



HAL
open science

Le complexe multisystématique AME de levure : dynamique de l'édifice et rôles non canoniques de ces composants

Ludovic Enkler

► To cite this version:

Ludovic Enkler. Le complexe multisystématique AME de levure : dynamique de l'édifice et rôles non canoniques de ces composants. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ055 . tel-01423846

HAL Id: tel-01423846

<https://theses.hal.science/tel-01423846>

Submitted on 1 Jan 2017

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

ED414

THÈSE

Présentée par :

Ludovic ENKLER

Soutenue le : **12 Septembre 2014**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaire et cellulaires de la biologie

Le complexe multisynthétasique AME de levure
Dynamique de l'édifice et rôles non canoniques de ses composants

THÈSE dirigée par (Directeur/Co-directeur) :

M. BECKER Hubert D. Professeur, Institut de Physiologie et de Chimie Biologique (UMR7156)
M. SENGER Bruno Docteur, Institut de Physiologie et de Chimie Biologique (UMR7156)

RAPPORTEURS :

Mme. DELAHODDE Agnès Docteur, Institut de Génétique et Microbiologie (UMR8621)
M. MIRANDE Marc Docteur, LEBS Centre de recherche de Gif-sur-Yvette

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. LUQUE ROMERO Ignacio Docteur, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Mme. FRUGIER Magalie Docteur, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (UPR9002)

“La chance nait d’une rencontre entre la préparation et l’opportunité.”

Sénèque

“Tout ce qui est dans la limite du possible doit être et sera accompli.”

Jules Verne

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier les membres du jury, le Dr. Agnès Delahodde, le Dr. Magalie Frugier, le Dr. Marc Mirande et le Pr. Ignacio Luque Roméro qui me font l'honneur de juger mon travail.

Je remercie également le Dr. Ivan Tarrasov pour son accueil au sein de l'UMR7156, ainsi que pour son aide au cours de ma préparation au concours de l'École Doctorale.

Je voudrais remercier le Dr. Robert Martin pour sa présence dans ce jury en tant que membre invité, mais également pour nos discussions lors de ma préparation pour le concours de l'ÉD ainsi qu'au cours de toutes nos réunions de laboratoire. Vos connaissances théorique et technique nous ont beaucoup apporté ! Merci également d'avoir partagé avec moi votre amour du vin et quelques grands moments de dégustations et de rigolades aux quatre coins du monde !

Hubert, je ne sais même pas par où commencer ! Tout d'abord merci pour ces 5 années passées en ta compagnie. Tu as été à plus d'un titre un exemple et une source d'inspiration pour moi. Ton ouverture et tes connaissances, ta compassion et ton sens de l'humour m'ont permis de passer 5 belles années dans ton équipe. Je pourrais encore m'étaler comme cela sur des pages, énumérer le nombre de cafés, de fous rires, de prises de becs...que nous avons eu. Simplement Merci !

A toi Bruno – *Brunes/Bulle de savon/Brownie* – Senger. Comme pour Hubert, il y aurait tant de choses à dire...Merci pour ton aide précieuse à (quasiment) chaque moment de ma thèse. Tu es un exemple de zénitude et de débrouillardise ! Je vais regretter nos discussions matinales, nos petits breaks de 12h30 et ton sens de l'humour ! Pour tout cela (et bien d'autres choses encore) merci !

Merci à vous aussi mes compagnons de galère : Daphné, ton sourire quotidien et tes petites blagues vont me manquer. Nos échanges d'idées aussi ! Je sais que tu vas porter le sujet MetRS plus loin qu'on aurait pu l'imaginer ! N'oublie pas de tendre l'oreille dès que quelqu'un au labo dira « *mesl* » ! Gaëtan tu es et tu resteras mon bleu au labo ☺ j'ai passé des moments mémorables en ta compagnie et je pense que ça ne va pas s'arrêter là ! Du temps a passé depuis cet été « mitochondrial » ! Continu sur ta lancée et ça va rouler pour toi ! Jo, comment ne pas te remercier de m'avoir ouvert les yeux et l'esprit sur un (très) grand nombre de sujets ! Nos discussions technique, philosophique et nos fous rires vont terriblement me manquer (tout comme notre rdv quotidien de 12h30 avec Bruno...). Bon vent à toi chez les Suisses !

A tous les anciens du labo (337 et IPCB), un grand merci également. A toi Matthieu qui m'a pris sous ton aile en 2010 et qui m'a tant appris. A Nizar, son trash-métal-hardcore et son célèbre « Maman ! » dont j'entends encore l'écho dans le labo... A toi Frédo mon mentor de Nanars et mon

compatriote des longues nuits d'étés, tu sublimeras les accords d'or encore longtemps ! A Guigz, maintenant sous le soleil de Lyon. Merci pour toutes ces franches rigolades, ces soirées musicales et nos longues discussions (encore désolé pour ton tendon...) ! Merci à Yuhei, j'ai eu la chance de partager presque 3 ans avec ton savoir, ton humour et tes petites attentions. La philosophie Nippone hante le laboratoire grâce à toi ! J'espère un jour te revoir dans ton magnifique pays. Merci à toi Aline pour ton aide à la paillasse et mon initiation à la culture cell !

Un grand merci à tous ceux du 4^o étage de l'IPCB. A toi Sylvie pour mon initiation au microscope, pour ton enthousiasme et ta bonne humeur. A Johann pour avoir su me guider dans mes palabres traffickingsque ! Ton savoir de bibliothèque est une mine d'or pour l'équipe ! A Bruno (R) pour ton aide précieuse en ces moments de rédaction. A Aline K, notre maman à tous qui nous fait des miracles ! Si, vraiment ! Merci ! Sans oublier Anne-Marie, sa bonne humeur à toute épreuve et son rire communicatif, Dimitri et nos partagent musicaux, Yann et son sens de l'humour hors norme, Nina et ses conseils techniques, Benoît et ses blagues et conseils de poster (ils sont toujours le bienvenu) !

Je n'oublie pas non plus toutes les personnes avec qui j'ai partagé une partie de ma thèse à l'IBMC, je pense tout particulièrement à Delphine P et Fafa.

Je ne saurais comment remercier toute l'équipe enseignante de PAM (Luc, Mickael, Fabrice M et Claire) pour avoir apporté tant de finesse à ces TPs, je n'y aurai pas survécu sans vous. Merci à Daniela pour sa gentillesse et ses cours d'enzymologie très instructifs et Angélique pour son aide précieuse pendant mes semaines de TP de FPB.

Mes amis, Etienne, Mathieu, Fabien...on se suit depuis le master, et vous êtes comme des frères pour moi. Je vous dois énormément. Merci d'avoir été là depuis le début ! A vous aussi mes demoiselles Clémence et Julie...vous apportez de la distinction dans nos grands moments de digression. Vous êtes notre salut à tous ! Merci de partager nos vies ! Mélanie M, tu es l'exemple même qu'il est parfois bon de s'ennuyer en cours...ACS nous a réuni et je suis content de t'avoir dans ma vie, tu es une amie en or. Mélanie B, tu as été ma tortionnaire pendant 2 ans et demi et je reviendrais sans hésiter ! Tu es une perle et tu apportes un peu de douceur dans ce monde sans pitié qu'est la science. Un grand merci à Pn pour toutes ces années passées ensemble, nos fous rires et nos tragédies ! Pau et Manu je ne vous oublie pas non plus...nos grandes discussions et nos dérives de l'Irish vont me manquer ! j'ai également une pensée pour Chris, avec qui j'ai partagé de beaux moments depuis le lycée...Merci également à Céline et Roxanne pour m'avoir accompagné toutes ces années. Et finalement Marion, oui je me garde le meilleur pour la fin ! Tu as été à mes côtés depuis le Master 2...tu m'as accompagné et supporté à travers les moments les plus importants de ces 4 dernières années. J'ai appris énormément de choses à tes côtés. Tu es un peu mon « ancre cytoplasmique » ! Merci d'être là.

Sommaire

I. Introduction générale	1
I.1 Généralités	3
I.2 La traduction eucaryote.....	4
I.2.1 Le ribosome eucaryote	10
I.2.2 L'initiation	10
I.2.3 L'élongation	13
I.2.4 Terminaison et recyclage du ribosome	15
I.2.5 Autres particularités de la traduction	16
I.3 Aminoacyl-ARNt synthétase et formation de l' aminoacyl-ARNt correspondant.....	18
I.3.1 Biogénèse des ARNt et nouveautés conceptuelles.....	18
I.3.2 Epissage et maturation	20
I.3.3 Modifications et rôles.....	20
I.3.4 Dégradation.....	22
I.3.5 Localisation subcellulaire	22
I.3.6 Nouveautés émergentes.....	23
I.3.7 Aminoacyl-ARNt synthétases : classes et fonctions	24
I.4 Les complexes multisynthétasiques	31
I.4.1 Origines et rôles	33
I.4.2 Natures et diversité des complexes	35
I.4.3 Domaines et motifs spécifiques	43
I.4.4 Variants, physiocrines et régulation homéostatique.....	49
I.4.5 Aminoacyl-ARNt synthétases et dysfonctionnements cellulaire	50
I.4.6 Discussion générale sur les complexes	51
I.5 Le métabolisme fermentaire et la transition diauxique	54
I.5.1 Les voies Ras/PKA, TOR et Snf1-4.....	54
I.5.2 Les mitochondries et la respiration chez la levure <i>S.cerevisiae</i>	56
I.5.3 Expression et import des protéines mitochondriales.....	60
I.5.4 Les complexes de la chaîne respiratoire.....	63
I.5.5 Synchronisation du génome nucléaire et mitochondrial	66
I.6 Mon sujet de thèse.....	68
II. Analyse du complexe AME chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71
II.1 Apport de mon travail de thèse à la problématique	73
II.2 Article 1 : Expression of nuclear and mitochondrial genes encoding ATP synthase is synchronized by disassembly of a multisynthetase complex.....	76
III. Impact du complexe AME sur le complexe III de la chaîne respiratoire	145

III.1 Introduction au sujet.....	147
III.2 Résultats	147
III.2.1 La souche nM produit une quantité importante de ROS	147
III.2.2 Les ROS produit dans la souche nM sont issus du complexe III de la CR	147
III.2.3 La mort de la souche nM en respiration n'est pas due aux ROS.....	151
III. 3 Discussion et perspectives.....	155
III.4 Matériels et méthodes.....	157
III.4.1 Milieux de culture	157
III.4.2 Acquisition des images de microscopie et mesure de ROS.....	158
III.4.3 Préparation des extraits protéiques totaux et immunodétection	158
III.4.4 Tests d'activités du complexe III de la CR.....	158
III.4.5 Etude transcriptomique des gènes nucléaires du complexe III de la CR.....	159
III.4.6 Microscopie électronique à transmission	159
III.4.7 Traduction <i>in vivo</i> mitochondriale.....	159
IV. Etude de l'EPRS^{N1} chez les mammifères et son rôle dans les mitochondries	161
IV. 1 Introduction au sujet.....	163
IV.1.1 L'EPRS et les domaines WHEP.....	163
IV.1.2 L' EPRS ^{N1} : variant transcriptionnel et rôle dans les cellules humaines.....	164
IV.1.3 Origines du projet de recherche sur l'EPRS ^{N1}	166
IV. 2 Résultats	169
IV.2.1 Expression et localisation cellulaire de l'EPRS ^{N1}	169
IV.2.2 Rôle(s) de l'EPRS ^{N1} dans les mitochondries humaines	169
IV.2.3 Cristallisation de l'EPRS ^{N1}	174
IV.2.4 Sous-clonage de l'EPRS ^{N1} et test de viabilité chez la levure	175
IV.2.5 Localisation subcellulaire chez la levure	179
IV.2.6 Split-GFP et localisation de l'EPRS ^{N1}	179
IV.2.7 Tests fonctionnels chez la levure	182
IV.2.8 Test d'interaction avec Arc1p	185
IV. 3 Discussion	185
IV. 4 Matériels et méthodes	190
IV.4.1 Milieu de culture	190
IV.4.1.1 Pour levures.....	190
IV.4.1.2 Pour cellules humaines.....	190
IV.4.2 Vecteurs pour expression dans des levures et cellules humaines.....	191
IV.4.3 Transfection des cellules HeLa	191
IV.4.4 Traduction mitochondriale <i>in vivo</i>	191

IV.4.5 Acquisition des images par microscopie.....	192
IV.4.6 Préparation des extraits protéiques totaux.....	192
IV.4.7 Purification des mitochondries à partir de cellules humaines	193
IV.4.8 Immunodétection.....	193
IV.4.9 Gel filtration.....	194
V. Etude d'un facteur d'export de l'aminocyl-ARNt chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Cex1p	195
V.1 Introduction au sujet.....	197
V.1.1 Les échanges de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme	197
V.1.2 Export des ARNts aminocylés : implication de Cex1p	199
V.1.3 Caractérisation de Cex1p.....	201
V.1.4 Pourquoi s'intéresser à Cex1p ?	203
V.2 Résultats	203
V.2.1 Des débuts difficiles	203
V.2.2 Régulation transcriptionnelle de CEX1	204
V.2.3 Etude génétique de CEX1.....	209
V.2.4 Localisation intracellulaire de Cex1p.....	213
V.2.5 Implication de Cex1p dans le trafficking intracellulaire	215
V.2.6 Etude de la fragmentation vacuolaire	218
V.2.7 Test phénotypique et étude de la fonction vacuolaire	219
V.2.8 Etablissement de l'interactome de Cex1p en respiration.....	223
V.2.9 Trafficking vésiculaire et mitochondries	227
V.3 Discussion	227
V.3.1 Discussion sur Cex1p : le domaine kinase-like	227
V.3.2 Discussion sur Cex1p : le domaine C-ter	231
V.3.3 Les homologues humains SCYL1, SCYL2 et SCYL3	232
V.3.4 Discussion générale et perspectives	234
V.4 Matériels et méthodes.....	236
V.4.1 Milieux de culture.....	236
V.4.2 Acquisition des images par microscopie et marquage au FM4-64.....	236
V.4.3 Extraits protéiques total de levure et fractionnement subcellulaire.....	236
V.4.4 Tests de croissance en gouttes.....	237
V.4.5 Tests de sécrétion CPY.....	237
V.4.6 Immunodétection.....	238
V.4.7 Co-immunoprécipitation.....	238
V.4.8 Spectrométrie de masse	239

V.4.9 Extraction des ARNm et qPCR	239
Discussion générale.....	241
Articles	247
Idiosyncrasies in decoding mitochondrial genomes.....	249
Crystal structure of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mitochondrial GatFAB reveals a novel subunit assembly in tRNA-dependent amidotransferases.....	263
Bibliographie	285

Partie I

Introduction générale

I.1 Généralités

La cellule est une unité complexe qui se développe au sein d'une population hétérogène (génotype, morphologie...). Que l'on parle d'organismes unicellulaires (bactéries, protozoaires, certains eucaryotes) ou d'entités faisant partie d'une population plus large (organismes multicellulaires), la cellule est amenée à se développer dans un environnement très diversifié soit en terme d'individus soit de ressources. Bien qu'étant une unité individuelle séparée de son environnement par une barrière lipidique semi-perméable (la membrane plasmique), la cellule ne peut se suffire à elle-même. Pour se développer de manière optimale, elle doit notamment établir des moyens de communication avec le milieu extérieur afin de récupérer un certain nombre de métabolites (sodium, potassium...) ou nutriments (sucres...) *via* des canaux (uniport, symport, antiport), des transporteurs ou simplement par diffusion. La régulation de l'import des nutriments est d'autant plus importante qu'ils sont la source principale d'énergie pour la cellule. En effet, la disponibilité en composés carbonés et azotés dans le milieu, ainsi que la capacité de la cellule à les assimiler va directement impacter son métabolisme et donc son fonctionnement (principe de *fitness*). Cette capacité de la cellule à utiliser les nutriments et à les convertir en énergie (par voies métaboliques) implique qu'elle doit être en mesure de moduler l'expression de son génome (régulation transcriptionnelle et/ou traductionnelle) afin d'adapter son métabolisme aux sources d'énergie disponible. La cascade d'événements allant de la détection du substrat (par des récepteur à la surface de la cellule ou simplement par diffusion) au choix et à l'utilisation du métabolisme adéquat, passe par une succession d'événements qui vont permettre de remodeler le paysage intracellulaire tant au niveau moléculaire qu'organellaire afin de s'adapter au substrat.

