum Mol Genet* **9**: 467-475.
- Boue, S., Letunic, I. and Bork, P. 2003. Alternative splicing and evolution. *Bioessays* **25**: 1031-1041.

- Brandon, M.C., Lott, M.T., Nguyen, K.C., Spolim, S., Navathe, S.B., Baldi, P. and Wallace, D.C. 2005. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res* **33**: D611-613.
- Briand, C., Poterszman, A., Eiler, S., Webster, G., Thierry, J.-C. and Moras, D. 2000. An intermediate step in the recognition of tRNA^{Asp} by aspartyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **299**: 1051-1060.
- Brigotti, M., Carnicelli, D., Alvergnà, P., Pallanca, A., Sperti, S. and Montanaro, L. 1995. Differential up-regulation by tRNAs of ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett* **373**: 115-118.
- Brigotti, M., Keith, G., Pallanca, A., Carnicelli, D., Alvergnà, P., Dirheimer, G., Montanaro, L. and Sperti, S. 1998. Identification of the tRNAs which up-regulate agrostin, barley RIP and PAP-S, three ribosome-inactivating proteins of plant origin. *FEBS Lett* **431**: 259-262.
- Brindefalk, B., Viklund, J., Larsson, D., Thollesson, M. and Andersson, S.G. 2007. Origin and evolution of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Biol Evol* **24**: 743-756.
- Brubacher-Kauffmann, S., Maréchal-Drouard, L., Cosset, A., Dietrich, A. and Duchêne, A.M. 1999. Differential import of nuclear-encoded tRNA^{Gly} isoacceptors into solanum Tuberosum mitochondria. *Nucleic Acids Res* **27**: 2037-2042.
- Brulé, H., Holmes, W.M., Keith, G., Giegé, R. and Florentz, C. 1998. Effect of a mutation in the anticodon of human mitochondrial tRNA^{Pro} on its post-transcriptional modification pattern. *Nucleic Acids Res* **26**: 537-543.
- Buck, C.A. and Nass, M.M.K. 1969. Studies on mitochondrial tRNA from animal cells. I. A comparison of mitochondrial and cytoplasmic tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases. *J Mol Biol* **41**: 67-82.
- Bukau, B. and Horwich, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
- Bullard, J., Cai, Y.C., Demeler, B. and Spremulli, L. 1999. Expression and characterization of a human mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **288**: 567-577.
- Bullard, J., Cai, Y.C. and Spremulli, L. 2000. Expression and characterization of the human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase. *Biochem Biophys Acta* **1490**: 245-258.

C

- Caillet, J., Nogueira, T., Masquida, B., Winter, F., Graffe, M., Dock-Brégeon, A.C., Torres-Larios, A., Sankaranarayanan, R., Westhof, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Romby, P. and Springer, M. 2003. The modular structure of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase as both an enzyme and a regulator of gene expression. *Mol Microbiol* **47**: 961-974.

- Carrodeguas, J.A., Kobayashi, R., Lim, S.E., Copeland, W.C. and Bogenhagen, D.F. 1999. The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol* **19**: 4039-4046.
- Casewell, M. and Hill, R. 1985. In-vitro activity of mupirocin ('pseudomonic acid') against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **15**: 523-531.
- Cavarelli, J., Rees, B., Eriani, G., Ruff, M., Boeglin, M., Gangloff, J., Thierry, J.-C. and Moras, D. 1994. The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: Structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *EMBO J* **13**: 327-337.
- Cavarelli, J., Rees, B., Ruff, M., Thierry, J.-C. and Moras, D. 1993. Yeast tRNA^{Asp} recognition by its cognate class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Nature* **362**: 181-184.
- Cen, S., Javanbakht, H., Niu, M. and Kleiman, L. 2004. Ability of wild-type and mutant lysyl-tRNA synthetase to facilitate tRNA(Lys) incorporation into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **78**: 1595-1601.
- Cen, S., Khorchid, A., Javanbakht, H., Gabor, J., Stello, T., Shiba, K., Musier-Forsyth, K. and Kleiman, L. 2001. Incorporation of Lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* **75**: 5043-5048.
- Cerini, C., Kerjan, P., Astier, M., Gratecos, D., Mirande, M. and Semeriva, M. 1991. A component of the multisynthetase complex is a multifunctional aminoacyl-transfer RNA synthetase. *EMBO J* **10**: 4267-4277.
- Charron, C., Roy, H., Blaise, M., Giegé, R. and Kern, D. 2003. Non-discriminating and discriminating aspartyl-tRNA synthetases differ in the anticodon-binding domain. *EMBO J* **22**: 1632-1643.
- Chaumont, F., O'Riordan, V. and Boutry, M. 1990. Protein transport into mitochondria is conserved between plant and yeast species. *J Biol Chem* **265**: 16856-16862.
- Chinnaronk, S., Gravers Jeppesen, M., Suzuki, T., Nyborg, J. and Watanabe, K. 2005. Dual-mode recognition of noncanonical tRNAs(Ser) by seryl-tRNA synthetase in mammalian mitochondria. *EMBO J* **24**: 3369-3379.
- Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Diekert, K., Lill, R., Turnbull, D.M. and Lightowers, R.N. 1999. Peptide nucleic acid delivery to human mitochondria. *Gene Therapy* **6**: 1919-1928.
- Chomyn, A., Enriquez, J.A., Micol, V., Fernandez-Silva, P. and 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.
- Claros, M.G. 1995. MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput Appl Biosci* **11**: 441-447.

- Claros, M.G. and Vincens, P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786.
- Clayton, D.A. 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 453-478.
- Coenen, M.J., Antonicka, H., Ugalde, C., Sasarman, F., Rossi, R., Heister, J.G., Newbold, R.F., Trijbels, F.J., van den Heuvel, L.P., Shoubbridge, E.A. and Smeitink, J.A. 2004. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *N Engl J Med* **351**: 2080-2086.
- Consortium, I.H.G.S. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-958.
- Consortium., I.H.G.S. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**: 931-945.
- Corradini, R., Sforza, S., Tedeschi, T., Totsingan, F. and Marchelli, R. 2007. Peptide nucleic acids with a structurally biased backbone: effects of conformational constraints and stereochemistry. *Curr Top Med Chem* **7**: 681-694.
- Craστο, C., Forrest, A., Karoli, T., March, D., Mensah, L., O'Hanlon, P., Nairn, M., Oldham, M., Yue, W., Banwell, M. and Easton, C. 2003. Synthesis and activity of analogues of the isoleucyl tRNA synthetase inhibitor SB-203207. *Bioorg Med Chem* **11**: 2687-2694.
- Crick, F.H.C. 1955. On degenerate templates and the adaptor hypothesis: A note for the RNA tie club; cité par M. B. Hoagland (1960). In: Chargaff E., and Davidson J.N., eds. *The Nucleic Acids*. New York: Academic Press. pp 349.
- Curnow, A.W., Ibba, M. and Söll, D. 1996. tRNA-dependent asparagine formation. *Nature* **382**: 589-590.
- Cusack, S. 1993. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Op Struct Biol* **3**: 39-44.
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Härtleln, M., Nassar, N. and Leberman, R. 1990. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* **347**: 249-255.

D

- Dardel, F., Panvert, M. and Fayat, G. 1990. Transcription and regulation of expression of the *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase gene. *Mol Gen Genet* **223**: 121-133.
- Degoul, F., Brulé, H., Capanec, C., Helm, M., Marsac, C., Leroux, J.-P., Giegé, R. and 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.

