



HAL
open science

**Etude de nouveaux aspects liés à la machinerie
traductionnelle : amidotransférases et aminoacyl-ARNt
synthétases.**

Bruno Senger

► **To cite this version:**

Bruno Senger. Etude de nouveaux aspects liés à la machinerie traductionnelle : amidotransférases et aminoacyl-ARNt synthétases.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2006. <tel-00270801>

HAL Id: tel-00270801

<https://theses.hal.science/tel-00270801v1>

Submitted on 7 Apr 2008

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

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



HAL Authorization

**Faculté de Sciences de la Vie de
Université Louis Pasteur de Strasbourg**

2006

Habilitation à Diriger des Recherches

**Etude de nouveaux aspects liés à la machinerie
traductionnelle : amidotransférases et aminocyl-tRNA
synthétases**

Présentée par :

SENGER Bruno

Chargé de recherche au C.N.R.S.

Architecture et Réactivité de l'ARN
Unité Propre de Recherche du CNRS n° 9002
IBMC
15, rue René Descartes
F- 67084 Strasbourg Cedex

Composition du Jury :

M. B. Lapeyre	Rapporteur externe
Mme C. Branlant	Rapporteur externe
M. R. Bordonné	Examineur externe
M. P. Carbon	Rapporteur interne
M. F. Fasiolo	Garant d'habilitation

Table des matières

CURRICULUM VITAE	1
Senger Bruno	1
Cursus universitaire (Université Louis Pasteur Strasbourg I)	1
Déroulement de carrière	2
Distinctions	3
Prix de Thèse ADRERUS 1996	3
Médaille de Bronze du CNRS 2002	3
Publications	3
Publications sans comité de lecture	5
Contribution à l'encadrement d'étudiants	6
Activité d'enseignement	6
Monitorat d'initiation à l'enseignement supérieur	6
Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (ATER)	7
Développement d'outils pédagogiques	7
TD de biochimie sur outil informatique :	7
La chromatographie de gel-filtration sur ordinateur	7
Activité de gestion de la recherche	8
Sociétés	8
Participation à l'obtention de financements	8
Microscopie à épifluorescence	8
Contrats ARC pour le projet Efl1p	9
RESUME DES TRAVAUX ET PROJET DE RECHERCHE	10
I. INTRODUCTION	12
II. LES INTERACTIONS ARNt-PROTEINE	14
1. Le complexe MetRS / ARNt ^{Met} de levure	14
2. Le complexe PheRS / ARNt ^{Phe} de mitochondrie de levure	17
3. Biosynthèse et rôle dans l'aminocyclation des bases modifiées Ψ et I des ARNt ^{lle} de levure	19
4. Commentaires annexes	21

III. LES ECHANGES NUCLEOCYTOPLASMIQUES CHEZ LA LEVURE	22
IV. ETUDES D'AMINOACYL-ARNt SYNTHETASES	26
1. Les MetRS cytoplasmique et mitochondriale de levure	26
2. Rôle de Arc1p dans la modulation de l'activité de la GluRS	28
V. LA BIOGENESE DES RIBOSOMES	32
1. Introduction	32
2. Efl1p, une GTPase impliquée dans la synthèse du 60S	36
3. L'absence d'Efl1p conduit à une hétérogénéité du centre GTPasique	39
4. Remarques annexes	43
VI. PROJETS	44
1. Introduction	44
2. Contexte du projet	46
3. L'aspect AdT : GatB et Yqey de levure	49
4. Vers une « intégration » de la synthèse protéique	56
VII. CONCLUSION	58
BIBLIOGRAPHIE	59
PUBLICATIONS	71

Curriculum Vitae

Senger Bruno

Né le 26 janvier 1968 à La Walck (67)

38 ans, marié, 3 enfants.

Situation militaire : service national accompli en 1991/92

Situation professionnelle actuelle : chargé de recherches 1^{ère} classe au C.N.R.S.

Adresse personnelle :

2, rue des alouettes

67350 Pfaffenhoffen

Tél : 03 88 07 04 95

Mél : B.Senger@free.fr

Adresse professionnelle :

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire

15, rue René Descartes

67084 Strasbourg Cedex

Tel. : 03 88 41 70 41

Fax : 03 88 60 22 18

Mél : B.Senger@ibmc.u-strasbg.fr

Cursus universitaire (Université Louis Pasteur Strasbourg I)

1995 - 1996 Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (fin de thèse)

1992 - 1995 Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire, mention très honorable
avec félicitations du jury.

1991 - 1992 Service national

1990 - 1991 DEA de Biologie Moléculaire et Cellulaire

1989 - 1990 Maîtrise de Biochimie

1988 - 1989 Licence de Biochimie

1986 - 1988 DEUG A2

Déroulement de carrière

- Depuis 1999 **En qualité de Chargé de Recherches CNRS**, travaux sur le rôle d'une nouvelle GTPase de type EF-2 impliquée dans la biogenèse des ribosomes. Contribution à l'étude des méthionyl-ARNt synthétases cytoplasmique et mitochondriale de levure. Travaux réalisés au sein de l'UPR 9002 dirigée par le Pr B. Ehresmann dans l'équipe du Dr F. Fasiolo.
- recruté en qualité de chargé de recherches 2^e classe stagiaire
 - avril 2001 : titularisé en qualité de chargé de recherche 2^e classe.
 - octobre 2002 : promu chargé de recherches 1^{ère} classe
 - janvier 2005 : Directeur de l'unité : Pr E. Westhof
 - juillet 2006 : rejoint l'équipe du Pr D. Kern
- 1996 - 1999 **Stage post-doctoral** à l'Université de Heidelberg dans le groupe du Pr E. Hurt. Travaux sur le rôle de MTR10 dans le transport nucléocytoplasmique chez la levure. Bourse Alexander von Humboldt et Financement de l'Université de Heidelberg
- 1995 - 1996 **Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche**, fin des travaux de thèse.
- 1992 - 1995 **Etudiant en thèse**, travaux sur la reconnaissance ARNt - protéine (aminoacyl-ARNt synthétases et enzyme de modification d'ARNt) dans l'équipe du Dr F. Fasiolo au sein de l'UPR 9002 dirigée par le Pr B. Ehresmann.
- 1991 - 1992 Service national
- 1990 - 1991 **Etudiant en D.E.A. de Biologie Moléculaire et Cellulaire**, travaux portant sur la reconnaissance ARNt^{Met} / MetRS de levure dans le Laboratoire de Biochimie I dirigé par le Pr J.P. Ebel dans l'équipe du Dr F. Fasiolo

Distinctions

Prix de Thèse ADRERUS 1996

L'ADRERUS (Association pour le Développement des Relations entre l'Economie et la Recherche auprès des Universités de Strasbourg et de l'Université de Haute Alsace) décerne chaque année un certain nombre de prix de thèses destinés à valoriser et à faire connaître les auteurs des travaux les plus remarquables soutenus au cours de l'année. Le Conseil Général du Bas-Rhin soutient cette action.

Médaille de Bronze du CNRS 2002

Rôle fonctionnel de la GTPase cytoplasmique Efl1p dans une phase tardive de maturation des sous-unités ribosomales 60S

Publications

P 18 Deletion of EFL1 results in heterogeneity of the 60S GTPase-associated rRNA conformation

Graindorge, J. S., Rousselle, J. C., **Senger, B.**, Lenormand, P., Namane, A., Lacroute, F. and Fasiolo, F.
J. Mol. Biol. (2005), 352, 355-369.

P 17 Role of Arc1p in the modulation of yeast Glutamyl-tRNA synthetase activity

Graindorge, J. S., **Senger, B.**, Tritch, D., Simos, G. and Fasiolo, F.
Biochemistry. (2005), 44, 1344-1352.

P 16 Ribosome assembly in eukaryotes

Fromont-Racine, M., **Senger, B.**, Saveanu, C. and Fasiolo, F.
Gene. (2003), 313, 17-42.

P 15 Functional analysis in yeast of the Brix protein superfamily involved in the biogenesis of ribosomes

Bogengruber, E., Briza, P., Doppler, E., Wimmer, H., Koller, L., Fasiolo, F. **Senger, B.**, Hegemann, J.H. and Breitenbach, M.
FEMS Yeast Res. (2003), 3, 35-43.

- P 14** The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis
Senger, B., Lafontaine, D.L., Graindorge, J.S., Gadal, O. Camasses, A., Sanni, A., Garnier, J.M., Breitenbach, M., Hurt, E. and Fasiolo, F.
Molecular Cell (2001), 8, 1363-1373.
- P 13** Yeast cytoplasmic and mitochondrial methionyl-tRNA synthetases : two structural frameworks for identical functions
Senger, B., Despons, L., Walter, P., Jakubowski, H. and Fasiolo, F.
J. Mol. Biol. (2001), 311, 205-216.
- P 12** Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA binding protein Npl3p
Senger, B., Simos, G., Bischoff, F.R., Podtelejnikov, A., Mann, M. and Hurt, E.
EMBO J. (1998), 17, 2196-2207.
- P 11** Structural requirements for enzymatic formation of threonylcarbamoyladenosine (t6A) in tRNA: an in vivo study with *Xenopus laevis* oocytes.
Morin, A., Auxilien, S., **Senger, B.**, Tewari, R. and Grosjean, H.
RNA (1998), 4, 24-37.
- P 10** The modified wobble base inosine in yeast tRNA^{Ile} is a positive determinant for aminoacylation by isoleucyl-tRNA synthetase.
Senger, B., Auxilien, S., Englisch, U., Cramer, F. and Fasiolo, F.
Biochemistry (1997), 36, 8269-8275.
- P 9** Importance of structural features for tRNA^{Met} identity
Senger, B., Aphasizhev, R. and Fasiolo, F.
RNA (1997), 3, 489-497.
- P 8** Yeast tRNA^{Met} recognition by methionyl-tRNA synthetase requires determinants from the primary, secondary and tertiary structure : A review
Senger, B. and Fasiolo, F.
Biochimie, (1996), 78, 597-604.
- P 7** Conservation in evolution for a small monomeric phenylalanyl-tRNA synthetase of the tRNA^{Phe} recognition nucleotides and initial aminoacylation site
Senger, B., Aphasizhev, R., Rengers, J.U., Sprinzl, M., Walter, P., Nussbaum, G. and Fasiolo, F.
Biochemistry, (1996), 35, 117-123.
- P 6** The presence of a D-stem but not of a T-stem is essential for triggering aminoacylation upon anticodon binding in yeast methionine tRNA

- Senger, B.**, Aphasizhev, R., Walter, P. and Fasiolo, F.
J. Mol. Biol., (1995), 249, 45-58.
- P 5** Intron-dependent formation of pseudouridines in the anticodon of *Saccharomyces cerevisiae* minor tRNA^{Ile}
Szweykowskakulinska, Z., **Senger, B.**, Keith, G., Fasiolo, F. and Grosjean, H.
EMBO J., (1994), 13, 4636-4644.
- P 4** Modulation of the suppression efficiency and amino acid identity of an artificial yeast amber isoleucine transfer RNA in *Escherichia coli* by a G-U pair in the anticodon stem
Buttcher, V., **Senger, B.**, Schumacher, S., Reinbolt, J. and Fasiolo, F.
Biochem. Biophys. Res. Commun., (1994), 200, 370-377.
- P 3** The anticodon triplet is not sufficient to confer methionine acceptance to a transfer RNA
Senger, B., Despons, L., Walter, P. and Fasiolo, F.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 10768-10771.
- P 2** Binding of the yeast tRNA^{Met} anticodon by the cognate methionyl-tRNA synthetase involves at least two independent peptide regions
Despons, L., **Senger, B.**, Fasiolo, F. and Walter, P.
J. Mol. Biol. (1992) 225, 897-907.
- P 1** Identification of potential amino acid residues supporting anticodon recognition in yeast methionyl-tRNA synthetase
Despons, L., Walter, P., **Senger, B.**, Ebel, J.P. and Fasiolo, F.
FEBS Lett.ers (1991) 289, 217-220.

Publications sans comité de lecture

Structural and kinetic bases for the recognition of tRNA^{Met} by yeast methionyl-tRNA synthetase

Walter, P., Despons, L., **Senger, B.** and Fasiolo, F.

In *Supramolecular structure and Function*, edited by Greta Pifat. Balaban Publishers and Ordentlich Publishers, (1994), 133-147.

Intron-dependent formation of pseudouridines in the anticodon of a minor *Saccharomyces cerevisiae* tRNA^{Ile}

Senger, B., Szweykowska-Kulinska, Z., Keith, G., Simon, C., Fasiolo, F. and Grosjean, H.

Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique, 1994, 102, B91.

Enzymatic formation of threonyl-carbamoyl-adenosine (t6A) in the anticodon of eukaryotic tRNAs

Morin, A., **Senger, B.**, Auxilien, S. and Grosjean, H.

Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique, 1995, 103, B76.

Contribution à l'encadrement d'étudiants

Gommenginger Claudine :

« Analyse génétique du rôle d'une modification de base en position "wobble" de l'ARNt^{lle} mineur de levure » - DEA de Biologie Moléculaire et Cellulaire (1995).

Schmelzl Birgit :

Technicienne qui m' a été attribuée par le Pr E. Hurt pendant la dernière année de mon stage post-doctoral à l'Université de Heidelberg. Cette personne a entrepris un travail de thèse après mon départ puisqu'elle était titulaire du diplôme allemand équivalent du DEA. (1998/99)

Graindorge Jean-Sébastien :

« Biogenèse de la sous-unité 60 S de levure : rôle de la GTPase Efl1p dans le recyclage du facteur nucléolaire Tif6p » - DEA de Biologie Moléculaire et Cellulaire (2000) et en thèse (2001-2004).

Activité d'enseignement

Monitorat d'initiation à l'enseignement supérieur

Années universitaires 1992/93, 1993/94 et 1994/95

Travaux pratiques et dirigés de Biochimie en deuxième année de DEUG

- Université Louis Pasteur de Strasbourg

- Tuteur pédagogique : Pr. G. THOLEY

Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (ATER)

Année universitaire 1995/96

Travaux pratiques de Génétique Formelle en licence de Biochimie

- Université Louis Pasteur de Strasbourg

- Responsable : Pr. S. POTIER

Développement d'outils pédagogiques

TD de biochimie sur outil informatique :

Année universitaire 1994/95

Suite à une journée de formation dans le cadre du monitorat, Mme Kirsch (Professeur en chimie) et M. Faerber (Responsable du centre d'autoformation de l'ULP) nous ont montré brièvement ce qu'était le centre d'autoformation de l'ULP. Devant la lacune manifeste dans le domaine de la biochimie, un autre moniteur et moi-même avons décidé de créer un TD de biochimie sur outil informatique.

Année universitaire 1995/96

Le produit que nous avons créé et qui avait été accueilli favorablement par les étudiants, a été enrichi en exercices et mis à la disposition des étudiants de 2e année de DEUG de biologie en mars 1996. En concertation avec M. Faerber, j'ai amélioré ce didacticiel de sorte que n'importe qui puisse l'enrichir en exercices et utiliser le dictionnaire intégré.

La chromatographie de gel-filtration sur ordinateur

Années universitaires 1996/97 et 1997/98

Ce projet a été réalisé en collaboration avec Hubert Becker (moniteur en thèse chez le Pr Daniel Kern, ULP) lorsque nous avons constaté les difficultés des étudiants à comprendre cette technique biochimique. Ce logiciel traite les points suivants : principe de la gel-filtration, montage de la colonne, déroulement d'une expérience,

matrices utilisées, exploitation des données, exercices. Si le contenu de ce logiciel a été validé par le Pr Kern, la forme a été critiquée par R. Faerber. Nous en avons donc complètement remanié l'interface, la présentation tout en enrichissant le côté interactif. Cette deuxième version a convaincu R. Faerber, et suite à de petites corrections, ce produit est maintenant disponible au Centre d'Autoformation de l'ULP depuis janvier 1998.

Activité de gestion de la recherche

- 1999 - 2003: co-gestion du stock d'enzymes de restrictions de l'UPR et négociation des tarifs
- depuis 2003 : gestion du stock d'enzymes de restrictions de l'UPR et négociation des tarifs
- printemps 2001 : participation à l'organisation du XXVIIIe Forum des Jeunes Chercheurs qui s'est tenu à Strasbourg du 3 au 7 septembre 2001.

Sociétés

Membre de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire depuis 1995

Participation à l'obtention de financements

Microscopie à épifluorescence

La concrétisation des travaux sur Efl1p devait passer par des études de localisation cellulaire de diverses molécules. Si mon stage post-doctoral m'a permis de mettre en œuvre cette technique de façon routinière, cela était matériellement impossible dans l'équipe du Dr F. Fasiolo. J'ai donc saisi l'opportunité d'un appel d'offres du Conseil Scientifique de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg I pour rédiger une demande de crédits pour l'achat d'équipements complémentaires pour équiper un microscope en épifluorescence avec une caméra digitale couleur et une station de traitement d'images. Si cet achat était très important pour mener à bien nos projets

de recherche, il avait également un aspect fédérateur puisque d'autres projets développés au sein de notre UPR nécessitaient une telle acquisition. Ce matériel a depuis été mis en service multi-utilisateur au sein de notre unité. Il a été financé à hauteur de 50% par l'appel d'offres, la somme restante étant prise sur le budget de l'UPR.

Contrats ARC pour le projet Efl1p

Les travaux menés dans l'équipe du Dr F. Fasiolo étaient déjà soutenus par des financements de l'ARC à mon arrivée dans le laboratoire. Au cours des dernières années, j'ai participé à la rédaction de deux demandes de subvention fixe à cet organisme en me consacrant plus particulièrement à la partie « plan de recherche ». Ces demandes ont été couronnées de succès.

Résumé des travaux et projet de recherche

Mes divers thèmes de recherche concernent la traduction qui, au sens large du terme, peut être considérée comme la production de biomolécules à rôle structural et/ou fonctionnel à partir de l'information contenue dans les gènes. Pour cela, la cellule met à profit toute une série de processus complexes (transcription, aminoacylation, biogenèses diverses, etc...) dont l'étude individuelle est en cours depuis plusieurs décennies.

Je me suis intéressé tout d'abord aux ARNs de transfert (ARNt) et à leur aminoacylation par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) ainsi qu'à la modification post-transcriptionnelle de certaines de leurs bases. En effet, l'ARNt est un acteur clé de la synthèse protéique car c'est de l'exactitude de son aminoacylation que dépend essentiellement la fidélité de la synthèse protéique.

L'un des systèmes d'aminocacylation que j'ai étudié est la reconnaissance de l'ARNt^{Met} par la MetRS de levure. Le groupe du Pr E. Hurt (Heidelberg) a identifié Arc1p, une protéine qui lie à la fois la MetRS et la GluRS mettant ainsi en évidence l'existence d'un lien entre la biogenèse des ARNts, leur transport du noyau vers le cytoplasme et leur aminoacylation donnant ainsi une première ébauche d'intégration des ARNts au niveau cellulaire. Fasciné par ce résultat et leurs méthodologies, j'ai réalisé un stage post-doctoral dans ce groupe. J'ai étudié le rôle de Mtr10p dans les échanges nucléocytoplasmiques chez la levure et un lien possible dans l'export des ARNts depuis le noyau.

Les acquis du stage post-doctoral m'ont été très utiles dans les travaux réalisés depuis mon recrutement au CNRS notamment en ce qui concerne l'étude d'Efl1p, une GTPase de type EF-2 impliquée dans une étape tardive (cytoplasmique) de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomale 60S.

Après m'être intéressé aux ARNts, à leur aminoacylation ainsi qu'au transport nucléocytoplasmique et à la synthèse du ribosome, un composant essentiel de l'usine traductionnelle, je compte maintenant étudier la localisation et l'interactome des aaRSs. En effet, la traduction de l'information génétique est un processus extrêmement complexe faisant intervenir de nombreux facteurs dans un ordre et à des moments précis soulignant par là même l'importance de la caractérisation de réseaux d'interactions ainsi que la localisation *in vivo* des divers protagonistes de la traduction. Si, dans l'étude de la

biogenèse des ribosomes, l'intégration du concept spatio-temporel est évidente, au moins chez les eucaryotes, il est également vrai que l'interrelation avec d'autres voies de biosynthèse (notamment les voies métaboliques) n'est pas à négliger vu que la production de sous-unités ribosomales représente une dépense énergétique majeure pour la cellule. En ce qui concerne les aaRSs, il est connu que chez les eucaryotes supérieurs elles forment des complexes de haut poids moléculaire comprenant pas moins de 9 aaRSs et 3 protéines non synthétasiques. Quel est l'intérêt de tels complexes ? Sont-ils localisés à proximité des ribosomes ? Interagissent-ils avec d'autres voies biochimiques ? Existe-t-il réellement une « canalisation » de la traduction ? Qu'advient-il des aaRSs non impliquées dans ces complexes ?

De nombreuses questions restent donc ouvertes quant à l'intégration totale du rôle des aaRSs dans la vie de la cellule. En effet, il n'est pas concevable que le couple ARNt/aaRS évolue de façon autonome dans la cellule mais il doit interagir / communiquer d'une part avec les acteurs directs de la synthèse protéique et, d'autre part, avec des facteurs intervenant dans d'autres processus cellulaires. Trouver, comprendre et étudier les spécificités de divers organismes fournira peut-être de nouvelles pistes à but thérapeutique restées insoupçonnées jusqu'alors.

Un autre aspect de mon projet, toujours relié aux aaRSs, traitera d'un système atypique de la machinerie traductionnelle qui est celui des voies de formation des aminoacyl-ARNts dans les systèmes asparagine et glutamine. En effet, un certain nombre d'organismes, pathogènes de l'homme, ne possèdent pas d' aminoacyl-ARNt synthétase (AsnRS, GluRS) pour l'un et/ou l'autre de ces acides aminés et pallient à cette absence par l'utilisation d'une voie indirecte pour la formation de ces aminoacyl-ARNts. L'étude de ces voies est non seulement intéressante sur les plans évolutifs et celui de la relation structure-fonction ARN-protéine mais également d'un point de vue appliqué, certes à plus long terme, dans le but d'enrayer ces voies de biosynthèse amenant ainsi des cibles alternatives pour des molécules de type antibiotique. Cet aspect est d'autant plus important qu'à l'heure actuelle apparaissent des phénomènes de résistance aux antibiotiques posant de vrais problèmes de santé publique.

I. Introduction

Mes activités de recherche sont centrées sur la traduction de l'information génétique chez la levure. Dans un premier temps, c'est l'ARNt qui a été au centre de mes préoccupations. En effet, il constitue un élément clé du processus de traduction car c'est lui qui, par le biais de l'interaction codon-anticodon, assure la correspondance entre un triplet de bases du message génétique et un acide aminé de la chaîne polypeptidique naissante (Crick, 1958). Donc, c'est essentiellement de la précision avec laquelle une aaRS aminoacyle son (ou ses) ARNt(s) homologue(s) que va dépendre la justesse de l'acide aminé incorporé dans une protéine en réponse à un codon donné (Chapeville et al., 1962). Dans certains cas, l'exactitude de cette reconnaissance peut-être modulée voire gouvernée par la présence de bases modifiées au niveau de l'ARNt (Björk, 1995 ; Dunin-Horkawicz et al., 2006). D'ailleurs, ces dernières peuvent également influencer le processus de traduction en jouant sur la spécificité de lecture d'un codon (Urbonavicius et al., 2001).

Si chez les procaryotes transcription et traduction ont lieu dans le même compartiment cellulaire et peuvent même se dérouler de façon concomitante (Miller et al., 1970), il n'en est pas de même chez les eucaryotes comme la levure. En effet, la séparation physique entre le matériel génétique et le lieu de la synthèse protéique implique la prise en considération des phénomènes d'échanges nucléocytoplasmiques (Becksei and Mattaj, 2005 ; Pemberton and Paschal, 2005) qui viennent ajouter un degré de complexité supplémentaire à la machinerie traductionnelle chez les eucaryotes. D'autre part, il est difficilement concevable que les divers protagonistes de la traduction existent à l'état totalement libre dans la cellule mais que, dans un souci d'efficacité, ils soient organisés le long de véritables « routes » laissant ainsi émerger l'idée d'une certaine canalisation (« channelling ») de la synthèse protéique.