Bien que les cellules soient différentes sur bien des aspects (forme, rôle ou encore origine), elles sont toutes gouvernées par les mêmes processus élémentaires qui sont la réplication de leur matériel génétique suivie de la transcription de leurs gènes qui seront ensuite traduits sous forme de protéines. Ces dernières sont en grande partie responsables de l'homéostasie au sein de la cellule, du contrôle de la prolifération cellulaire ainsi que du développement de la cellule. Les processus de transfert de l'information génétique et la régulation de l'expression des gènes présentent un certain nombre de différences selon qu'il s'agisse d'une cellule eucaryote ou procaryote. Chez les eucaryotes le confinement du génome dans le noyau aboutit au fait que transcription et traduction sont spatialement séparées. Chez les organismes procaryotes en revanche, la transcription et la traduction sont couplées car il n'y pas de noyau séparant l'ADN génomique de la machinerie traductionnelle. C'est d'ailleurs également le cas des génomes mitochondriaux et chloroplastiques des eucaryotes qui proviennent d'organismes procaryotiques endosymbiontes qui ont donné naissance à ces organites. Chez les procaryotes et dans les organites, les ribosomes s'associent directement à l'ARN messager (ARNm) en cours de synthèse et le traduisent. Cette concomitance de la transcription et de la traduction est également rendue possible par l'absence d'introns dans les gènes des organismes

procaryotiques qui n'ont donc pas besoin d'être épissés et peuvent être directement traduits en protéines fonctionnelles. Il est toutefois à noter que certaines bactéries possèdent des gènes présentant des introns (Haugen et al., 2005; Hausner et al., 2014) et que les gènes de certains génomes organellaires en possèdent également.

La séparation physique chez les eucaryotes, entre la transcription et la traduction des ARNm, impose des modes de régulation bien plus complexes que ceux rencontrés chez les procaryotes, comme l'utilisation de riboswitch, famille d'ARN non codant régulant l'expression de la majorité des gènes chez les procaryotes (Saad et al., 2012; Saad et al., 2013; Smith et al., 2010; Vitreschak et al., 2004) bien qu'ils aient été également retrouvés chez certains eucaryotes, notamment pour la régulation du métabolisme de la thiamine chez les levures (Cheah et al., 2007). La transcription des ARNms messagers a lieu dans le noyau, puis les ARNm sont épissés et exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines (Figure 1). Il existe des liens forts entre le métabolisme de la cellule et la régulation de la traduction. Ces relations sont importantes puisqu'un défaut dans la régulation et donc dans la traduction *per se*, aura un impact sur le bon fonctionnement de la cellule.

A ce titre, ma thèse a porté sur l'étude d'un complexe multisynthétasique (MSC) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et son rôle dans l'adaptation au passage du métabolisme fermentaire au métabolisme respiratoire. Composé de deux aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS), la méthionyl-ARNt synthétase (MRS) et la glutamyl-ARNt synthétase (ERS), et d'une protéine d'assemblage, Arc1p, le complexe AME (Arc1p-MRS-ERS) est essentiel à la traduction cytosolique. En effet la MRS et l'ERS sont des éléments clés de la traduction puisqu'ils sont respectivement responsables de la formation des méthionyl-ARNt^{Met} initiateur (M-ARNt_i^M) et élongateur (M-ARNt_e^M) et du glutamyl-ARNt^{Glu}. Mais comme nous le verrons, la dynamique du complexe AME est directement liée au métabolisme de la levure.

I.2 La traduction eucaryote

Au cours de la synthèse protéique eucaryote, l'information génétique contenue dans les ARNms monocistroniques est décodée par le ribosome qui va canaliser les ARNts porteurs d'un acide aminé (aa), on parle alors d'ARNt aminoacylé, pour synthétiser un polypeptide. Le ribosome va ainsi se déplacer le long de l'ARNm afin de décrypter l'information qu'il contient sous forme d'une succession de codons (triplet de bases nucléotidiques) pour la convertir en une succession d'aa liés entre eux.

Bien que l'on retrouve classiquement 20 acides aminés dans les protéines, il est maintenant admis qu'il existe 22 aa codés par le code génétique. Le 21^{ème} et le 22^{ème} aa sont la sélénocystéine codé par le codon stop UGA (opale) et la pyrrolysine codé par le codon stop UAG (ambre).

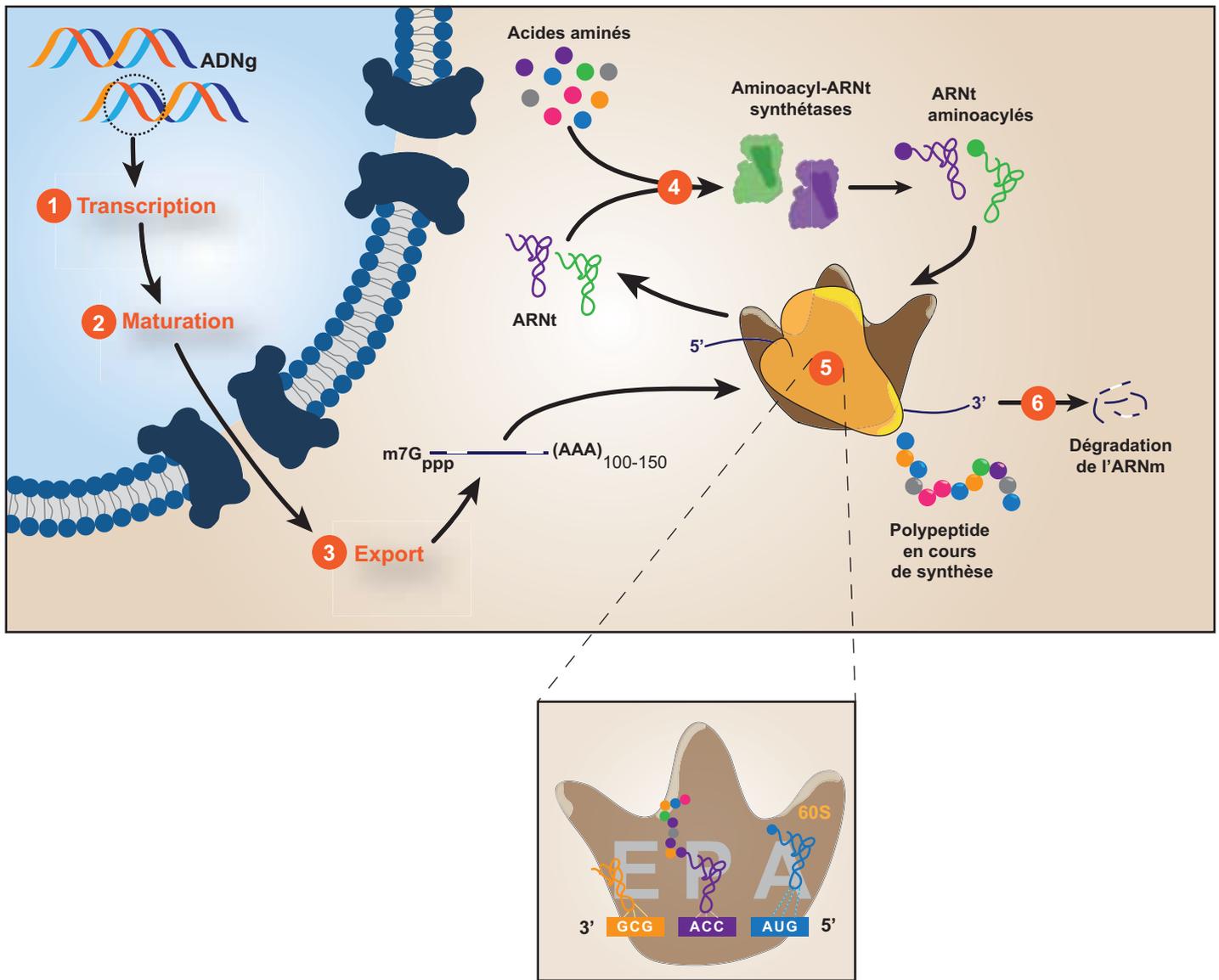


Figure 1 : Vue d'ensemble schématique de la traduction eucaryote.

Dans la cellule, les ARNm sont transcrits à partir des gènes dans le noyau **1** puis maturés (ajout d'une coiffe et d'une queue poly-A, épissage des introns) **2**. Les ARNm matures sont ensuite exportés du noyau **3** et liés par le ribosome 80S pour être traduits. Pour cela, les codons doivent être décodés grâce à des ARNt aminoacylés formés par la fixation d'un acide aminé (aa) sur son ARNt homologue catalysée par les aminoacyl-ARNt synthétases **4**. Au niveau du ribosome, les ARNt aminoacylés apportent les aa au polypeptide naissant au cours de la synthèse protéique **5**. Une fois la traduction des ARNm terminée, les messagers sont dégradés **6**.

Les codons étant des triplets de nucléotides, le nombre maximum de combinaisons possibles est de 64 codons (61 codons possibles plus 3 codons stop). Comme ils ne codent qu'au maximum pour 22 aa, un acide aminé pourra être décodé par plusieurs codons, aussi appelés codons synonymes (Figure 2). Il y a toujours moins d'ARNt et donc d'anticodons que de combinaisons de codons à traduire. Chez les eucaryotes on trouve en moyenne 48 espèces différentes d'ARNt pour décoder les 61 codons. Parmi ces 48 ARNt, 16 utilisent le phénomène de « wobble pairing » pour décoder 2 codons différents. Le wobble pairing permet à la première base du triplet de l'anticodon (dans le cas d'un G ou d'un U) de s'apparier respectivement avec un C ou un U ou avec G ou un A situé en dernière position du codon (Figure 3). Il existe encore un autre moyen pour étendre la capacité de décodage d'un ARNt, l'introduction d'une modification posttranscriptionnelle de la première base de l'anticodon (Grosjean, 2005; Umeda et al., 2005). Ainsi, la présence d'une inosine, pouvant s'apparier à A, C ou U, en première position de l'anticodon permettra de décoder jusqu'à 3 codons différents (Figure 3)

Cela étant, le nombre de codons codant pour une espèce d'aa diffère grandement : dans le code génétique standard, il n'y a qu'un seul codon pour la méthionine (AUG) de même que pour le tryptophane (UGG) tandis que l'on retrouve jusqu'à six codons pour la leucine, la sérine ou encore l'arginine. Même si cela est vrai pour la plupart des organismes, un grand nombre d'études montrent qu'au cours de l'évolution, plusieurs codons ont été réassignés par rapport à ce code génétique standard (Knight et al., 2001). Le cas le plus courant concerne le codon stop UGA qui, chez un grand nombre d'organismes code pour le tryptophane (Figure 4), battant en brèche l'hypothèse du « frozen accident » proposé par Francis Crick en 1968 pour expliquer l'apparition et l'universalité du code génétique (Crick, F. H. C. The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.***38**, 367–379 (1968)). Ces réassignations de codons s'opèrent aussi bien au niveau du génome nucléaire que mitochondrial, même si les changements ont plus fréquemment lieu au niveau du génome mitochondrial. De manière intéressante, lorsqu'un codon est perdu ou réassigné dans le génome nucléaire, il l'est également dans le génome mitochondrial, ce qui indiquerait que les changements ne sont pas complètement aléatoires. Quoiqu'il en soit, ces changements sont le fruit d'un nombre varié de modifications comme les modifications de bases (par exemple l'apparition de la pseudo-uridine, de l'inosine ou de modifications post-transcriptionnelles), des mutations au niveau des ARNt ou encore des mécanismes d'édition des ARNs.