- Delage, L., Duchêne, A.M., Zaepfel, M. and Maréchal-Drouard, L. 2003. The anticodon and the D-domain sequences are essential determinants for plant cytosolic tRNA^{Val} import into mitochondria. *The Plant Journal* **34**: 623-633.
- DeLano, W.L. 2002. The PyMOL molecular graphics system. San Carlos, CA, USA: Delano Scientific (<http://www.pymol.org>).
- Delarue, M., Poterszman, A., Nikonov, S., Garber, M., Moras, D. and Thierry, J.-C. 1994. Crystal structure of a prokaryotic aspartyl-tRNA synthetase. *EMBO J* **13**: 3219-3229.
- Desnuelle, C. 2003. Updating the concept of mitochondrial disease. *Bull Acad Natle Méd* **187**: 537-557.
- Dickey, T., Khaki, A., Gauger, A., Nieuwkoop, A., Agyiri, A., Ducker, G. and Chihade, J.W. 2006. Animal mitochondrial alanyl-tRNA synthetase use divergent tRNA recognition strategies. *2006 International conference on aminoacyl-tRNA synthetases: from the genetic code to human diseases & medicine*.
- Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P.J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M. and Pfanner, N. 1997. Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* **388**: 195-200.
- Dietrich, A., Small, I., Cosset, A., Weil, J.H. and Maréchal-Drouard, L. 1996. Editing and import: strategies for providing plant mitochondria with a complete set of functional transfer RNAs. *Biochimie* **78**: 518-529.
- DiMauro, S. 2006. Mitochondrial myopathies. *Curr Opin Rheumatol* **18**: 636-641.
- Dörner, M., Altmann, M., Pääbo, S. and Mörl, M. 2001. Evidence for import of a lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. *Mol Biol Cell* **12**: 2688-2698.
- Drakas, R., Prisco, M. and Baserga, R. 2005. A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics* **5**: 132-137.
- Dreher, T.W. 1999. Functions of 3'-untranslated regions of positive strand RNA viral genomes. *Annu Rev Phytopathol* **37**: 151-174.
- Dubois, D.Y., Blaise, M., Becker, H.D., Campanacci, V., Keith, G., Giegé, R., Cambillau, C., Lapointe, J. and Kern, D. 2004. An aminoacyl-tRNA synthetase-like protein encoded by the *Escherichia coli* yadB gene glutamylates specifically tRNA^{Asp}. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7530-7535.
- Duchêne, A.M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N.M., Zaepfel, M., Maréchal-Drouard, L. and Small, I.D. 2005. Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 16484-16489.

Duchêne, A.M., Peeters, N., Dietrich, A., Cosset, A., Small, I.D. and Wintz, H. 2001. Overlapping destinations for two dual targeted glycyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem* **276**: 15275-15283.

Dudek, S.M. and Semenkovich, C.F. 1995. Essential amino acids regulate fatty acid synthase expression through an uncharged transfer RNA-dependent mechanism. *J Biol Chem* **270**: 29323-29329.

E

Edvardson, S., Shaag, A., Kolesnikova, O., Gomori, J.M., Tarassov, I., Einbinder, T., Saada, A. and Elpeleg, O. 2007. Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet* **81**: 857-862.

Eiler, S., Dock-Bregeon, A.C., Moulinier, L., Thierry, J.-C. and Moras, D. 1999. Synthesis of aspartyl-tRNA^{Asp} in *Escherichia coli*-a snapshot of the second step. *EMBO J* **18**: 6532-6541.

Enriquez, J.A., Chomyn, A. and Attardi, G. 1995. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA^{Lys} and premature translation termination. *Nature Genetics* **10**: 47-55.

Entelis, N.S., Kieffer, S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. 1998. Structural requirements of tRNA^{Lys} for its import into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2838-2843.

Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P. and 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. and Moras, D. 1990. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**: 203-206.

F

Falkenberg, M., Larsson, N. and Gustafsson, C. 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 679-699.

Fechter, P., Rudinger-Thirion, J., Florentz, C. and Giegé, R. 2001. Novel features in the tRNA-like world of plant viral RNAs. *CMLS, Cell Mol Life Sci* **58**: 1547-1561.

Fender, A., Sauter, C., Messmer, M., Pütz, J., Giegé, R., Florentz, C. and Sissler, M. 2006. Loss of a primordial identity element for a mammalian mitochondrial aminoacylation system. *J Biol Chem* **281**: 15980-15986.

- Ferrer, M., Chernikova, T.N., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N. 2004. Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4499-4504.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S. and Mello, C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Florentz, C. and Sissler, M. 2001. Disease-related *versus* polymorphic mutations in human mitochondrial tRNAs: where is the difference? *EMBO Reports* **2**: 481-486.
- Florentz, C., Sohm, B., Tryoen-Tóth, P., Pütz, J. and Sissler, M. 2003. Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1356-1375.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. and Purnelle, B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **440**: 325-331.
- Francklyn, C. 2005. tRNA synthetase-Like proteins. In: Ibba M., Francklyn C., and Cusack S., eds. *Aminoacyl-tRNA synthetases*. Georgetown, TX: Landes Biosciences. pp 285-297.
- Francklyn, C., Perona, J.J., Pütz, J. and Hou, Y.-M. 2002. Aminoacyl-tRNA synthetases: Versatile players in the changing theater of translation. *RNA* **8**: 1363-1372.
- Francklyn, C. and Schimmel, P. 1989. Aminoacylation of RNA minihelices with alanine. *Nature* **337**: 478-481.
- Frazer-Abel, A.A. and Hagerman, P.J. 1999. Determination of the angle between the acceptor and anticodon stems of a truncated mitochondrial tRNA. *J Mol Biol* **285**: 581-593.
- Frugier, M., Florentz, C. and Giegé, R. 1994. Efficient aminoacylation of resected RNA helices by class II aspartyl-tRNA synthetase dependent on a single nucleotide. *EMBO J* **13**: 2218-2226.
- Frugier, M. and Giegé, R. 2003. Yeast aspartyl-tRNA synthetase binds specifically its own mRNA. *J Mol Biol* **331**: 375-383.
- Frugier, M., Moulinier, L. and 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.
- Frugier, M., Ryckelynck, M. and Giegé, R. 2005. tRNA-balanced expression of a eukaryal aminoacyl-tRNA synthetase by an mRNA-mediated pathway. *EMBO Rep* **6**: 860-865.
- Fuller, A., Mellows, G., Woolford, M., Banks, G., Barrow, K. and Chain, E. 1971. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature* **234**: 416-417.

G

- Gakh, O., Cavadini, P. and Isaya, G. 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 63-77.
- Galani, K., Großhans, H., Deinert, K., Hurt, E.C. and Simos, G. 2001. The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J* **20**: 6889-6898.
- Gamian, A., Krzyzaniak, A., Barciszewska, M.Z., Gawrońska, I. and Barciszewski, J. 1991. Specific incorporation of glycine into bacterial lipopolysaccharide. Novel function of specific transfer ribonucleic acids. *Nucleic Acids Res* **19**: 6021-6025.
- Gaudin, C., Nonin-Lecomte, S., Tisné, C., Corvaisier, S., Bordeau, V., Dardel, F. and Felden, B. 2003. The tRNA-like domains of E coli and A.aeolicus transfer-messenger RNA: structural and functional studies. *J Mol Biol* **331**: 457-471.
- Gavel, Y. and von Heijne, G. 1990. Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng* **4**: 33-37.
- Gavin, A.C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edlmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147.
- Giegé, R., Florentz, C., Kern, D., Gangloff, J., Eriani, G. and Moras, D. 1996. Aspartate identity of transfer RNAs. *Biochimie* **78**: 605-623.
- Giegé, R. and Frugier, M. 2003. Transfer RNA structure and identity. In: Lapointe J., and Brakier-Gringas L., eds. *Translation mechanisms*. Georgetown, TX: Landes Sciences. pp 1-24.
- Giegé, R. and Rees, B. 2005. Aspartyl-tRNA synthetases. In: Ibba M., Francklyn C., and Cusack S., eds. *Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Georgetown, TX: Landes Bioscience. pp 210-226.
- Giegé, R., Sissler, M. and Florentz, C. 1998. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* **26**: 5017-5035.
- Giegé, R., Touzé, E., Lorber, B., Théobald-Dietrich, A. and Sauter, C. 2008. Crystallogensis Trends of Free and Liganded Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Crystal Growth & Design* **In press**.
- Goldgur, Y., Mosyak, L., Reshetnikova, L., Ankilova, V., Lavrik, O., Khodyreva, S. and Safro, M. 1997. The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{Phe}. *Structure* **5**: 59-68.

- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. and Metz, F. 1999. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308.
- Gould, R.M., Thornton, M.P., Liepkalns, V. and Lennarz, W.J. 1968. Participation of aminoacyl transfer ribonucleic acid in aminoacyl phosphatidylglycerol synthesis. II. Specificity of alanyl phosphatidylglycerol synthetase. *J Biol Chem* **243**: 3096-3104.
- Graffe, M., Dondon, J., Caillet, J., Romby, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Springer, M. 1992. The specificity of translational control switched using tRNA identity rules. *Science* **255**: 994-996.
- Graier, W.F., Frieden, M. and Malli, R. 2007. Mitochondria and Ca(2+) signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch* **455**: 345-396.
- Grasbon-Frodl, E.M., Kosel, S., Sprinzl, M., von Eitzen, U., Mehraein, P. and Graeber, M.B. 1999. Two novel point mutations of mitochondrial tRNA genes in histologically confirmed Parkinson disease. *Neurogenetics* **2**: 121-127.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology* **2**: 1018.1-1018.5.
- Green, D.R. and Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.
- Grishok, A., Pasquinelli, A., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D., Fire, A., Ruvkun, G. and Mello, C. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**: 23-24.
- Grundy, F.J., Hodil, S.E., Rollin, S.M. and Henkin, T.M. 1997. Specificity of tRNA-mRNA interactions in *Bacillus subtilis tyrS* antitermination. *J Bacteriol* **179**: 2587-2594.
- Grundy, F.J., Rollins, S.M. and Henkin, T.M. 1994. Interaction between the acceptor end of tRNA and the T box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis tyrS* gene: a new role for the discriminator base. *J Bacteriol* **176**: 4518-4545 4526.

H

- Hao, H. and Moraes, C.T. 1997. A disease-associated G5703A mutation in human mitochondrial DNA causes a conformational change and a marked decrease in steady-state levels of mitochondrial tRNA^{Asn}. *Mol Cell Biol* **17**: 6831-6837.
- Hasegawa, T., Himeno, H., Ishikura, H. and Shimizu, M. 1989. Discriminator base of tRNA^{Asp} is involved in amino acid acceptor activity. *Biochem Biophys Res Comm* **163**: 1534-1538.
- Hauser, R. and Schneider, A. 1995. tRNAs are imported into mitochondria of *Trypanosoma brucei* independently of their genomic context and genetic origin. *EMBO J* **14**: 4212-4220.

- Hayashi, I., Yokogawa, T., Kawai, G., Ueda, T., Nishikawa, K. and Watanabe, K. 1997. Assignment of imino proton signals of G-C base pairs and magnesium ion binding: an NMR study of bovine mitochondrial tRNA^{Ser^{GCU}} lacking the entire D arm. *J Biochem* **121**: 1115-1122.
- Helm, M., Brulé, H., Degoul, F., Capanec, C., Leroux, J.-P., Giegé, R. and 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. and Florentz, C. 2000. Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* **6**: 1356-1379.
- Helm, M., Florentz, C., Chomyn, A. and 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. and 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.
- Herbert, C.J., Labouesse, M., Dujardin, G. and Slonimski, P. 1988. The NAM2 proteins from *S. cerevisiae* and *S. douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases, and are involved in mRNA splicing. *EMBO J* **7**: 473-483.
- Hicks, G. and Raikhel, N. 1995. Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 155-188.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. 1998. Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**: 516-521.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y. and Kobayashi, I. 1997a. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**: 1670-1673.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T. and Tenover, F.C. 1997b. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **40**: 135-136.
- Hoagland, M.B. 1955. An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim Biophys Acta* **16**: 288-289.
- Hoagland, M.B., Stephenson, M.L., Scott, J.F., Hecht, L.I. and Zamecnik, P.C. 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem* **231**: 241-257.
- Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. 1957. Intermediate reactions in protein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **24**: 215-216.

- Holt, I.J., Harding, A.E. and Morgan-Hughes, J.A. 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331**: 717-719.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E. and Jacobs, H.T. 2000. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**: 515-524.
- Hou, Y.-M. and Schimmel, P. 1988. A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature* **333**: 140-145.
- Howard, O.M., Dong, H.F., Yang, D., Raben, N., Nagaraju, K., Rosen, A., Casciola-Rosen, L., Hartlein, M., Kron, M., Yiadom, K., Dwivedi, S., Plotz, P.H. and Oppenheim, J.J. 2002. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med* **196**: 781-791.
- Hsu, J.L., Rho, S.B., Vannella, K.M. and Martinis, S.A. 2006. Functional divergence of a unique C-terminal domain of leucyl-tRNA synthetase to accommodate its splicing and aminoacylation roles. *J Biol Chem* **281**: 23075-23082.
- Hughes, J. and Mellows, G. 1980. Interaction of pseudomonic acid A with Escherichia coli B isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochem J* **191**: 209-219.
- Hutten, S. and Kehlenbach, R.H. 2007. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol* **17**: 193-201.
- Hytönen, V.P., Laitinen, O.H., Airene, T.T., Kidron, H., Meltola, N.J., Porkka, E.J., Hörhä, J., Paldanius, T., Määttä, J.A., Nordlund, H.R., Johnson, M.S., Salminen, T.A., Airene, K.J., Ylä-Herttuala, S. and Kulomaa, M.S. 2004. Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in Escherichia coli. *Biochem J* **384**: 385-390.

I

- Ibba, M., Francklyn, C. and Cusack, S. 2005. *The aminoacyl-tRNA synthetases*. Georgetown, TX: Landes Biosciences.
- Ibba, M., Morgan, S., Curnow, A.W., Pridmore, D.R., Vothknecht, U.C., Gardner, W., Lin, W., Woese, C.R. and Söll, D. 1997. A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science* **278**: 1119-1122.
- Ingman, M. and Gyllensten, U. 2006. mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. *Nucleic Acids Res* **34**: D749-751.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. and Gyllenstein, U. 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* **408**: 708-713.
- Initiative, T.A.G. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Isaya, G., Kalousek, F., Fenton, W.A. and Rosenberg, L.E. 1991. Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. *J Cell Biol* **113**: 65-76.

J

Jacobs, H.T. 2003. Disorders of mitochondrial protein synthesis. *Hum Mol Genet* **12**: R293-R301.

Janin, J., Dumas, C., Morera, S., Xu, Y., Meyer, P., Chiadmi, M. and Cherfils, J. 2000. Three-dimensional structure of nucleoside diphosphate kinase. *J Bioenerg Biomembr* **32**: 215-225.

Jennissen, H.P. 1995. Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. *Eur J Biochem* **231**: 1-30.

Jeppesen, T.D., Schwartz, M., Frederiksen, A.L., Wibrand, F., Olsen, D.B. and Vissing, J. 2006. Muscle phenotype and mutation load in 51 persons with the 3243A>G mitochondrial DNA mutation. *Arch Neurol* **63**: 1701-1706.

Jiang, S., Wolfe, C.L., Warrington, J.A. and Norcum, M.T. 2005. Three-dimensional reconstruction of the valyl-tRNA synthetase/elongation factor-1H complex and localization of the delta subunit. *FEBS Lett* **579**: 6049-6054.