Cette notion de canalisation est applicable non seulement aux ARNts mais semble être également d'actualité pour la biogenèse des ribosomes. Dans le premier cas, des liens directs ou indirects ont pu être mis en évidence entre la biosynthèse d'un ARNt (qui démarre dans le noyau et s'achève dans le cytoplasme) et son aminoacylation (Simos et al., 1996a ; Grosshans et al., 2000). En ce qui concerne la biogenèse des ribosomes une telle notion est plus facile à admettre vu que ce processus démarre dans le nucléole pour s'achever dans le cytoplasme et que des travaux ont montré que les sous-unités transitent

effectivement dans un ordre donné par des zones bien précises du noyau avant d'atteindre le cytoplasme (Gadal et al., 2002). Il est donc tout à fait raisonnable d'envisager l'existence d'une canalisation de la synthèse protéique où différentes voies de biogenèse utilisent des routes proches dont les interconnexions et les points d'ancrage restent encore à découvrir. En effet, les connaissances actuelles concernant divers processus composant la synthèse protéique sont de plus en plus affinées au niveau moléculaire mais leur intégration au niveau cellulaire ainsi que leurs interdépendances représentent encore un domaine d'investigations peu poussé à l'heure actuelle. Signalons néanmoins que des liens ont été trouvés entre la voie métabolique majeure que représente la biogenèse des ribosomes et la voie de signalisation TOR (Powers and Walter, 1999 ; Zaragoza et al., 1998).

De telles études sont maintenant grandement facilitées grâce à l'avènement de l'ère génomique et post-génomique combiné aux avancées considérables dans le domaine de la spectrométrie de masse. En effet, très peu de matériel suffit pour permettre l'identification des composants d'un complexe dont, de surcroît, les techniques de purification ont elles aussi bénéficié de grands progrès. Enfin, dans le cas des aaRSs, la génomique aura conduit à l'identification de voies atypiques d'aminocyclation dont l'étude semble très prometteuse tant d'un point de vue évolutif que sur le plan d'application à caractère thérapeutique.

II. Les interactions ARNt-protéine

Dans cette première partie, c'est le couple ARNt^{Met} / méthionyl-ARNt synthétase (MetRS) de levure qui a occupé une place centrale dans mes travaux de recherche. Cependant, les circonstances m'ont donné l'opportunité d'élargir le champ de mes investigations vers d'autres couples ARN / protéine (ARNt^{Ile} / enzyme de modification de base de l'anticodon / isoleucyl-ARNt synthétase (IleRS), ARNt^{Phe} / phenylalanyl-ARNt synthétase (PheRS)).

1. Le complexe MetRS / ARNt^{Met} de levure

Parallèlement à l'analyse des éléments d'identité de l'ARNt, nous avons testé, par mutagenèse dirigée, un modèle d'interaction (**Figure 1**) entre la MetRS de levure et l'ARNt^{Met}, plus particulièrement entre la protéine et l'anticodon (Despons et al., 1991). Nous avons ainsi montré que l'anticodon établit des contacts avec deux régions peptidiques distinctes à l'extrémité distale du domaine hélicoïdal C-terminal de la MetRS. Un des peptides renferme des résidus basiques hautement conservés dans toutes les MetRSs séquencées à ce jour, et dont la substitution entraîne surtout un effet au niveau de k_{cat} , et donc de l'étape de transition de la réaction d'aminocyclation (Despons et al., 1992).

Globalement tous les ARNts possèdent la même structure tertiaire mais il existe pour chacun d'entre eux des éléments structuraux qui par leur nature chimique et leur localisation dans la structure tertiaire constituent l'identité de l'ARNt (Giegé et al., 1998). Ainsi, dans le cas de l'ARNt^{Met} de levure, des substitutions au niveau de l'anticodon CAU ont révélé des changements de plusieurs ordres de grandeur des paramètres K_m et k_{cat} , soulignant ainsi le rôle majeur du triplet CAU dans la reconnaissance de l'ARNt^{Met} par la MetRS.

Des changements d'anticodon des ARNt^{Val} et ARNt^{Asp} de levure par le triplet CAU ne rendent pas ces ARNts aminocyclables par la MetRS de levure. La transformation des ARNt^{Asp} et ARNt^{Val} de levure en bons substrats pour la MetRS requiert, i) soit la boucle anticodon complète, ii) soit l'anticodon et la base discriminatrice. Un changement

d'identité optimal est obtenu par la transplantation simultanée de la boucle anticodon et du nucléotide A73 (Senger et al., 1992).

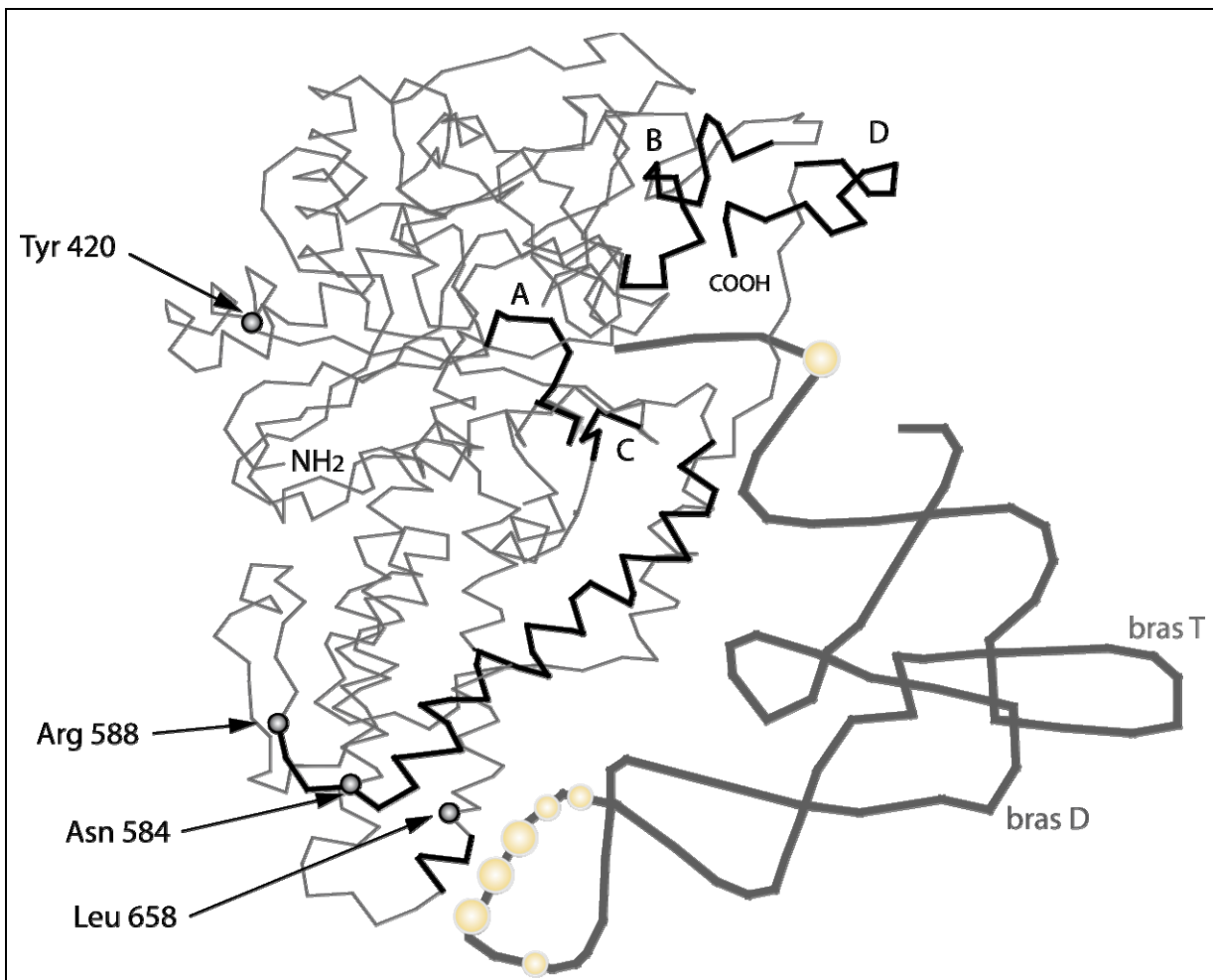


Figure 1 : Modèle du complexe MetRS-ARNt^{Meti} de levure

Juxtaposition du modèle de la MetRS de levure avec le squelette sucre-phosphate de l'ARNt^{Meti} de levure. Les séquences consensus HIGH (région A) et KMSKS (région B) sont indiquées. L'extrémité C-terminale (région D) se replie vers le domaine N-terminal, près d'une zone riche en cystéines (région B). Le bras accepteur plonge dans le site actif de l'enzyme et, les bases de l'anticodon sont spatialement proches de la Leu 658 (début de l'hélice H4') mais plus éloignées de l'Asn 584 (fin de l'hélice H1') et de l'Arg 588 (brin β S1'). Les boules jaunes sur l'ARNt représentent les positions des éléments d'identité.

A la lumière de nos résultats, nous comprenons pourquoi, chez *E. coli*, le seul changement d'anticodon, dans les ARNts non homologues valine, isoleucine et tryptophane, en CAU était suffisant pour conférer une identité méthionine à ces ARNts (Schulman and Pelka, 1988). En effet, la transplantation du triplet CAU dans ces ARNts recrée la séquence complète de la boucle anticodon de l'ARNt^{Met}.

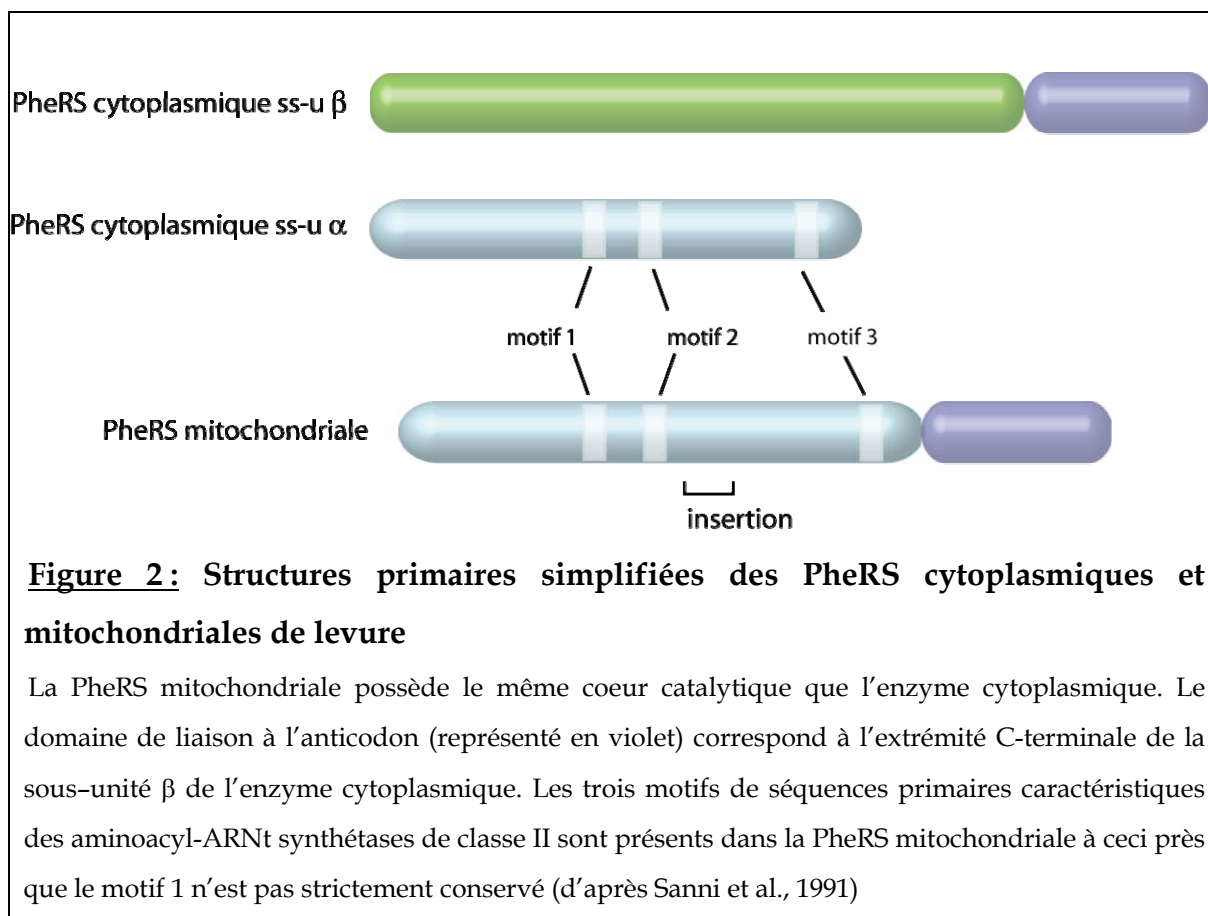
Le site actif de la MetRS est à plus de 70 Å du site de reconnaissance du triplet CAU impliquant l'existence d'une communication fonctionnelle entre ces deux sites de l'enzyme. Nous avons disséqué l'ARNt^{Met} de levure en deux minihélices mimant les bras accepteur et anticodon afin de vérifier si l'interaction avec l'anticodon génère une transmission de signal de type allostérique. Cette étude a montré que le défaut d'aminocyclation du bras accepteur isolé résulte d'une mauvaise affinité du minisubstrat pour la MetRS même en présence du bras anticodon. Ce dernier se fixe par contre à l'enzyme avec une affinité inférieure d'environ cinq fois seulement à celle de l'ARNt. Ce résultat démontre qu'un lien covalent entre l'anticodon et l'extrémité 3' terminale impliquant vraisemblablement la structure tridimensionnelle de l'ARNt est nécessaire à son aminocyclation (Aphasizhev et al., 1997).

Afin de vérifier si d'autres régions de l'ARNt (bras D ou T) influent de manière directe ou indirecte l'aminocyclation de l'ARNt^{Met}, nous avons créé des variants d'ARNt^{Met} chimériques délétés soit de leur bras D (appelé ΔD), soit de leur bras T (appelé ΔT). En effet, il existe des ARNts mitochondriaux, non conventionnels, possédant une délétion des bras D ou T. Les mutants ΔD et ΔT sont bien reconnus par l'enzyme mais seul le mutant ΔT est aminocyclé avec une efficacité comparable à celle de l'ARNt^{Met} suggérant un rôle du bras D dans l'acte catalytique (effet k_{cat} principalement). Les contacts de la MetRS avec le squelette sucre-phosphate du bras D peuvent, par exemple, contribuer au positionnement correct de l'extrémité acceptrice CCA dans le site actif, ce qui explique l'effet k_{cat} observé (Senger and Fasiolo, 1996).

L'importance de la conformation globale en L de l'ARNt a été confirmée par des mutants de résidus impliqués dans les interactions tertiaires. La mutation de résidus impliqués dans des interactions conservées ou semi-conservées comme la paire de Levitt (15-48) ou l'interaction triple entre U8 A14 A21 est délétère pour l'activité de ces ARNts. La structure tridimensionnelle globale joue donc un rôle important pour la reconnaissance. Elle permet la présentation des bases spécifiques (la boucle anticodon et la base discriminatrice) dans une configuration optimale pour l'interaction avec l'aminocyclase-ARNt synthétase. La reconnaissance d'un ARNt par l'aaRS est donc un phénomène complexe : elle nécessite la contribution d'éléments directs (bases spécifiques) et indirects (conformation de l'ARNt, contacts avec le squelette sucre-phosphate).

2. Le complexe PheRS / ARNt^{Phe} de mitochondrie de levure

La PheRS mitochondriale de levure (encore appelée MSF) se distingue par sa structure quaternaire (un monomère) et sa petite taille (55 kDa) des autres PheRSs cytoplasmiques qui sont toutes du type $\alpha_2\beta_2$ avec un poids moléculaire élevé (environ 250 kDa). En effet, des alignements de séquences ont permis de montrer que l'enzyme mitochondrial est constitué de la sous-unité α (avec une insertion après le motif 2 et une partie N-t raccourcie) à laquelle vient s'ajouter le domaine de liaison à l'anticodon (**Figure 2**).



La PheRS cytoplasmique de levure établit des points de contact aux trois extrémités distales de la structure de l'ARNt^{Phe} : l'anticodon, le bras accepteur et la poche variable formée par la juxtaposition des boucles D et T dans le repliement tertiaire de la molécule d'ARNt (Sampson et al., 1989). Les trois bases de l'anticodon ainsi que les nucléotides du bras accepteur (les premières paires de bases, et le nucléotide A73) sont également des éléments d'identité vis-à-vis de la protéine monomérique MSF. Par contre, l'enzyme mitochondrial semble insensible aux mutations dans la poche variable. L'absence d'un troisième site de contact lors de la formation du complexe ARNt^{Phe}:MSF permet de

comprendre la plus grande souplesse de l'enzyme mitochondrial vis-à-vis de la conformation de l'ARNt par rapport à son homologue cytoplasmique (Aphasizhev et al., 1996).

Ces résultats sont aisément compréhensibles aux vues des structures primaires et tridimensionnelles des PheRSs cytoplasmique et mitochondriale. En effet, il est difficilement concevable qu'un enzyme 5 fois plus petit puisse établir autant de contacts avec son ARNt homologue qu'un enzyme 5 fois plus gros.

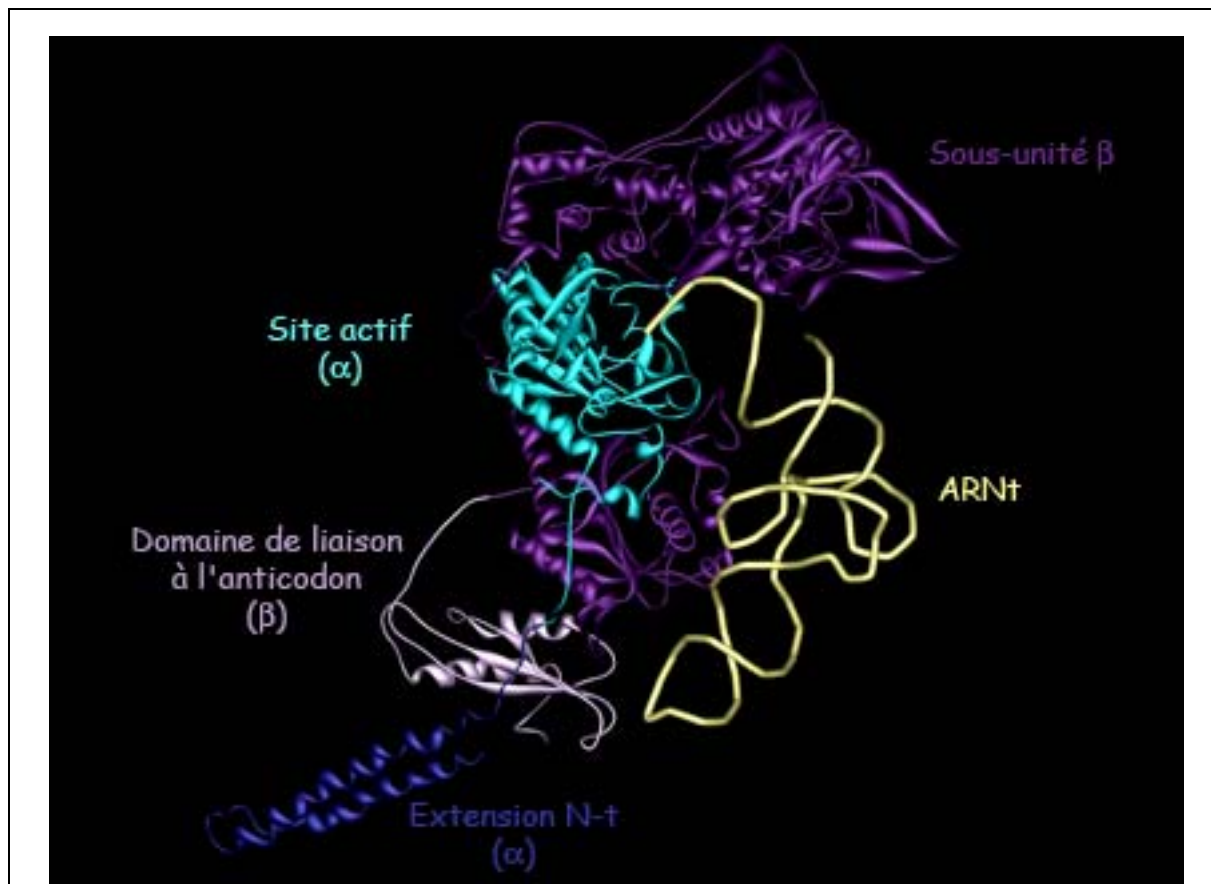


Figure 3: Structure tridimensionnelle du complexe PheRS: ARNt^{Phe} de *T. thermophilus*

Les parties claires de la structure de la PheRS représentent celles qui sont présentes dans l'enzyme mitochondrial à savoir le site actif et le domaine de liaison à l'anticodon. Le tracé reliant les phosphates de l'ARNt est indiqué en jaune (adapté de Goldgur et al., 1997).

Ce constat peut être illustré en ne considérant dans la structure tridimensionnelle du complexe PheRS:ARNt^{Phe} que les portions conservées dans la structure primaire de MSF (**Figure 3**). Il est alors aisé de remarquer que, dans le cas de MSF, l'intérieur de la structure en L de l'ARNt n'établit quasiment plus de contacts avec l'enzyme.

D'un point de vue évolutif, une hypothèse vraisemblable est que dans les systèmes de traduction primitifs, un code opérationnel liant l'identité de l'ARNt et l'acide aminé correspondant, était le résultat de l'interaction entre une aminoacyl-ARNt synthétase primitive et une minihélice acceptrice, l'anticodon intervenant beaucoup plus tardivement dans la traduction du message génétique tel que nous le connaissons aujourd'hui (Schimmel, 1995). Le fait que l'anticodon soit un élément d'identité pour deux PheRSs phylogénétiquement éloignées suggère que la PheRS mitochondriale de levure est une forme contemporaine d' aminoacyl-ARNt synthétase.

La PheRS cytoplasmique, comme d'autres aaRSs, est capable d'activer et de transférer sur son ARNt des acides aminés dont la structure est proche de l'acide aminé homologue (revue de Jakubowski and Goldman, 1992). Ces erreurs d' aminoacylation nécessitent, de la part de ces aaRSs, l'existence d'un mécanisme de correction post-transfert. Dans le cas de la PheRS cytoplasmique, une telle activité correctrice a été attribuée à une région de la sous-unité β (Roy et al., 2004, 2006) et, aux vues de la comparaison des enzymes mitochondriaux et cytoplasmiques, il n'est pas étonnant qu'une telle activité soit absente de l'enzyme mitochondrial (Roy et al., 2005).

3. Biosynthèse et rôle dans l' aminoacylation des bases modifiées Ψ et I des ARNt^{lle} de levure

Par analogie avec le système bactérien, la levure possède deux ARNt^{lle} : une espèce majeure avec un anticodon IAU chargé de décoder les codons AUU et AUC, et une espèce mineure avec un anticodon Ψ A Ψ chargé de décoder le codon AUA. Le triplet Ψ A Ψ , ou sa version non modifiée UAU présente dans le transcrit primaire, aurait donc la potentialité de lire un codon AUG (méthionine) d'après la théorie du "wobbling". L'analyse des appariements codon-anticodon permet de rejeter la lecture d'un codon méthionine par l'ARNt^{lle} mineur de levure uniquement si Ψ 34 est en conformation *syn* (**Figure 4**). La conformation *syn*, si elle existe, doit donc dépendre de la propriété structurale de l'ARNt dans la région de l'anticodon.