Il existe à l'heure actuelle trois courants majoritaires de pensée pour expliquer l'apparition de ces variations dans le code génétique (Knight et al., 2001). Elles se basent sur différents critères comme l'occurrence de mutations influençant le contenu de certains codons dans le génome (*Codon capture* (Osawa and Jukes, 1989; Osawa et al., 1992), l'apparition de mutations au niveau des ARNt mais pas au niveau de l'anticodon (*Ambiguous intermediate* (Schultz and Yarus, 1994, 1996) ou

		Deuxième lettre				
		U	C	A	G	
U	U	UUU	UCU	UAU	UGU	U
		UUC	UCC	UAC	UGC	C
	A	UUA	UCA	UAA	UGA	A
		UUG	UCG	UAG	UGG	G
C	C	CUU	CGU	CAU	CGU	U
		CUC	CGC	CAC	CGC	C
	A	CUA	CGA	CAA	CGA	A
		CUG	CGG	CAG	CGG	G
A	A	AUU	ACU	AAU	AGU	U
		AUC	ACC	AAC	AGC	C
	A	AUA	ACA	AAA	AGA	A
		AUG	ACG	AAG	AGG	G
G	U	GUU	GCU	GAU	GGU	U
		GUC	GCC	GAC	GGC	C
	A	GUA	GCA	GAA	GGA	A
		GUG	GCG	GAG	GGG	G

Figure 2 : Le code génétique standard et ses 64 codons

Chaque codon est classé par rapport à sa séquence. Les couleurs correspondent aux différents acides aminés

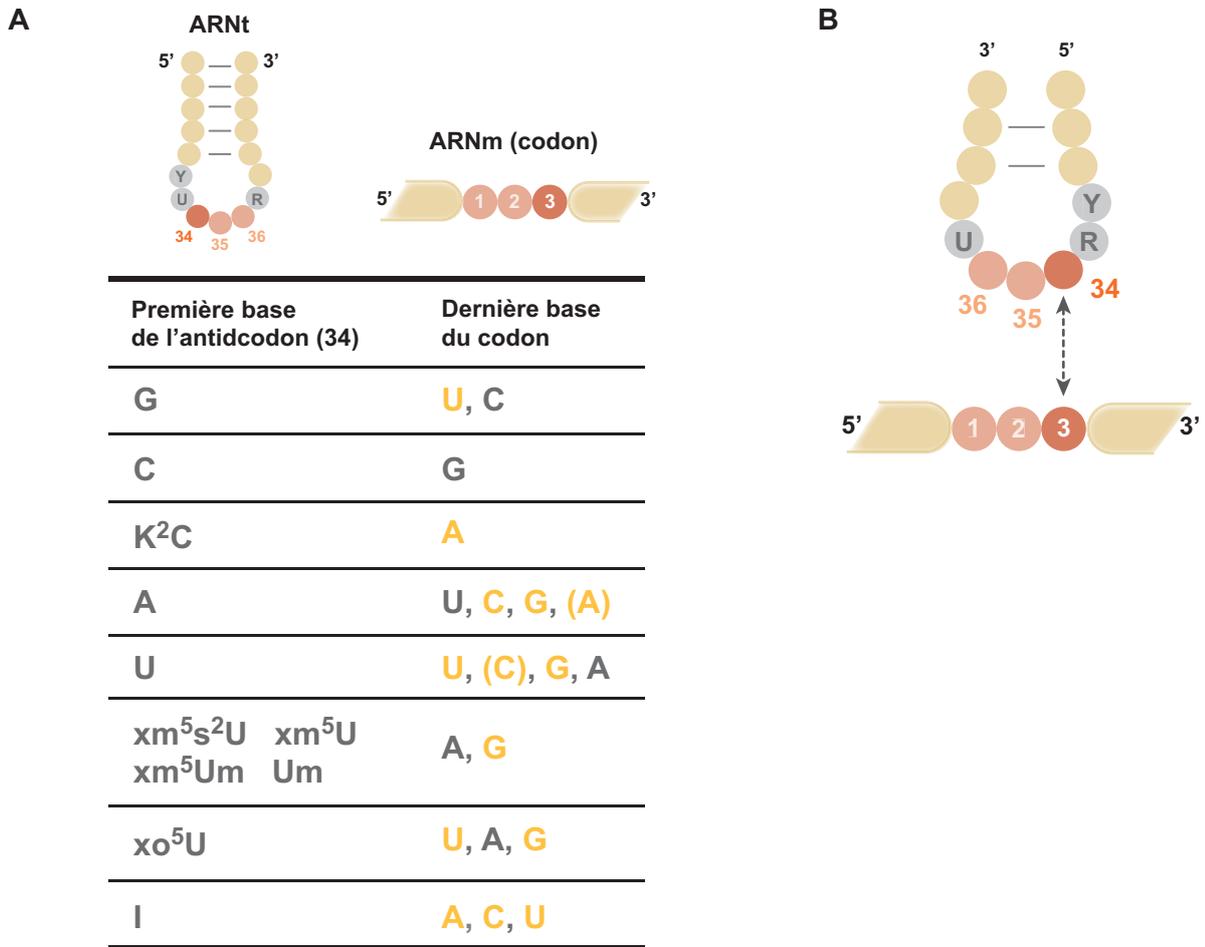


Figure 3: Principe de l'appariement de type «wobble».

(A) Tableau des interactions possibles entre la base 34 de l'ARNt et la base en 3' du codon de l'ARN messager. Les paires «wobble» sont en jaune. (B) Schéma de la reconnaissance entre la base 34 de l'ARNt et la base en 3' du codon. Cette interaction est rendue possible grâce à la conformation en L-inversé qu'adopte l'ARNt.

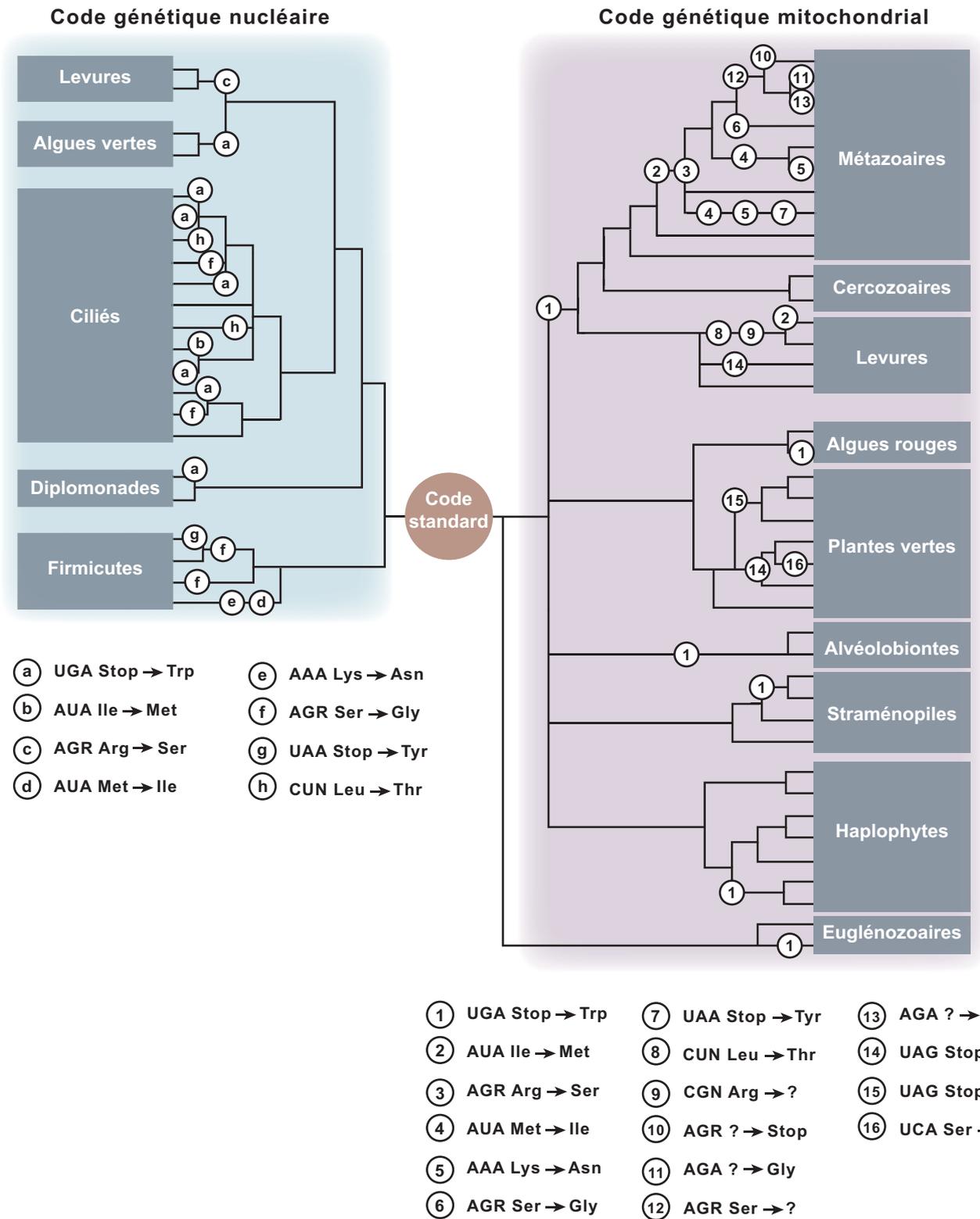


Figure 4: Variation des codes génétiques nucléaires et mitochondriaux par rapport au code standard chez différents organismes

encore que les changements sont opérés par sélection naturelle pour réduire la taille de la machinerie traductionnelle (*Genome streamline* (Andersson and Kurland, 1995, 1998). Ces théories, bien que différentes, ne sont pas mutuellement exclusives.

La présence de codons synonymes dans le code génétique implique que tous les codons ne sont pas utilisés à la même fréquence dans les ARNm. Ce phénomène, connu sous le nom de biais (ou usage) de codon, diffère selon les organismes (Hershberg and Petrov, 2008) et influe grandement sur la vitesse de traduction et impacte donc le niveau d'expression des gènes notamment chez la levure (Novoa and Ribas de Pouplana, 2012). La vitesse globale de traduction est en partie modulée par l'alternance des codons synonymes sur un même ARNm (tPI : **tRNA Pairing Index** ; Cannarozzi 2010). Une étude récente menée par Tuller et ses collègues (Tuller et al., 2010) a montré que plus une séquence doit être traduite rapidement, plus l'alternance de codons synonymes est faible, c'est l'autocorrélation des codons. Ce phénomène implique que les mêmes ARNs sont recyclés aux abords du ribosome puis aminoacylés grâce à la présence des protagonistes participant à la formation des aminoacyl-ARNs (aa-ARNt), ces derniers sont ensuite canalisés vers le ribosome pour à nouveau participer à la traduction (cf § I.4.6.1 Le translasome). La vitesse de traduction peut également dépendre de nombreux autres mécanismes dont la quasi-totalité ont déjà été référencés (Novoa and Ribas de Pouplana, 2012) comme par exemple, la concentration de codon rare en 5' d'un messenger (ramping du ribosome), le ralentissement du ribosome pour permettre au polypeptide naissant de prendre sa structure secondaire, ou encore la présence de structures secondaires dans l'ARNm.

Bien entendu, pour que ce système fonctionne de façon optimale et que tous les partenaires agissent de manière concertée, il faut un grand nombre de protéines additionnelles qui sont les maîtres d'œuvre et les garants du bon déroulement de la traduction. Chez les eucaryotes ces protéines sont les facteurs d'initiation (eIFs), les facteurs d'élongations (eEFs), les facteurs de terminaison (eRFs), ainsi que des GTPases (GAP) et facteurs d'échange de guanosine (GEF). On ne dénombre pas moins de 12 facteurs d'initiations (+ 7 auxiliaires), au moins 4 facteurs d'élongation et 3 à 4 facteurs de terminaison. La compréhension globale de la traduction a, en grande partie, été possible grâce à la résolution des structures cristallographiques du 70S, 80, 60 et 40S (Ben-Shem et al., 2011; Klinge et al., 2011; Rabl et al., 2011; Wilson and Doudna Cate, 2012; Yusupov et al., 2001).

I.2.1 Le ribosome eucaryote

I.2.2 L'initiation

L'étape d'initiation est considérée comme l'étape limitante de la traduction. Elle est aussi la plus documentée, la plus complexe et la plus détaillée des étapes de la traduction (procaryote et eucaryote). Elle est aussi l'étape la plus sujette à la régulation. De manière générale, l'activité des

facteurs d'initiations est modulée par phosphorylation, comme par exemple eIF2A qui lie le M-ARNt_i^M ou encore certaines protéines liants eIF4E (Hinnebusch and Lorsch, 2012).

I.2.2.1 Complexe de pré-initiation 43S et l'étape de scanning

La première étape de l'initiation est la formation du complexe de pré-initiation (PIC) 43S (Figure 5). La sous-unité 40S du ribosome se lie aux facteurs eIF1, 1A et eIF3 tandis que le M-ARNt_i^M se lie au facteur d'initiation eIF2-GTP. Une fois que les facteurs eIF1-1A et 3 sont en place, le complexe ternaire eIF2-GTP•M-ARNt_i^M est recruté avec eIF5 pour former le complexe de pré-initiation 43S. Il existe deux théories concernant le déroulement de ces étapes, le modèle stochastique (semblable à l'initiation chez les procaryotes) et le modèle ordonné (propre aux eucaryotes). Dans le modèle stochastique, chaque eIF s'assemble à la sous-unité 40S de manière indépendante et aléatoire. L'assemblage dépend des constantes d'affinité de chacun des facteurs et de leur abondance. La liaison du complexe ternaire eIF2-GTP•M-ARNt_i^M stabilise l'ensemble sous la forme du complexe de pré-initiation 43S. Le modèle ordonné implique que les facteurs eIF1-1A et -5 s'associent de manière coordonnée à eIF3, et ce complexe à multiples facteurs est recruté par la sous-unité 40S du ribosome pour former le PIC.