Jones, C.N., Wilkinson, K.A., Hung, K.T., Weeks, K.M. and Spremulli, L.L. 2008. Lack of secondary structure characterizes the 5' ends of mammalian mitochondrial mRNAs. *RNA* **14**: 862-871.

Jovine, L., Djordjevic, S. and Rhodes, D. 2000. The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 2.0Å resolution: cleavage by Mg²⁺ in 15-year old crystals. *J Mol Biol* **301**: 401-414.

Jørgensen, R., Søgarrd, M.M., Rossing, A.B., Martensen, P.M. and Justesen, J. 2000. Identification and characterization of human mitochondrial tryptophanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **275**: 16820-16826.

K

Kalousek, F., Hendrick, J.P., and Rosenberg, L.E., 1988. Two mitochondrial matrix proteases act sequentially in the processing of mammalian matrix enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7536-7540.

Kamiryo, T. and Matsushashi, M. 1969. Sequential addition of glycine from glycyl-tRNA to the lipid-linked precursors of cell wall peptidoglycan in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **36**: 215-222.

Keeney, J.B., Chapman, K.B., Lauerma, V., Voytas, D.F., Aström, S.U., von Pawel-Rammigen, U., Byström, A. and Boeke, J.D. 1995. Multiple molecular determinants for retrotransposition in a primer tRNA. *Mol Cell Biol* **15**: 217-226.

- Keiler, K.C., Waller, R.H. and Sauer, R.T. 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**: 990-993.
- Kelley, S., Steinberg, S. and Schimmel, P. 2000. Functional defects of pathogenic human mitochondrial tRNAs related to structural fragility. *Nature Struct Biol* **7**: 862-865.
- Kelley, S.O., Steinberg, S.V. and 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.
- Kim, J.E., Kim, K.H., Lee, S.W., Seol, W., Shiba, K. and Kim, S. 2000. An elongation factor-associating domain is inserted into human cysteinyl-tRNA synthetase by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **28**: 2866-2875.
- Kirino, Y., Yasukawa, T., Ohta, S., Akira, S., Ishihara, K., Watanabe, K. and Suzuki, T. 2004. Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15070-11575.
- Klipcan, L., Levin, I., Kessler, N., Moor, N., Finarov, I. and Safro, M. 2008. The tRNA-Induced Conformational Activation of Human Mitochondrial Phenylalanyl-tRNA Synthetase. *Structure* **16**: 1095-1104.
- Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanowska-Lightowers, Z., Lightowers, R.N., Martin, R. and Tarassov, I.A. 2004. Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet* **13**: 2519-2534.
- Konishi, M., Nishio, M., Saitoh, K., Miyaki, T., Oki, T. and Kawaguchi, H. 1989. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physico-chemical properties and structure. *J Antibiot (Tokyo)* **42**: 1749-1755.
- Konrad, I. and Rösenthaller, R. 1977. Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Lett* **83**: 341-347.
- Kozak, M. 1999. initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**: 187-208.
- Kozak, M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **361**: 13-37.
- Kumazawa, Y., Himeno, H., Miura, K.-I. and Watanabe, K. 1991. Unilateral aminoacylation specificity between bovine mitochondria and eubacteria. *J Biochem* **109**: 421-427.
- Kwon, S., Barbaresen, E. and Carson, J.H. 1999. The cis-acting RNA trafficking signal from myelin basic protein mRNA and its cognate trans-acting ligand hnRNP A2 enhance cap-dependent translation. *J Cell Biol* **147**: 247-256.

L

- La Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. and Brunak, S. 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**: 527-536.
- 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.
- Lechler, A. and Kreuzer, R. 1998. The phenylalanyl-tRNA synthetase specifically binds DNA. *J Mol Biol* **278**: 897-901.
- Lee, J., Kim, S., Lee, J., Kim, S., Kang, S., Seo, S., Chun, M., Kang, T., Choi, S. and Kim, H. 2003. N-Alkoxysulfamide, N-hydroxysulfamide, and sulfamate analogues of methionyl and isoleucyl adenylates as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 1087-1092.
- Lenhard, B., Orellana, O., Ibba, M. and Weygand-Durasevic, I. 1999. tRNA recognition and evolution of determinants in seryl-tRNA synthesis. *NAR* **27**: 721-729.
- Lengyel, P. 1966. Problems in protein biosynthesis. *J Gen Physiol* **49**: 305-330.
- Lestienne, P. and Ponsot, G. 1988. Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet* **I** (8590): 885.
- Levinger, L., Giegé, R. and Florentz, C. 2003. Pathology-related substitutions in human mitochondrial tRNA^{Ile} reduce precursor 3'-end processing efficiency *in vitro*. *Nucleic Acids Res* **31**: 1904-1912.
- Levinger, L., Jacobs, O. and James, M. 2001. In vitro 3' end endonucleolytic processing defect in a human mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} precursor with the U7445C substitution, which causes non-syndromic deafness. *NAR* **29**: 4334-4340.
- Levinger, L., Mörl, M. and Florentz, C. 2004a. Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Research* **32**: 5430-5441.
- Levinger, L., Oestereich, I., Florentz, C. and Mörl, M. 2004b. A pathogenesis-associated mutation in human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} leads to reduced 3'-end processing and CCA addition. *J Mol Biol* **337**: 535-544.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**: 1437-1441.
- Liu, M. and Spremulli, L.L. 2000. Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem* **275**: 29400-29406.
- Logan, D.C. 2006. The mitochondrial compartment. *J Exp Bot* **57**: 1225-1243.

- Luciano, P. and Géli, V. 1996. The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia* **52**: 1077-1082.
- Lund, E. and Dahlberg, J.E. 1998. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* **282**: 2082-2085.
- Lynch, D.C. and Attardi, G. 1976. Amino acid specificity of the transfer RNA species coded for by HeLa cell mitochondrial DNA. *J Mol Biol* **102**: 125-141.

M

- MacKenzie, J.A. and Payne, R.M. 2007. Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 509-523.
- Mahata, B., Mukherjee, S., Mishra, S., Bandyopadhyay, A. and Adhya, S. 2006. Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science* **314**: 471-474.
- Maniataki, E. and Mourelatos, Z. 2005. Human mitochondrial tRNA^{Met} is exported to the cytoplasm and associates with the Argonaute 2 protein. *RNA* **11**: 849-852.
- Marquet, R., Isel, C., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. 1995. tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie* **77**: 113-124.
- Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J. and Florentz, C. 1999. Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expending functions. *EMBO J* **18**: 4591-4596.
- Mayeda, A. and Krainer, A.R. 1992. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**: 365-375.
- 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*. Washington DC: Am. Soc. Microbiol. Press. pp 335-347.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**: 185-197.
- Miller, C., Saada, A., Shaul, N., Shabtai, N., Ben-Shalom, E., Shaag, A., Hershkovitz, E. and Elpeleg, O. 2004. Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol* **56**: 734-738.
- Miller, E.L. 2002. The penicillins: a review and update. *J Midwifery Womens Health* **47**: 426-434.
- Mirande, M., Lazard, M., Martinez, R. and Latreille, M.T. 1992. Engineering mammalian aspartyl-tRNA synthetase to probe structural features mediating its association with the multisynthetase complex. *Eur J Biochem* **203**: 459-466.