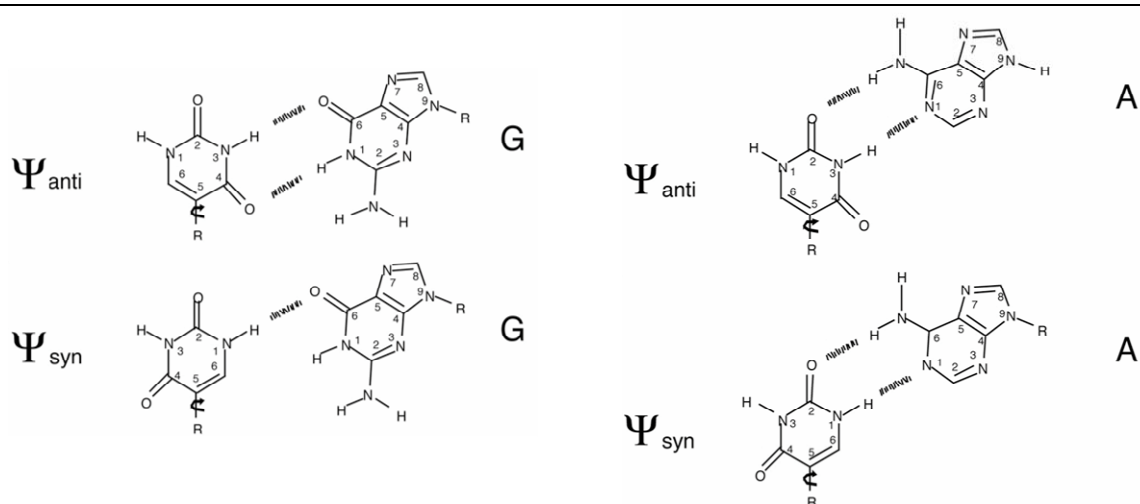


Figure 4 : Appariements de G et A avec Ψ

En partant d'un appariement classique G: Ψ et A: Ψ , on met la base Ψ en conformation *syn* (rotation de 180° autour de la liaison base-sucre). Dans ce cas, il n'y a plus d'appariement G: Ψ viable rejetant de ce fait la lecture d'un codon AUG par un ARNt^{lle} possédant un codon Ψ A Ψ .

Grâce à une collaboration avec Henri Grosjean (Gif-sur-Yvette), nous avons montré que la formation des pseudouridines (Ψ s) dans l'anticodon de l'ARNt^{lle} i) est intron dépendante, ii) n'est pas sensible aux mutations ponctuelles dans la région de l'anticodon (positions 32 à 37), iii) ne requiert pas la structure tridimensionnelle de l'ARNt, iv) les deux Ψ s en positions 34 et 36 sont synthétisées par un même enzyme (Szweykowska-Kulinska et al., 1994). Depuis nos travaux qui ont été réalisés à l'aide d'extraits S₃₀ (ou des fractions enrichies pour cette activité), l'enzyme responsable de la biosynthèse de ces Ψ s a été identifié (Simos et al., 1996b). Il s'agit de Pus1p, une protéine de 62 kDa qui est en charge de la formation de pseudouridines dans divers ARNs (Motorin et al., 1998). Si ces travaux ont permis de montrer que Pus1p semble reconnaître une structure ARN relativement simple (une hélice avec les résidus à modifier en bulge interne), des travaux récents poussent cette simplification encore plus loin en suggérant que le résidu à modifier soit simplement accessible et proche d'une hélice (Behm-Ansmant et al., 2006). Ceci n'exclut pas que des éléments d'identité soient requis au sein de cette hélice.

Par ailleurs, nous avons également collaboré avec le groupe du Dr Grosjean en ce qui concerne les déterminants de la formation de la base modifiée t⁶A qui est souvent trouvée en position directement adjacente à l'anticodon (Morin et al., 1998). L'enzyme responsable de la formation de t⁶A requiert la présence de la base adjacente de l'anticodon U₃₆ ainsi qu'une structure globale en L de l'ARNt. Cependant, cette forme en L doit être obtenue

par le repliement spatial correct des 4 bras de l'ARNt. En effet, les mutants d'ARNt^{Met} privés de bras T ou D mais qui ont une forme globale en L ne sont pas substrats de cet enzyme de modification.

L'absence de bases modifiées dans les transcrits d'ARNt^{Ile} obtenus *in vitro* grâce à la T7 ARN polymérase est délétère pour leur activité d'aminacylation par l'IleRS. Une preuve directe du rôle joué par les modifications de bases dans la reconnaissance de l'ARNt^{Ile} a été apportée par l'introduction de I₃₄ par voie enzymatique. Nous avons ainsi établi que l'efficacité de la réaction d'aminacylation diminue progressivement avec les changements suivants en position 34 de l'anticodon : I = Ψ > U > G > A. La sélection positive de l'ARNt^{Ile} peut être mieux comprise si l'on raisonne en termes de position et de groupes chimiques communs aux deux bases, capables d'engager des liaisons hydrogènes avec les chaînes latérales de la protéine. Il s'agit de la structure -NH-CO- commune aux cycles puriques et pyrimidiques en positions N₁-O₆ et N₃-O₄ respectivement (Senger et al., 1997). Nous avons également étudié l'identité, *in vivo*, d'un ARNt^{Ile} ambre supprimeur (Buttcher et al., 1994).

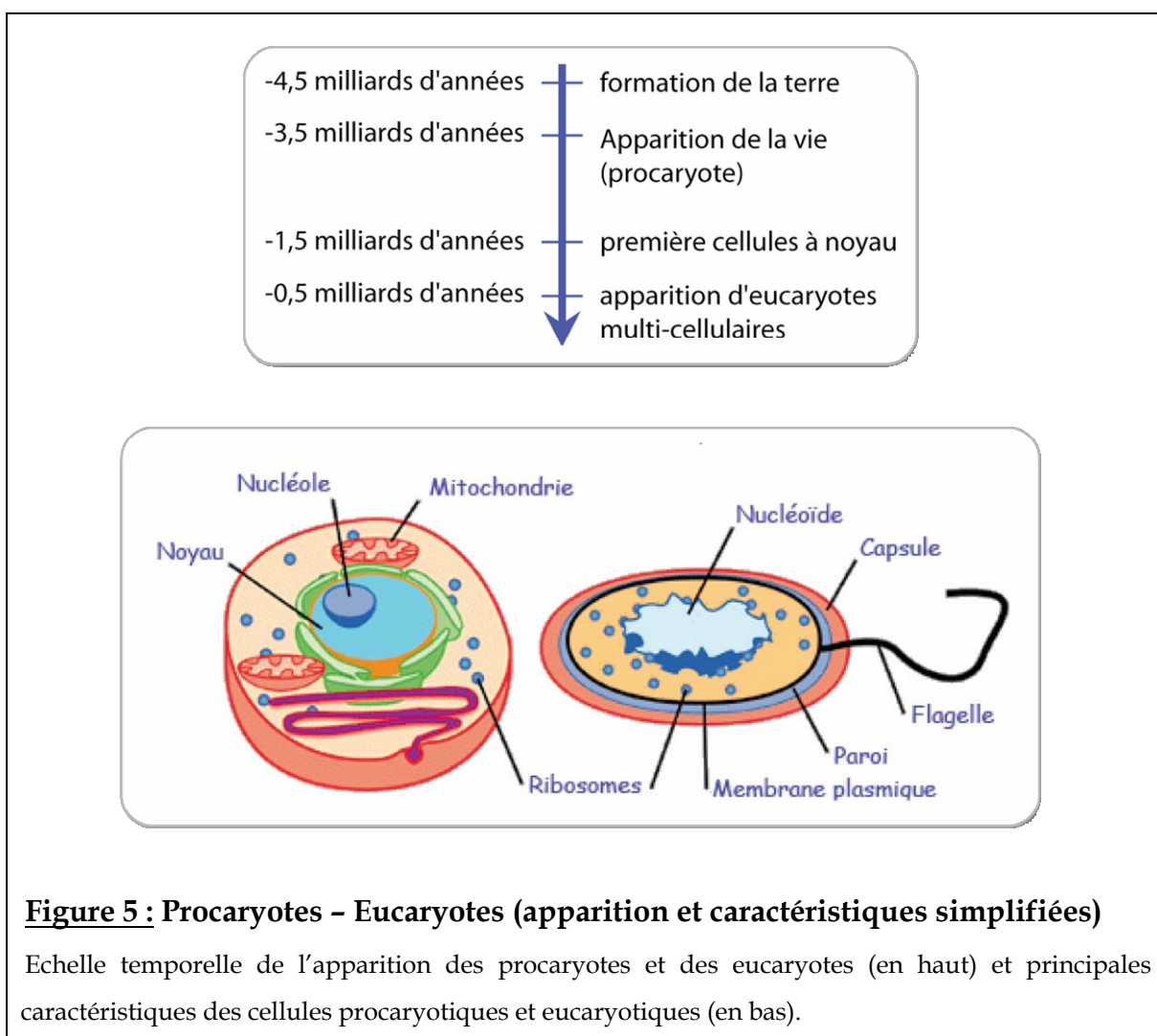
4. Commentaires annexes

Durant mes travaux de thèse, je me suis intéressé non seulement à l'aspect fonctionnel de l'ARNt (aminacylation) mais aussi à un aspect plutôt orienté vers la biosynthèse de l'ARNt (formation de pseudouridines et t⁶A). Ceci m'avait conduit à me poser des questions sur des notions de canalisation de la molécule d'ARNt du noyau vers le cytoplasme.

Par ailleurs, deux découvertes durant cette période ont influencé mes choix futurs. Il s'agit d'abord de la mise en évidence du complexe Arc1p-MetRS-GluRS chez la levure (Simos et al., 1996a) mais également de la découverte de Pus1p, l'enzyme responsable de la formation de Ψ_{34/36} dans l'ARNt^{Ile} mineur de levure (Simos et al., 1996b) par le groupe de E. Hurt (Heidelberg). Ce groupe s'intéresse aux constituants du pore nucléaire chez la levure ainsi qu'aux phénomènes d'échanges nucléocytoplasmiques. Coupler la biosynthèse des ARNts à leur export du noyau puis à leur aminacylation semblait donc possible. J'avais là une occasion unique d'étudier ces phénomènes en élargissant mon champ de compétences pratiques vers des outils génétiques et biochimiques totalement nouveaux pour moi.

III. Les échanges nucléocytoplasmiques chez la levure

Un des éléments clé définissant une cellule eucaryotique est l'existence d'une double couche lipidique qui crée des compartiments nucléaires et cytoplasmiques distincts séparant ainsi physiquement le lieu de la transcription de celui de la synthèse protéique. Cette compartimentation, qui s'est faite au cours de l'évolution (**Figure 5**), est importante pour le bon fonctionnement de la cellule. Elle implique l'importance des phénomènes de transport intracellulaire des macromolécules et leur localisation subcellulaire.



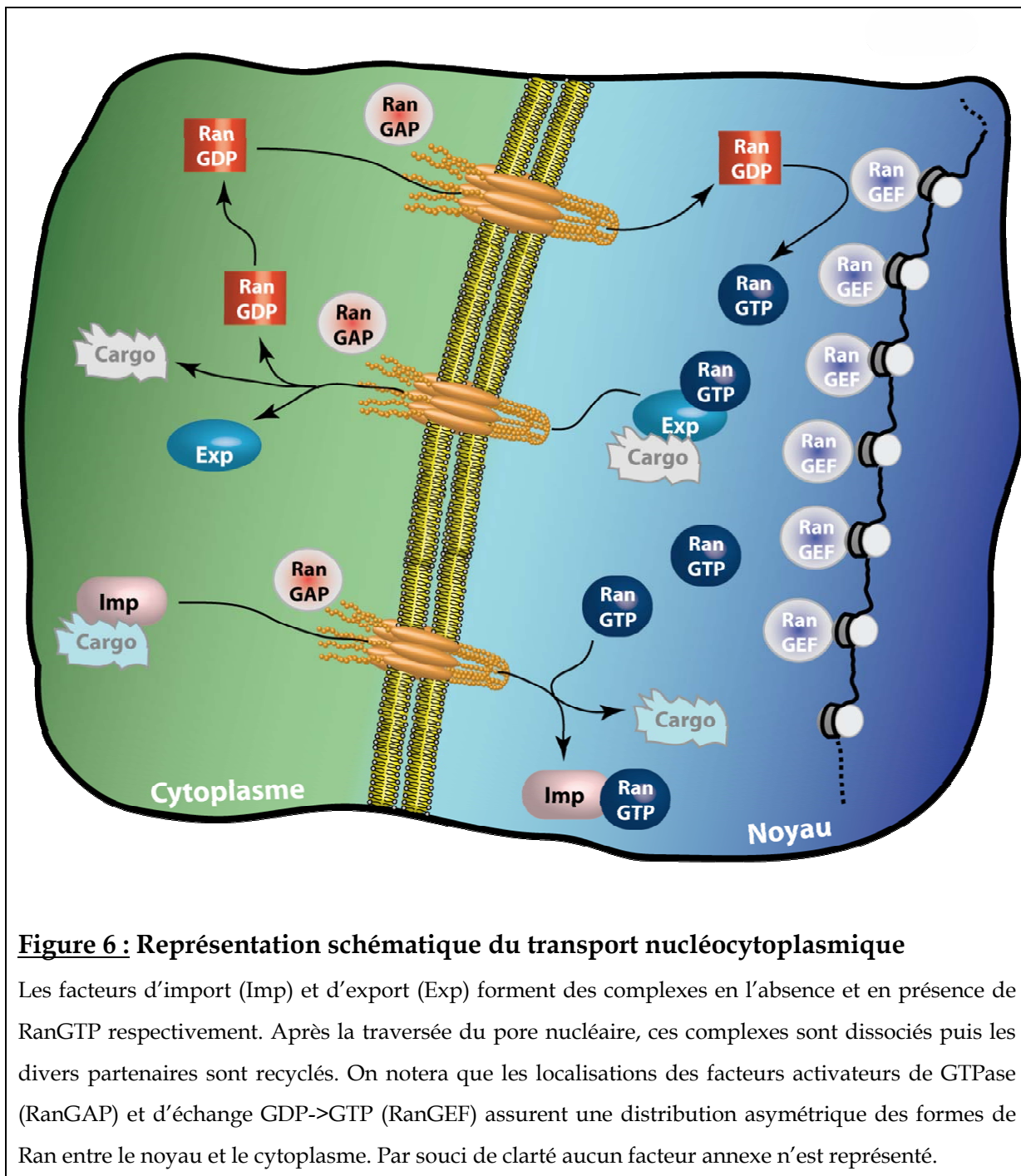
En effet, localisation et activité d'une molécule sont souvent intimement liées (comme dans le cas de certains facteurs de transcription par exemple, Kim et al., 2006). Ainsi la biogenèse des sous-unités ribosomiques a lieu dans un compartiment précis du noyau, le nucléole, lieu où l'on retrouve également de nombreuses molécules impliquées

dans ce processus. Cependant, les dernières étapes de maturation sont cytoplasmiques et sont donc réalisées après le passage de la barrière nucléaire. Les ARNts suivent une voie comparable à ceci près que leur maturation ne semble pas liée au nucléole (Simos and Hurt, 1999 et références incluses).

Lors de mon stage post-doctoral dans le laboratoire du Pr E. Hurt je me suis intéressé au produit du gène MTR10 qui avait été identifié dans un crible visant à isoler des mutants de transport des ARNm (Kadowaki et al., 1994). Le groupe du Pr Hurt a également identifié MTR10 dans un crible génétique visant à isoler des gènes en interaction avec NUP85 qui code pour une protéine constitutive du pore nucléaire. Rapidement nous avons réalisé un test qui a permis d'observer qu'une souche délétée du gène codant pour MTR10 montre un phénotype de perte de suppression (ou LOS) suggérant un lien possible avec le transport ou la biogenèse des ARNts.

Cependant, il faut noter qu'en 1996, année pendant laquelle j'ai démarré mon stage post-doctoral, les connaissances concernant les mécanismes et les molécules impliquées dans les phénomènes d'échanges nucléocytoplasmiques étaient limitées (Görlich and Mattaj, 1996). C'est en 1997 qu'une famille de facteurs de transport ressemblant à l'"importin β ", le transporteur de protéines possédant un signal de localisation nucléaire classique (NLS), a été identifiée sur la base d'homologies de séquences dans la partie N-terminale responsable de la liaison à la GTPase Ran (Görlich et al., 1997). De nombreux travaux ont rapidement permis de concilier le rôle de la GTPase Ran et celui des facteurs de transport pour arriver à un modèle de fonctionnement (revues de Corbett and Silver, 1997 ; Nakielny and Dreyfuss, 1997 ; Fornerod et al., 1997). Ran joue un rôle clé dans le transport nucléocytoplasmique et existe sous deux formes : i) Ran GTP dans le noyau et ii) Ran GDP dans le cytoplasme.

Ainsi, un facteur d'import forme un complexe avec son substrat dans le cytoplasme et, après translocation à travers le pore nucléaire, ce complexe est dissocié suite à la fixation de RanGTP au facteur d'import. Pour l'export de molécules depuis le noyau, il faut former un complexe trimérique entre l'exportin, le cargo et RanGTP. A son arrivée dans le cytoplasme, ce complexe est dissocié suite à l'hydrolyse de GTP en GDP au niveau de Ran (**Figure 6**).



MTR10 n'est pas un gène essentiel mais sa disruption provoque une croissance ralentie à 30°C et la mort de la levure à 37°C. Si des expériences d'hybridation *in situ* n'ont pas permis de montrer que Mtr10p intervient dans l'export des ARNts depuis le noyau, nous avons pu mettre en évidence que Mtr10p forme un complexe avec deux protéines, Npl3p et Hrb1p, qui sont impliquées dans l'export des ARNm depuis le noyau. Ces deux protéines nucléaires s'accumulent dans le cytoplasme en l'absence de Mtr10p appuyant donc le rôle de Mtr10p dans leur import vers le noyau (Senger et al., 1998).

Le complexe d'import que nous avons identifié n'est pas dissocié *in vitro* par l'action de RanGTP. C'est l'action concertée de RanGTP et de l'ARN total de levure qui permet la libération des trois partenaires, suggérant que ce complexe n'est pas dissocié dès son arrivée dans le noyau mais irait rejoindre un site intranucléaire où il y aurait de l'ARNm, cible des protéines Npl3p et Hrb1p.

Nous avons également montré que la séquence responsable de la localisation nucléaire de Npl3p se situe dans la partie C-terminale qui possède des motifs répétés RGG. Ces motifs interviennent non seulement dans la localisation nucléaire de Npl3p mais également dans l'interaction avec l'ARN et d'autres fonctions de Npl3p (McBride et al., 2005 ; Xu and Henry, 2004).

Récemment, un lien direct entre les ARNts et Mtr10p a pu être mis en évidence. En effet, Mtr10p intervient dans le transport rétrograde des ARNts du cytoplasme vers le noyau (Shaheen and Hopper, 2005 ; Takano et al., 2005). Cette découverte ouvre de nouveaux horizons quant aux fonctions non canoniques des ARNts (revue de Yoshihisa, 2006). En effet, l'ARNt en tant que molécule capable de faire la navette noyau/cytoplasme lui permettrait de jouer le rôle de molécule régulatrice de la traduction cytoplasmique, de participer à une éventuelle traduction nucléaire, de remplir la fonction de transmetteur de signal, etc...

IV. Etudes d'aminoacyl-ARNt synthétases

1. Les MetRS cytoplasmique et mitochondriale de levure

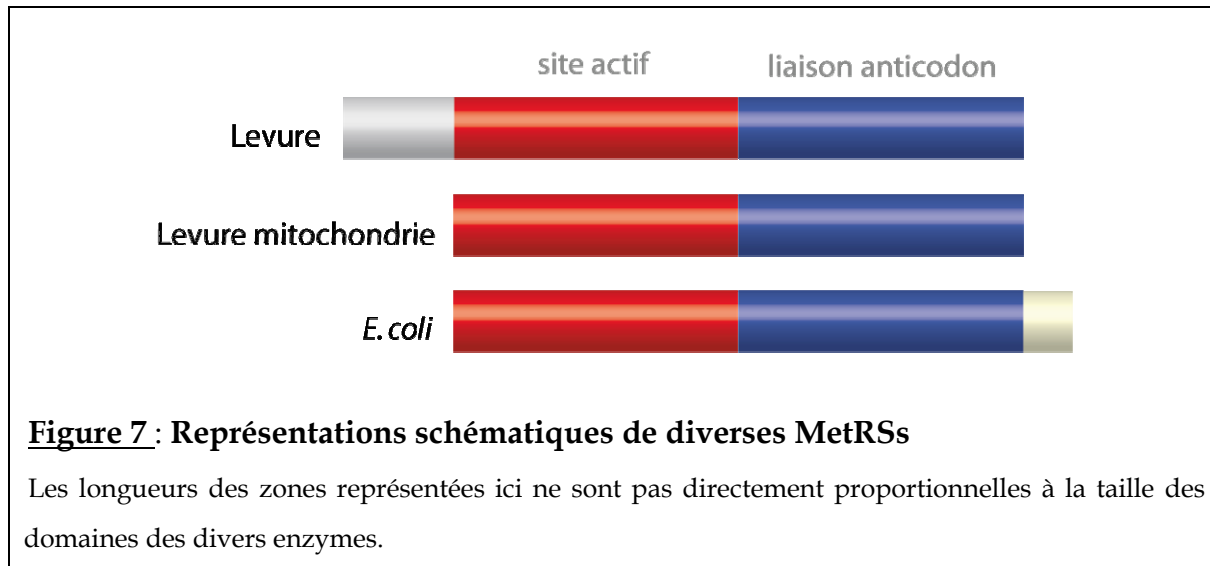
(Senger et al., 2001)

Les aminoacyl-ARNt synthétases assurent la fidélité de la traduction du message génétique. La complexité du mécanisme moléculaire de reconnaissance d'un ARNt par son aminoacyl-ARNt synthétase homologue doit être à la hauteur de l'étroite spécificité requise lors de l'association de ces deux molécules. Ainsi, nous voulions savoir si les deux MetRSs présentes chez la levure, l'une cytoplasmique, l'autre mitochondriale, étaient capables de remplir les mêmes fonctions avec une précision semblable. Si tel est le cas, nous devrions être en mesure de comparer les choix que la nature a fait pour le maintien de la fidélité de cet enzyme.

La MetRS d'*E. coli* possède de fortes homologies de séquence avec la MetRS de levure ce qui nous avait permis d'obtenir un modèle de l'enzyme cytoplasmique de levure auquel nous avons juxtaposé la structure de l'ARNt^{Meti} (**Figure 1**). L'enzyme bactérien a une extension C-terminale alors que l'enzyme cytoplasmique de levure est pourvu d'une extension N-terminale (**Figure 7**). Il était connu que la MetRS bactérienne est capable de lier un ion zinc dont le rôle n'est pas catalytique mais plutôt structural vu son remplacement possible par du cobalt ou du cadmium (Xu et al., 1993). Cet ion zinc vient se lier à la MetRS d'*E. coli* au niveau du peptide CP1 et forme une région de type doigt de zinc. Les peptides CP1 et CP2 viennent relier les deux moitiés du domaine de Rossmann. Un alignement de séquences de diverses MetRS nous a permis d'avancer l'hypothèse qu'il y a trois types de MetRS, deux possédant des motifs capables de lier du zinc et une qui en serait dépourvu. Ainsi la MetRS cytoplasmique de levure est un métalloenzyme alors que ce n'est pas le cas pour son homologue mitochondrial (Senger et al., 2001). L'ion zinc est essentiel à l'activité de la MetRS cytoplasmique et il pourrait participer au bon positionnement de l'extrémité acceptrice de l'ARNt^{Met} dans le site actif de l'enzyme.

La comparaison des activités d'aminoacylation des MetRS cytoplasmique et mitochondriale *in vitro* révèle que l'enzyme mitochondrial semble 10 fois plus actif que son homologue cytoplasmique. Mais il ne s'agit là que d'un effet dû à l'absence du cofacteur Arc1p dans la préparation d'enzyme cytoplasmique (Simos, et al., 1996a). En effet, en

présence d'Arc1p l'enzyme cytoplasmique à la même activité que l'enzyme mitochondrial ce qui nous a conduit à montrer que l'enzyme mitochondrial peut être supplanté par son homologue cytoplasmique *in vivo*.



Puisque la fidélité de la traduction passe par l'exactitude de la réaction d'aminocyclation, nous avons analysé les capacités des deux MetRSs à corriger l'activation de l'homocystéine. En effet, la MetRS cytoplasmique est capable d'activer efficacement l'homocystéine, le précurseur direct de la méthionine dans la voie de biosynthèse de cet acide aminé (Jakubowski, 1992). Le transfert de l'homocystéine activée sur l'ARNt^{Met} conduirait à un ARNt^{Met} misaminoacylé par l'homocystéine et donc à une incorporation erronée d'homocystéine dans les protéines en réponse à un codon méthionine. Il faut donc un mécanisme de correction et dans ce cas particuliers, il y a conversion de l'homocystéine activée en homocystéine thiolactone avant le transfert sur l'ARNt. L'analyse de la capacité de correction pour les enzymes cytoplasmique et mitochondrial révèle effectivement que les deux protéines sont capables de réaliser cette réaction avec des efficacités comparables *in vivo* et *in vitro*.