Ce dernier peut alors se lier à l'ARNm à traduire sur lequel s'est fixé le complexe multi-protéique eIF4F, composé de 4 facteurs d'initiations : eIF4A, 4B, 4E et 4G. La coiffe de l'ARNm, correspondant à une guanosine méthylée (m⁷G), est spécifiquement reconnue par eIF4E lui-même lié aux poly-binding proteins (PABP) qui lient la séquence polyA rajoutée posttranscriptionnellement à l'extrémité 3' des ARNm. Cette interaction d'eIF4E et de la PABP permet la circularisation de l'ARNm. Le PIC est recruté sur l'ARNm circularisé grâce à l'interaction entre eIF4G et eIF3. Le complexe 43S comprenant eIF4F, eIF1 et eIF1A va alors se déplacer le long de l'ARNm (étape de scanning) afin de positionner M-ARNt_i^M en face du premier AUG dans le site P (peptidyl) du ribosome. Au cours de cette étape de scanning, le premier AUG est reconnu car il se trouve dans un contexte optimal de reconnaissance, c'est-à-dire précédé d'une séquence GCC(A/G)CCAUGG (Kozak, 1992). Ce mécanisme discriminant empêche le M-ARNt_i^M de reconnaître partiellement une paire de base non-AUG. Cette étape de scanning aboutit à la formation du complexe d'initiation 48S, prêt à se lier à la sous-unité 60S du ribosome. Pour cela, le ribosome recrute le facteur eIF5B sous sa forme activée (eIF5B-GTP) qui permet de dissocier le complexe eIF4F, -1, -2, -3 et -5 de la petite sous-unité du ribosome, et autorise ainsi la sous-unité 60S à rejoindre le complexe d'initiation. L'hydrolyse du GTP par eIF5B provoque son propre relarguage de la petite sous-unité du ribosome ainsi que celui d'eIF1A. Le complexe 40S•60S•M-ARNt_i^M aussi appelé complexe d'initiation 80S est alors opérationnel pour entrer dans la phase d'élongation. L'initiation de la traduction, de la formation du complexe 43S au 80S, est un processus impliquant un grand nombre de facteurs. Bien que la plupart d'entre eux soient connus depuis plusieurs décennies (Jackson et al., 2010), de nombreuses études récentes continuent d'identifier de nouveaux facteurs régulant cette étape de la traduction. Au cours

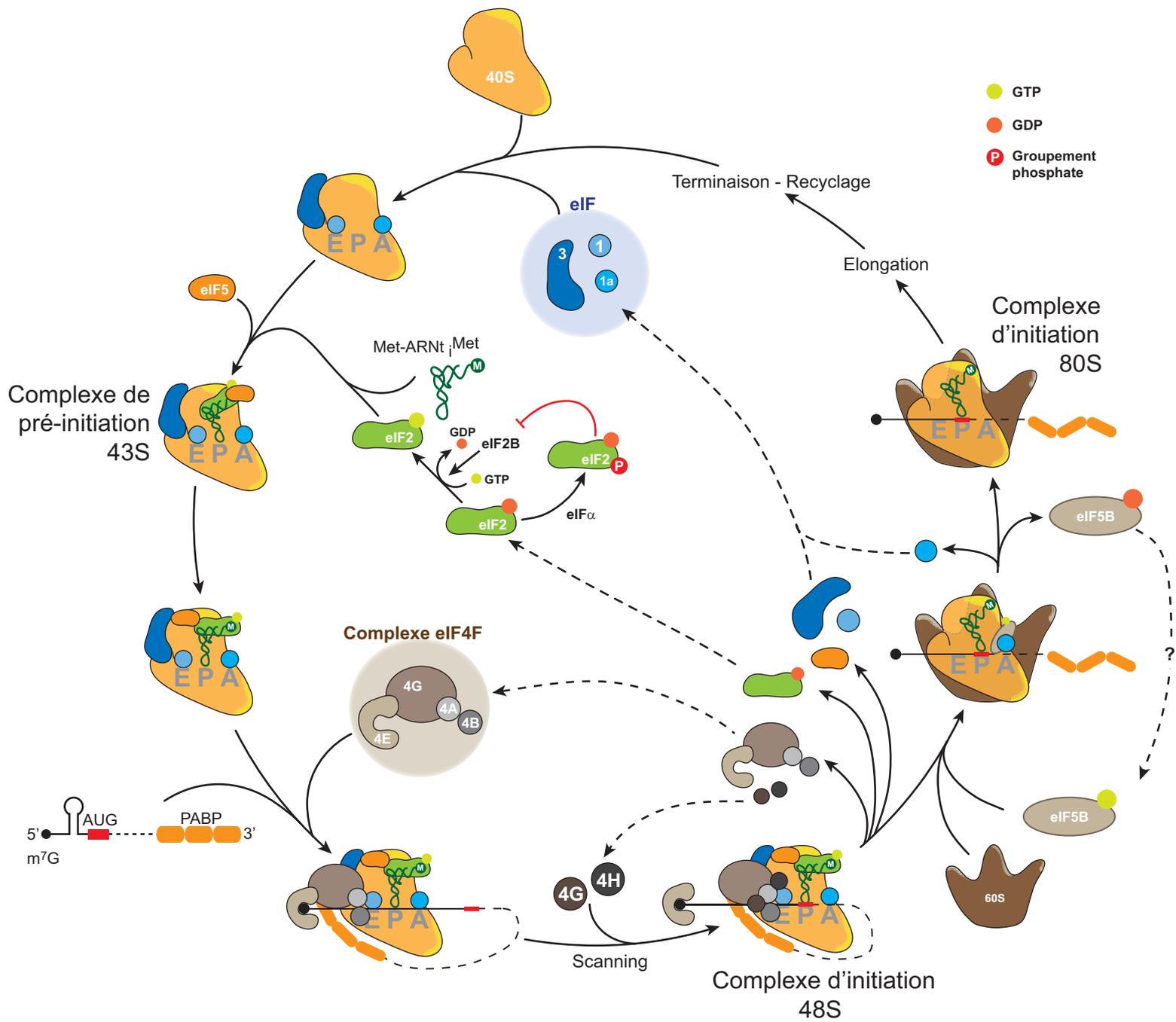


Figure 5 : Représentation schématique de l'étape d'initiation au cours de la traduction eucaryote

des 6 dernières années, 6 facteurs auxiliaires (DHX29, Ded1, p97, PABP, eIF2D et eIF5A) ont été identifiés (Hershey et al., 2012; Hinnebusch, 2011; Hinnebusch and Lorsch, 2012; Jackson et al., 2010). eIF6, un autre facteur auxiliaire est connu depuis bien plus longtemps (Hershey et al., 2012; Kausik and Umadas, 1999) mais son rôle dans l'initiation a depuis été remis question.

I.2.3 L'élongation

Par rapport à l'étape d'initiation, l'élongation chez les eucaryotes est peu documentée et moins étudiée que chez les procaryotes. Cela peut en partie être expliqué par le fait que cette étape est relativement bien conservée entre les espèces. Elle démarre lorsque le complexe 80S est formé, c'est-à-dire lorsque le M-ARNt^M se trouve dans le site P et que tous les facteurs d'initiation ne sont plus liés au complexe 80S (Figure 6). Elle comprend 3 étapes qui se répètent jusqu'à l'apparition d'un codon STOP dans le site A du ribosome. Tout d'abord les aa-ARNts sont déposés dans le site A (accepteur) du ribosome par le facteur d'élongation eEF1A sous sa forme activée (eEF1A-GTP). Le transfert de l'aa-ARNt aminoacylé et la reconnaissance du codon par l'anticodon de l'aa-ARNt provoque l'hydrolyse du GTP d'eEF1A-GTP. Après hydrolyse, eEF1A-GDP quitte le ribosome et interagit avec le facteur eEF1B, un GEF, qui catalyse l'échange d'une molécule de GDP par un GTP. Cela permet le recyclage d'eEF1A-GTP qui pourra lier un nouvel aa-ARNt pour le déposer dans le site A d'un ribosome en cours d'élongation. La réaction de transpeptidation catalysée au niveau du centre peptidyl transférase de l'ARN ribosomique 28S va permettre de former une liaison peptidique entre le COOH du peptide naissant qui estérifie le OH 3' de l'ARNt fixé dans le site P et le NH₂ de l'aa porté par l'ARNt fixé dans le site A. Après formation de cette liaison peptidique, l'ARNt déchargé contenu dans le site P et le peptidyl-ARNt contenu dans le site A vont être transloqués respectivement dans le site E (exit – sortie) et P grâce à l'hydrolyse du GTP d'eEF2-GTP après que celui-ci se soit fixé dans le site A du ribosome. Cette étape de translocation est suivie par l'étape dite de post-translocation, au cours de laquelle l'ARNt déacylé se trouve dans le site E et le site A est vacant, attendant un nouvel ARNt aminoacylé apporté par eEF1A-GTP.

Chez la levure, eEF3 participe également à l'étape d'élongation de la traduction en favorisant le départ de l'ARNt déacylé du site E du ribosome (Andersen et al., 2006; Triana-Alonso et al., 1995). Outre son rôle dans l'élongation, eEF3 semble également être un facteur de recyclage du ribosome (Kurata et al., 2010a; Kurata et al., 2013b), mais nous y reviendrons plus tard. Une étude récente fait également état de l'implication du facteur d'initiation eIF5A au cours de l'élongation (Saini et al., 2009). Les étapes successives d'incorporation des ARNts aminoacylés, de formation de liaisons peptidiques, de translocations et de relargage des ARNts déacylés sont répétées jusqu'à ce qu'un codon STOP (qui ne correspond à aucun acide aminé) soit identifié au niveau du site A. Il se met alors en place la phase de terminaison de la traduction.

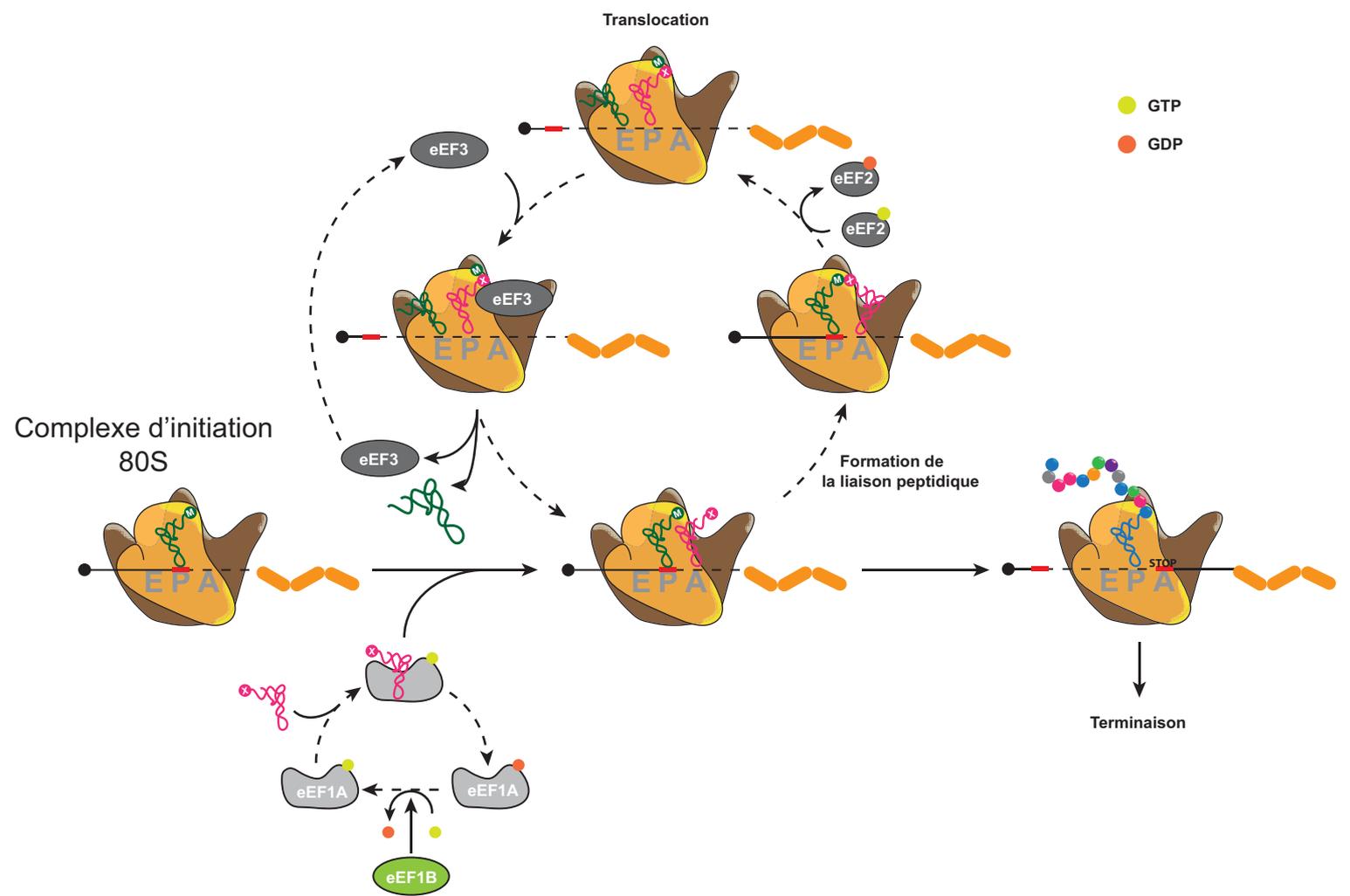


Figure 6 : Représentation schématique de l'étape d'élongation au cours de la traduction eucaryote

I.2.4 Terminaison et recyclage du ribosome

L'étape de terminaison est catalysée par deux facteurs eRF1 et eRF3 qui agissent de manière concertée sous la forme d'un complexe ternaire eRF1-eRF3-GTP (Alkalaeva et al., 2006; Stansfield et al., 1995; Zhouravleva et al., 1995). Le premier est impliqué dans la reconnaissance spécifique des codons STOP (UAA, UAG et UGA) ainsi que dans l'hydrolyse de la liaison peptidyl-ARNt au niveau du site P du ribosome. Le second (eRF3) quant à lui, accélère la libération du polypeptide synthétisé et augmente l'efficacité de terminaison de manière GTP-dépendante (Alkalaeva et al., 2006; Eyller and Green, 2011). La spécificité de reconnaissance d'eRF1 envers les codons STOP est due à sa structure globale en forme d'ARNt. Elle comporte notamment un domaine analogue à la tige acceptrice des ARNts (Song et al., 2000), ce qui lui confère sa capacité à promouvoir la libération du peptide dans le site P. Une fois le polypeptide libéré, le ribosome 80S peut entrer dans la dernière phase de son cycle de traduction : le recyclage (revue dans (Dever and Green, 2012)).

Le déroulement exact des événements ainsi que les facteurs qui conduisent à la séparation des sous-unités du ribosome 80S et à son recyclage ne sont pas encore tous bien connus. Quoiqu'il en soit, un consensus peut être tiré des nombreuses études faites sur ce sujet. Il existe trois destinées pour le ribosome entrant en post-terminaison (Figure 7A-C): soit le complexe 80S se dissocie complètement pour que la sous-unité 40S initie à nouveau un cycle de traduction, soit il s'engage à nouveau dans un cycle de traduction sur le même ARNm (on parle dans ces deux cas de recyclage) (Pisarev et al., 2007; Rajkowitsch et al., 2004) ; soit le ribosome ne se dissocie pas et reste lié à l'ARNm pour initier la traduction à un codon AUG en aval, et entre dans une étape de ré-initiation (Hinnebusch, 1997; McCarthy, 1998; Sachs and Geballe, 2006).