- Mirande, M., Le Corre, D. and Waller, J.-P. 1985. A complex from cultured Chinese hamster ovary cells containing nine aminoacyl-tRNA synthetases. Thermolabile leucyl-tRNA synthetase from the tsH1 mutant cell line is an integral component of this complex. *Eur J Biochem* **147**: 281-289.
- Modrek, B. and Lee, C. 2002. A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* **30**: 13-19.
- Montoya, J., Ojala, D. and Attardi, G. 1981. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* **290**: 465-470.
- Moras, D. 1992. Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases. *Trends Biochem Sci* **17**: 159-164.
- Motorin, Y.A., Wolfson, A.D., Löhr, D., Orlovsky, A.F. and Gladilin, K.L. 1991. Purification and properties of a high-molecular-mass complex between Val-tRNA synthetase and the heavy form of elongation factor 1 from mammalian cells. *Eur J Biochem* **201**: 325-331.
- Moulinier, L., Eiler, S., Eriani, G., Gangloff, J., Thierry, J.C., Gabriel, K., McClain, W.H. and Moras, D. 2001. The structure of an AspRS-tRNA^{Asp} complex reveals a tRNA-dependant control mechanism. *EMBO J* **20**: 5290-5301.
- Mudge, S.J., Williams, J.H., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Cowan, P.J. and Power, D.A. 1998. Complex organisation of the 5'-end of the human glycine tRNA synthetase gene. *Gene* **209**: 45-50.
- Mukhopadhyay, A., Ni, L., Yang, C.S. and Weiner, H. 2005. Bacterial signal peptide recognizes HeLa cell mitochondrial import receptors and functions as a mitochondrial leader sequence. *Cell Mol Life Sci* **62**: 1890-1899.
- Munro, T.P., Magee, R.J., Kidd, G.J., Carson, J.H., Barbarese, E., Smith, L.M. and Smith, R. 1999. Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *J Biol Chem* **274**: 34389-34395.
- Muramatsu, T., Yokoyama, S., Horie, N., Matsuda, A., Ueda, T., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Nishimura, S. and Miyazawa, T. 1988. A novel lysine-substituted nucleoside in the first position of the anticodon of minor isoleucine tRNA from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 9261-9267.
- Muratovska, A., Lightowers, R.N., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Smith, R.A., Wilce, J.A., Martin, S.W. and Murphy, M.P. 2001. Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations: implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease. *Nucleic Acids Res* **29**: 1852-1863.
- Murphy, M.P. and Smith, R.A. 2000. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv Drug Deliv Rev* **41**: 235-250.

Murray, J., Yonally, S., Aggeler, R., Marusich, M.F. and Capaldi, R.A. 2004. Focused proteomics: towards a high throughput monoclonal antibody-based resolution of proteins for diagnosis of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* **1659**: 206-211.

N

Nagao, A., Suzuki, T. and Suzuki, T. 2007. Aminoacyl-tRNA surveillance by EF-Tu in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* **51**: 41-42.

Nakai, K. and Kanehisa, M. 1992. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**: 897-911.

Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S.F., Lee, C.G., Hurwitz, J., Parvin, J.D. and Montminy, M. 1997. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* **90**: 1107-1112.

Nakatsu, T., Kato, H. and Oda, J. 1998. Crystal structure of asparagine synthetase reveals a close evolutionary relationship to class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Nature Struct Biol* **5**: 15-19.

Nallamsetty, S., Austin, B.P., Penrose, K.J. and Waugh, D.S. 2005. Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci* **14**: 2964-2971.

Nameki, N., Tamura, K., Himeno, H., Asahara, H., Hasegawa, T. and Shimizu, M. 1992. *E. coli* tRNA^{Asp} recognition mechanism differing from that of the yeast system. *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 856-862.

Nass, G., Poralla, K. and Zähler, H. 1969. Effect of the antibiotic Borrelidin on the regulation of threonine biosynthetic enzymes in *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **34**: 54-91.

Nathanson, L. and Deutscher, M.P. 2000. Active aminoacyl-tRNA synthetases are present in nuclei as a high molecular weight multienzyme complex [In Process Citation]. *J Biol Chem* **275**: 31559-31562.

Negrutskii, B.S., Shalak, V.F., Kerjan, P., El'skaya, A.V. and Mirande, M. 1999. Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1 alpha in the complex with EF-1H. *J Biol Chem* **274**: 4545-4550.

Nesbitt, J.A. and Lennarz, W.J. 1968. Participation of aminoacyl transfer ribonucleic acid in aminoacylphosphatidylglycerol synthesis. (I) Specificity of lysyl phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* **243**: 3088-3095.

Nett, J., Schagger, H. and Trumppower, B. 1998. Processing of the presequence of the *Schizosaccharomyces pombe* Rieske iron-sulfur protein occurs in a single step and can be converted to two-step processing by mutation of a single proline to serine in the presequence. *J Biol Chem* **273**: 8652-8658.

Nett, J. and Trumpower, B. 1996. Dissociation of import of the Rieske iron-sulfur protein into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria from proteolytic processing of the presequence. *J Biol Chem* **271**: 26713-26716.

Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annual Rev Biochem* **66**: 863-917.

Neupert, W. and Herrmann, J.M. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 723-749.

Ng, J.D., Sauter, C., Lorber, B., Kirkland, N., Arnez, J. and Giegé, R. 2002. Comparative analysis of space-grown and earth-grown crystals of an aminoacyl-tRNA synthetase: space-grown crystals are more useful for structural determination. *Acta Cryst* **D58**: 645-652.

O

O'Hanlon, T.P. and Miller, F.W. 2002. Genomic organization, transcriptional mapping, and evolutionary implications of the human bi-directional histidyl-tRNA synthetase locus (HARS/HARSL). *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 609-614.

Oberst, A., Bender, C. and Green, D.R. 2008. Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death Differ* **15**: 1139-1146.

Ogilvie, A., Wiebauer, K. and Kersten, W. 1975. Inhibition of leucyl-transfer ribonucleic acid synthetase. *Biochem J* **152**: 511-515.

Otani, A., Slike, B.M., Dorrell, M.I., Hood, J., Kinder, K., Ewalt, K.L., Cheresch, D., Schimmel, P. and Friedlander, M. 2002. A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 178-183.

P

Paetz, W. and Nass, G. 1973. Biochemical and immunological characterization of threonyl-tRNA synthetase of two borrelidin-resistant mutants of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* **35**: 331-337.

Park, S.G., Ewalt, K.L. and Kim, S. 2005. Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends Biochem Sci* **30**: 569-574.

Park, S.G., Schimmel, P. and Kim, S. 2008. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 11043-11049.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. and Ruvkun, G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**: 86-89.

- Paukstelis, P.J., Coon, R., Madabusi, L., Nowakowski, J., Monzingo, A., Robertus, J. and Lambowitz, A.M. 2005. A tyrosyl-tRNA synthetase adapted to function in group I intron splicing by acquiring a new RNA binding surface. *Molecular Cell* **17**: 417-428.
- Paukstelis, P.J., Coon, R., Madabusi, L., Nowakowski, J., Monzingo, A., Robertus, J. and Lambowitz, A.M. 2007. A tyrosyl-tRNA synthetase adapted to function in group I intron splicing by acquiring a new RNA binding surface. *Mol Cell* **17**: 417-428.
- Pavlov, P., Rudhe, C., Bhushan, S. and Glaser, E. 2007. In vitro and in vivo protein import into plant mitochondria. *Methods Mol Biol* **372**: 297-314.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A. and Saccone, C. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol* **48**: 427-434.
- Pfanner, N. and Geissler, A. 2001. Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 339-349.
- Poirot, O., O'Toole, E. and Notredame, C. 2003. Tcoffee@igs: a web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res* **31**: 3503-3506.
- Poirot, O., Suhre, K., Abergel, C., O'Toole, E. and Notredame, C. 2004. 3DCoffee@igs: a web server for combining sequences and structures into multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* **32**: W37-W40.
- Popadin, K.Y., Mamirova, L.A. and Kondrashov, F.A. 2007. A manually curated database of tetrapod mitochondrially encoded tRNA sequences and secondary structures. *BMC Bioinformatics* **8**: 441.
- Pope, A., McVey, M., Fantom, K. and Moore, K. 1998. Effects of substrate and inhibitor binding on proteolysis of isoleucyl-tRNA synthetase from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **273**: 31702-31706.
- Poterszman, A., Delarue, M., Thierry, J.-C. and Moras, D. 1994. Synthesis and recognition of aspartyl-adenylate by *Thermus thermophilus* aspartyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **244**: 158-167.
- Praetorius-Ibba, M., Hausmann, C., Paras, M., Rogers, T. and Ibba, M. 2007. Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **282**: 3680-3687.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B. and Rådmark, O. 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* **21**: 5864-5874.
- Pujol, C., Bailly, M., Kern, D., Maréchal-Drouard, L., Becker, H.D. and Duchêne, A.M. 2008. Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNAGln synthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 6481-6485.