Pourquoi cette réaction de conversion de l'homocystéine ? En plus du maintien de la fidélité de la traduction, il s'agirait d'un moyen de détoxifier la cellule puisque l'homocystéine est un composé toxique (Jakubowski, 2006). En outre, le produit de cette réaction, l'homocystéine thiolactone, est un thioester réactif qui peut intervenir dans la modification post-traductionnelle des protéines. Enfin, notons qu'il pourrait s'agir là d'une trace de l'évolution puisque cette homocystéine thiolactone aurait pu être une forme

primitive d'acide aminé activé dans des systèmes de traduction prébiotiques. En effet, on retrouve cette capacité d'activation de l'homocystéine (suivi de conversion en homocystéine thiolactone) pour d'autres aminoacyl-ARNt synthétases que la MetRS (Jakubowski, 1995).

En plus des réactions déjà décrites, les MetRSs d'*E. coli* et de levure sont capables de catalyser l'amination du coenzyme A par la méthionine (pour former du méthionyl-CoA) avec des efficacités comparables (Jakubowski, 1998). Il existe plusieurs aminoacyl-ARNt synthétases capables de transférer leur acide aminé homologue sur le coenzyme A. Par conséquent, il se pourrait que les aminoacyl-ARNt synthétases actuelles dérivent d'un enzyme ancestral capable de lier le coenzyme A dans le but de réaliser une synthèse protéique non codée mais dépendante d'un thioester. D'autres modules se seraient greffés sur cet enzyme ancestral pour évoluer vers les aminoacyl-ARNt synthétases actuelles. Cette évolution laisserait la voie ouverte à diverses solutions pour peu qu'elles conduisent à des enzymes fidèles. Les MetRSs cytoplasmiques et mitochondriales pourraient être considérées comme tel : deux structures pour des fonctions identiques.

2. Rôle de Arc1p dans la modulation de l'activité de la GluRS

(Graindorge et al., 2005)

Les aminoacyl-ARNt synthétases sont des enzymes à caractère modulaire dont une vue très simplifiée consiste à dire qu'elles possèdent un cœur catalytique, un domaine de reconnaissance de l'anticodon (à l'exception de la SerRS, Cusack et al., 1996) et fréquemment un ou plusieurs domaines additionnels. Ainsi, chez les mammifères, ces domaines additionnels peuvent conduire à la formation d'un complexe de haut poids moléculaire regroupant 8 aaRS (mais 9 activités aminoacyl-ARNt synthétases) et trois protéines non catalytiques (p43, p38 et p18) (Mirande, 1991). Chez la levure, un complexe simplifié a pu être mis en évidence ; il est formé de deux aaRS, la MetRS et la GluRS associés à Arc1p, l'homologue de p43 (Simos et al., 1996b).

Dans le cas du couple Arc1p-MetRS, des études cinétiques et structurales ont amené à la conclusion que Arc1p augmente l'affinité de l'ARNt^{Met} pour la MetRS alors que la spécificité de l'interaction est indépendante de Arc1p. Il en résulte une augmentation de

l'efficacité catalytique d'aminacylation de l'ARNt^{Met} par la MetRS en présence de Arc1p de deux ordres de grandeur, principalement due à une baisse du Km (Simos et al., (1996a).

La GluRS est une aaRS qui nécessite la présence de l'ARNt homologue pour activer l'acide aminé avant son transfert sur l'ARNt (Lee et al., 1967). La présence d'Arc1p stimule également la réaction d'aminacylation mais contrairement à la MetRS, la GluRS est capable de former un complexe stable avec son propre ARNt. Ceci suggère que la liaison d'Arc1p à la GluRS n'a pas pour seul effet d'augmenter l'affinité de la GluRS pour l'ARNt^{Glu}.

Sachant que la partie N-t d'Arc1p se lie à la partie N-t de la GluRS et de la MetRS (Simos et al., 1998), nous avons caractérisé de façon plus fine le domaine de la GluRS qui interagit avec Arc1p. Il s'agit de la région comprise entre les résidus 100 à 170.

Sur la base d'expériences d'aminacylation, nous avons montré que seul le complexe Arc1p-GluRS possède une activité suffisante pour déterminer les paramètres cinétiques k_{cat} et Km qui sont $0,016\text{ s}^{-1}$ et 450 nM respectivement démontrant l'effet positif d'Arc1p sur la réaction de glutaminylation. Cependant, une telle vitesse d'aminacylation est incompatible avec la vitesse de la synthèse protéique et devrait être environ de 1 s^{-1} . Ceci nous a conduit à mesurer l'activité de la GluRS et du complexe au niveau de la réaction d'échange ATP-PPi. Nous avons constaté que la présence d'Arc1p n'affectait pas l'affinité de la GluRS pour son ARNt mais que la réaction était deux fois plus rapide en présence d'Arc1p et que son k_{cat} était de $4,4\text{ s}^{-1}$. Arc1p ne modifie pas l'étape limitante de la réaction d'aminacylation qui est le transfert de l'acide aminé activé sur l'ARNt^{Glu}.

L'utilisation de transcrits d'ARNt^{Glu} dans la réaction d'aminacylation a permis d'obtenir un plateau de charge un peu plus important (2,5 %) mais toujours faible. Ceci suggère fortement qu'une base modifiée de l'ARNt^{Glu} joue un rôle majeur dans la l'aminacylation par la GluRS (vraisemblablement la 5-méthylamino-méthyl-2-thiouridine qui est très fragile et en première position de l'anticodon, mais qui n'est pas un élément d'identité majeur).

La faible activité des transcrits dans la réaction d'aminacylation nous a conduit à mesurer la constante de dissociation apparente (Kd) entre le transcrit et la GluRS ou le complexe GluRS-Arc1p par des expériences de retard sur gel. Ainsi le Kd apparent est de 30 nM pour le complexe et de 3600 nM pour la GluRS seule montrant bien l'importance d'Arc1p dans la formation du complexe GluRS -ARNt^{Glu}. Dans le but de prouver que

Arc1p est bien responsable de l'augmentation de l'affinité pour l'ARNt, nous avons montré que l'addition d'Arc1p au complexe GluRS-ARNt^{Glu} provoquait bien l'apparition d'un complexe migrant à la même hauteur sur gel de polyacrylamide que le complexe ARNt^{Glu}-GluRS-Arc1p et de mobilité inférieure à celle du complexe Arc1p-ARNt^{Glu}. Enfin, nous avons vérifié que le domaine N-terminal de Arc1p (responsable de la liaison à la GluRS) n'est pas l'unique élément augmentant l'affinité de la GluRS pour l'ARNt^{Glu}.

Malheureusement, l'aminacylation du transcrit a été trop faible pour mesurer le paramètre k_{cat} de l'ARNt et de vérifier que Arc1p influence la vitesse d'aminacylation. Cependant, le plateau d'aminacylation réduit d'un facteur 10 en l'absence d'Arc1p est troublant. En effet, pour obtenir une valeur de plateau optimale, la vitesse initiale d'aminacylation doit être maximale pour compenser la déacylation chimique de l'ARNt chargé. Un effet k_{cat} peut donc être déduit indirectement de l'augmentation du plateau d'aminacylation en présence d'Arc1p à condition que l'affinité de l'ARNt pour le complexe reste inchangée (Bonnet and Ebel, 1972).

Un premier pas concernant l'assemblage de ce complexe multi-synthétasique vient d'être franchi avec la résolution de deux structures : celle du complexe du fragment N-terminal de la GluRS (1-207) avec le fragment N-t d'Arc1p (1-122) et celle du complexe du fragment N-t de la MetRS (1-160) avec le fragment d'Arc1p (**Figure 8**, Simader et al., 2006). Nos résultats concernant l'interaction Arc1p:GluRS sont en accord avec les données cristallographiques qui montrent également que l'interaction d'Arc1p avec les deux aaRSs est structuralement comparable à celle que l'on retrouve dans des dimères de glutathion S-transférase.

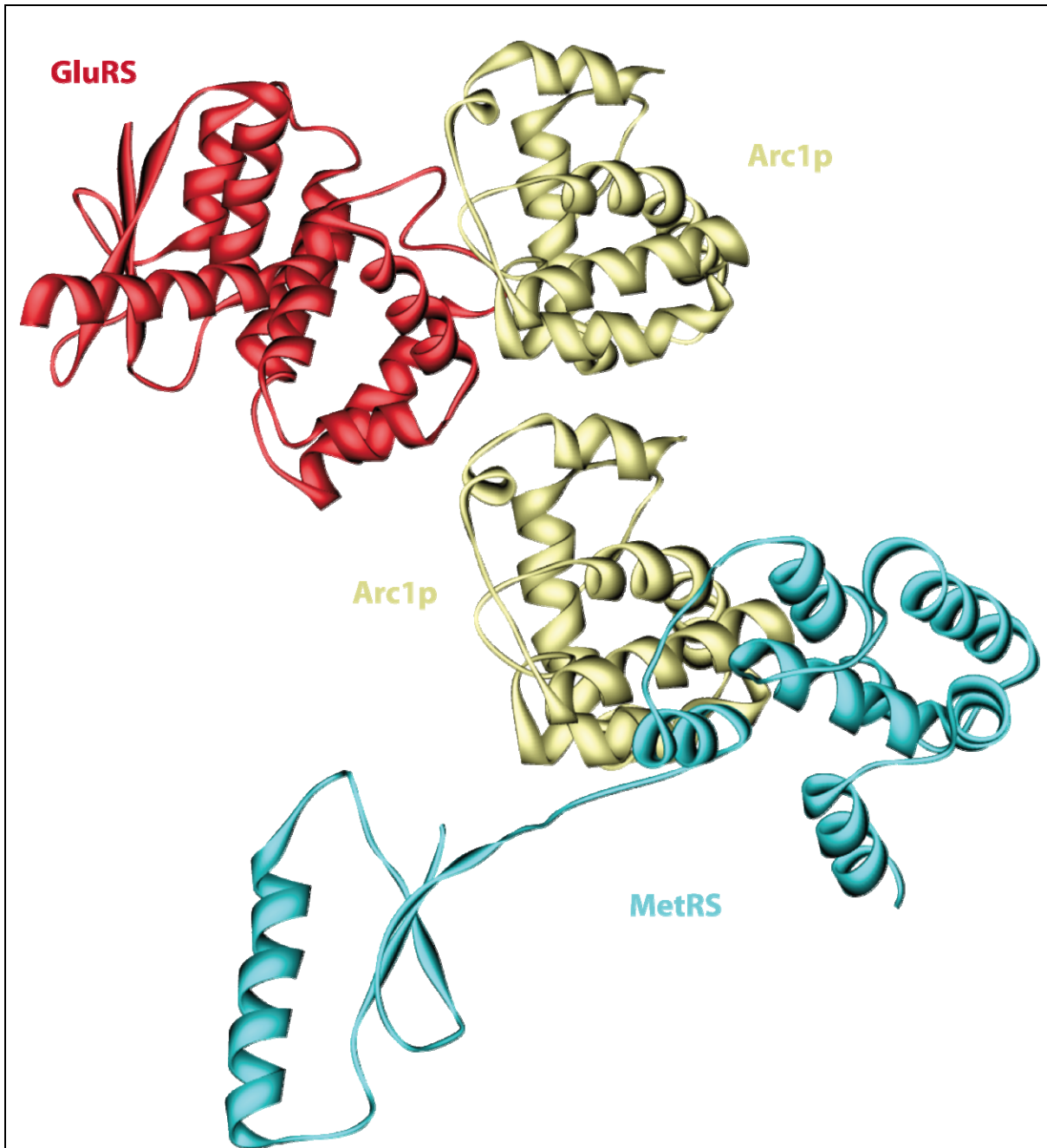


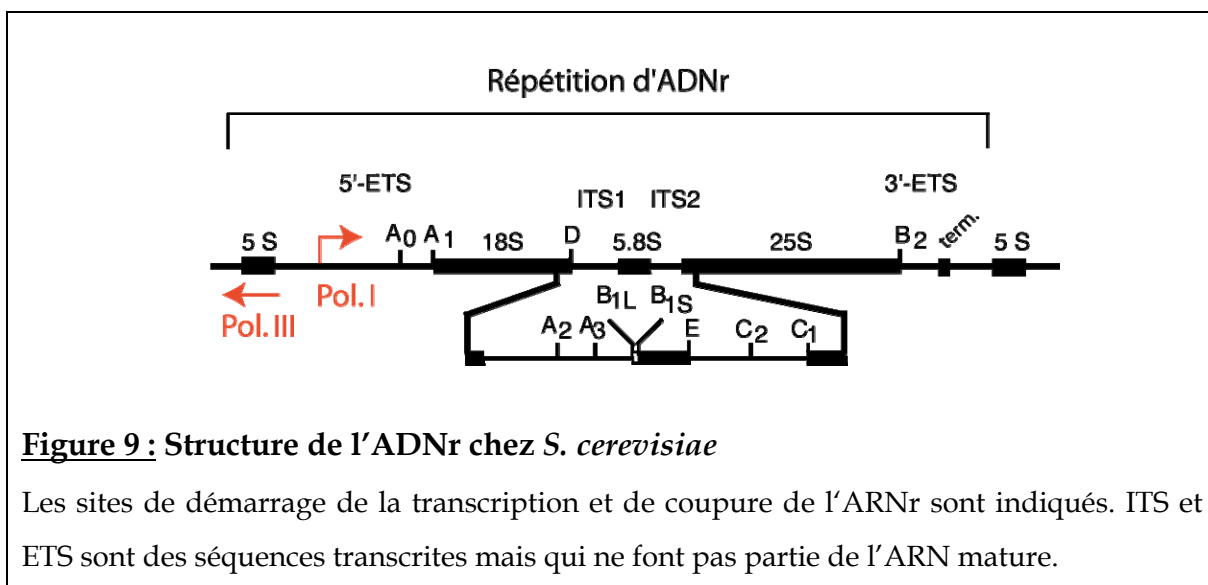
Figure 8 : Interactions de Arc1p avec la MetRS et la GluRS

La position spatiale de Arc1p est similaire dans les deux complexes. On voit donc que la GluRS et la MetRS n'interagissent pas avec les mêmes faces d'Arc1p. Ici, la GluRS contacte Arc1p par la gauche en arrivant par l'arrière et la MetRS plutôt par la droite en arrivant par l'avant d'Arc1p.

V. La biogenèse des ribosomes

1. Introduction

La biogenèse des ribosomes représente une voie métabolique majeure et des cellules se divisant activement synthétisent environ 2000 ribosomes par minute. Chez la levure, le ribosome est constitué de 4 ARNs et 79 protéines ribosomales qui s'assemblent avec le concours de plus d'une centaine de facteurs protéiques et ribonucléoprotéiques. La synthèse des sous unités ribosomales démarre dans le nucléole pour s'achever dans le cytoplasme soulignant de ce fait que les événements de maturation de l'ARNr et d'assemblage requièrent non seulement une compartimentation dynamique des acteurs de la biosynthèse des ribosomes mais également un ordonnancement spatio-temporel précis (revues de Venema and Tollervey, 1999 ; Fromont-Racine et al. 2003, Tschochner and Hurt, 2003).



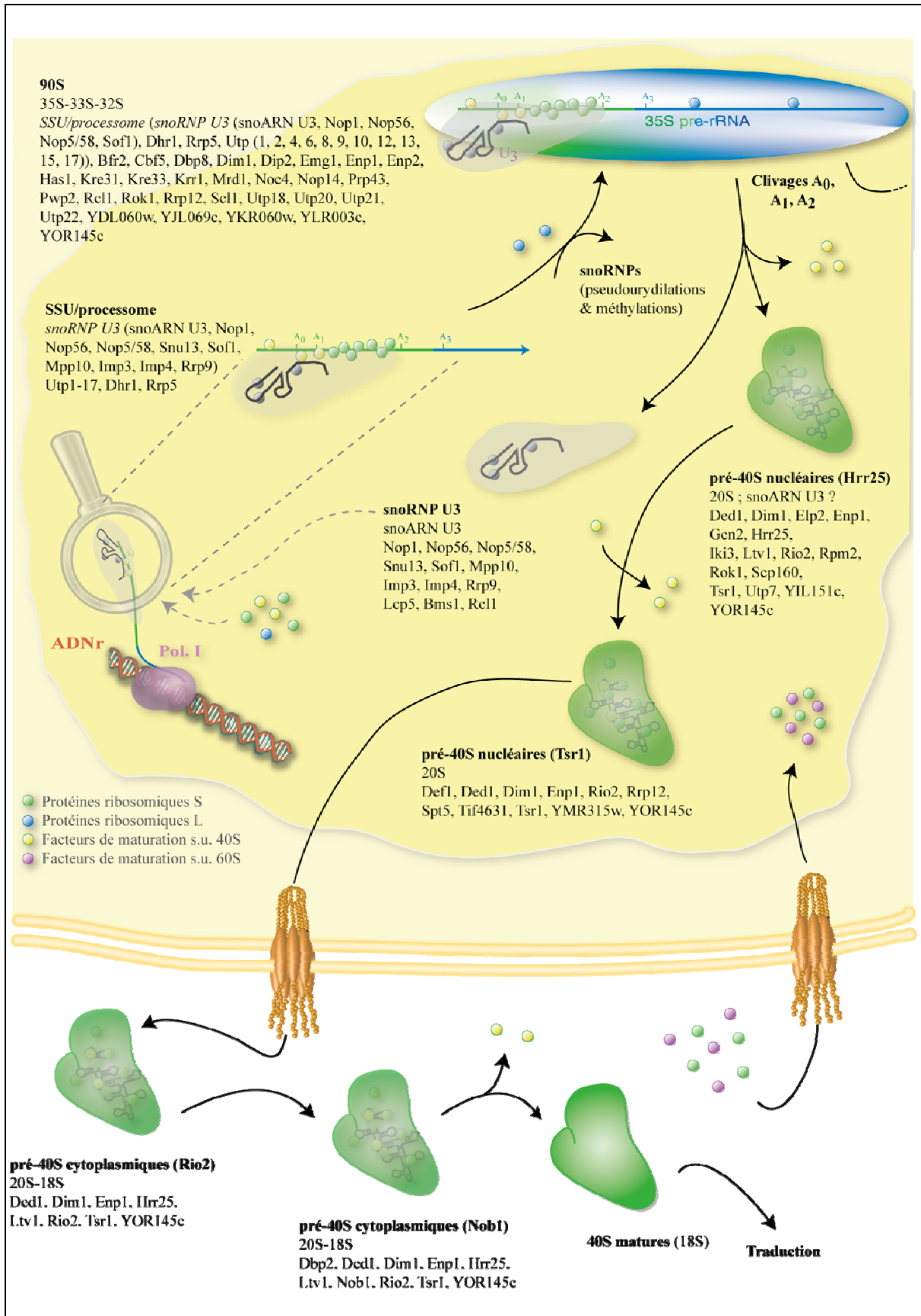
Ainsi, l'ADNr (**Figure 9**) est transcrit dans le nucléole, et, avant même l'achèvement de cette réaction, les premiers facteurs viennent s'associer à la chaîne d'ARN naissante. On obtient alors rapidement une énorme particule de 90S (Udem and Warner, 1972 ; Trapman et al., 1975) qui, vu le sens de la transcription, contient surtout des facteurs de la biogenèse de la sous-unité 40S. Des travaux plus récents ont montré que cette particule de 90S est en réalité une succession d'intermédiaires complexes dont la taille est très proche (Grandi et

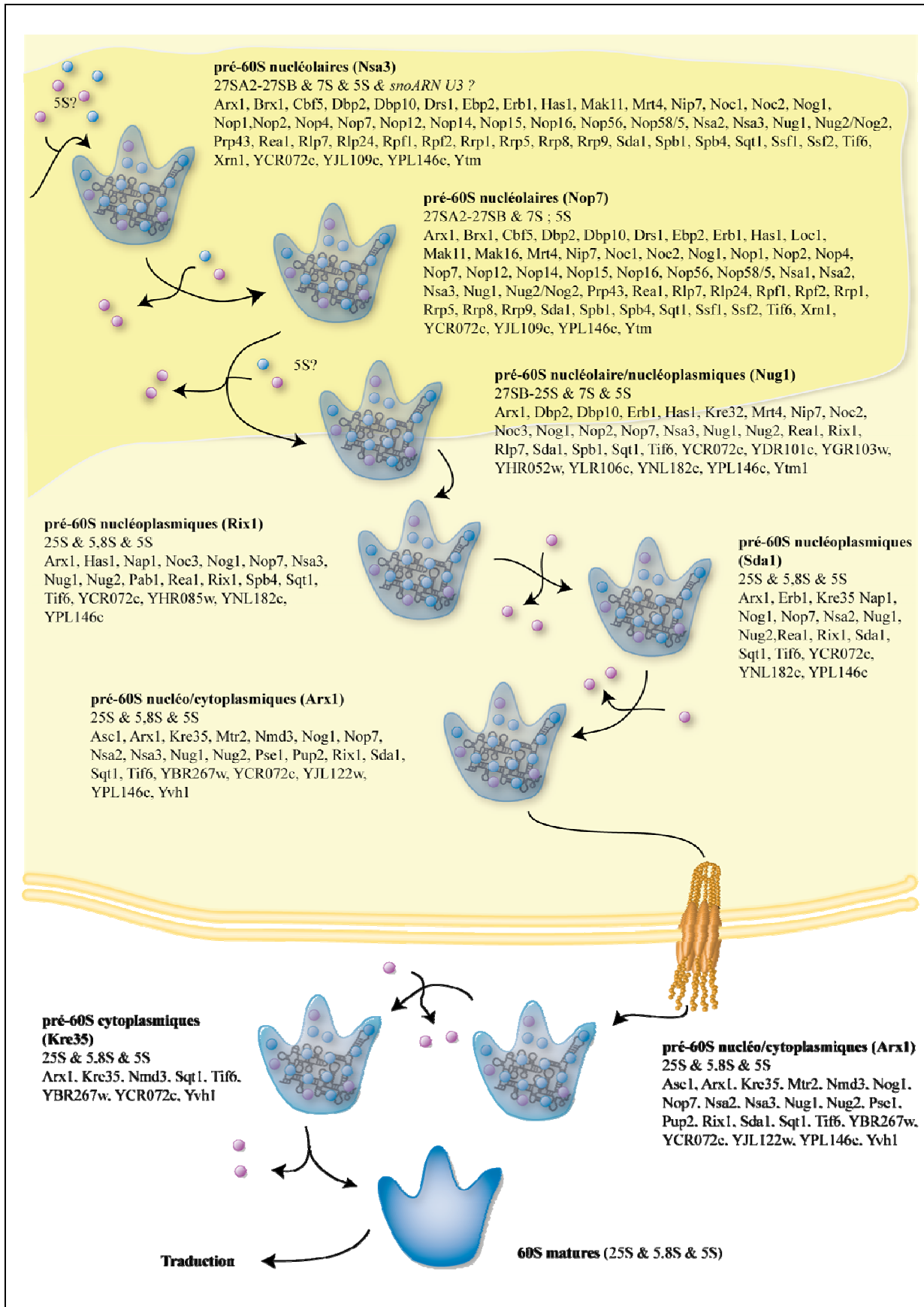
al., 2002). Dès l'avènement de coupure A2, les voies de biosynthèse des particules 60S et 40S se séparent. Chacune des voies se poursuit alors indépendamment de l'autre (voir plus loin, **Figure 12**). Sans entrer dans le détail des étapes successives qui vont amener à des sous-unités ribosomales matures, j'aimerais rappeler que non seulement de nombreuses coupures endo- et exonucléolytiques seront nécessaires pour passer du précurseur 35S aux ARNs matures 25S, 18S, 5,8S et 5S mais également l'intégration des nombreuses protéines ribosomales qui fait intervenir encore davantage de facteurs dont le rôle de la plupart est encore mal connu. A cette vision séquentielle de l'assemblage du ribosome vient encore se greffer un facteur espace-temps puisque sa biogenèse démarre dans le nucléole pour s'achever dans le cytoplasme. Ce dernier aspect, même s'il complique encore le tableau, offre néanmoins l'avantage de confiner certaines étapes de l'assemblage autorisant ainsi la mise en place d'autant de points de contrôle de la particule en cours de synthèse. Enfin, notons également que l'ARN ribosomique est porteur de nombreuses bases modifiées (pseudouridines et bases méthylées).