L'étape de ré-initiation quant à elle n'est possible que dans certaines conditions, qui dépendent de la vitesse des cycles d'élongation, de la longueur de la phase de lecture à traduire (uORF de moins de 35 codons, présentes dans environ 13% des gènes de levure) ou encore du contexte nucléotidique avoisinant le codon STOP (Hinnebusch, 2005; Jackson et al., 2010). La ré-initiation est donc strictement dépendante de l'étape de scanning entre le site de terminaison (uORF) et le codon initiateur de la phase de lecture en aval (Figure 7B) et n'a lieu que dans certaines conditions comme une carence en aa. Le meilleur exemple est la ré-initiation sur l'ARNm de *GCN4*, un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes de la biosynthèse des aa qui est exprimé lorsque ces derniers viennent à manquer dans le milieu (Hinnebusch, 1994a).

En entrant dans l'étape de recyclage, le ribosome 80S est toujours lié à l'ARNm ainsi qu'aux facteurs eRF1 eRF3 et à l'ARNt déacylé. eRF3 est soit libéré après hydrolyse du polypeptide, soit libéré après recrutement de la protéine multifonctionnelle ABCE1 (Rli1p chez la levure). Il a d'ailleurs été montré que la vitesse de libération du peptide par eRF1-eRF3 était directement liée à ABCE1

(Khoshnevis et al., 2010; Shoemaker and Green, 2011). Le rôle principal d'ABCE1 reste néanmoins le recyclage du ribosome 80S (Barthelme et al., 2011; Pisarev et al., 2010), et la séparation des deux sous-unités, 40S et 60S est vraisemblablement opérée par un changement de conformation d'ABCE1 suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Becker et al., 2012b) (Figure 7C). Au terme de cette étape, le ribosome peut se dissocier pour entrer dans une nouvelle étape d'initiation (Pisarev et al., 2007; Rajkowitsch et al., 2004). Cette étape est rendue possible grâce à la circularisation 5'-3' de l'ARNm *via* eIF4E et les PolyA Binding Proteins (PABP) (Rajkowitsch et al., 2004) et nécessite la présence des facteurs d'initiation eIF1, eIF1A et eIF3 au niveau de la sous-unité 40S (Pisarev et al., 2007). Il a même été proposé qu'eIF3 puisse être recruté directement *via* un de ces partenaires eIF3j et ABCE1 au niveau du ribosome 80S (Kispal et al., 2005). Récemment, il a été proposé que le facteur d'élongation eEF3 puisse jouer un rôle primordial dans le recyclage du ribosome chez la levure (Kurata et al., 2010b; Kurata et al., 2013a). En effet, les auteurs proposent un scénario de post-terminaison selon lequel l'ARNt déacylé quitte le ribosome, puis l'ARNm. Le complexe 80S est alors dissocié sous l'action d'eEF3 et de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Kurata et al., 2013a).

Tous ces éléments prouvent que l'étape de terminaison et de recyclage ne sont pas encore totalement comprises, et ceci est probablement dû à un manque de connaissance de tous les facteurs impliqués. Il est donc compliqué de représenter une réaction précise de la terminaison comme nous pouvons le voir dans la figure 7.

I.2.5 Autres particularités de la traduction

I.2.5.1 Hibernation du ribosome

En phase stationnaire de croissance, au cours d'une carence en aa par exemple, la synthèse protéique est stoppée chez les procaryotes comme chez les eucaryotes. Alors que chez les eucaryotes, la synthèse ribosomique est stoppée *via* la phosphorylation du facteur eIF2A (Hinnebusch, 1994b), chez les bactéries le ribosome est converti en un dimère 100S (Kato et al., 2010; Ueta et al., 2010; Wada et al., 1990) ou un monomère 90S (Agafonov et al., 2001) inactif. Le ribosome 100S est un dimère du ribosome 70S bactérien (homologue du 80S eucaryote). Cette dimérisation est rendue possible par l'action du facteur de modulation du ribosome (RMF : **R**ibosome **M**odulation **F**actor) et du facteur de promotion de l'hibernation (HPF : **H**ibernation **P**romoting **F**actor) (Maki et al., 2000; Ueta et al., 2005). En condition de croissance plus favorable (e.g. milieu riche) le dimère 100S se dissocie rapidement pour libérer deux ribosome 70S opérationnels (Aiso et al., 2005; Wada et al., 1990). Le monomère inactif 90S est induit par association de la sous-unité 70S à une autre protéine YfiA, exprimée en condition de stress (Agafonov et al., 1999).

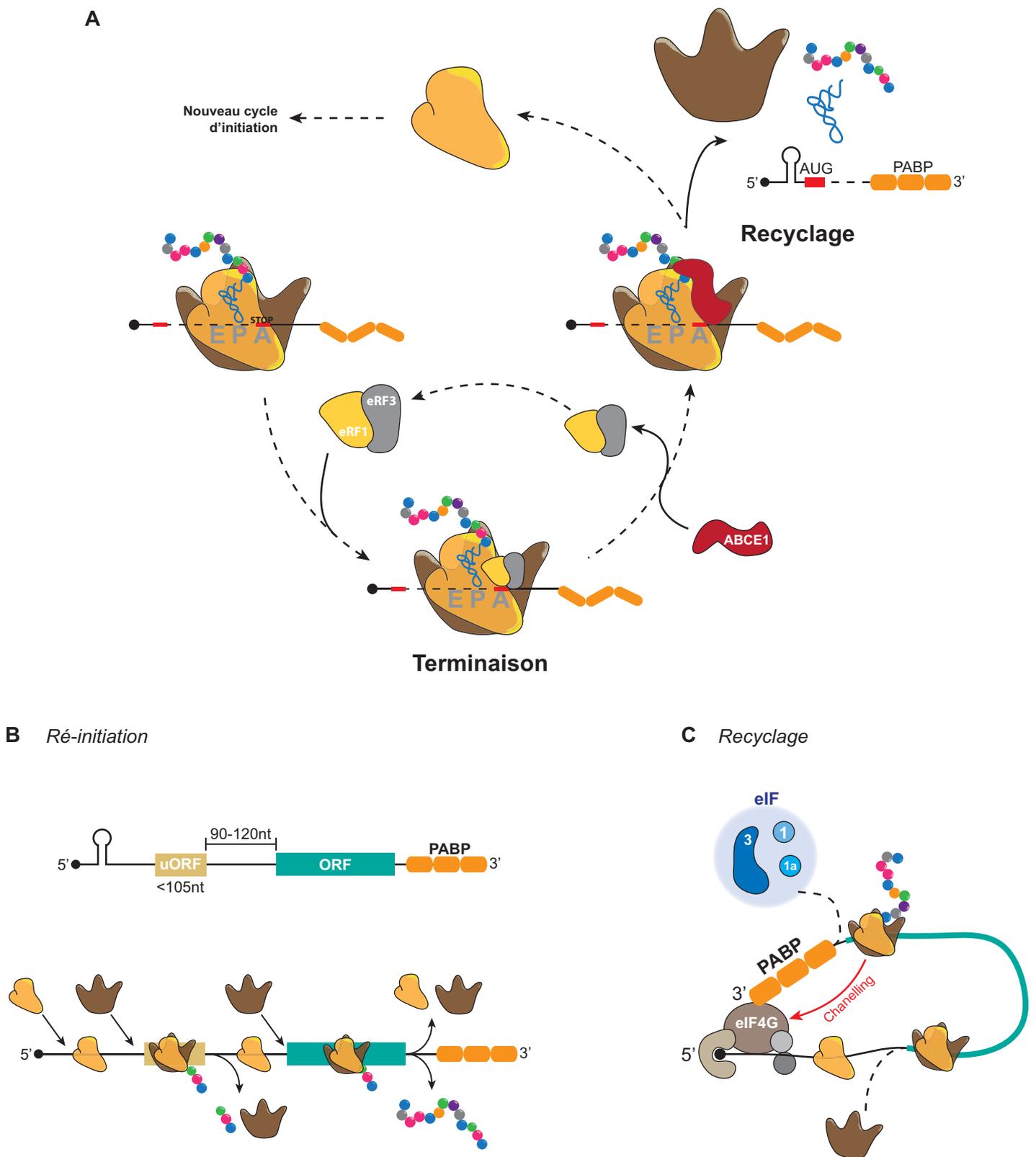


Figure 7 : Représentation schématique de la terminaison eucaryote et des alternatives au recyclage.

(A) Représentation consensuelle de la terminaison chez les eucaryotes. (B) Schéma de la ré-initiation qui intervient dans la traduction de certaines ORF précédées de petites ORF (uORF) au cours de laquelle les ribosomes restent sur le même ARNm pour traduire deux gènes. (C) Exemple de l'étape de recyclage du ribosome qui a lieu lorsqu'un même gène doit être traduit de manière importante.

I.2.5.2 Initiation indépendante de la Coiffe

Un certain nombre d'ARNm cellulaire (5 à 10%) recrutent le ribosome directement au niveau d'une séquence interne sans passer par la reconnaissance de la coiffe. Cette séquence que l'on connaît sous le nom de site interne d'entrée du ribosome (IRES : **I**nternal **R**ibosome **E**ntry **S**ite) et surtout utilisée pour la traduction d'ARNm viraux, mais est également retrouvée dans certains ARNm eucaryote (Jackson, 2013).

I.2.5.3 Initiation non-AUG de la traduction

Bien que la traduction de la majeure partie des protéines est initiée à un codon AUG, l'initiation aux codons CUG ou encore GUG est également possible chez les mammifères. Ce mécanisme est présent pour débiter la traduction d'uORFs et permet également de produire des isoformes fonctionnelles plus longues ou tronquées de certaines protéines. La présence d'un aussi grand nombre de sites alternatifs d'initiations semble avoir une signification biologique puisqu'ils sont utilisés pour initier la traduction de pool spécifique d'ARNm (Ingolia et al., 2011).

I.3 Aminoacyl-ARNt synthétase et formation de l' aminoacyl-ARNt correspondant

I.3.1 Biogénèse des ARNt et nouveautés conceptuelles

L'ARNt, constitué de 73 à 90 nucléotides, possède une structure primaire particulière en forme de feuille de trèfle, qui adopte une structure tridimensionnelle en forme de L renversé (Figure 8). Chez les eucaryotes, l'expression des ARNts semble être régulée *via* les voies TOR (**T**arget **O**f **R**apamycin) et PKA (**P**rotéine **K**inase **A**) (Ciesla and Boguta, 2008) par l'intermédiaire du facteur de transcription Maf1p (Johnson 2007), suggérant ainsi, que la synthèse des ARNts est coordonnée et régulée en réponse à la concentration en nutriments dans la cellule et d'autres facteurs environnementaux. Les ARNts sont transcrits par l'ARN polymérase III (Hopper et al., 2010) sous la forme de long transcrits précurseurs contenant une séquence 5'-leader et une extension 3' terminatrice d'environ 12 nucléotides (nt) chacun (O'Connor and Peebles, 1991). Dans le génome de *S. cerevisiae*, les gènes d'ARNts possèdent souvent des introns de 14 à 60 nt, invariablement insérés entre le nucléotide 37 et 38 de l'ARNt. A ce titre, il a été montré que chez la levure, sur les 274 gènes nucléaires d'ARNt, environ 20% (codant pour 10 ARNts différents) contiennent des introns (Phizicky and Hopper, 2010) <http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/>). Après transcription, les pré-ARNts subissent une succession d'étapes de maturations dans le noyau (suppression des extensions 5' et 3' leader ; ajout du CCA) puis dans le cytoplasme (épissage et modifications).