- Pujol, C., Maréchal-Drouard, L. and Duchêne, A.M. 2007. How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J Mol Biol* **369**: 356-367.
- Putney, S.D. and Schimmel, P. 1981. An aminoacyl-tRNA synthetase bind to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. *Nature* **291**: 632-635.
- Pütz, J., Dupuis, B., Sissler, M. and Florentz, C. 2007. Mamit-tRNA, a database of mammalian mitochondrial tRNA primary and secondary structures. *RNA* **13**: 1184-1190.
- Pütz, J., Puglisi, J.D., Florentz, C. and Giegé, R. 1991. Identity elements for specific aminoacylation of yeast tRNA^{Asp} by cognate aspartyl-tRNA synthetase. *Science* **252**: 1696-1699.
- Putzer, H., Grunberg-Manago, M. and Springer, M. 1995a. Bacterial Aminoacyl-tRNA synthetases: Genes and regulation of expression. In: Söll D., and RajBhandary U.L., eds. *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. Press. pp 293-333.
- Putzer, H., Laalami, S., Brakhage, A.A., Condon, C. and Grunberg-Manago, M. 1995b. Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth rate regulation. *Mol Microbiol* **16**: 709-718.

Q

- Quevillon, S., Robinson, J.-C., Berthonneau, E., Siatecka, M. and Mirande, M. 1999. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: Identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J Mol Biol* **285**: 183-195.

R

- Rapaport, D. 2003. Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep* **4**: 948-952.
- Reed, V.S., Wastney, M.E. and Yang, D.C. 1994. Mechanisms of the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem* **269**: 32932-32936.
- Rees, B., Webster, G., Delarue, M., Boeglin, M. and Moras, D. 2000. Aspartyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: flexibility and adaptability to the substrates. *J Mol Biol* **299**: 1157-1164.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.-A.T., Alfonzo, J.D. and Söll, D. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes and Development* **19**: 583-592.

- Roberts, W.S.L., Petit, J.F. and Strominger, J.L. 1968a. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VIII. Specificity in the utilisation of L-alanyl transfer ribonucleic acid for inter-peptide bridge synthesis in *arthrobacter crystallopoietes*. *J Biol Chem* **243**: 768-772.
- Roberts, W.S.L., Strominger, J.L. and Söll, D. 1968b. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VI. Incorporation of L-threonine into interpeptide bridges in *Micrococcus roseus*. *J Biol Chem* **243**: 749-756.
- Rohrer, S. and Berger-Bächi, B. 2003. FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 837-846.
- Rokov-Plavec, J., Dulic, M., Duchêne, A.M. and Weygand-Durasevic, I. 2008. Dual targeting of organellar seryl-tRNA synthetase to maize mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell Rep* **27**: 1157-1168.
- Romby, P., Caillet, J., Ebel, C., Sacerdot, C., Graffe, M., Eyermann, F., Brunel, C., Moine, H., Ehresmann, C., Ehressman, B. and Springer, M. 1996. The expression of *E. coli* threonyl-tRNA synthetase is regulated at the translational level by symmetrical operator-repressor interactions. *EMBO J* **15**: 5976-5987.
- Romby, P., Moras, D., Bergdoll, M., Dumas, P., Vlassov, V.V., Westhof, E., Ebel, J.-P. and Giegé, R. 1985. Yeast tRNA^{Asp} tertiary structure in solution and areas of interaction of the tRNA with aspartyl-tRNA synthetase. A comparative study of the yeast phenylalanine system by phosphate alkylation experiments with ethylnitrosourea. *J Mol Biol* **184**: 455-471.
- Romby, P. and Springer, M. 2003. Bacterial translational control at atomic resolution. *Trends Genet* **19**: 155-161.
- Rost, B., Yachdav, G. and Liu, J. 2004. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* **32**.
- Roy, H., Becker, H.D., Reinbolt, J. and Kern, D. 2003. When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9837-9842.
- Roy, M.D., Wittenhagen, L.M. and Kelley, S.O. 2005. Structural probing of a pathogenic tRNA dimer. *RNA* **11**: 254-260.
- Rudinger, J., Puglisi, J.D., Pütz, J., Schatz, D., Eckstein, F., Florentz, C. and Giegé, R. 1992. Determinant nucleotides of yeast tRNA^{Asp} interact directly with aspartyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5882-5886.
- Ruff, M., Boeglin, M., Cavarelli, J., Krishnaswamy, S., Mitschler, A., Podjarny, A., Poterszman, A., Rees, B., Thierry, J.-C. and Moras, D. 1992. The crystal structure of yeast tRNA^{Asp} complexed with its cognate synthetase; functional relevance to class II aminoacyl-tRNA synthetase. In: Sarma R.H., and Sarma M.H., eds. *Structure and Function*: Adenine Press. pp 159-168.

Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J.C. and Moras, D. 1991. Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: Crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Asp}. *Science* **252**: 1682-1689.

Ryckelynck, M., Giegé, R. and Frugier, M. 2003. Yeast tRNA^{Asp} charging accuracy is threatened by the N-terminal extension of aspartyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **278**: 9683-9690.

S

Sachs, A., Sarnow, P. and Hentze, M. 1997. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* **89**: 831-838.

Salazar, J.C., Ambrogelly, A., Crain, P.F., McCloskey, J.A. and Söll, D. 2004. A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7536-7541.

Sali, A. and Blundell, T.L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779-815.

Salinas, T., Duchêne, A.M., Delage, L., Nilsson, S., Glaser, E., Zaepfel, M. and Maréchal-Drouard, L. 2006. The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 18362-18367.

Salinas, T., Duchêne, A.M. and Maréchal-Drouard, L. 2008. Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci* **33**: 320-329.

Salinas, T., Schaeffer, C., Maréchal-Drouard, L. and Duchêne, A.M. 2005. Sequence dependence of tRNA(Gly) import into tobacco mitochondria. *Biochimie* **87**: 863-872.

Sauter, C., Lorber, B., Cavarelli, J., Moras, D. and Giegé, R. 2000. The free yeast aspartyl-tRNA synthetase differs from the tRNA^{Asp}-complexed enzyme by structural changes in the catalytic site, hinge region, and anticodon binding domain. *J Mol Biol* **299**: 1313-1324.

Sauter, C., Lorber, B. and Giegé, R. 2002. Towards atomic resolution with crystals grown in gel: the case of thaumatin seen at room temperature. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **48**: 146-150.

Scheffler, I. 1999. *Mitochondria*. New-York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, INC., Publication.

Scheper, G.C., van der Klok, T., van Andel, R.J., van Berkel, C.G., Sissler, M., Smet, J., Muravina, T.I., Serkov, S.V., Uziel, G., Bugiani, M., Schiffmann, R., Krageloh-Mann, I., Smeitink, J.A., Florentz, C., Coster, R.V., Pronk, J.C. and van der Knaap, M.S. 2007. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* **39**: 534-539.