La biogenèse des ribosomes est donc un processus extrêmement complexe (**Figure 10**) dont les récentes avancées sont intimement liées à l'avènement de la technique du TAP-tag et aux progrès des analyses par spectrométrie de masse qui permettent l'identification de chaque partenaire du complexe. Cette identification est d'autant plus facile que le nombre de génomes séquencés ne cesse de croître.

Figure 10: Complexes de la biogenèse des sous-unités ribosomales (page suivante)

Les complexes représentés ont été identifiés par purification à l'aide de la technique du TAP tag du facteur indiqué entre parenthèses. Les espèces d'ARNs présentes dans ces complexes sont également indiquées.

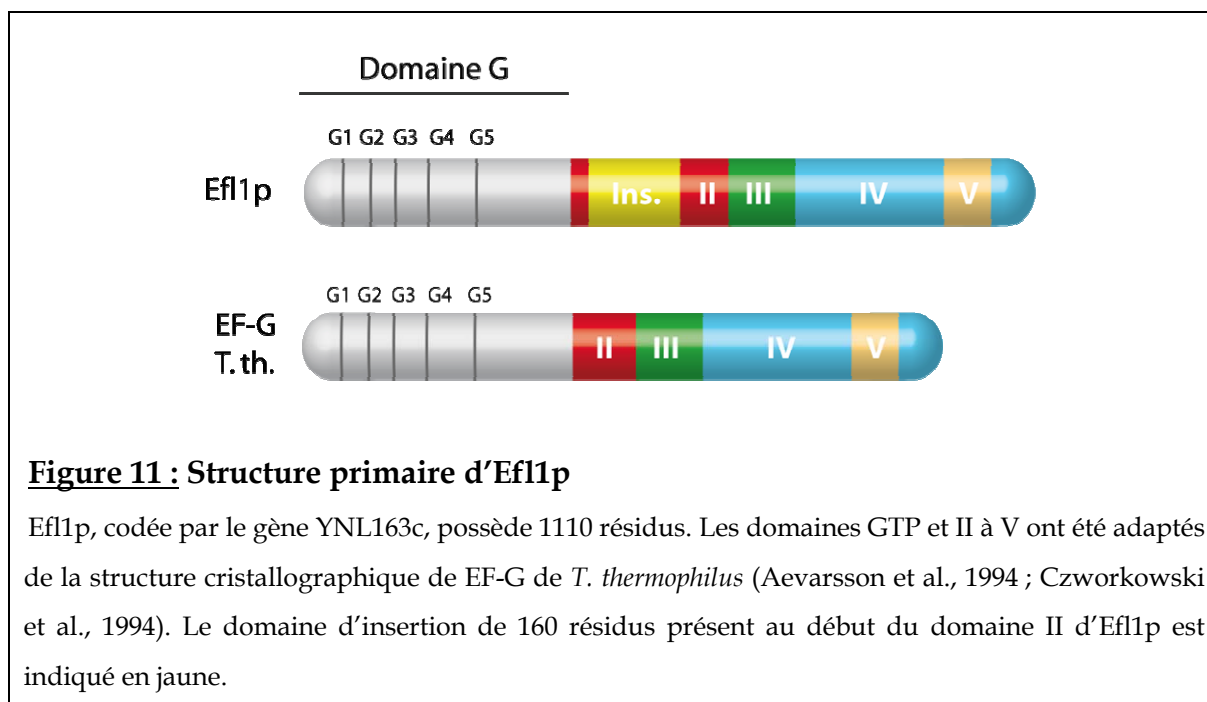




2. Efl1p, une GTPase impliquée dans la synthèse du 60S

(Senger et al., 2001)

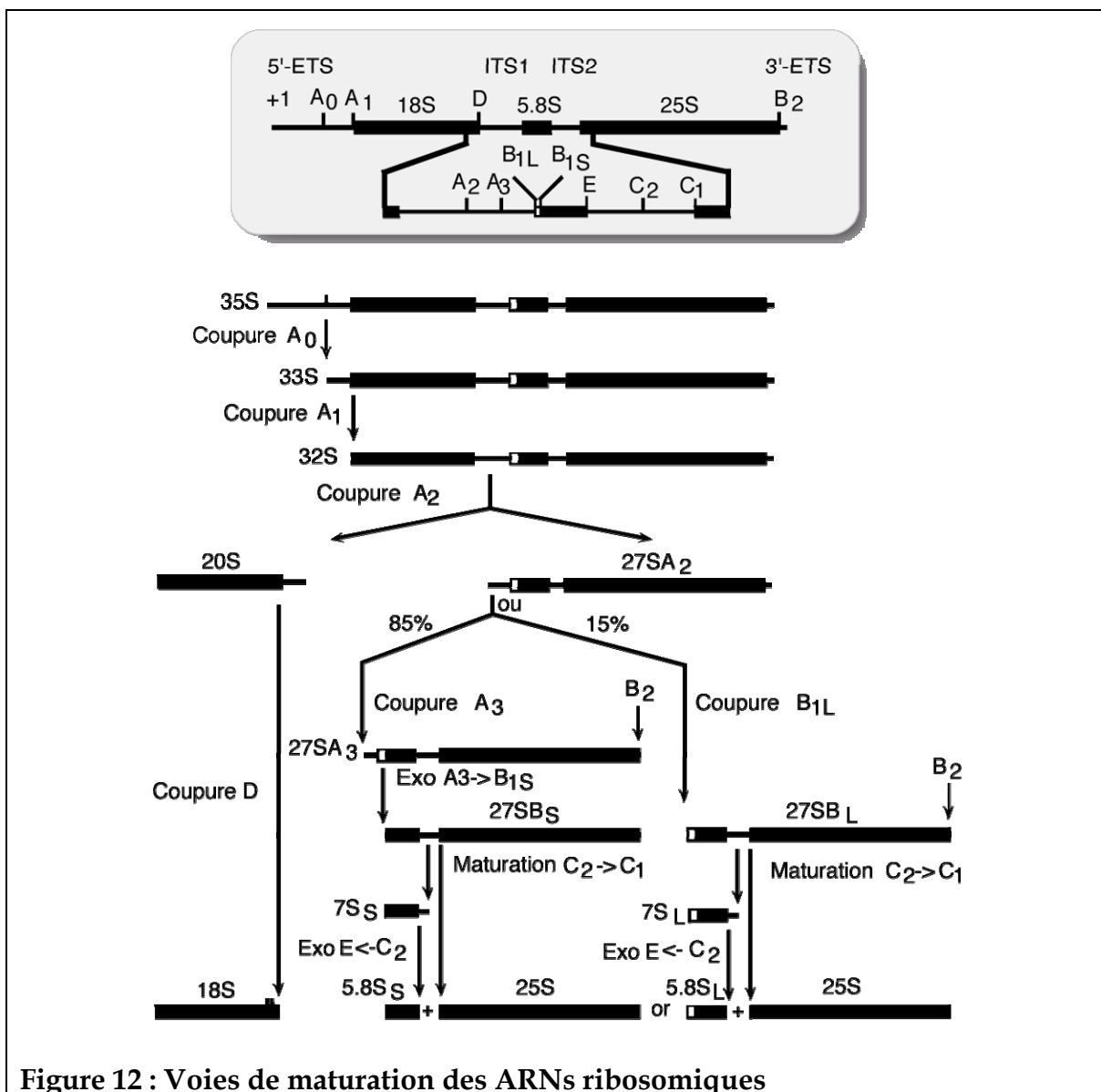
Le gène EFL1 a été cloné de manière fortuite suite à une réaction de PCR visant à amplifier une aminoacyl-ARNt synthétase à l'aide d'oligonucléotides dégénérés. Ce gène code pour une protéine de 1110 résidus (Efl1p) qui possède de fortes homologues de séquences avec les facteurs de translocation de type EF-2 (**Figure 11**). Ainsi, Efl1p comporte un domaine G responsable de la liaison au GTP et les domaines II-V des facteurs d'élongation dans des positions relatives conservées. Par contre, Efl1p se distingue de ces facteurs par la présence d'un domaine d'insertion de 160 résidus au début du domaine II.



Dans le but d'approcher la fonction d'Efl1p, nous avons délété le gène correspondant générant ainsi la souche efl1Δ1. Une telle souche est viable mais sa croissance est extrêmement ralentie (temps de génération de 10 h) démontrant le caractère quasi-essentiel de ce gène. La localisation d'Efl1p *in vivo* a été réalisée de deux façons indépendantes : i) par l'expression d'une protéine de fusion fonctionnelle entre Efl1p et la "Green Fluorescent Protein" (GFP), une protéine fluorescente quand elle est éclairée par la lumière UV, et, ii) par fractionnement cellulaire en séparant les noyaux de la fraction cytoplasmique. Efl1p est une protéine cytoplasmique.

L'homologie d'Efl1p avec les facteurs de traduction nous a conduit à analyser par centrifugation sur gradient de sucrose les profils de polyribosomes d'une souche sauvage avec ceux d'une souche *efl1Δ1*. Nous avons noté une baisse importante du nombre de polysomes ainsi qu'une chute drastique du taux de sous-unités libres 60S par rapport aux sous-unités 40S. L'analyse de ces gradients par des techniques de Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre Efl1p révèle que ce facteur n'est ni associé aux sous-unités ribosomales libres, ni aux polysomes.

Nous avons ensuite analysé la maturation des ARNs ribosomiques (**Figure 12**) dans une souche *efl1Δ1*, tout d'abord par la technique globale du "pulse-chase" puis par une analyse plus fine à l'aide de techniques de Northern blot et



d'extension d'amorce (collaboration entre F. Fasiolo et D. Lafontaine (Bruxelles)). Ainsi, nous avons pu conclure au ralentissement des coupures A0-A2 et à l'inhibition de la maturation C2 -> C1.

La localisation cytoplasmique d'Efl1p est en apparence contradiction avec une interférence de la maturation des ARNs ribosomiques au niveau d'étapes nucléaires. L'isolement et la caractérisation d'un suppresseur d'une souche *efl1Δ1* a conduit à l'identification de TIF6, un gène qui code pour un facteur nucléolaire impliqué dans la biogenèse de la sous-unité 60S (Si et al., 1997 ; Si and Maitra, 1999). Ce lien génétique n'a jamais pu être confirmé par une interaction physique directe entre les deux molécules.

C'est une analyse de la localisation *in vivo* des divers partenaires (Tif6p, Efl1p et la sous-unité 60S au travers d'un de ses composants, la protéine L25) dans divers contextes génétiques qui aura permis de comprendre comment ils interagissent entre eux. Ces résultats nous ont amené à proposer le modèle décrit dans la **Figure 13**.

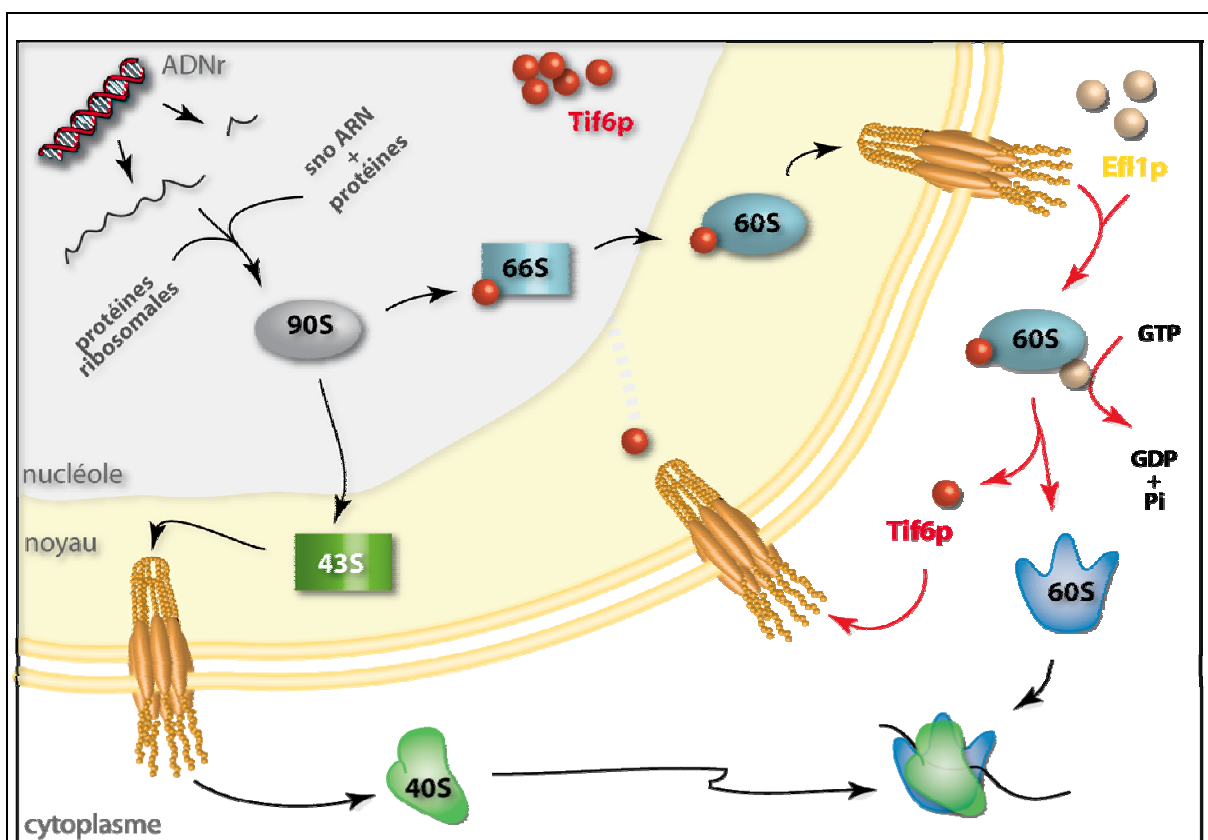


Figure 13 : Modèle de fonctionnement d'Efl1p

Tif6p se fixe au pré-ribosome dans le nucléole, l'accompagne dans le cytoplasme où Efl1p reconnaît ce complexe et permet, suite à un changement conformationnel, le relargage de Tif6p et son recyclage vers le noyau.

A l'aide de ce modèle, il est aisé de comprendre que l'absence d'Efl1p empêche le recyclage de Tif6p vers le noyau et interfère donc avec une étape nuclé(ol)aire de la biogenèse de la sous-unité 60S. D'autre part, il est maintenant possible de comprendre le lien entre Tif6p et Efl1p. Ce lien n'est pas direct mais a lieu via la particule 60S en cours de maturation. De plus, la libération de Tif6p pourrait faire intervenir un réarrangement structural de la grande sous-unité qui pourrait servir de contrôle qualité ultime avant que celle-ci ne s'engage vers la synthèse protéique.

Afin d'appuyer ce modèle, nous avons cherché à mettre au point un test fonctionnel démontrant qu'Efl1p est responsable de la libération de Tif6p de la pré-particule 60S. Pour cela nous avons mis à profit la propriété de Tif6p qui est de jouer le rôle de facteur d'anti-association des sous-unités 60S et 40S. Cette inhibition de la formation de particules 80S devrait donc être bloquée en présence d'Efl1p. Effectivement, Efl1p est capable de faciliter l'association de sous-unités 60S et 40S tout en permettant la libération de Tif6p.

Cette libération de Tif6p médiée par Efl1p nécessite certainement de l'énergie apportée par l'hydrolyse de GTP au niveau d'Efl1p. Il était donc primordial de prouver qu'Efl1p est réellement doué d'une activité GTPasique comme cela était suggéré par les alignements de séquences. Efl1p possède une activité GTPase intrinsèque extrêmement faible, c'est-à-dire que l'hydrolyse de GTP par la protéine seule est très lente. Elle est stimulée fortement par l'addition de la sous-unité 60S qui apporte "l'autre substrat de la réaction". Néanmoins, les taux d'activité GTPasique observés restent faibles aux regards de ce qui a été mesuré pour d'autres GTPases de type EF-2.

3. L'absence d'Efl1p conduit à une hétérogénéité du centre GTPasique

(Graindorge et al., 2005)

La question du changement conformationnel (travail de thèse de Jean-Sébastien Graindorge au sein de l'équipe du Dr F. Fasiolo) nécessaire à la libération de Tif6p est très délicate vu le caractère dynamique de la biogenèse des ribosomes. Dans le but d'obtenir des informations à ce sujet, nous avons comparé les structures en solution de sous-unités ribosomales préparées à partir d'une souche sauvage et d'une souche *efl1Δ1*. Pour écarter la possibilité que les changements que nous avons observés dans une souche *efl1Δ1* sont

dûs à un déficit nucléolaire en Tif6p, nous avons également analysé la structure de particules obtenues à partir d'une souche révertante de *efl1Δ1* (appelée R1) et qui possède une croissance sauvage suite à une mutation au niveau de Tif6p lui permettant d'être libéré dans le cytoplasme et recyclé vers le noyau en l'absence d'Efl1p.

Tout d'abord nous avons vérifié qu'Efl1p se lie bien au centre GTPasique du ribosome. Pour cela nous avons préparé des sous-unités 60S non lavées qui contiennent une forte activité EF-2 vu l'inhibition de cette activité par l'acide fusidique. Sachant qu'Efl1p possède une activité GTPasique bien plus faible, nous l'avons utilisé dans des tests de compétition de l'activité EF-2 pour montrer qu'Efl1p se lie bien au centre GTPasique du ribosome.

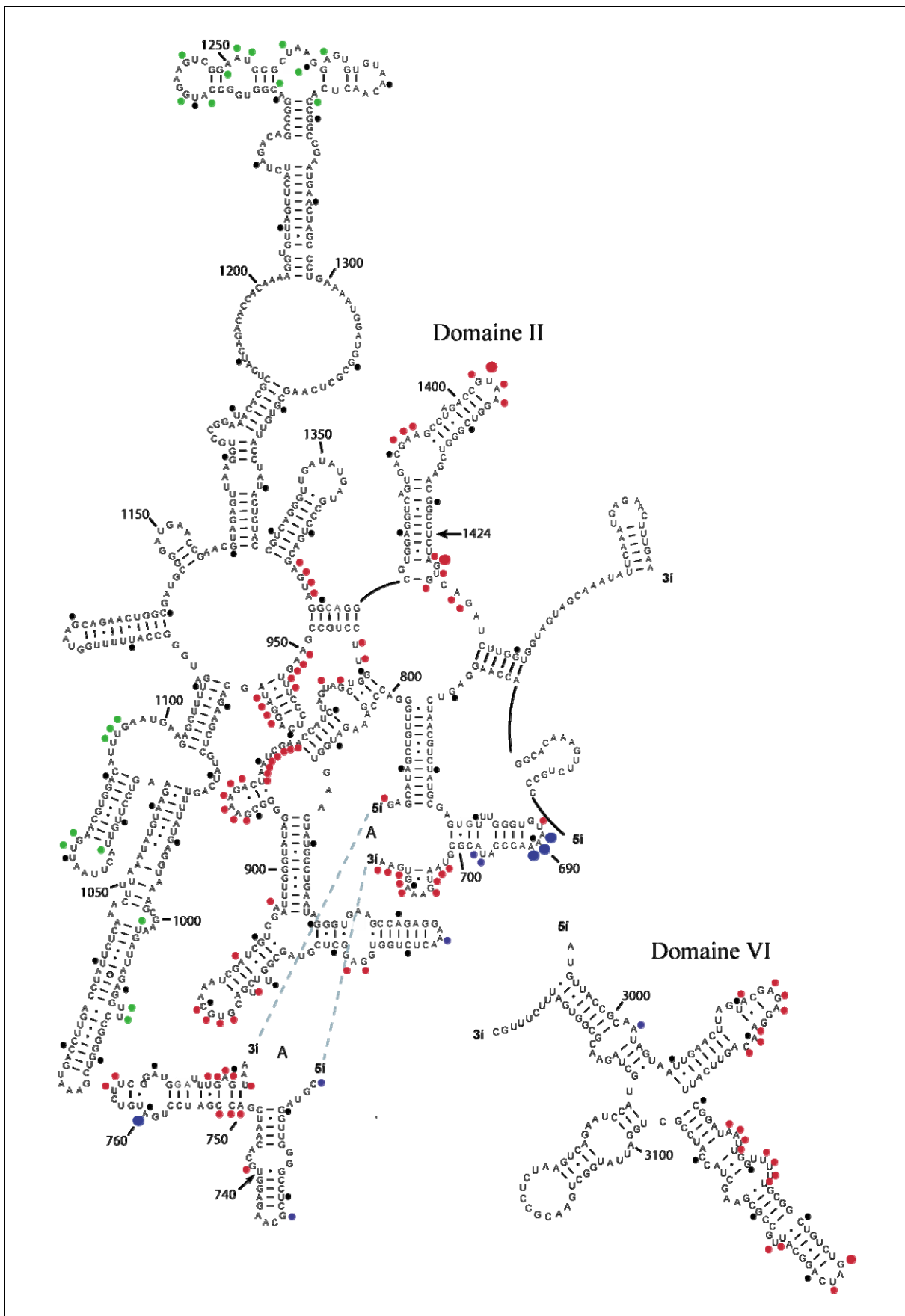
Ensuite, nous avons utilisé des sondes de structure en solution et révélé les endroits modifiés à l'aide de divers oligonucléotides et de la reverse transcriptase couvrant ainsi le domaine II et une partie du domaine VI (boucle α -sarcin) représentant environ 1/3 de l'ARN ribosomique 25S.

Dans un premier temps, nous avons analysé la conformation de l'ARN du centre GTPasique de ribosomes 80S issus de souches sauvages, *efl1Δ1* et R1. A notre grande surprise, nous n'avons constaté aucune différence entre les 3 types de sous-unités. Cette observation ne semble pas en faveur d'un changement conformationnel médié par Efl1p lors de la maturation de la particule 60S.

Pour résumer de façon simple notre analyse structurale des sous-unités 60S, on peut dire que les sous-unités 60S sauvages et R1 possèdent des structures semblables alors qu'il existe des différences claires mais limitées à des régions bien précises pour les 60S *efl1Δ1* (**Figure 14**). Il en résulte que les différences observées pour les sous-unités 60S *efl1Δ1* ont pour origine le déficit nucléolaire de Tif6p puisque les structures 60S sauvages et R1 sont identiques et que dans cette dernière Efl1p est absent alors que le niveau de Tif6p dans le

Figure 14: Structure secondaire de l'ARN 25S de levure

Seules les régions correspondant au domaine II et la région α -sarcin du domaine IV sont représentées. Les points bleus représentent une réactivité supérieure dans les sous-unités 60S sauvages par rapport à celles issues d'une souche R1. Les points rouges représentent une réactivité supérieure dans les sous-unités issues d'une souche *efl1Δ1*. Les positions en vert indiquent les résidus à réactivité identique chez des sous-unités des trois types mais différente de l'ARN nu. La taille des points est proportionnelle à la réactivité des nucléotides.



noyau est normal. De plus, les trois types de particules ne possèdent que des ARNs ribosomiques matures et une composition protéique identique démontrant bien que les sous-unités 60S *efl1Δ1* correspondent à des sous-unités matures ayant une conformation locale différente. Ces sous-unités à la conformation altérée ne sont pas engagées dans la traduction et ne sont probablement pas fonctionnelles.

Parallèlement, nous avons réalisé une analyse protéomique en utilisant la technique du TAP tag (Tandem Affinity purification, Rigaut et al., 1999) pour purifier des pré-particules ribosomiques à partir des contextes sauvages, *efl1Δ1* et R1 en utilisant une construction TAP-Tif6p. Conformément aux résultats de l'analyse conformationnelle de l'ARN, nous avons obtenu des profils similaires dans les trois cas. En plus des protéines ribosomales, nous avons co-élué 26 facteurs d'assemblage, aussi bien des facteurs intervenant dans des étapes précoces que des facteurs intervenant dans des étapes tardives. Ceci démontre bien que Tif6p est présent tout au long du processus de maturation de la grande sous-unité ribosomale.

Lors de nos purifications, nous avons trouvé Lsg1p, une autre GTPase qui intervient tardivement dans la biogenèse de la sous-unité 60S et qui semble impliquée dans le relargage de Nmd3p, l'adaptateur entre le pré-ribosome 60S et le facteur d'export Crm1p. Tif6p ne s'accumule pas sur les pré-ribosomes cytoplasmiques d'une souche mutante de *lsg1* (Hedges et al., 2005) suggérant que les deux GTPases agissent soit de façon séquentielle, soit en tandem pour permettre des réarrangements structuraux importants conduisant à la libération des derniers facteurs de biogenèse avant que les sous-unités ne s'engagent vers la traduction.