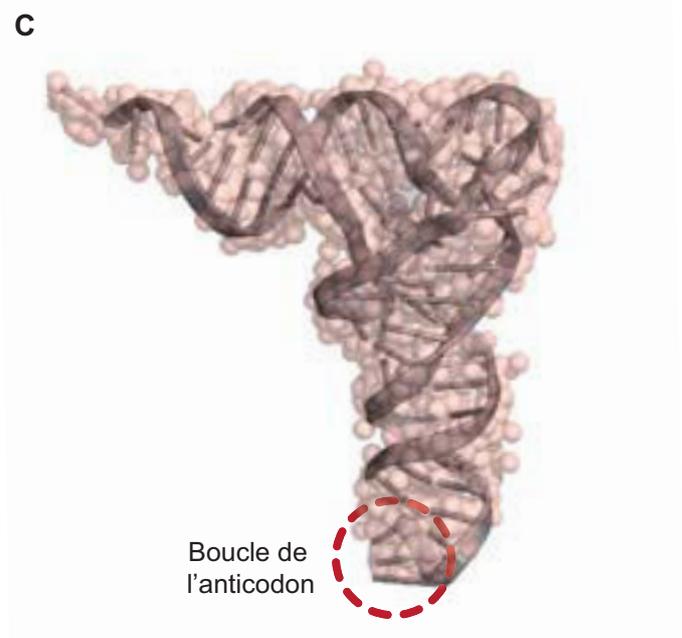
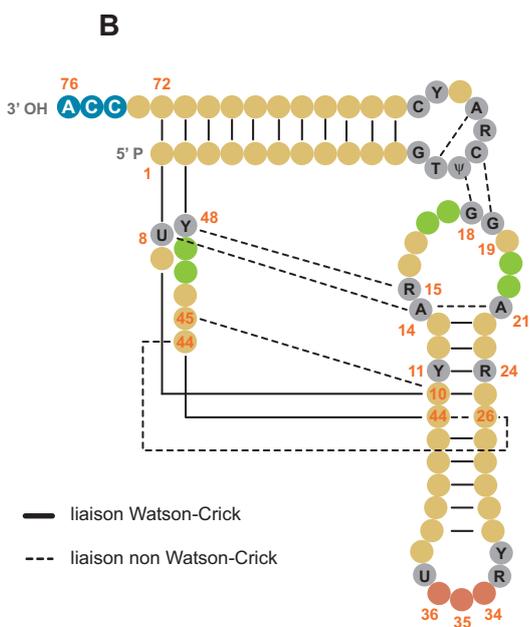
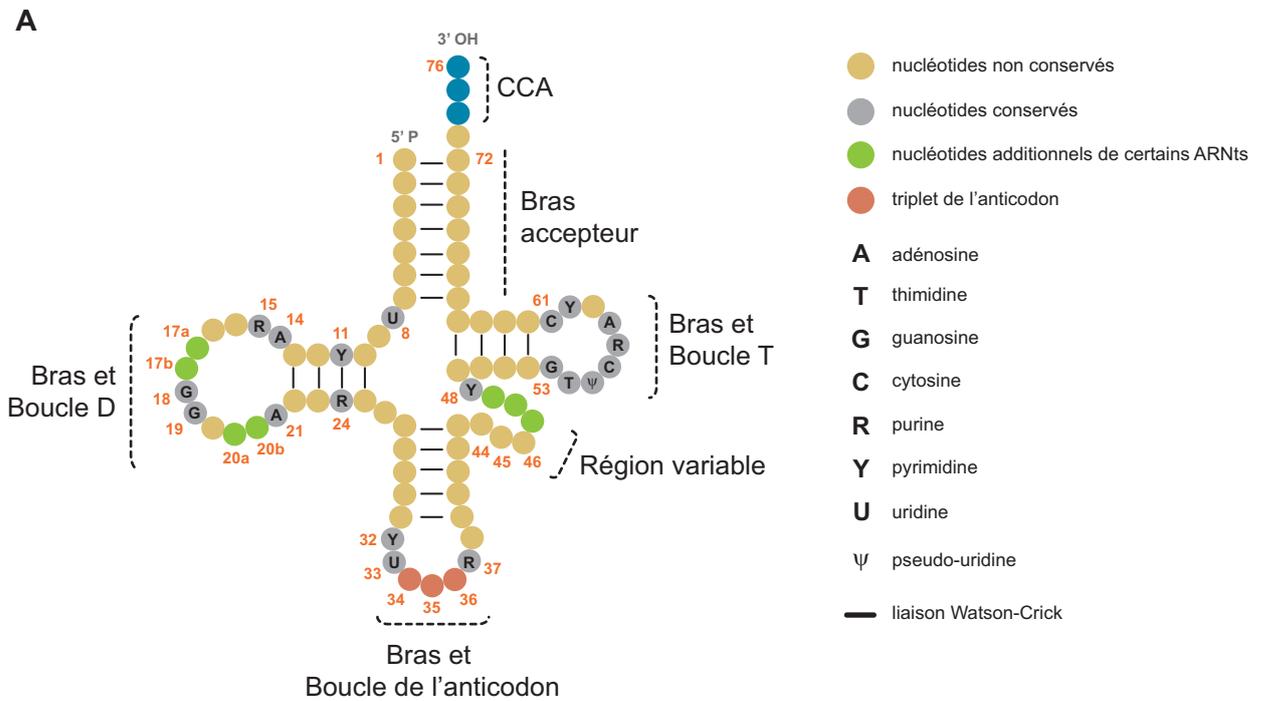


Figure 8: Schémas de l'ARN de transfert.

(A) Représentation de la structure secondaire en forme de feuille de trèfle. La numérotation des nucléotides est indiquée en orange à partir de l'extrémité 5'phosphate (5'P). (B) Représentation en forme de L-inversé caractéristique de l'ARNt. (C) Structure cristallographique de l'ARNt^{Phe} de levure en L-inversé (accession pdb : 1TRA).

I.3.2 Epissage et maturation

La première étape de maturation est la suppression de l'extension 5' leader qui est catalysée par l'endonucléase RNase P, puis l'extension 3' est à son tour excisée par action de l'endonucléase Rex1p (Copela et al., 2008; Ozanick et al., 2009) et de l'exonucléase RNase Z (Chen et al., 2005b) chez la levure (Figure 9). La RNase Z coupe l'ARNt immédiatement après la base discriminatrice (N_{73}), permettant ainsi l'addition du triplet CCA au niveau du bras accepteur par l'ARNt nucléotidyl transférase Cca1p (Aebi, 1990). A ce stade l'ARNt est exporté du noyau pour terminer sa maturation. L'épissage (retrait de la séquence intronique lorsque cela est nécessaire) est un mécanisme complexe, orchestré par une endonucléase hétérotétramérique (Sen2-15-34-54p) puis une ARNt ligase (Trl1p), qui se déroule en trois étapes à la surface de la mitochondrie (Huh et al., 2003); (Yoshihisa et al., 2003). Premièrement, l'endonucléase va générer deux moitiés d'ARNt par excision de l'intron, avec la moitié 5' se terminant par un phosphate cyclique 2'-3' et une moitié 3' avec une extrémité 5'-hydroxyle. Puis dans un deuxième temps, l'ARNt ligase Trl1p clive le cycle 2'-3' phosphate générant un 2'-phosphate et 3'-OH (de la moitié 5' de l'ARNt épissé) et ajoute un phosphate au groupement 5'-OH de la moitié 3' de l'ARNt épissé afin de relier les moitiés 5' et 3' par une liaison phosphodiester. Enfin, l'excision du 2' phosphate excédentaire se trouvant à la jonction épissée est catalysée par une ARNt 2' phosphotransférase (pour une vue d'ensemble consulter les deux bonnes revues (Hopper, 2013; Hopper et al., 2010). Après épissage les ARNts peuvent encore subir les dernières étapes de maturation que sont les modifications des bases nucléotidiques.

I.3.3 Modifications et rôles

En tout, une centaine de modifications ont été répertoriées à travers toutes les espèces vivantes (pour une revue exhaustive (El Yacoubi et al., 2012); <http://mods.rna.albany.edu/home>) et cartographiées (<http://modomics.genesilico.pl/sequences/list/tRNA/>). Chez la levure, on dénombre environ 25 modifications sur les ARNts (Hopper, 2013; Phizicky and Hopper, 2010), et de manière assez spectaculaire un ARNt contient en moyenne entre 7 et 17 modifications (Phizicky and Hopper, 2010). De plus, les gènes responsables de ces modifications sont maintenant connus et la liste a été dressée par le groupe d'Anita K. Hopper (Hopper, 2013). Bien entendu, le choix de la base qui a été modifiée n'est pas trivial et sert un but bien précis. Ainsi le ribose l'adénosine 64 de l'ARNt_i^M est méthylé en 2'OH afin de permettre sa discrimination par rapport à l'ARNt^M élongateur (Åström and Byström, 1994; Åström et al., 1993) qui peut être reconnu par eIF2 et non pas par eEF1A (Åström et al., 1993; Shin et al., 2011). On peut également citer des modifications qui vont permettre de favoriser la reconnaissance codon-anticodon comme la conversion de A vers I à la position 34 du wobble par les ADATs, la modification cmnm5s2U en position 34 (wobble) de l'ARNt^Q pour décoder les A et G (Kurata et al., 2008; Yokoyama and Nishimura, 1995), ou encore celles qui vont affecter la stabilité (Horie et al., 1985) ou le bon repliement de l'ARNt en feuille de trèfle (Helm and Attardi, 2004).

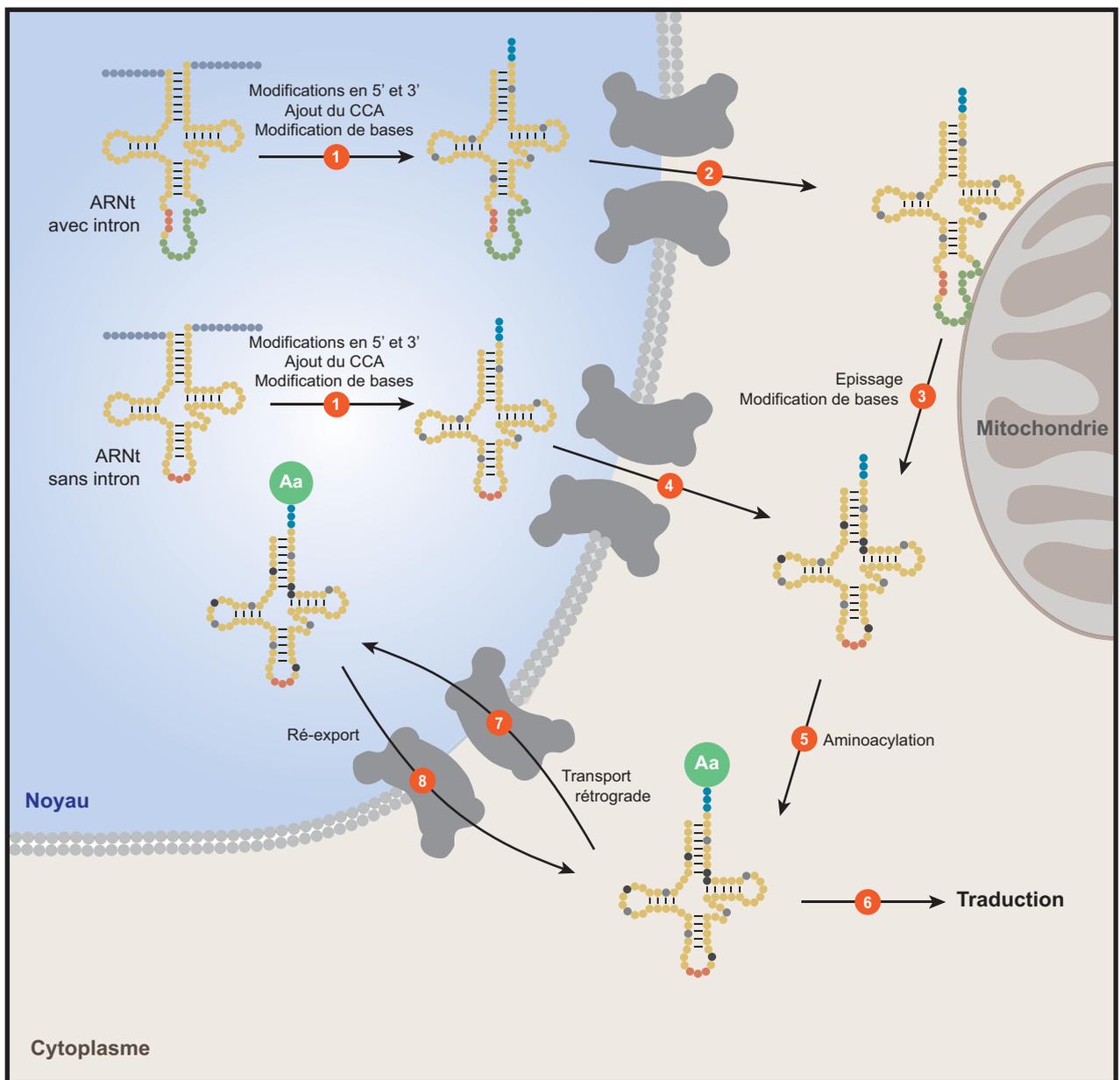


Figure 9 : Schéma de la biogénèse des ARNt chez les eucaryotes.

1 Les ARNt avec ou sans intron sont transcrits dans le nucléole, puis processés en 5' et 3', avant l'addition de la séquence CCA et la modification de certains nucléosides. 2 Les ARNt avec introns sont ensuite exportés du noyau par Los1p, amenés à la surface des mitochondries pour être épissés puis à nouveau modifiés 3. 4 Les ARNt ne possédant pas d'introns sont exportés du noyau par Los1p ou Msn5p. 5 Les ARNt épissés ou non sont aminoacylés par leurs aaRSs correspondantes. 6 Les ARNt aminoacylés sont ensuite soit directement utilisés pour la traduction soit importés dans le noyau (transport rétrograde) via Mtr10p. 7 Une fois dans le noyau les ARNt peuvent être ré-exportés par un mécanisme dépendant de Msn5p ou de Los1p 8. Ces ARNt sont par la suite utilisés pour la traduction 6.

Toutes ces modifications auront donc un impact sur la fidélité, la processivité et la vitesse de la traduction.

I.3.4 Dégradation

Bien que les ARNt aient un temps de demi-vie très important, allant de quelques heures à plusieurs jours (Phizicky and Hopper, 2010), ils doivent être recyclés. Deux mécanismes sont à l'ouvrage, le premier a été proposé par Anderson et correspond à la voie de dégradation 3'-5' par l'exosome nucléaire et le complexe TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4p Polyadenylation complex) (Anderson et al., 1998; Anderson et al., 2000; Kadaba et al., 2004; Vanacova et al., 2005). Le second, la voie RTD de dégradation 5'-3' (**R**apid **t**RNA **D**ecay) a été proposée par Phisicky (Alexandrov et al., 2006).

I.3.5 Localisation subcellulaire

Comme nous l'avons vu, les ARNts sont transcrits dans le nucléole, maturés et modifiés dans le noyau puis exportés dans le cytoplasme où ils sont épissés (à la surface de la mitochondrie) et également modifiés. L'export des ARNts codés par des gènes contenant des introns est réalisé par le facteur d'export nucléaire Los1p, tandis que ceux codés par des gènes sans introns semblent être exportés *via* Los1p ou la karyophérine Msn5p. De manière assez surprenante, les ARNts peuvent à nouveau être importés dans le noyau par un mécanisme dépendant de la karyophérine Mtr10p. Observé pour la première fois par les laboratoires d'Endo (Yoshihisa et al., 2003) et de Shen (Stanford et al., 2004), ce mécanisme de transport rétrograde reste cependant assez obscur. En effet, certaines études tendraient à montrer que l'accumulation d'ARNts dans le noyau serait favorisée au cours d'une carence en aa (Shaheen and Hopper, 2005) bien qu'il ait également été proposé que cet import rétrograde soit un processus constitutif (Chafe et al., 2011). Parmi les rôles possibles on peut également avancer que la voie rétrograde favorise la modification des ARNts (Ohira and Suzuki, 2011), ou l'aminacylation des ARNts (Sarkar et al., 1999), ou encore participe à une étape de contrôle de qualité (Kramer and Hopper, 2013). Une fois dans le noyau, ces ARNts peuvent à nouveau être réexportés *via* Los1p ou Msn5p en réponse à la levée de la carence nutritionnelle (Shaheen and Hopper, 2005; Takano et al., 2005).

Certains ARNts codés par le génome nucléaire peuvent également être importés dans la mitochondrie, c'est le cas d'un des isoaccepteur de l'ARNt^{Lys} cytosolique (tRK2) en condition de stress (Kamenski et al., 2007) ou encore des ARNt^{Gln} (UUG1) et (CUG) cytosoliques (Rinehart et al., 2005; Rubio et al., 2008) bien que l'import de ces derniers fassent encore l'objet de nombreux débats (Frechin et al., 2009).