- Schimmel, P., Giegé, R., Moras, D. and Yokoyama, S. 1993. An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8763-8768.
- Schimmel, P. and Söll, D. 1979. Aminoacyl-tRNA synthetases: General features and recognition of transfer RNAs. *Annu Rev Biochem* **48**: 601-648.
- Schimmel, P., Tao, J. and Hill, J. 1998. Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new anti-infectives. *FASEB J* **12**: 1599-1609.
- Schimmel, P. and Wang, C.-C. 1999. Getting tRNA synthetases into the nucleus. *Trends Biochem Sci* **24**: 127-128.
- Schmitt, E., Moulinier, L., Fujiwara, S., Imanaka, T., Thierry, J.-C. and Moras, D. 1998. Crystal structure of aspartyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD: archeon specificity and catalytic mechanism of adenylate formation. *EMBO J* **17**: 5227-5237.
- Schneider, A. 1996. Cytosolic yeast tRNA^{His} is covalently modified when imported into mitochondria of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* **24**: 1225-1228.
- Schneider, A. and Maréchal-Drouard, L. 2000. Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol* **10**: 509-513.
- Schön, A., Krupp, A., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, G. and Söll, D. 1986. The tRNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* **322**: 281-284.
- Schray, B. and Knippers, R. 1991. Binding of human glutaminyl-transfer RNA synthetase to a specific site of its messenger RNA. *Nucleic Acids Res* **19**: 5307-5312.
- Seneca, S., Goemans, N., Van Coster, R., Givron, P., Reybrouck, T., Sciot, R., Meulemans, A., Smet, J. and Van Hove, J.L. 2005. A mitochondrial tRNA aspartate mutation causing isolated mitochondrial myopathy. *Am J Med Genet A* **137**: 170-175.
- Shapira, A.H.V. 2006. Mitochondrial disease. *The Lancet* **368**: 70-82.
- Sharma, M.R., Koc, E.C., Datta, P.P., Booth, T.M., Spremulli, L.L. and Agrawal, R.K. 2003. Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* **115**: 97-108.
- Shiba, K., Schimmel, P., Motegi, H. and 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. and Watanabe, K. 2001. Dual mode of recognition of two isoacceptor tRNAs by mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **276**: 46770-46778.

- Shin, S.H., Kim, H.S., Jung, S.H., Xu, H.D., Jeong, Y.B. and Chung, Y.J. 2008. Implication of leucyl-tRNA synthetase 1 (LARS1) over-expression in growth and migration of lung cancer cells detected by siRNA targeted knock-down analysis. *Exp Mol Med* **40**: 229-236.
- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M. and 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.
- Sissler, M., Delorme, C., Bond, J., Ehrlich, S.D., Renault, P. and Francklyn, C. 1999. An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic role in histidine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8985-8990.
- Sissler, M., Helm, M., Frugier, M., Giegé, R. and Florentz, C. 2004. Aminoacylation properties of pathology-related variants of human mitochondrial tRNA^{Lys} variants. *RNA* **10**: 841-853.
- Sissler, M., Lorber, B., Messmer, M., Schaller, A., Pütz, J. and Florentz, C. 2008. Handling mammalian mitochondrial tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases for functional and structural characterization. *Methods (Special issue on « Aminoacyl-tRNA synthesis »)* **44**: 176-189.
- Sissler, M., Pütz, J., Fasiolo, F. and Florentz, C. 2005. Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. In: Ibba M., Francklyn C., and Cusack S., eds. *Aminoacyl-tRNA synthetases*. Georgetown, TX: Landes Biosciences. pp 271-284.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F. and Lurin, C. 2004. Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* **4**: 1581-1590.
- Smeitink, J.A., Elpeleg, O., Antonicka, H., Diepstra, H., Saada, A., Smits, P., Sasarman, F., Vriend, G., Jacob-Hirsch, J., Shaag, A., Rechavi, G., Welling, B., Horst, J., Rodenburg, R.J., van den Heuvel, B. and Shoubbridge, E.A. 2006. Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am J Hum Genet* **79**: 869-877.
- Sohm, B., Frugier, M., Brulé, H., Olszak, K., Przykorska, A. and Florentz, C. 2003. Towards understanding human mitochondrial leucine aminoacylation identity. *J Mol Biol* **328**: 995-1010.
- Söll, D. 1993. Transfer RNA - an RNA for all seasons. In: Gesteland R., and Atkins J., eds. *The RNA World*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 157-184.
- Söll, D. and RajBhandary, U.L. 1995. *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. Press.
- Spencer, A., Heck, A., Takeuchi, N., Watanabe, K. and Spremulli, L. 2004. Characterization of the human mitochondrial methionyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **43**: 9743-9754.

- Springer, M., Graffe, M., Butler, J.S. and Grunberg-Manago, M. 1986. Genetic definition of the translational operator of the threonine tRNA ligase gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 4384-4388.
- Sprinzi, M. and Vassilenko, K.S. 2005. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res* **33**: D139-D140.
- Srivastava, S. and Moraes, C.T. 2001. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum Mol Genet* **10**: 3093-3099.
- Suen, D.F., Norris, K.L. and Youle, R.J. 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* **22**: 1577-1590.
- Suzuki, H., Ueda, T., Taguchi, H. and Takeuchi, N. 2007. Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu. *J Biol Chem* **282**: 4076-4084.
- Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K. and 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.

T

- Tanaka, K., Tamaki, M. and Watanabe, S. 1969. Effect of furanomycin on the synthesis of isoleucyl-tRNA. *Biochim Biophys Acta* **195**: 244-245.
- Tanaka, M., Ino, H., Ohno, K., Hattori, K., Sato, W., Ozawa, T., Tanaka, T. and Itoyama, S. 1990. Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. *Lancet* **336**: 1452.
- Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R.P. 1995a. An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *J Mol Biol* **245**: 315-323.
- Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R.P. 1995b. Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J* **14**: 3461-3471.
- Tarassov, I.A. and Entelis, N.S. 1992. Mitochondrially-imported cytoplasmic tRNA^{Lys}(CUU) of *Saccharomyces cerevisiae*: *in vivo* and *in vitro* targeting systems. *Nucleic Acid Res* **20**: 1277-1281.
- Tarassov, I.A. and 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. and Ghosh, S.S. 2003. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotech* **21**: 281-286.

- Tolkunova, E., Park, H., Xia, J., King, M.P. and 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.
- Tolstrup, A.B., Bejder, A., Fleckner, J. and Justesen, J. 1995. Transcriptional regulation of the Interferon- γ -inducible tryptophanyl-tRNA synthetase includes alternative splicing. *J Biol Chem* **270**: 397-403.
- Torchilin, V.P. 2006. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng* **8**: 843-875.
- Torres-Larios, A., Dock-Bregeon, A.-C., Romby, P., Rees, B., Sankaranarayanan, R., Caillet, J., Springer, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Moras, D. 2002. Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase. *Nature Struct Biol* **9**: 343-347.
- Tumbula, D.L., Becker, H.D., Chang, W.Z. and Söll, D. 2000. Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature* **407**: 106-110.

V

- Valente, L., Tiranti, V., Marsano, R.M., Malfatti, E., E., F.-V., Donnini, C., Mereghetti, P., De Gioia, L., Burlina, A., Castellan, C., Comi, G.P., Savasta, S., Ferrero, I. and Zeviani, M. 2007. Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet* **80**: 44-58.
- Van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Hönlinger, A. and Pfanner, N. 1999. Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* **401**: 485-489.
- Varshavsky, A. 1992. The N-end rule. *Cell* **69**: 725-735.
- Venter, J.C.E.A. 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.
- Voytas, D.F. and Boeke, J.D. 1993. Yeast retrotransposons and tRNAs. *TIG* **9**: 421-427.