De façon intéressante, nous avons trouvé systématiquement la protéine Ytm1p dont on sait qu'elle interagit avec les facteurs Nop1p et Erb1p révélant un lien probable avec d'autres processus cellulaires majeurs (réplication, croissance cellulaire ; Miles et al., 2005). Nous avons également trouvé Pab1p (poly-A-binding protein) et EF1 α , ce qui va de pair avec une fraction cytoplasmique de Tif6p. Finalement, nous avons également identifié trois ORFs, YCR072C, YOR289W et YOR192C. Récemment, Rsa4p, le produit du gène YCR072C, a été caractérisé et semble impliqué dans le transport intranucléaire de la pré-particule 60S (De La Cruz et al., 2005).

L'ensemble de nos résultats nous permet de suggérer qu'Efl1p ne catalyse pas de changement de conformation de la sous-unité 60S durant sa biogenèse mais que le déficit

nucléaire de Tif6p conduit à la formation de particules mal repliées dont le contenu ribonucléoprotéique est normal. Il a été montré que Tif6p intervient dans le clivage C2 de l'ARN ribosomique mais ce n'est pas le seul. Or Tif6p n'a aucune activité endonucléasique ce qui laisse supposer que ce clivage peut avoir lieu en l'absence de Tif6p mais qu'il entraîne la synthèse de particules 60S présentant un défaut structural. Cette conclusion ne nous permet cependant pas d'écarter qu'Efl1p, par l'hydrolyse du GTP, catalyse un mouvement moléculaire au niveau de la sous-unité 60S aboutissant à la libération de Tif6p au moment de l'association avec le complexe de pré-initiation 43S.

4. Remarques annexes

L'assemblage du ribosome chez la bactérie, même s'il est possible tel quel *in vitro*, est malgré tout facilité par des facteurs protéiques qui semblent exploitables comme des nouvelles cibles pour des molécules antibiotiques (Comartin and Brown, 2006). Des pistes de plus en plus nombreuses pour l'interconnexion de la biosynthèse du ribosome eucaryotique avec d'autres processus cellulaires sont mises en évidence (Stavreva et al., 2006 ; Honma et al., 2006). Il est fort à parier que, comme chez les procaryotes, de nouvelles cibles thérapeutiques pourront être mises en évidence (Dresios et al., 2006).

VI. Projets

1. Introduction

Au sens large du terme, la traduction de l'information génétique consiste à décrypter l'information contenue dans les gènes pour synthétiser des molécules (protéines et/ou ARNs) ayant un rôle structural et/ou fonctionnel précis au sein de la cellule. C'est dans ce cadre que viennent s'inscrire les travaux de recherche auxquels j'ai participé (**Figure 15**).

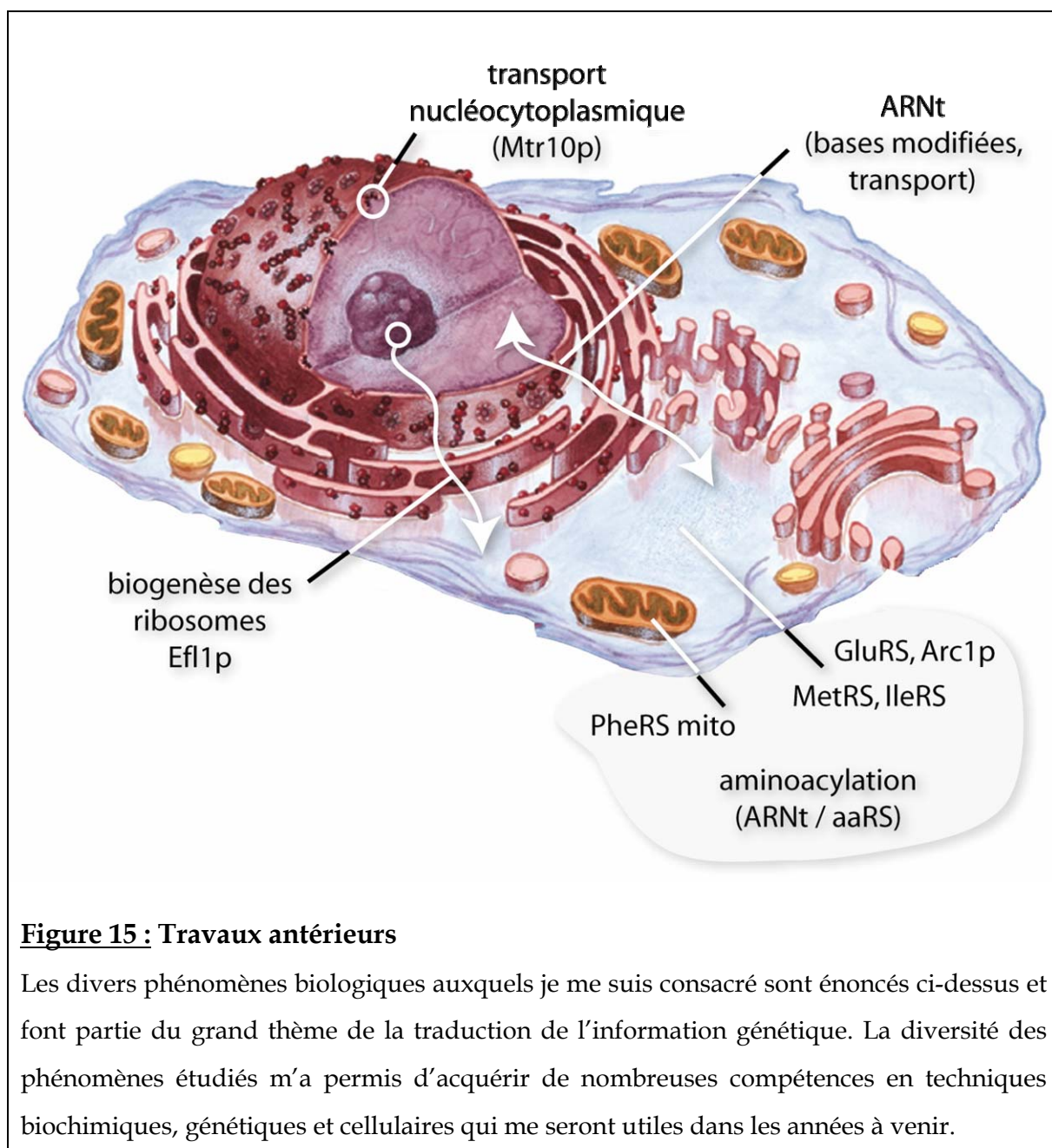


Figure 15 : Travaux antérieurs

Les divers phénomènes biologiques auxquels je me suis consacré sont énoncés ci-dessus et font partie du grand thème de la traduction de l'information génétique. La diversité des phénomènes étudiés m'a permis d'acquérir de nombreuses compétences en techniques biochimiques, génétiques et cellulaires qui me seront utiles dans les années à venir.

Plus particulièrement, la synthèse protéique implique la transcription du message génétique d'ADN en ARN messager (ARNm) puis la traduction de celui-ci en protéines. Cette deuxième étape requiert une correspondance exacte codon / acide aminé (aa) qui est assurée par une molécule adaptatrice, l'ARNt. Celui-ci, chargé avec son acide aminé homologue, permet d'assurer la traduction fidèle de l'ARNm. Par conséquent, l'étape d'aminocyclation de l'ARNt est cruciale et il paraissait logique d'avoir une aaRS particulière pour chaque aa.

L'avènement de l'ère génomique et post-génomique a balayé cette idée en montrant que les organismes possédant le jeu complet et unique des 20 aaRSs constituent plutôt l'exception (Ibba et al., 2000). Diverses observations ont conduit à la découverte de voies alternatives de formation d'un aa-ARNt donné ainsi qu'à la mise en évidence de paralogues d'enzymes de la synthèse protéique impliqués dans d'autres processus cellulaires (Schimmel and Ribas de pouplana, 2000 ; Roy et al., 2003 ; Blaise et al., 2004 ; Campanacci et al., 2004 ; Dubois et al., 2004). L'analyse des voies non conventionnelles d'aminocyclation est intéressante non seulement d'un point de vue évolutif mais également d'un point de vue «appliqué» puisque beaucoup d'entre elles semblent spécifiques à des microorganismes pathogènes de l'homme et permettent d'envisager la conception de nouveaux antibiotiques. A l'heure où les phénomènes de résistance aux antibiotiques commencent à poser des problèmes de santé publique, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, à travers des études d'aspect plus fondamental, constitue une retombée non négligeable.

Chez les eucaryotes, les aaRS forment des complexes de haut poids moléculaire avec d'autres protéines (Mirande, 1991), participent à des événements de régulation de l'expression génique (p.ex. Caillet et al., 2003 et références incluses) et sont capables d'aller aminocycler leur ARNt dans le noyau (Lund and Dahlberg, 1998). Ces observations soulèvent de nombreuses questions qui restent ouvertes quant à l'intégration totale du rôle des aaRSs dans la vie d'une cellule. En effet, il n'est pas raisonnable de penser que le couple ARNt/aaRS évolue de façon autonome dans la cellule mais qu'il fait partie d'un réseau d'interactions où il pourrait lui-même être régulé d'une part et jouer le rôle de régulateur d'autre part. Définir la place occupée par le couple ARNt/aaRS dans la vie de la cellule passera par une étude à spectre large des interactions de ces protéines avec des facteurs impliqués dans d'autres processus cellulaires. Trouver, comprendre et étudier les

spécificités de divers organismes fournira peut-être de nouvelles pistes à but thérapeutique restées jusqu'alors insoupçonnées.

2. Contexte du projet

Au sein de notre UPR, le groupe de D. Kern a mis en évidence chez *Thermus thermophilus*, l'existence de deux AspRSs : i) l'AspRS1 qui ne charge que l'ARNt^{Asp} et qui est de type eubactérien, et, ii) l'AspRS2 qui charge l'ARNt^{Asp} et l'ARNt^{Asn} et qui est de type archaeobactérien (Becker et al., 1997, 2000). La production d'Asp-ARNt^{Asn} étant toxique pour la cellule, des recherches sur le devenir de cet aa-ARNt ont

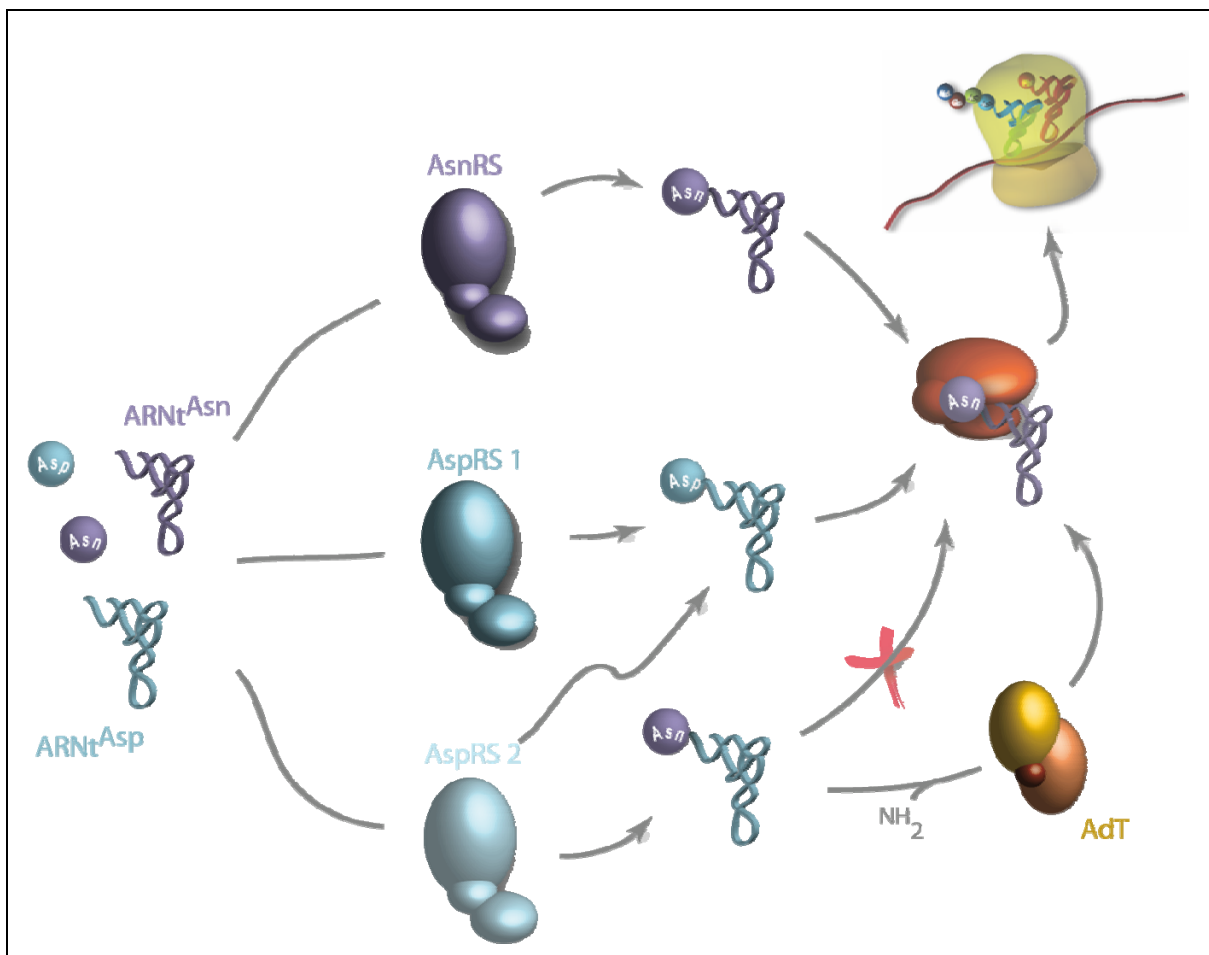


Figure 16 : Voies de formation de l'Asn-ARNt^{Asn} chez *T. thermophilus*

L'aminoacylation des ARNts ainsi que la réaction de transamination nécessitent de l'ATP comme source d'énergie. L'Asp-ARNt^{Asn} n'est pas pris en charge par le facteur d'élongation EF-Tu (indiqué en rouge sur la figure).

conduit à la découverte d'une Asp-ARNt^{Asn} amidotransférase ARNt-dépendante (Asp-AdT) hétérotrimérique qui convertit l'Asp-ARNt^{Asn} en Asn-ARNt^{Asn} en présence d'ATP et d'un donneur de groupe NH₂ (Asn, Gln ou ion ammonium) (Becker et al., 1998, **Figure 16**).

Ces deux étapes constituent une voie indirecte de formation d'Asn-ARNt^{Asn}. Cependant *T. thermophilus* possède également une AsnRS capable de former directement l'Asn-ARNt^{Asn}, mais l'organisme est incapable de synthétiser l'Asn libre rendant la voie indirecte essentielle en milieu carencé en Asn. Les propriétés des partenaires de la voie indirecte d'asparaginylation et les études phylogénétiques suggèrent que cette voie est ancestrale et a précédé l'apparition de l'AsnRS et de l'Asn synthétase, les protagonistes de la voie directe d'asparaginylation (Becker et al., 2000). L'Asp-AdT serait donc apparue dans l'ancêtre commun avant l'émergence des trois règnes du monde vivant. Cette idée est soutenue par le fait que même dans les organismes privés de l'Asp-AdT, on retrouve des paralogues d'une des sous-unités. Il est intéressant de souligner que l'intermédiaire Asp-ARNt^{Asn} n'est pas pris en charge par le facteur d'élongation EF-Tu et par conséquent n'est pas utilisé pour la synthèse des protéines évitant ainsi l'incorporation erronée d'Asp dans les chaînes polypeptidiques.

Dans une étude menée parallèlement à ces travaux, l'équipe du Pr Söll (Université de Yale) a caractérisé chez *Bacillus subtilis* une AdT trimérique constituée des sous-unités GatA, GatB et GatC ayant un fort degré d'homologie avec les sous-unités de l'Asp-AdT de *T. thermophilus* mais assurant la conversion du Glu-ARNt^{Gln} en Gln-ARNt^{Gln} (Curnow et al., 1997). Un travail mené conjointement par les deux équipes a finalement montré que les deux fonctions celle de formation d'Asn-ARNt^{Asn} et celle de formation de Gln-ARNt^{Gln} étaient assurées par un seul et même enzyme de spécificité relaxée, l'AdT (amidotransférase ARNt-dépendante). En effet, l'AdT de *B. subtilis* qui, *in vivo*, assure la formation de Gln-ARNt^{Gln} est capable *in vitro* de convertir l'Asp-ARNt^{Asn} en Asn-ARNt^{Asn} et vice-versa pour l'enzyme de *T. thermophilus*.

L'analyse des génomes séquencés d'eubactéries montre qu'au regard de leur stratégie pour former les aa-ARNt amidés, les organismes peuvent être classés en 4 groupes: i) les organismes possédant l'AsnRS et la GlnRS et qui utilisent la voie directe et moderne d'asparaginylation et de glutaminylation de l'ARNt, ii) les organismes privés d'AsnRS mais possédant la GlnRS ou iii) privés de GlnRS mais possédant l'AsnRS et iv)

ceux privés à la fois d'AsnRS et de GlnRS. L'analyse des génomes des espèces des trois derniers groupes, montre la présence d'un jeu unique de gènes *gatA*, *gatB* et *gatC* codant pour une seule AdT, démontrant, en accord avec l'étude *in vitro*, que le même enzyme peut selon les besoins physiologiques de la bactérie, assurer la fonction d'Asp-AdT ou de Glu-AdT ou même de Glu/Asp-AdT.

Les génomes d'archaebactéries sont privés du gène codant pour la GlnRS. Deux tiers d'entre eux possèdent les gènes *gatCAB* codant pour l'AdT bactérienne tandis que tous codent une Glu-AdT constituée des sous-unités GatE (un paralogue de GatB) et GatD (un paralogue du gène *ansA* codant une L-asparaginase de type I). La Glu-AdT archaebactérienne dimérique, à l'inverse de l'AdT bactérienne trimérique a une spécificité restreinte à la conversion du Glu-ARNt^{Gln} en Gln-ARNt^{Gln}. La coexistence dans les archaebactéries de l'AdT bactérienne de spécificité relâchée et de la Glu-AdT de spécificité stricte s'interprète par l'incapacité de cette dernière AdT à reconnaître le Glu-ARNt^{Gln} archaebactérien (Tumbula et al., 2000).

Les études phylogénétiques basées sur les séquences et les structures d'AspRS, d'AsnRS et d'Asn synthétase, conduites dans l'équipe de D. Kern, suggèrent que l'AspRS archaebactérienne de spécificité relâchée a subi une double duplication de gènes ayant conduit à l'émergence de l'AsnRS et de l'Asn synthétase de type A. La spécificité de l'AsnRS a été conférée après acquisition par la protéine de la capacité à reconnaître et activer l'Asn et après avoir affiné sa spécificité pour l'ARNt^{Asn}. La conversion de l'AspRS en Asn synthétase a nécessité la perte de la capacité de la protéine à reconnaître l'ARNt, par délétion du domaine de liaison de l'anticodon, et par acquisition de la capacité à activer le carboxyle β et non plus le carboxyle α de l'Asp.

En plus des études structurales et fonctionnelles des amidotransférases, l'équipe du Pr Kern (dont je fais dorénavant partie), un nouvel axe de recherches sera développé et il visera à intégrer dans le fonctionnement global de la cellule non seulement les amidotransférases mais d'une façon plus large les aaRSs et les paralogues d'aaRS. Dans un premier temps, ces études se dérouleront chez la levure, un organisme modèle chez lequel il existe des outils génétiques et biochimiques très puissants et avec lesquels je me suis familiarisé depuis mon départ en stage post-doctoral. J'ai déjà évoqué le potentiel thérapeutique des amidotransférases mais il est également fort à parier que l'intégration des aaRSs dans le fonctionnement global de la cellule apportera son lot de nouveautés que

nous ne manquerons pas d'exploiter en plus de l'aspect fondamental de cette recherche. Ces travaux seront menés dans l'équipe du Pr D. Kern que je viens de rejoindre.

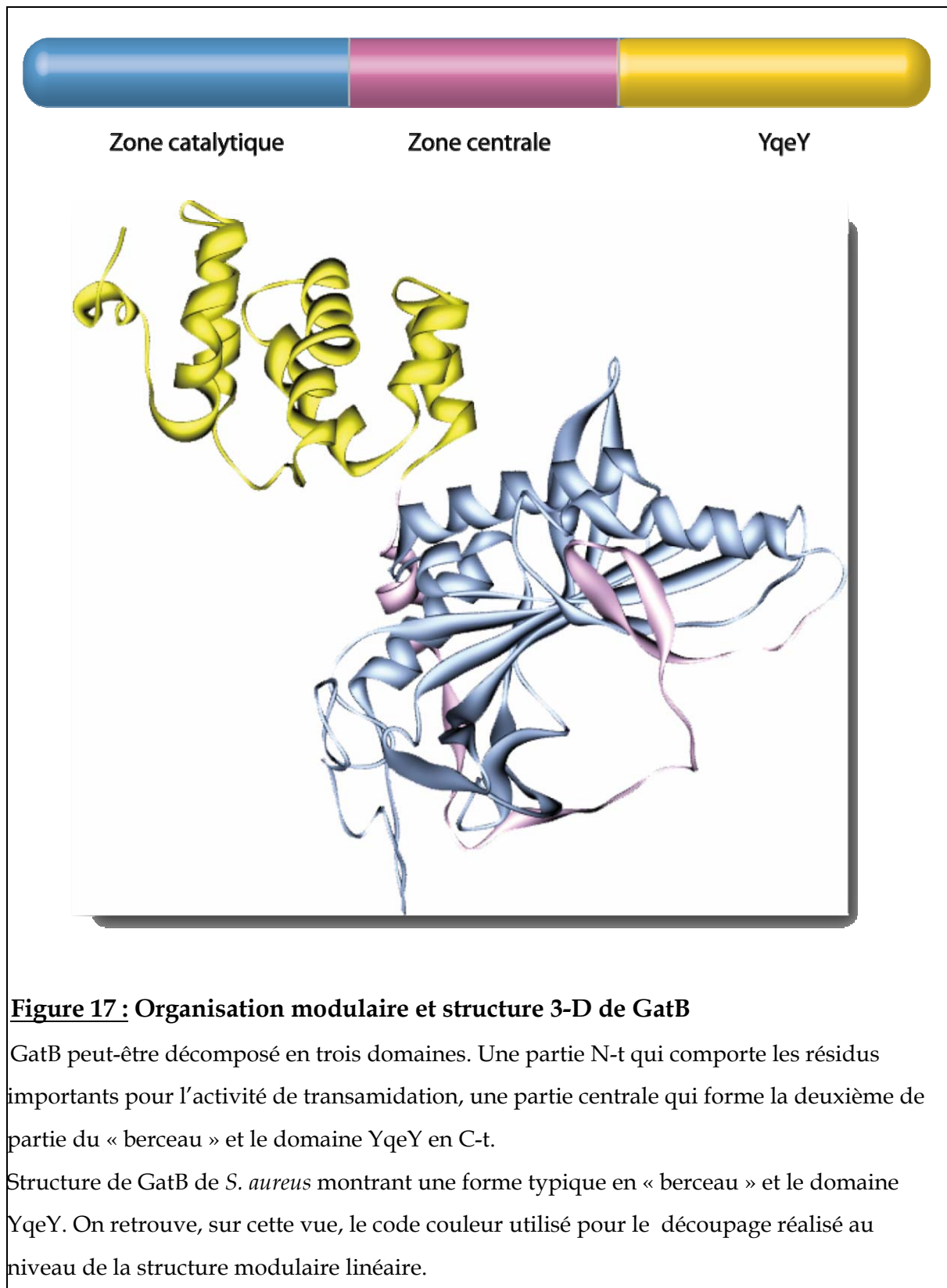
3. L'aspect AdT : GatB et Yqey de levure

Cet aspect de mon projet s'inscrit dans le cadre de la thématique de l'équipe de D. Kern, à savoir l'exploration systématique des particularités de la machinerie traductionnelle, l'étude des propriétés des partenaires atypiques présents dans certains organismes et les vestiges de ces partenaires trouvés dans d'autres organismes ainsi que l'analyse de l'interrelation structurale et fonctionnelle entre les protagonistes de la machinerie traductionnelle.