I.3.6 Nouveautés émergentes

I.3.6.1 Réplication virale

Chez l'Homme, l'initiation de la transcription reverse du virus de l'immunodéficience humaine (HIV : **H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus) nécessite la présence de l'isoaccepteur 3 de l'ARNt^{Lys} (ARNt_{3^K}) (Jiang et al., 1993). Cet exemple n'est plus une exception puisqu'une équipe de Padua (Italie) vient de montrer que l'ARNt^P (ainsi qu'un fragment dérivé de cet ARNt) était capable d'initier la transcription réverse du génome du virus HTLV-1 (**H**uman **T**-cell **L**eukemia **V**irus Type 1) (Ruggero et al., 2014).

I.3.6.2 Petits ARN dérivés d'ARNt induit après un stress (tiRNA) et fragments dérivés d'ARNt (tRFs)

Les nouvelles méthodes de séquençage à haut débit ont permis ces dernières années d'identifier tout un panel de nouvelles espèces d'ARNs non codants. Bien au-delà de tout ce que l'on avait déjà observé en termes de diversité et de rôle, l'émergence de ces nouvelles technologies a ouvert un pan entier de recherche consacré à l'élucidation de la biogénèse et des fonctions de ces petits ARNs non codants. Parmi les espèces identifiées, la présence de fragments d'ARNts est particulièrement intéressante.

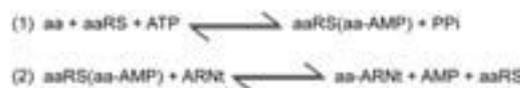
La formation de deux « moitiés » d'ARNts, appelé tiRNAs (tRNA-derived stress-induced fragments), est catalysée, chez la levure, par la RNase Rny1p à partir d'ARNt mature par clivage endonucléolytique dans la boucle de l'anticodon (Luhtala and Parker, 2012; Thompson et al., 2008; Thompson and Parker, 2009). Ce mécanisme clive les ARNts en fragment d'environ 30 à 40nt en condition de stress oxydatif, de densité cellulaire trop élevée ou de faible taux de nutriments (Thompson and Parker, 2009). Les tiRNAs sont également produits chez les mammifères par l'angiogénine, une RNase induite au cours de certains stress (Saxena et al., 1992), dans quelques espèces bactériennes *via* la nucléase PrrC (et autres voir (Kaufmann, 2000) ainsi que chez la levure *Kluyveromyces lactis* par la γ -toxine (Lu et al., 2008). De plus en plus d'études font état de la présence des tiRNAs et pourtant peu de choses sont connues sur leurs rôles. Bien que plusieurs groupes aient proposé leur implication dans l'élimination des ARNts non aminoacylé ou redondants (Fu et al., 2009; Lee and Collins, 2005), il semble qu'ils aient un rôle dans le contrôle de la traduction et la formation de granules de stress chez les mammifères et les plantes (Emara et al., 2010; Hsieh et al., 2009; Loss-Morais et al., 2013; Nowacka et al., 2013; Sobala and Hutvagner, 2013) ou encore dans l'homéostasie des petits ARNs interférants (siRNA) au cours d'un choc de température chez la drosophile (Durdevic et al., 2013). Plusieurs études publiées entre 2010 et 2014 ont pu mettre en évidence la présence de ces tiRNAs chez l'apicomplexe *Trypanosoma cruzi* et leurs liens avec l'homologue d'argonaute TcPIWI-trp suggérant l'implication de ces ARNs dans le mécanisme d'ARN interférence (Garcia-Silva et al., 2014b; Garcia Silva et al., 2011). De plus, les tiRNAs sont retrouvés en association avec TcPIWI-trp

dans des vésicules de sécrétion, qui sont transférées entre apicomplexes et vers des cellules de l'hôte pendant les étapes d'infections (Garcia-Silva et al., 2014a; Garcia Silva et al., 2011).

Les fragments dérivés d'ARNt ou tRFs sont plus petits que les tRNAs, entre 13 et 30 nt, et sont retrouvés dans tous les organismes étudiés à ce jour (Lee et al., 2009). Le clivage peut avoir lieu sur des pré-ARNts comme sur des ARNts matures et produit de nombreuses espèces différentes (5'tRF, 3'CCA tRF, 3'U tRF et 5' leader-exon tRF ; pour revue d'ensemble (Gebetsberger and Polacek, 2013) et (Sobala and Hutvagner, 2011)). Brièvement, les 5'tRFs peuvent altérer l'homéostasie entre les petits ARNs interférents (siRNA) et les micro-ARN (miRNA) (Durdevic et al., 2013) ou encore inhiber la traduction en se liant au ribosome (Gebetsberger et al., 2012). Les 3'CCA tRFs semblent avoir un rôle proche de celui des micro-ARNs en modulant la traduction de certains ARN messagers (Li et al., 2012; Maute et al., 2013) ou peuvent également agir comme des inhibiteurs de la réplication de certaines séquences rétrovirales insérées dans le génome de la cellule hôte (Li et al., 2012). Les quelques études menées sur les 3'U tRFs tendent à montrer qu'ils impactent la viabilité des cellules (Lee et al., 2009). Enfin les 5' leader-exon tRFs sensibilisent les cellules à l'activation de la voie de suppression des tumeurs activées par p53 (un facteur de transcription suppresseur de tumeur) en réponse à un stress oxydatif, conduisant à la mort par apoptose (Hanada et al., 2013).

I.3.7 Aminoacyl-ARNt synthétases : classes et fonctions

Les aaRS sont une famille d'enzyme très diverses par leurs structures mais qui présentent toutes la même activité primordiale pour la cellule qui est l'amination des ARNts qui seront utilisés au cours de la traduction. La réaction d'amination comporte deux étapes qui sont (1) l'activation d'un aa par une molécule d'ATP afin de former un intermédiaire aminoacyl-adénylate (aa~AMP ; voir encadré) puis (2) le transfert de cet aa activé sur l'ARNt homologue grâce à la formation d'une liaison ester entre l'acide aminé et l'extrémité 2'- ou 3'-OH du ribose de l'adénosine 76 de la tige acceptrice de l'ARNt.



I.3.7.1 Classification

Il existe généralement 20 aaRSs, une pour chacun des 20 aa classiquement codées par le code génétique. Ces enzymes sont classées en 2 familles distinctes (classe I et classe II) sur la base de l'architecture de leur site catalytique (Eriani et al., 1990; Ribas de Pouplana and Schimmel, 2001), de leur structure tridimensionnelle globale (Cusack et al., 1990) et de leurs propriétés chimiques (Figure 10). L'appartenance d'une aaRS à une classe est conservée à travers l'échelle évolutive à une exception près, celle de la lysyl-ARNt synthétase (KRS) de certaines archées qui appartient à la classe

	Classe I	Classe II		
Séquence signature du site catalytique	HIGH KMSKS	gφxxφxxPφφ fRxe-h/rxxxFxxx(d/e) gφgφgφ(d/e)Rφφφφφ		
Structure du domaine catalytique	Domaine de Rossmán (cinq brins β parallèles)	Sept brins β antiparallèles encadrés d'hélices α		
Sous-classes et oligomérisation	Ia	IIa		
	Méthionyl-ARNt synthétase	$\alpha 2, \alpha 2, \alpha$	Séryl-ARNt synthétase	$\alpha 2$
	Valyl-ARNt synthétase	α	Thréonyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$
	Isoleucyl-ARNt synthétase	α	Alanyl-ARNt synthétase	$\alpha 4, \alpha 2, \alpha$
	Leucyl-ARNt synthétase	α	Glycyl-ARNt synthétase	$\alpha 2\beta 2, \alpha 2, \alpha 2$
	Cystéinyl-ARNt synthétase	α	Prolyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$
	Aginyl-ARNt synthétase	α	Histidyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$
	Ib		IIb	
	Glutamyl-ARNt synthétase	α	Aspartyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$
	Glutaminyl-ARNt synthétase	α	Asparaginyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$
	Lysyl-ARNt synthétase	α	Lysyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$
	Ic		IIc	
	Tyrosyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$	Phénylalanyl-ARNt synthétase	$\alpha 2\beta 2$
	Tryptophanyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$	Pyrolysyl-ARNt synthétase	$\alpha 2$
			O-phosphoryl-ARNt synthétase	$\alpha 4$
Résidu accepteur de l' aminoacyl adénylate	2'OH de l'A76	3'OH de l'A76		

La structure oligomérique indiquée en regard de chaque aminoacyl-ARNt synthétase suit si nécessaire le schéma suivant : bactérie, archée, eucaryote

Figure 10 : Les deux classes d' aminoacyl-ARNt synthétases

I des aaRSs (Ibba et al., 1997). Chaque classe (I et II) est également divisée en sous-classes (a-c) sur la base de propriétés caractéristiques de leur domaine catalytique, de l'aa qu'elles reconnaissent ou de la structure du domaine de liaison de l'anticodon.

Les aaRSs de classe I sont généralement des enzymes monomériques, toutes caractérisées par un domaine de Rossmann contenant deux séquences signatures dont le consensus est KMSKS (Lys-Met-Ser-Lys-Ser) et HIGH (His-Ile-Gly-His). La séquence KMSKS permet de stabiliser l'ATP au cours de l'activation de l'aa et stabilise l'ARNt au cours du transfert de l'aa activé sur l'ARNt. La séquence HIGH permet elle aussi de stabiliser le squelette phosphate de l'ATP au cours de l'activation de l'aa. Les aaRS de classe I lient l'ARNt *via* le sillon mineur, et attachent l'aa sur le 2'-OH de l'A₇₆.

Les aaRSs de classes II sont quant à elles souvent oligomériques (di- ou tétramérique) et sont caractérisées par un corps catalytique composé des motifs 1, -2 et -3 des synthétases de classe II qui s'organisent en sept brins bêta antiparallèles encadrés par des hélices alpha. Ces trois motifs consensus du site catalytique de ces aaRSs sont pour le motif 1 $g\phi xx\phi xxP\phi\phi$, $fRxe-h/rxxxFxxx(d/e)$ pour le motif 2 et $g\phi g\phi g\phi(d/e)R\phi\phi\phi\phi\phi$ pour le motif 3, où ϕ représente un acide aminé hydrophobe, x n'importe quel acide aminé et X un acide aminé conservé. Au cours de l'étape d'aminocyclation, les synthétases de classe II lient l'ARNt *via* son sillon majeur, et attachent l'aa sur le 3'-OH de l'A₇₆.

En plus des 20 aaRS connues, deux nouvelles enzymes ont été identifiées plus récemment chez des archées méthanogènes et appartiennent aux synthétases de classe II. La première, la O-phosphoséryl-ARNt synthétase (SepRS) est responsable de l'activation de l'O-phosphosérine et de son transfert sur l'ARNt^{Cys} (ARNt^C) (O'Donoghue et al., 2005) et la seconde, la pyrrolyl-ARNt synthétase (PylRS), active la pyrrolysine et la transfère sur l'ARNt^{Pyl} (Polycarpo et al., 2004).

1.3.7.2 Spécificité envers les acides aminés

Divers domaines et insertions ont été acquis par les synthétases au fil de l'évolution afin d'augmenter la spécificité et la fidélité de l'étape d'aminocyclation. En d'autres termes ces ajouts permettent de minimiser la formation d'ARNt mésacylé ce qui entraînerait l'apparition de mutations traductionnelles dans les protéines et donc une perte d'homéostasie dans la cellule, qui dans certains cas mènerait à la mort cellulaire (Schimmel, 2008). Neuf des 20 aaRS canoniques possèdent des domaines de correction (ou d'édition) en *cis* composés d'un site actif qui permet de corriger les erreurs d'activation d'un aa isostérique. Le plus connu et le plus étudié est le polypeptide connectif 1 (CP1 : **C**onnective **P**olypeptide **1**) (Starzyk et al., 1987) que l'on retrouve chez certaines synthétases de classe I comme la LRS, l'IRS et la VRS. Dans certains organismes procaryotiques ces aaRS pouvant mésactiver un aa ne possèdent pas ces domaines de correction et l'édition est opérée en *trans* par des domaines d'édition exprimés sous forme de protéines autonome. Pour ne citer qu'un exemple, la protéine YbaK édite les espèces mésacylées Ala-ARNt^{Pro} et Cys-ARNt^{Pro} chez *Haemophilus influenzae* (An and Musier-Forsyth, 2004; Wong et al., 2003). Il a d'ailleurs été proposé que certains

domaines de correction autonomes (c'est-à-dire agissant en *trans*) ont été incorporés dans les synthétases au cours de l'évolution pour devenir des domaines de correction en *cis* (Ahel et al., 2003).

Que ce soit en *cis* ou en *trans*, il existe deux types de mécanisme d'éditations. L'édition « pré-transfert » qui clive l'aa~AMP avant que l'aa mésactivé soit transféré sur l'ARNt, et l'édition « post-transfert » qui édite l'aa mésactivé après son transfert sur l'ARNt par hydrolyse de la liaison ester entre l'aa et l'ARNt mésacylé (Jakubowski, 2012; Martinis and Boniecki, 2010; Pang et al., 2014).

Malgré tous les mécanismes développés par la cellule pour corriger les erreurs au cours de l'aminocyclation, il subsiste néanmoins un certain nombre d'ARNts mésacylés qui ne sont pas édités (moins de 3 pour 10,000 (Loftfield and Vanderjagt, 1972)). Ces ARNts mésacylés peuvent ensuite participer à la traduction et conduiront à l'incorporation, dans le polypeptide naissant, d'un aa différent de celui codé par le codon correspondant dans l'ARNm. Dans une grande majorité des cas, cela conduit à des dysfonctionnements et maladies chez les mammifères, qui dans certains cas sont létales (Jakubowski, 2012; Nangle et al., 2006; Schimmel, 2008).