W

- Wakasugi, K., Nakano, T. and Morishima, I. 2005. Oxidative stress-responsive intracellular regulation specific for the angiostatic form of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **44**: 225-232.
- Wakasugi, K. and 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. and Schimmel, P. 2002a. Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **277**: 20124-20126.
- Wakasugi, K., Slike, B.M., Hood, J., Otani, A., Ewalt, K.L., Friedlander, M., Cheresch, D.A. and Schimmel, P. 2002b. A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 173-177.
- Wakita, K., Watanabe, Y.-I., Yokogawa, T., Kumazawa, Y., Nakamura, S., Ueda, T., Watanabe, K. and Nishikawa, K. 1994. Higher-order structure of bovine mitochondrial tRNA^{Phe} lacking the 'conserved' GG and TΨCG sequences as inferred by enzymatic and chemical probing. *Nucleic Acids Res* **22**: 347-353.
- Wallace, D.C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**: 1482-1488.
- Wang, Z., Xiang, L., Shao, J. and Yuan, Z. 2006. The 3' CCACCA sequence of tRNA^{Ala}(UGC) is the motif that is important in inducing Th1-like immune response, and this motif can be recognized by Toll-like receptor 3. *Clin Vaccine Immunol* **13**: 733-739.
- Wek, R.C., Jackson, B.M. and Hinnebusch, A.G. 1989. Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetase in GCN2 protein suggests a mechanism of coupling GCN4 expression to amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4579-4583.
- Werner, R., Thorpe, L., Reuter, W. and Nierhaus, K. 1976. Indolmycin inhibits prokaryotic tryptophanyl-tRNA ligase. *Eur J Biochem* **68**: 1-3.
- Westhof, E., Dumas, P. and Moras, D. 1985. Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA. *J Mol Biol* **184**: 119-145.
- Wiedemann, N., Frazier, A.E. and Pfanner, N. 2004. The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 14473-14476.
- Wittenhagen, L.M. and Kelley, S.O. 2002. Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nat Struct Biol* **9**: 586-590.
- Wittenhagen, L.M. and Kelley, S.O. 2003. Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *TIBS* **28**: 605-611.
- Wittenhagen, L.M., Roy, M.D. and Kelley, S.O. 2003. The pathogenic U3271C human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation disrupts a fragile anticodon stem. *Nucleic Acid Res* **31**: 596-601.
- Wolf, Y.I., Aravind, L., Grishin, N.V. and Koonin, E.V. 1999. Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases--analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* **9**: 689-710.

Wolfe, C.L., Warrington, J.A., Davis, S., Green, S. and Norcum, M.T. 2003. Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII. *Protein Sci* **12**: 228-2290.

X

Xie, W., Schimmel, P. and Yang, X.L. 2006. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a native human tRNA synthetase whose allelic variants are associated with Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**: 1243-1246.

Y

Yang, J.L., Weissman, L., Bohr, V.A. and Mattson, M.P. 2008. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. *DNA Repair* **7**: 1110-1120.

Yang, M.Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H.T. and Holt, I.J. 2002. Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* **111**: 495-505.

Yao, Y.N., Wang, L., Wu, X.F. and Wang, E.D. 2003. The processing of human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase in the insect cells. *FEBS Lett* **534**: 139-142.

Yasukawa, T., Hino, N., Suzuki, T., Watanabe, K., Ueda, T. and Ohta, S. 2000a. A pathogenic point mutation reduces stability of mitochondrial mutant tRNA^{Ile}. *NAR* **28**: 3779-3784.

Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S. and 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., Ishii, N., Ueda, T., Ohta, S. and Watanabe, K. 2000b. Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA^{Lys} with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett* **467**: 175-178.

Yasukawa, T., Suzuki, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S. and Watanabe, K. 2000c. 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.

Yokogawa, T., Shimada, N., Takeuchi, N., Benkowski, L., Suzuki, T., Omori, A., Ueda, T., Nishikawa, K., Spemulli, L.L. and Watanabe, K. 2000. Characterization and tRNA recognition of mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **275**: 19913-19920.

Yokogawa, T., Watanabe, Y., Kumazawa, Y., Ueda, T., Hirao, I., Miura, K. and Watanabe, K. 1991. A novel cloverleaf structure found in mammalian mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)}. *Nucleic Acids Res* **19**: 6101-6105.

Young, J.C., Hoogenraad, N.J. and Hartl, F.U. 2003. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**: 41-50.

Z

Zeviani, M. and Carelli, V. 2003. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* **16**: 585-594.

Zhu, S., Sobolev, A.Y. and Wek, R.C. 1996. Histidyl-tRNA synthetase-related sequences in GCN2 protein kinase regulate in vitro phosphorylation of eIF-2. *J Biol Chem* **271**: 24989-24994.

Zhu, S. and Wek, R.C. 1998. Ribosome-binding domain of eukaryotic initiation factor-2 kinase GCN2 facilitates translation control. *J Bio Chem* **273**: 1808-1814.

Résumé

La traduction permet l'expression de l'information génétique portée par l'ADN en protéines, et repose en partie sur l'amination spécifique des ARN de transfert (ARNt) par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS). Peu de choses sont connues concernant les systèmes d'amination mitochondriaux (mt) de mammifères qui sont la cible de mutations engendrant de nombreuses pathologies. Ainsi, le travail de cette thèse s'inscrit dans l'étude structurale et fonctionnelle du système d'aspartylation mt humain et des impacts moléculaires de mutations pathologiques ciblant l'ARNt^{Asp} et l'AspRS mt humains.

Dans une première partie, la structure en solution de l'ARNt^{Asp} mt humain (soit natif, soit transcrit *in vitro*) a été établie à l'aide de sondes structurales. Ceci a permis de définir le réseau d'interactions tertiaires sous-jacent à sa structure 3D (**Article 1**) et de montrer que la mutation pathologique A7526G (A9G) affecte l'interaction triple 9-[12-23] entraînant aussi une perte de l'efficacité d'aspartylation par l'AspRS mt humaine (**Article 2**). Cette étude a été étendue à l'influence des éléments d'identité du système d'aspartylation sur la structure de l'anticodon (**Article 3**). Dans une deuxième partie, l'inhibition de l'activité de l'AspRS mt humaine de type procaryote par des analogues d'adénylate a été étudiée et a montré que cette enzyme est plus fortement inhibée par ces molécules que les AspRS eubactériennes (**Article 4**). La troisième partie est dédiée, d'une part, à la mise en place d'outils nécessaires à la caractérisation de l'extrémité N-terminale de l'AspRS mt humaine et de ses partenaires protéiques. D'autre part, nous avons décrit le premier produit d'épissage alternatif de l'AspRS, exprimé dans les mitochondries humaines. Malheureusement, les nombreuses tentatives entreprises de sur-expression de cette protéine sont restées infructueuses. Plusieurs hypothèses de gain ou de perte de fonctions du variant d'épissage par rapport à l'AspRS mt native sont proposées (**Article 5**). Enfin, dans la dernière partie, nous avons montré qu'une mutation pathologique (S45G) localisée dans le signal d'adressage mt théorique de l'AspRS affecte sa maturation. Cette étude a aussi montré la relocalisation de l'AspRS au niveau de la membrane mt interne (**Article 6**). J'ai également participé à la rédaction d'une revue présentant les différentes techniques d'étude et les difficultés intrinsèques aux ARNt et aaRS mt de mammifères (**Article 7**). Ces travaux ouvrent de nombreuses nouvelles perspectives tant pour la compréhension des propriétés physico-chimiques et la caractérisation des relations structure/fonction des systèmes d'amination mt humains *in vitro*, que pour la connaissance de ces systèmes *in vivo*, en lien ou non avec des pathologies.

Mots clés : ARNt, aminoacyl-ARNt synthétase, mitochondrie, synthèse protéique, structure, inhibiteurs, épissage, adressage mitochondrial, pathologies mitochondriales