Les AdT sont très peu étudiées, pourtant ces protéines sont quasi ubiquitaires chez les procaryotes et la sous-unité GatB ou des paralogues de celle-ci sont codées par un grand nombre de génomes de bactéries n'exprimant pas l'AdT et par tous les génomes d'eucaryotes publiés à ce jour. En effet, dès la fin des années 1980, il a été remarqué que l'ARNt^{Gln} mitochondrial de plantes et d'animaux n'était pas chargé directement (Schön et al., 1988).

Chez la levure, un homologue de GatB a été identifié. Il s'agit du gène *pet112* (YBL080c) dont la disruption entraîne un phénotype de déficience respiratoire encore appelé « petite » car les colonies formées par de telles levures sont de taille réduite (Mulero et al., 1994). Cependant, des travaux récents ont montré l'absence de formation de Glu-ARNt^{Gln} dans la mitochondrie de levure (Rinehart et al., 2005) démontrant donc indirectement l'absence d'une activité amidotransférase ARNt-dépendante.

Puisque les eucaryotes semblent privés d'activité AdT, il est fort probable que dans ce phylum GatB ait été déviée vers une autre fonction de la synthèse protéique ; celle-ci reste à établir et constituera un de mes axes de recherches. Par ailleurs, on trouve dans les génomes de la levure et de diverses bactéries un gène codant une chaîne polypeptidique appelée YqeY très similaire au domaine C-t de GatB et dont la fonction reste méconnue (**Figure 17**). Il n'a pas encore été trouvé de trace du gène YqeY chez les eucaryotes supérieurs.



Un aperçu d'une fonction de la protéine YqeY est apporté par l'étude de la GlnRS de *Deinococcus radiodurans* (Denziak et al., en révision). Dans cette bactérie du groupe des déinococcales, YqeY est fusionnée au domaine de liaison de l'anticodon de la GlnRS

(extrémité C-t) et a pour effet d'augmenter l'efficacité catalytique d'aminoacylation essentiellement en augmentant l'affinité de l'enzyme pour l'ARNt. Cette GlnRS a été cristallisée et sa structure 3D, à l'exception du domaine YqeY, a été établie par remplacement moléculaire dans le groupe de D. Kern ; la structure du domaine YqeY a pu être établie par modélisation à partir de la structure de la protéine YqeY présente à l'état libre chez *B. subtilis* (structure 1NG6 déposée en 2002 dans la PDB).

L'examen de la structure 3-D de la GlnRS montre que YqeY est séparé du corps de la protéine par un long peptide mais il n'apporte aucun éclairage sur les bases structurales et sur sa contribution à l'affinité de l'enzyme pour l'ARNt. Il est à noter cependant que le cas de *D. radiodurans* est particulier et que dans les autres espèces, la protéine YqeY est codée sous forme d'une ORF autonome. Comme la plupart de ces organismes sont privés de GlnRS, la fonction de cette protéine ne peut être liée à la glutamylation de l'ARNt.

Les études préliminaires et l'analyse des séquences ne permettent pas de soupçonner une éventuelle activité catalytique de YqeY ou la présence d'un motif de liaison à un nucléotide d'où la nécessité de rechercher la fonction de cette protéine et d'identifier ses éventuels partenaires. Les récentes structures de GatCAB de *S. aureus* (Nakamura et al., 2006) mais surtout celle de GatDE en complexe avec l'ARNt^{Gln} de *M. thermautotrophicus* (Oshikane et al., 2006) montrent que le domaine YqeY est également présent au niveau de GatE et viendrait interagir avec la région d'interaction boucle D-boucle T de l'ARNt.

La protéine YqeY est donc de structure connue, vraisemblablement capable de lier de l'ARN mais ne possède pas de motif connu à ce jour. Chez la levure, elle est codée par le gène YOR215c dont le produit est localisé dans la mitochondrie (résultat obtenue par fusion avec la GFP). L'identification du rôle de YqeY passera par plusieurs types d'expériences à savoir : i) la recherche d'interactants directs (et si oui caractérisation du complexe), ii) des tests « fonctionnels » (liaison à un type d'ARN particulier, et si oui, étude du complexe), iii) la production de protéine, iv) la complémentation par des gènes YqeY d'autres espèces, iv) la recherche d'interactants indirects (voie génétique) et création de mutants et, v) l'étude de l'expression du gène YqeY et son adressage vers la mitochondrie.

La description de chacune des stratégies que nous envisageons serait beaucoup trop longue aussi celles-ci sont résumées dans la **figure 18**. Certaines techniques de ce schéma,

telles le TAP (tandem affinity purification), les analyses sur gel en vue d'un traitement

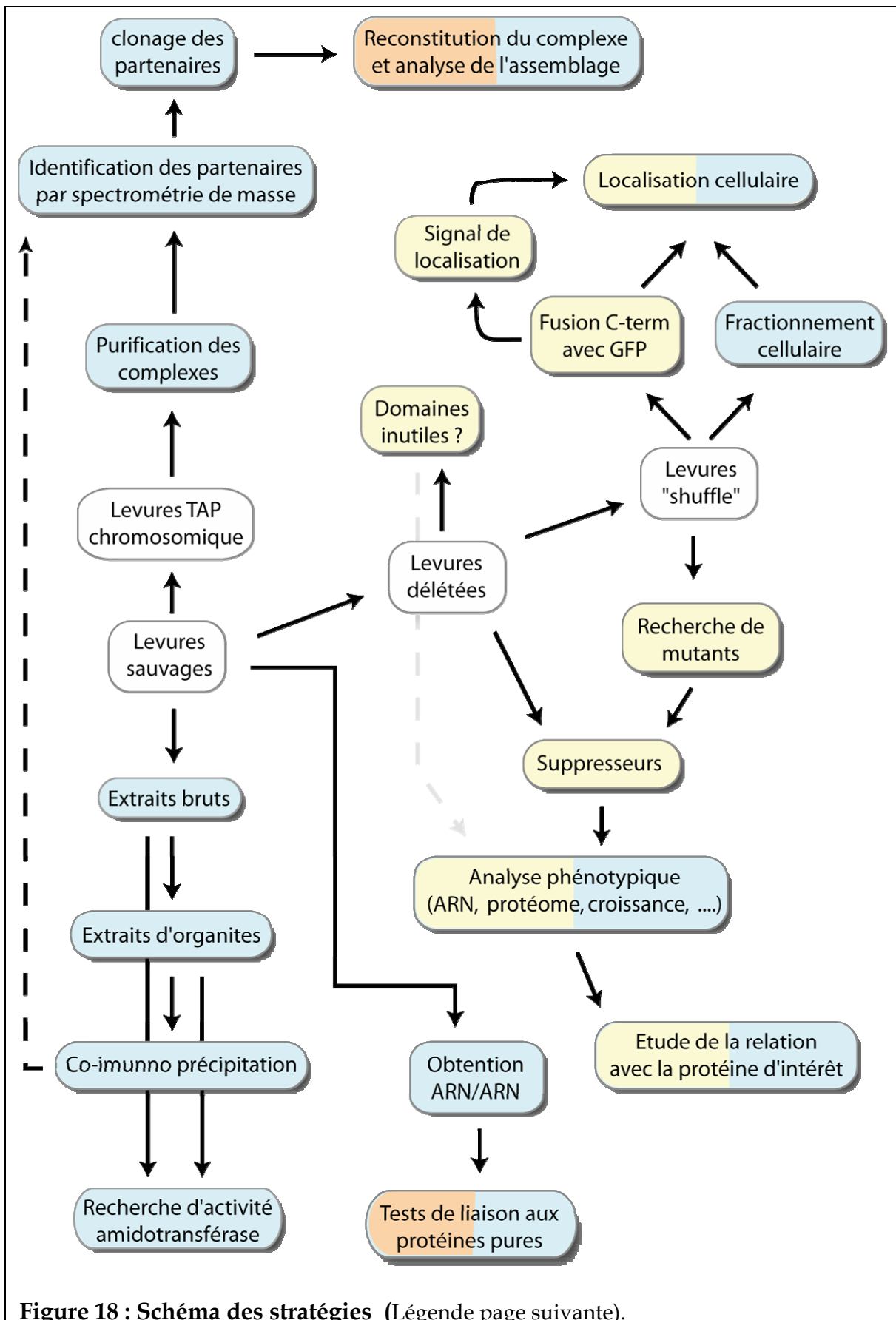
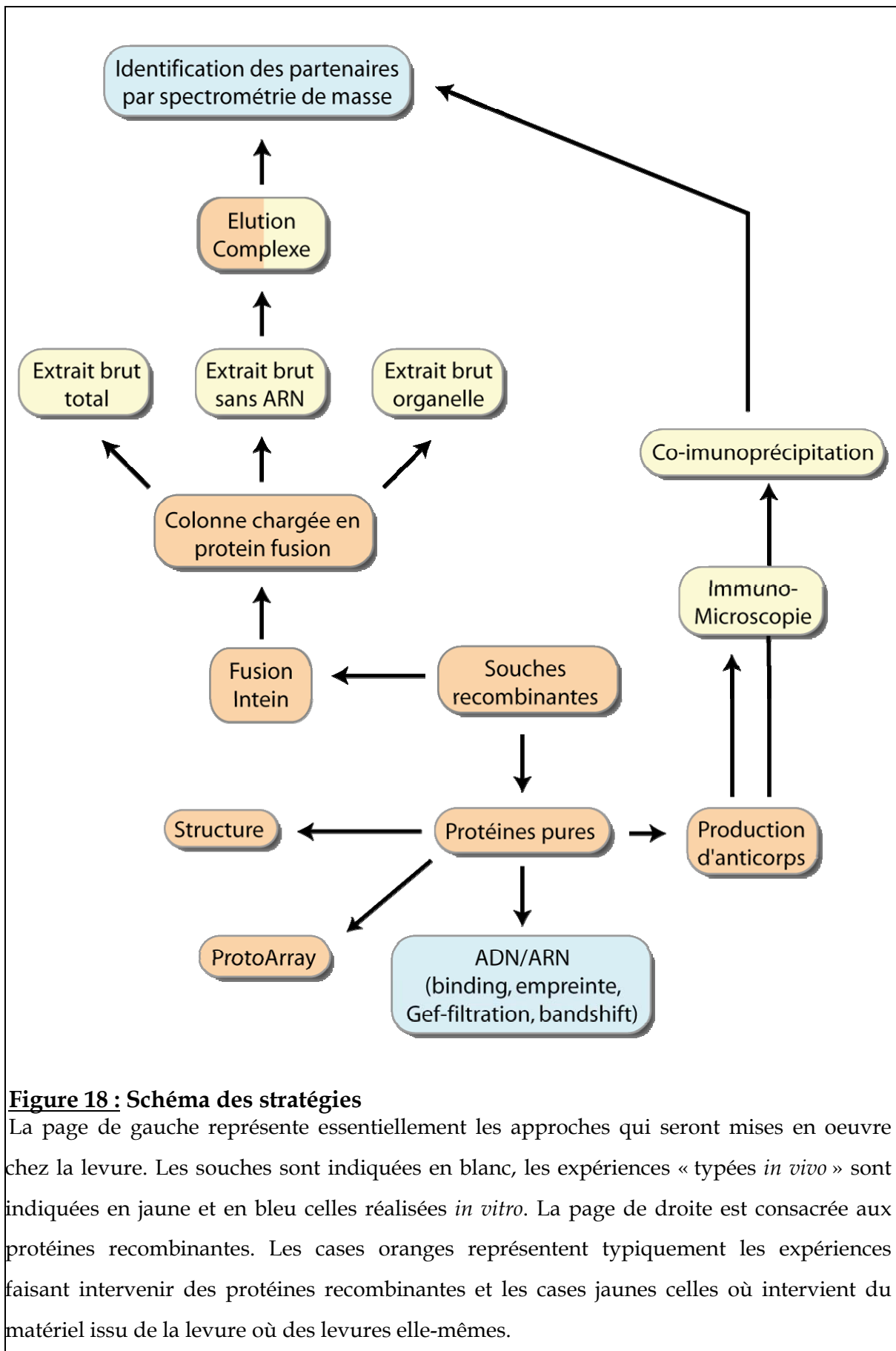


Figure 18 : Schéma des stratégies (Légende page suivante).



pour la spectrométrie de masse, la localisation cellulaire qui sera abordée non seulement *in*

in vivo avec des approches de la biologie moléculaire mais également *in vitro* avec des approches biochimiques par l'analyse du contenu des constituants isolés de la levure (cytoplasme, noyaux et mitochondries) sont des techniques nouvelles pour l'équipe dirigée par D. Kern mais dont j'ai une certaine expérience. Enfin, la levure constitue un outil puissant de criblage permettant de mettre en évidence *in vivo* des interactions, difficile à déceler par les techniques conventionnelles d'étude *in vitro*. En outre, elle permet également la production de mutants dont l'étude peut apporter une aide précieuse dans l'élucidation de la fonction d'un gène.

Il est à envisager que GatB, comme YqeY, si elle est exprimée de manière autonome n'exerce pas sa fonction à l'état libre mais dans un complexe incluant d'autres protéines et/ou ARNs. En effet, il a été montré que GatB est adressée vers la mitochondrie pour y jouer un rôle essentiel mais, peut-être, non comme constituant de l'AdT puisque le Gln-ARNt^{Gln} est formé directement à partir de la GlnRS cytoplasmique et de l'ARNt^{Gln} importés dans l'organelle qui de ce fait est privé de l'AdT (Rinehart et al., 2005). Les banques de données suggèrent que GatB s'associe à diverses protéines : Hrr25 (une kinase nucléaire), Nup100 (une protéine du pore nucléaire), Ypk2 (une kinase cytoplasmique), etc..., mais elle n'a jamais été utilisée comme appât pour rechercher d'éventuels partenaires, ni subi d'investigations plus poussées. Les différentes techniques évoquées dans la figure 18 seront mises en œuvre pour rechercher la fonction de GatB dans les organismes privés d'AdT et son éventuelle association à d'autres protéines.

Par ailleurs, je compte utiliser une approche originale pour mettre en évidence l'interaction de GatB avec d'autres partenaires protéiques. Il s'agit du système de puces à protéines de InVitrogen (Yeast Protoarray, **Figure 19**) permettant en l'espace de quelques heures de caractériser la protéine interagissant avec la protéine d'intérêt. Comme cette technique extrêmement prometteuse est relativement coûteuse, elle fera l'objet d'une demande préalable de financement.

L'extension de l'étude au système humain est prévue tout comme l'utilisation de techniques de type siRNA pour étudier l'expression de GatB et de ses partenaires et pour analyser les phénotypes associés à des variations de son expression.

Les travaux en cours sur GatB dans l'équipe de D. Kern concernent non seulement l'aspect levure/humain mais également les plantes et les bactéries ce qui permet d'aborder l'aspect évolutif de cette partie de la machinerie traductionnelle.

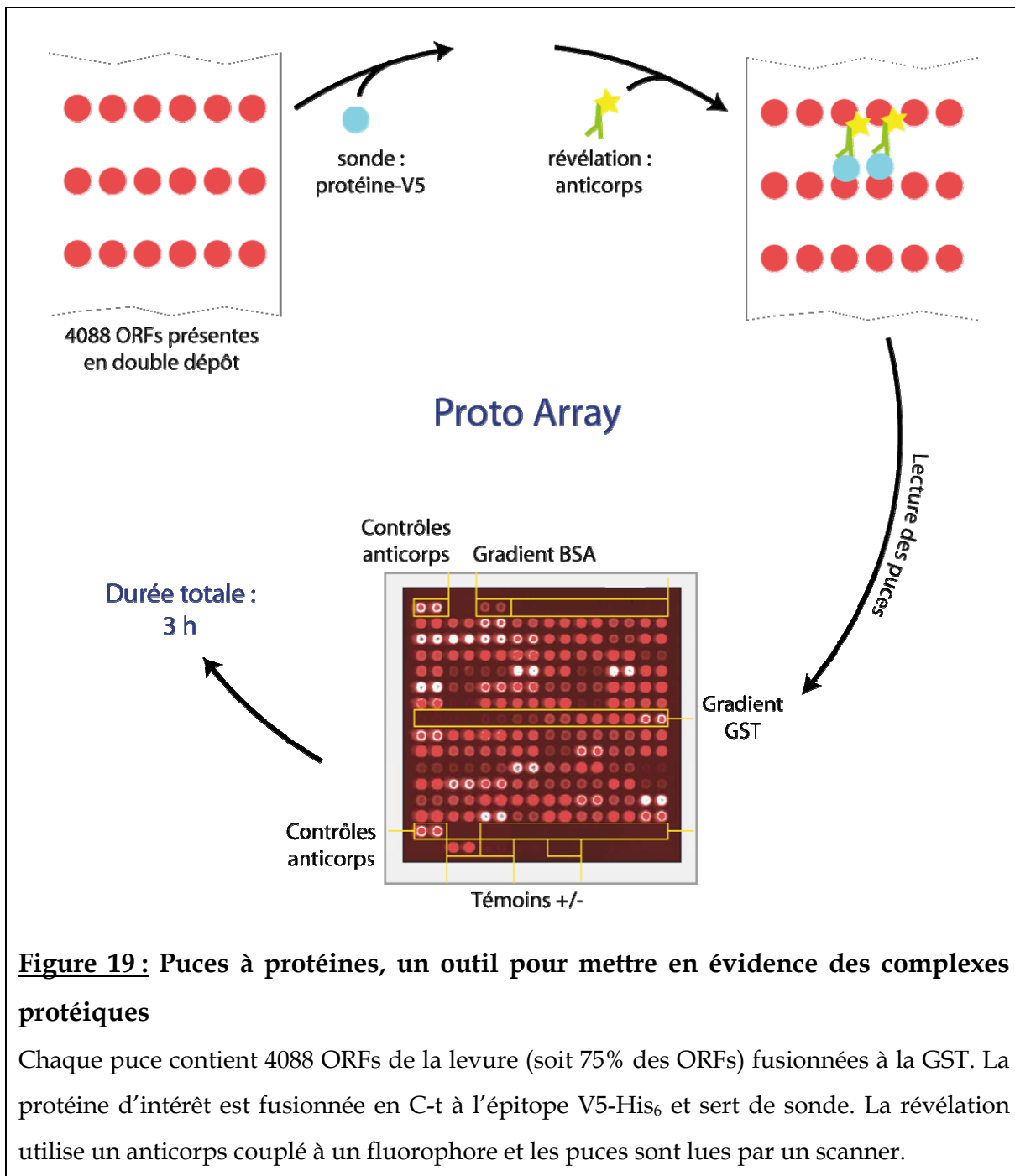


Figure 19 : Puces à protéines, un outil pour mettre en évidence des complexes protéiques

Chaque puce contient 4088 ORFs de la levure (soit 75% des ORFs) fusionnées à la GST. La protéine d'intérêt est fusionnée en C-t à l'épitope V5-His₆ et sert de sonde. La révélation utilise un anticorps couplé à un fluorophore et les puces sont lues par un scanner.

4. Vers une « intégration » de la synthèse protéique

La découverte du code génétique et des acteurs de la synthèse protéique a été le point de départ de recherches couvrant plusieurs décennies pour comprendre comment la cellule transforme l'information génétique contenue dans les gènes en ARNs et protéines ou complexes ARN/protéines fonctionnels. Si à l'heure actuelle notre vision des phénomènes de la synthèse protéique au sens large du terme s'est considérablement améliorée, il reste encore beaucoup à découvrir pour interconnecter les divers processus (transcription, production d'ARNt, aminoacylation, synthèse de ribosomes, ...) et obtenir une description fine de l'organisation spatio-temporelle des mécanismes moléculaires impliqués.

Divers arguments expérimentaux suggèrent une canalisation de l'ARNt depuis le site de sa transcription, en passant par les étapes de maturation, jusqu'au transport vers le cytoplasme où il est recruté par la machinerie traductionnelle. En effet, il a pu être montré que lors de la synthèse protéique chez les mammifères, l'ARNt ne diffusait pas librement dans la cellule (Stapulionis and Deutscher, 1995) et que les composants de l'appareil traductionnel ne sont pas libres dans la cellule (Barbarese et al., 1995).

Des complexes multisynthétasiques impliquant un grand nombre d'aaRSs de spécificités différentes ont été découverts chez les mammifères dès le début des années 1970 (Bandyopadhyay and Deutscher, 1971). Ces complexes existeraient sous forme libre ou associée aux ribosomes, siège de la synthèse protéique. Des interactions entre aaRSs et d'autres protagonistes de la machinerie traductionnelle ont été mises en évidence chez les eucaryotes tels le complexe MetRS-GluRS-Arc1p (Simos et al., 1996a) ou l'interaction de la ValRS avec le facteur d'élongation EF-1 α chez les mammifères (Motorin et al., 1988); un complexe associant la ProRS et la LeuRS vient d'être découvert dans les archaebactéries (Praetorius-Ibba et al., 2005). Enfin d'autres travaux ont montré l'existence de liens fonctionnels entre divers acteurs de la synthèse d'ARNt comme par exemple, chez la levure, le lien de PUS1 (une pseudouridine synthase) avec LOS1 (transport d'ARNt) (Simos et al., 1996b) puis de LOS1 avec Arc1p (Simos et al., 1996a).

Si à l'heure actuelle le processus de la traduction de l'information génétique au sens large du terme a été exploré dans les grandes lignes, il n'en demeure pas moins qu'une intégration des étapes individuelles à un niveau plus élevé fait encore défaut. Par exemple,

l'aminocyclation des ARNts et la synthèse de la chaîne polypeptidique au niveau du ribosome sont assez bien caractérisées, mais ces deux processus ont jusqu'à présent été étudiés de façon indépendante, de sorte que leur interrelation fonctionnelle reste méconnue. Cependant, des travaux récents ont montré que l'interaction des aaRS avec diverses sous-unités du facteur d'élongation EF-1 contribuent à l'augmentation de l'efficacité de la traduction (Sang Lee et al., 2002).

Je souhaite à travers l'étude de l'interactome des aaRSs participer à la compréhension du phénomène de canalisation de la synthèse protéique. Nous trouverons vraisemblablement des liens avec des facteurs impliqués dans d'autres grands processus cellulaires. En effet, des travaux réalisés chez les mammifères offrent de nombreuses pistes quant à l'intégration des aaRSs dans le fonctionnement global de la cellule comme le transport des ARNts, l'apoptose, la croissance cellulaire (revues de Han et al., 2003 ; Park et al., 2005, **Figure 20**).

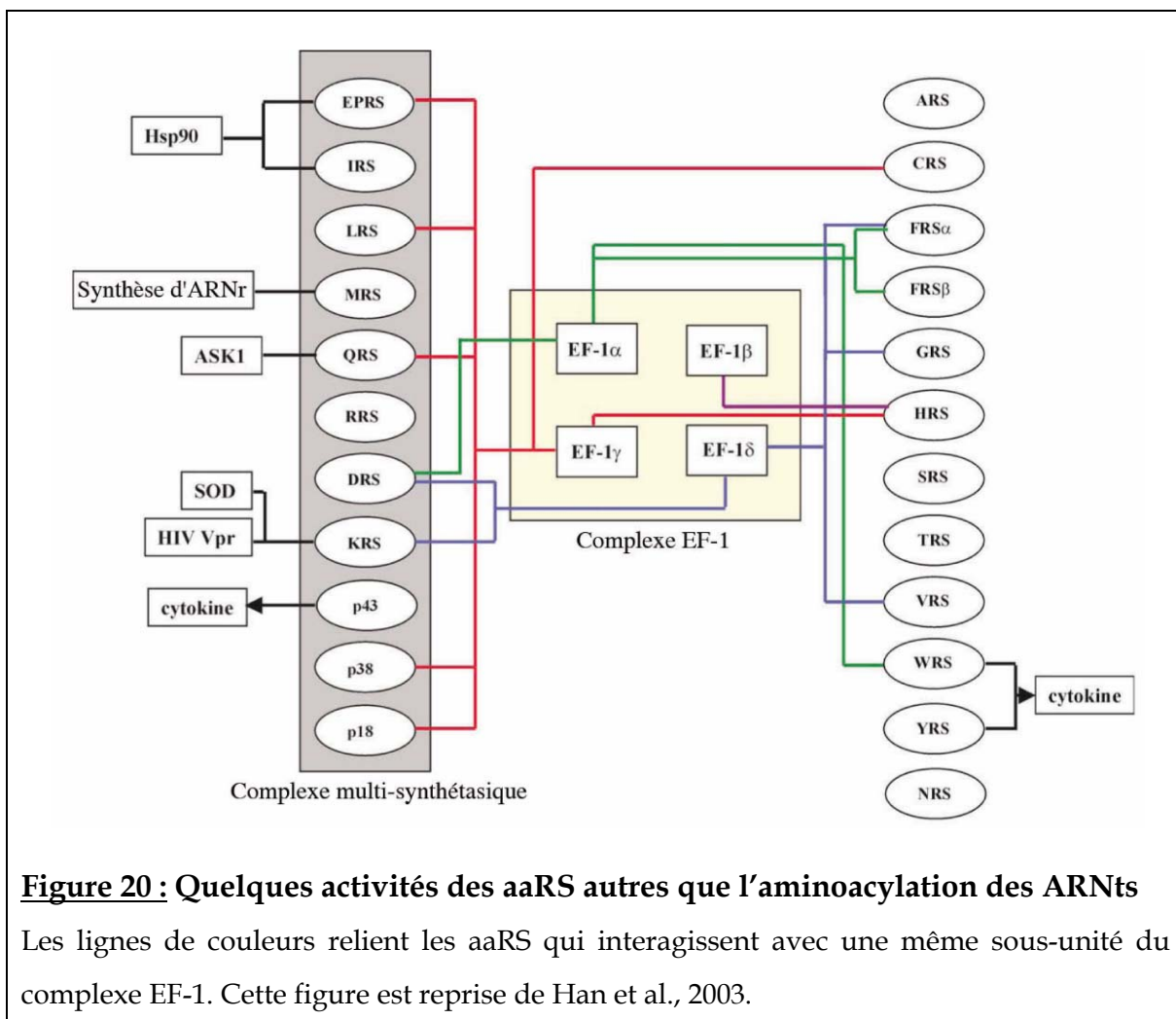


Figure 20 : Quelques activités des aaRS autres que l'aminocyclation des ARNts

Les lignes de couleurs relient les aaRS qui interagissent avec une même sous-unité du complexe EF-1. Cette figure est reprise de Han et al., 2003.

Le défi majeur sera certainement de comprendre pleinement la nature et le fonctionnement de ces interrelations moléculaires afin de les intégrer dans le fonctionnement de la cellule pour éventuellement, être capable d'en exploiter l'éventuel potentiel thérapeutique ou appliqué.

Cette étude mettra, elle aussi, à profit la technique de ProtoArray décrite plus haut et des expériences de localisation *in situ* des protagonistes de cette machinerie. L'interactome des partenaires de la synthèse protéique révélera très probablement des interactions et des complexes macromoléculaires ignorés jusqu'à ce jour et permettra de mettre le doigt sur des voies de régulation de la traduction encore méconnues aujourd'hui. Ce projet s'élargira inmanquablement au système humain. En permettant la localisation subcellulaire fine des partenaires et des étapes de la traduction, ce projet apportera des connaissances inédites sur ce processus complexe et ouvrira de nouvelles perspectives quant à sa compréhension. Mais ses retombées ne s'arrêteront pas là puisque ce travail pourrait nous amener à la conception d'inhibiteurs d'étapes de la synthèse protéique particulières aux microorganismes pathogènes dans le but d'enrayer leur prolifération et trouver des artifices permettant de corriger les dysfonctionnements de certains acteurs de la machinerie traductionnelle à l'origine de diverses pathologies. Parmi ces acteurs on peut trouver des mutants de TyrRS impliqués dans des désordres neurologiques (Jordanova et al., 2006), des mutants de LeuRS impliqués dans le diabète (t Hart et al., 2005) et p38, une des protéines à activité non synthétasique des complexes multi-synthétasiques, impliquée dans la maladie de Parkinson (Ko et al., 2005).

VII. Conclusion

Les divers travaux de recherche auxquels j'ai participé peuvent s'inscrire dans le cadre de la synthèse protéique en prenant cette thématique au sens très large du terme. En effet, je me suis intéressé au phénomène d'aminacylation des ARNt (reconnaissance ARNt-aaRS), au rôle des bases modifiées dans la reconnaissance ARNt-aaRS et à leur synthèse, à la biosynthèse des ARNt, aux échanges nucléocytoplasmiques et la biosynthèse des ribosomes (surtout la particule 60S), une voie métabolique qui allie assemblage d'une particule ribonucléoprotéique et transport nucléocytoplasmique.

L'ensemble de ces études m'a permis d'acquérir une large panoplie de techniques génétiques (chez la levure) et biochimiques (ARN/ protéines structure et fonction) ainsi que de bonnes connaissances des méthodes de localisation cellulaire de protéines et d'ARNs. Les travaux concernant YqeY, GatB et l'interactome des synthétases va me permettre non seulement de mettre pleinement à profit ces acquis mais également de les partager avec les autres membres de l'équipe (pour qui certains aspects sont nouveaux) et d'acquérir de nouvelles compétences telles que la purification de biomolécules, la cristallogénèse et la cristallographie (ou au moins de me familiariser avec ces techniques). Outre l'aspect fondamental de ces travaux, cette étude des particularités de la machinerie traductionnelle nous mènera peut-être vers de nouvelles voies thérapeutiques restées insoupçonnées jusqu'alors.

Bibliographie

A

- Aevarsson A., Brazhnikov E., Garber M., Zheltonosova J., Chirgadze Y., al-Karadaghi S., Svensson L. A. and Liljas A. (1994). Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.*, 13, 3669-3677.
- Aphasizhev R., Senger B. and Fasiolo F. (1997). Importance of structural features for tRNA(Met) identity. *RNA*, 3, 489-497.
- Aphasizhev R., Senger B., Rengers J. U., Sprinzl M., Walter P., Nussbaum G. and Fasiolo F. (1996). Conservation in evolution for a small monomeric phenylalanyl-tRNA synthetase of the tRNA(Phe) recognition nucleotides and initial aminoacylation site. *Biochemistry*, 35, 117-123.

B

- Bandyopadhyay A. K. and Deutscher M. P. (1971). Complex of aminoacyl-transfer RNA synthetases. *J. Mol. Biol.*, 60, 113-122.
- Barbarese E., Koppel D. E., Deutscher M. P., Smith C. L., Ainger K., Morgan F. and Carson J. H. (1995). Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. Cell Sci.*, 108, 2781-2790.
- 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 U.S.A.*, 95, 12832-12837.

- Becker H. D., Reinbolt J., Kreutzer R., Giege R. and Kern D. (1997). Existence of two distinct aspartyl-tRNA synthetases in *Thermus thermophilus*. Structural and biochemical properties of the two enzymes. *Biochemistry*, 36, 8785-8797.
- Becker H. D., Roy H., Moulinier L., Mazauric M. H., Keith G. and Kern D. (2000). *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 39, 3216-3230.
- Becskei A. and Mattaj J. W. (2005). Quantitative models of nuclear transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17, 27-34.
- Behm-Ansmant I., Massenet S., Immel F., Patton J. R., Motorin Y. and Branlant C. (2006). A previously unidentified activity of yeast and mouse RNA:pseudouridine synthases 1 (Pus1p) on tRNAs. *RNA*, 12, 1583-1593.
- Blaise M., Becker H. D., Keith G., Cambillau C., Lapointe J., Giege R. and Kern D. (2004). A minimalist glutamyl-tRNA synthetase dedicated to aminoacylation of the tRNA^{Asp} QUC anticodon. *Nucleic Acids Res.*, 32, 2768-2775.
- Bogengruber E., Briza P., Doppler E., Wimmer H., Koller L., Fasiolo F., Senger B., Hegemann J. H. and Breitenbach M. (2003). Functional analysis in yeast of the Brix protein superfamily involved in the biogenesis of ribosomes. *FEMS Yeast Res.*, 3, 35-43.
- Bonnet J. and Ebel J. P. (1972). Interpretation of incomplete reactions in tRNA aminoacylation. Aminoacylation of yeast tRNA^{Val} II with yeast valyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.*, 31, 335-344.

C

- Caillet J., Nogueira T., Masquida B., Winter F., Graffe M., Dock-Bregeon 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.
- Campanacci V., Dubois D. Y., Becker H. D., Kern D., Spinelli S., Valencia C., Pagot F., Salomoni A., Grisel S., Vincentelli R., Bignon C., Lapointe J., Giege R. and Cambillau C. (2004). The *Escherichia coli* YadB gene product reveals a novel aminoacyl-tRNA synthetase like activity. *J. Mol. Biol.*, 337, 273-283.
- Chapeville F., Lipmann F., Von Ehrenstein G., Weisblum B., Ray W. J., Jr. and Benzer S. (1962). On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 48, 1086-1092.
- Comartin D. J. and Brown E. D. (2006). Non-ribosomal factors in ribosome subunit assembly are emerging targets for new antibacterial drugs. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6, 453-458.
- Corbett A. H. and Silver P. A. (1997). Nucleocytoplasmic transport of macromolecules. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 61, 193-211.

Crick F. H. (1958). On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol., 12, 138-163.

Curnow A. W., Hong K., Yuan R., Kim S., Martins O., Winkler W., Henkin T. M. and Soll D. (1997). Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 94, 11819-11826.

Cusack S., Yaremchuk A. and Tukalo M. (1996). The crystal structure of the ternary complex of *T.thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA(Ser) and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site. EMBO J, 15, 2834-2842.

Czworkowski J., Wang J., Steitz T. A. and Moore P. B. (1994). The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. EMBO J., 13, 3661-3668.

D

de la Cruz J., Sanz-Martinez E. and Remacha M. (2005). The essential WD-repeat protein Rsa4p is required for rRNA processing and intra-nuclear transport of 60S ribosomal subunits. Nucleic Acids Res., 33, 5728-5739.

Despons L., Senger B., Fasiolo F. and Walter P. (1992). Binding of the yeast tRNA(Met) anticodon by the cognate methionyl-tRNA synthetase involves at least two independent peptide regions. J. Mol. Biol., 225, 897-907.

Despons L., Walter P., Senger B., Ebel J. P. and Fasiolo F. (1991). Identification of potential amino acid residues supporting anticodon recognition in yeast methionyl-tRNA synthetase. FEBS Lett., 289, 217-220.

Dresios J., Panopoulos P. and Synetos D. (2006). Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. Mol. Microbiol., 59, 1651-1663.

Dubois D. Y., Blaise M., Becker H. D., Campanacci V., Keith G., Giege 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.

Dunin-Horkawicz S., Czerwoniec A., Gajda M. J., Feder M., Grosjean H. and Bujnicki J. M. (2006). MODOMICS: a database of RNA modification pathways. Nucleic Acids Res., 34, D145-D149.

F

Fornierod M., Ohno M., Yoshida M. and Mattaj I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. Cell, 90, 1051-1060.

Fromont-Racine M., Senger B., Saveanu C. and Fasiolo F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. Gene, 313, 17-42.

G

- Gadal O., Strauss D., Petfalski E., Gleizes P. E., Gas N., Tollervey D. and Hurt E. (2002). Rlp7p is associated with 60S preribosomes, restricted to the granular component of the nucleolus, and required for pre-rRNA processing. *J. Cell Biol.*, 157, 941-951.
- Giegé R., Sissler M. and Florentz C. (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.*, 26, 5017-5035.
- Goldgur Y., Mosyak L., Reshetnikova L., Ankilova V., Lavrik O., Khodyreva S. and Saif M. (1997). The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{Phe}. *Structure*, 5, 59-68.
- Gorlich D., Dabrowski M., Bischoff F. R., Kutay U., Bork P., Hartmann E., Prehn S. and Izaurralde E. (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.*, 138, 65-80.
- Gorlich D. and Mattaj J. W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science*, 271, 1513-1518.
- Graindorge J. S., Rousselle J. C., Senger B., Lenormand P., Namane A., Lacroute F. and Fasiolo F. (2005). Deletion of EFL1 results in heterogeneity of the 60S GTPase-associated rRNA conformation. *J. Mol. Biol.*, 352, 355-369.
- Graindorge J. S., Senger B., Tritch D., Simos G. and Fasiolo F. (2005). Role of Arc1p in the modulation of yeast methyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry*, 44, 1344-1352.
- Grandi P., Rybin V., Bassler J., Petfalski E., Strauss D., Marzioch M., Schafer T., Kuster B., Tschochner H., Tollervey D., Gavin A. C. and Hurt E. (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell.*, 10, 105-115.
- Grosshans H., Simos G. and Hurt E. (2000). Review: transport of tRNA out of the nucleus- direct channeling to the ribosome? *J. Struct. Biol.*, 129, 288-294.

H

- Han J. M., Kim J. Y. and Kim S. (2003). Molecular network and functional implications of macromolecular tRNA synthetase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, 985-993.
- Hedges J., West M. and Johnson A. W. (2005). Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *EMBO J.*, 24, 567-579.
- Honma Y., Kitamura A., Shioda R., Maruyama H., Ozaki K., Oda Y., Mini T., Jeno P., Maki Y., Yonezawa K., Hurt E., Ueno M., Uritani M., Hall M. N. and Ushimaru T. (2006). TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients. *EMBO J.*, 25, 3832-3842.

I

Ibba M., Becker H. D., Stathopoulos C., Tumbula D. L. and Söll D. (2000). The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.*, 25, 311-316.

J

Jakubowski H. (1995). Proofreading *in vivo*. Editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 270, 17672-17673.

Jakubowski H. (1998). Aminoacylation of coenzyme A and pantetheine by aminoacyl-tRNA synthetases: possible link between noncoded and coded peptide synthesis. *Biochemistry*, 37, 5147-5153.

Jakubowski H. (2006). Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J. Nutr.*, 136, 1741S-1749S.

Jakubowski H. and Goldman E. (1992). Editing of errors in selection of amino acids for protein synthesis. *Microbiol. Rev.*, 56, 412-429.

Jordanova A., Irobi J., Thomas F. P., Van Dijck P., Meerschaert K., Dewil M., Dierick I., Jacobs A., De Vriendt E., Guergueltcheva V., Rao C. V., Tournev I., Gondim F. A., D'Hooghe M., Van Gerwen V., Callaerts P., Van Den Bosch L., Timmermans J. P., Robberecht W., Gettemans J., Thevelein J. M., De Jonghe P., Kremensky I. and Timmerman V. (2006). Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat. Genet.*, 38, 197-202.

K

Kadowaki T., Chen S., Hitomi M., Jacobs E., Kumagai C., Liang S., Schneiter R., Singleton D., Wisniewska J. and Tartakoff A. M. (1994). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *J. Cell Biol.*, 126, 649-659.

Kim D. and Tucker P. W. (2006). A regulated nucleocytoplasmic shuttle contributes to Bright's function as a transcriptional activator of immunoglobulin genes. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 2187-2201.

Ko H. S., von Coelln R., Sriram S. R., Kim S. W., Chung K. K., Pletnikova O., Troncoso J., Johnson B., Saffary R., Goh E. L., Song H., Park B. J., Kim M. J., Kim S., Dawson V. L. and Dawson T. M. (2005). Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *J. Neurosci.*, 25, 7968-7978.

L

Lee L. W., Ravel J. M. and Shive W. (1967). A general involvement of acceptor ribonucleic acid in the initial activation step of glutamic acid and glutamine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 121, 614-618.

Lund E. and Dahlberg J. E. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science*, 282, 2082-2085.

M

McBride A. E., Cook J. T., Stemmler E. A., Rutledge K. L., McGrath K. A. and Rubens J. A. (2005). Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions. *J. Biol. Chem.*, 280, 30888-30898.

Miles T. D., Jakovljevic J., Horsey E. W., Harnpicharnchai P., Tang L. and Woolford J. L., Jr. (2005). Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 10419-10432.

Miller O. L., Jr., Hamkalo B. A. and Thomas C. A., Jr. (1970). Visualization of bacterial genes in action. *Science*, 169, 392-395.

Mirande M. (1991). Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40, 95-142.

Morin A., Auxilien S., Senger B., Tewari R. and Grosjean H. (1998). Structural requirements for enzymatic formation of threonylcarbamoyladenine (t6A) in tRNA: an *in vivo* study with *Xenopus laevis* oocytes. *RNA*, 4, 24-37.

Motorin Y., Keith G., Simon C., Foiret D., Simos G., Hurt E. and Grosjean H. (1998). The yeast tRNA:pseudouridine synthase Pus1p displays a multisite substrate specificity. *RNA*, 4, 856-869.

Motorin Yu A., Wolfson A. D., Orlovsky A. F. and Gladilin K. L. (1988). Mammalian valyl-tRNA synthetase forms a complex with the first elongation factor. *FEBS Lett.*, 238, 262-264.

Mulero J. J., Rosenthal J. K. and Fox T. D. (1994). PET112, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required to maintain rho+ mitochondrial DNA. *Curr. Genet.*, 25, 299-304.

N

Nakamura A., Yao M., Chimnaronk S., Sakai N. and Tanaka I. (2006). Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB. *Science*, 312, 1954-1958.

Nakielny S. and Dreyfuss G. (1997). Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 420-429.

O

Oshikane H., Sheppard K., Fukai S., Nakamura Y., Ishitani R., Numata T., Sherrer R. L., Feng L., Schmitt E., Panvert M., Blanquet S., Mechulam Y., Söll D. and Nureki O. (2006). Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science*, 312, 1950-1954.

P

- 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.
- Pemberton L. F. and Paschal B. M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 6, 187-198.
- Powers T. and Walter P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 10, 987-1000.
- Praetorius-Ibba M., Rogers T. E., Samson R., Kelman Z. and Ibba M. (2005). Association between archaeal prolyl- and leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA(Pro) aminoacylation. *J. Biol. Chem.*, 280, 26099-26104.

R

- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M. and Seraphin B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.*, 17, 1030-1032.
- Rinehart J., Krett B., Rubio M. A., Alfonzo J. D. and Söll D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev.*, 19, 583-592.
- Roy H. and Ibba M. (2006). Phenylalanyl-tRNA synthetase contains a dispensable RNA-binding domain that contributes to the editing of noncognate aminoacyl-tRNA. *Biochemistry*, 45, 9156-9162.
- Roy H., Ling J., Alfonzo J. and Ibba M. (2005). Loss of editing activity during the evolution of mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.*, 280, 38186-38192.
- Roy H., Ling J., Irnov M. and Ibba M. (2004). Post-transfer editing *in vitro* and *in vivo* by the beta subunit of phenylalanyl-tRNA synthetase. *EMBO J.*, 23, 4639-4648.
- 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. U.S.A.*, 100, 9837-9842.

S

- Sampson J. R., DiRenzo A. B., Behlen L. S. and Uhlenbeck O. C. (1989). Nucleotides in yeast tRNA^{Phe} required for the specific recognition by its cognate synthetase. *Science*, 243, 1363-1366.
- Sang Lee J., Gyu Park S., Park H., Seol W., Lee S. and Kim S. (2002). Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291, 158-164.

- Sanni A., Walter P., Boulanger Y., Ebel J. P. and Fasiolo F. (1991). Evolution of aminoacyl-tRNA synthetase quaternary structure and activity: *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 88, 8387-8391.
- Schimmel P. (1995). An operational RNA code for amino acids and variations in critical nucleotide sequences in evolution. J. Mol. Evol., 40, 531-536.
- Schimmel P. and Ribas De Pouplana L. (2000). Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. Trends Biochem. Sci., 25, 207-209.
- Schön A., Kannangara C. G., Gough S. and Söll D. (1988). Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. Nature, 331, 187-190.
- Schulman L. H. and Pelka H. (1988). Anticodon switching changes the identity of methionine and valine transfer RNAs. Science, 242, 765-768.
- Senger B., Aphasizhev R., Walter P. and Fasiolo F. (1995). The presence of a D-stem but not a T-stem is essential for triggering aminoacylation upon anticodon binding in yeast methionine tRNA. J. Mol. Biol., 249, 45-58.
- Senger B., Auxilien S., Englisch U., Cramer F. and Fasiolo F. (1997). The modified wobble base inosine in yeast tRNA^{Ile} is a positive determinant for aminoacylation by isoleucyl-tRNA synthetase. Biochemistry, 36, 8269-75.
- Senger B., Despons L., Walter P. and Fasiolo F. (1992). The anticodon triplet is not sufficient to confer methionine acceptance to a transfer RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 10768-10771.
- Senger B., Despons L., Walter P., Jakubowski H. and Fasiolo F. (2001). Yeast cytoplasmic and mitochondrial methionyl-tRNA synthetases: two structural frameworks for identical functions. J. Mol. Biol., 311, 205-216.
- Senger B. and Fasiolo F. (1996). Yeast tRNA^{Met} recognition by methionyl-tRNA synthetase requires determinants from the primary, secondary and tertiary structure: a review. Biochimie, 78, 597-604.
- Senger B. and Fasiolo F. (1996). Yeast tRNA^{Met} recognition by methionyl-tRNA synthetase requires determinants from the primary, secondary and tertiary structure: a review. Biochimie, 78, 597-604.
- Senger B., Lafontaine D. L., Graindorge J. S., Gadad O., Camasses A., Sanni A., Garnier J. M., Breitenbach M., Hurt E. and Fasiolo F. (2001). The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. Mol. Cell., 8, 1363-73.
- Senger B., Simos G., Bischoff F. R., Podtelejnikov A., Mann M. and Hurt E. (1998). Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. EMBO J., 17, 2196-207.
- Shaheen H. H. and Hopper A. K. (2005). Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102, 11290-11295.

- Si K., Chaudhuri J., Chevesich J. and Maitra U. (1997). Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding translation initiation factor 6. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 94, 14285-14290.
- Si K. and Maitra U. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Mol. Cell Biol.*, 19, 1416-1426.
- Simader H., Hothorn M., Kohler C., Basquin J., Simos G. and Suck D. (2006). Structural basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed by crystal structures of two binary sub-complexes. *Nucleic Acids Res.*, 34, 3968-3979.
- Simos G. and Hurt E. (1999). Transfer RNA biogenesis: A visa to leave the nucleus. *Curr. Biol.*, 9, R238-R241.
- Simos G., Sauer A., Fasiolo F. and Hurt E. C. (1998). A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell*, 1, 235-242.
- Simos G., Segref A., Fasiolo F., Hellmuth K., Shevchenko A., Mann M. and Hurt E. C. (1996a). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.*, 15, 5437-5448.
- Simos G., Tekotte H., Grosjean H., Segref A., Sharma K., Tollervey D. and Hurt E. C. (1996b). Nuclear pore proteins are involved in the biogenesis of functional tRNA. *EMBO J.*, 15, 2270-2284.
- Stapulionis R. and Deutscher M. P. (1995). A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 7158-7161.
- Stavreva D. A., Kawasaki M., Dundr M., Koberna K., Muller W. G., Tsujimura-Takahashi T., Komatsu W., Hayano T., Isobe T., Raska I., Misteli T., Takahashi N. and McNally J. G. (2006). Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis. *Mol. Cell Biol.*, 26, 5131-5145.
- Szweykowska-Kulinska Z., Senger B., Keith G., Fasiolo F. and Grosjean H. (1994). Intron-dependent formation of pseudouridines in the anticodon of *Saccharomyces cerevisiae* minor tRNA^{le}. *EMBO J.*, 13, 4636-4644.

T

- Takano A., Endo T. and Yoshihisa T. (2005). tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science*, 309, 140-142.
- Trapman J., Retel J. and Planta R. J. (1975). Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp. Cell Res.*, 90, 95-104.
- Tschochner H. and Hurt E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, 13, 255-263.
- Tumbula D. L., Becker H. D., Chang W. Z. and Soll D. (2000). Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature*, 407, 106-110.

U

Udem S. A. and Warner J. R. (1972). Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol., 65, 227-242.

Urbonavicius J., Qian Q., Durand J. M., Hagervall T. G. and Bjork G. R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. EMBO J., 20, 4863-4873.

V

Venema J. and Tollervey D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Ann. Rev. Genet., 33, 261-311.

X

Xu B., Krudy G. A. and Rosevear P. R. (1993). Identification of the metal ligands and characterization of a putative zinc finger in methionyl-tRNA synthetase. J. Biol. Chem., 268, 16259-46264.

Xu C. and Henry M. F. (2004). Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. Mol. Cell. Biol., 24, 10742-10756.

Y

Yoshihisa T. (2006). tRNA, new aspects in intracellular dynamics. Cell. Mol. Life Sci., 63, 1813-1818.

Z

Zaragoza D., Ghavidel A., Heitman J. and Schultz M. C. (1998). Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. Mol. Cell. Biol., 18, 4463-4470.

Publications

(ordre chronologique)