De manière surprenante, il a été montré que certains organismes comme *Escherichia coli* peuvent tolérer jusqu'à 10% de mésacylation (Ruan et al., 2008). Plusieurs études chez la levure ou les bactéries ont ainsi démontré que la mésincorporation d'aa dans les protéines conférait un avantage aux cellules en condition de stress oxydatif (Netzer et al., 2009) ou pendant une carence en certains aa (Bacher et al., 2007; Jones et al., 2011; Pezo et al., 2004; Wiltrout et al., 2012). On peut donc réellement se demander si, de manière plus globale, ces erreurs de traduction ne pourraient pas donner un avantage sélectif à la cellule dans certaines conditions environnementales. Il a été montré que l'existence d'ambiguïté dans le code génétique favorise la synthèse d'un faible nombre de protéines contenant des mutations. Ces mutations faites au hasard au cours de la traduction créent des populations statistiques de protéines qui génèrent à terme une diversité phénotypique positive pour la cellule (Moura et al., 2009). Cette exploration de nouvelles combinaisons de séquences protéiques par mésincorporation aléatoire d'aa est également une manière de faire évoluer le protéome d'une espèce sans pour autant que son génome ait besoin d'être muté.

1.3.7.3 Déterminants d'identité et reconnaissance des ARNts

Les ARNts possèdent la même structure secondaire en « L-inversé » (voir Figure 8) et la formation du complexe aaRS•ARNt homologue dépend de nucléotides spécifiques répartis dans l'ARNt et qui sont soit des signaux positifs de reconnaissance (ou déterminants d'identité), ou des signaux négatifs de reconnaissance (ou anti-déterminants). Les déterminants d'identité permettent à une aaRS donnée de reconnaître son ou ses ARNt(s) homologue(s) et de l'aminocycler. A l'inverse, les anti-déterminants permettent aux aaRS de différencier un ARNt hétérologue de son ou ses ARNt(s) homologue(s) (pour revue (Giege et al., 1998)).

I.3.7.4 Mécanismes particuliers d'aminocyclation

Le développement des méthodes de séquençage modernes a permis d'obtenir les séquences complète de génome et d'avoir une image plus claire et précise du pool d'aaRS disponibles dans différents organismes. Ainsi le premier génome séquencé et assemblé donnant un accès immédiat au jeu entier des gènes d'aaRS d'un organisme fut celui d'*Haemophilus influenza Rd* en 1995 (Fleischmann et al., 1995). Il confirma l'hypothèse selon laquelle tous les organismes vivants devaient posséder 20 aaRS : une pour chacun des 20 aa codés par le code génétique ; hypothèse corroborée par l'identification de 20 activités d'aaRSs chez *E. coli* et le séquençage des 20 gènes correspondants (Blattner et al., 1997). La publication, en 1996, du génome de *Methanococcus jannaschii* a provoqué un changement profond de paradigme en la matière puisque l'analyse du génome de cette archée hyper-thermophile a révélé qu'elles ne disposaient que de 16 des 20 synthétases attendues (Bult et al., 1996), notons à ce sujet que c'est toujours encore le set minimal observé à ce jour. Depuis, de nombreuses études ont montré que l'absence de certaines aaRSs n'était pas une exception. Cette tendance est retrouvée chez la majorité des bactéries, chez toutes les archées et dans les organites des eucaryotes (mitochondrie et chloroplaste). Pour synthétiser les aa-ARNt correspondants, ces organismes utilisent des voies alternatives appelées « voies indirectes » ou « ARNt-dépendantes » d'aa.

Ces voies indirectes nécessitent l'utilisation d'une aaRSs ayant une spécificité relâchée pour un ARNt non homologue lui permettant de générer un aa-ARNt mésacylé. Ces synthétases sont donc appelées non-discriminantes (ND). Le tRNA orphelin est d'abord mésacylé par l'aaRS ND puis l'aa est converti en celui homologue du tRNA par une seconde enzyme qui a une activité de conversion de l'aa ARNt-dépendante. Dans tous les cas, l'aaRS qui misacyle le tRNA orphelin est spécifique d'un aa qui est un précurseur métabolique de celui dont l'aaRS est manquante. Après conversion de l'aa, l'aa-ARNt homologue pourra participer à la traduction.

I.3.7.4.1 Voies de transamidation et synthèse de l'Asn/Gln-ARNt^{Asn/Gln}

La voie la plus documentée, découverte par Wilcox et Nirenberg en 1968, est celle de la voie indirecte de formation du glutaminyl-ARNt^{Gln} (Q-ARNt^Q) utilisée par la quasi-totalité des bactéries, toutes les archées, et les organites (Ibba and Soll, 2000; Wilcox and Nirenberg, 1968). Lorsqu'un organisme ne possède pas de gène codant la glutaminyl-ARNt synthétase (QRS), la formation du Q-ARNt^Q est effectuée par la voie de transamidation faisant intervenir 2 enzymes : une glutaminyl-ARNt synthétase (ERS) non-discriminante (ERS-ND) et une amidotransférase ARNt-dépendante (Adt) (Figure 11). L'ERS-ND est non seulement capable de glutamyliser l'ARNt^{Glu} (ARNt^E), mais également l'ARNt^Q et donc de former le glutaminyl-ARNt^Q (E-ARNt^Q) mésacylé. Le glutamate estérifiant l'ARNt^Q est ensuite amidé en Q-ARNt^Q par l'AdT. Chez les bactéries et organites eucaryotes, l'AdT est un hétérotrimère formé des sous-unités GatA, GatB et GatC, que l'on appelle GatCAB (Glu-AdT CAB). Dans ce complexe GatA possède une activité glutaminase qui lui permet d'hydrolyser la glutamine

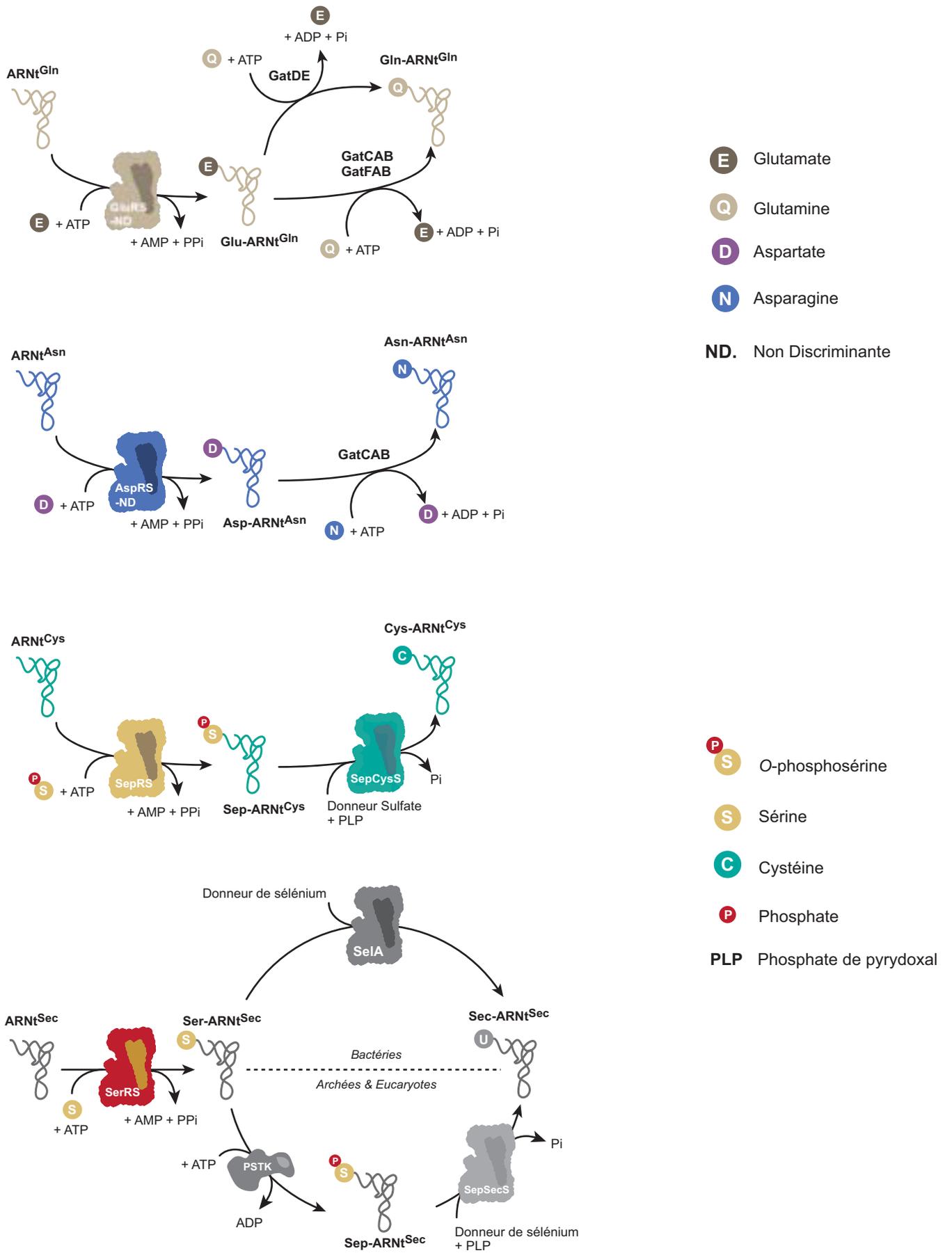


Figure 11: Les voies indirectes d'aminocyclation

(également substrat de l'AdT) en glutamate et de générer le groupement NH₂ qui sera transféré sur le glutamate estérifiant l'ARNt^Q. La sous-unité GatB possède une activité kinase qui permet de phosphoryler le groupement γ -COOH du glutamate estérifiant l'ARNt^Q activant ainsi ce groupement qui sera amidé grâce à l'activité transamidase que possède également GatB. GatC est une chaperonne qui maintient les sous-unités GatA et GatB liées entre-elles. Chez la levure, un tel trimère est également présent dans les mitochondries et permet la formation Q-ARNt^Q mitochondrial palliant ainsi à l'absence d'une QRS mitochondriale (Frechin et al., 2009). En revanche aucun gène codant GatC n'est présent chez la levure, il est remplacé par un homologue, GatF qui possède une extension N-terminale absente chez GatC. Des études cristallographiques auxquelles j'ai participé ont pu révéler l'organisation spatiale du trimère et permettre ainsi de comprendre le rôle de GatF et plus précisément de son extension N-terminale (Article 3).

La plupart des archées et certaines bactéries sont également dépourvues d'AsparaginyI-ARNt synthétase (NRS). La formation de l'Asparagine-ARNt^{Asn} (N-ARNt^N) est alors catalysée par la GatCAB (Becker and Kern, 1998; Becker et al., 2000; Curnow et al., 1996). Dans ce cas, une Aspartyl-ARNt synthétase non discriminante (DRS-ND) charge l'ARNt^N avec un aspartate qui sera amidé en Asn par la GatCAB libérant ainsi un N-ARNt^N. Il est à noter que les GatCAB bactériennes peuvent aussi bien transamider l'E-ARNt^Q que le D-ARNt^N c'est pourquoi on les appelle Glu/Asp AdT. C'est le cas notamment de la GatCAB d'*Helicobacter pylori* qui ne possède ni QRS ni NRS (Sheppard et al., 2007). Si dans une espèce bactérienne soit la QRS soit la NRS est présente alors que l'autre est manquante, l'AdT GatCAB ne sera donc requise que pour la synthèse d'un seul des 2 aa-tRNA amidés (N-ARNt^N et Q-ARNt^Q). Néanmoins, il a été montré que la GatCAB sera capable de transamider à la fois l'E-ARNt^Q et le N-ARNt^N. C'est également le cas de la GatFAB mitochondriale de levure, qui *in vivo* n'est essentielle qu'à la synthèse du Q-ARNt^Q mitochondrial, puisqu'il existe une NRS mitochondriale, mais qui est capable de transamider un D-ARNt^N d'origine bactérienne (Frechin et al., 2009).

Chez les archées, la formation du Q-ARNt^Q n'est pas assurée par la GatCAB mais par un hétérodimère formé des sous-unités GatD (glutaminase) et GatE (kinase) (Tumbula et al., 2000). Cette GatDE possède les fonctions semblables à l'AdT bactérienne mais elle n'est pas à double spécificité, et n'assure que la conversion de l'E-ARNt^Q en Q-ARNt^Q.

1.3.7.4.2 Les voies d'aminocyclation de l'ARNt^{Sec}

La sélénocystéine, forme biologique majeur du sélénium, est un aa « non canonique » retrouvé dans les trois domaines du vivant (Commans and Bock, 1999). Ses propriétés en font un excellent nucléophile notamment pour des réactions d'oxydo-réductions. La sélénocystéine est codée par le codon stop UGA et son insertion dépend de la présence d'une structure secondaire en tête d'épingle dans l'ARNm (élément SECIS). Le Sec-ARNt^{Sec} est apporté au cours de la traduction par un facteur

d'élongation spécifique, SelB chez les bactéries et EFSec chez les archées et eucaryotes (Figure 11). La voie indirecte de formation de cet aa-ARNt passe tout d'abord par la sérylation de l'ARNt^{sec} par une séryl-ARNt synthétase (SRS). Chez les bactéries, le Ser-ARNt^{sec} est ensuite converti en sec-ARNt^{sec} par une sélénocystéine synthase Sela en présence de sélénophosphate (donneur de sélénium) et de phosphate de pyridoxal (PLP). Chez les archées et les eucaryotes, l'*O*-phosphoséryl-ARNt^{Sec} kinase (PSTK) phosphoryle le Ser-ARNt^{Sec} générant un Sep-ARNt^{Sec} (*O*-phosphoséryl-ARNt^{Sec}) qui est converti par la Sep-ARNt:Sec-ARNt synthase (SepSecS) en Sec-ARNt^{sec} en présence de sélénophosphate et de PLP.

I.3.7.4.3 Formation du Cys-ARNt^{Cys}

Chez un certain nombre d'archées méthanogènes, la Cystéinyl-ARNt synthétase (CRS) peut être absente (Stathopoulos et al., 2001). Il existe donc dans ces organismes une voie indirecte de formation du Cys-ARNt^{Cys} (Figure 11). Ce processus implique l'aminoacylation de l'ARNt^{Cys} avec une *O*-phosphosérine (Sep) par une *O*-phosphoséryl-ARNt synthétase (SepRS). Le Sep-ARNt^{Cys} est ensuite converti en Cys-ARNt^{Cys} par une Sep-ARNt:Cys-ARNt synthase (SepCysS) en présence d'un donneur de sulfate et de PLP (Sauerwald et al., 2005).

Ces voies indirectes de formation d'aminoacyl-ARNt sont résumées dans la Figure 12 et ont été traitées dans une revue très exhaustive publiée par le groupe du Pr. Söll (Sheppard et al., 2008).

I.4 Les complexes multisynthétasiques

Les aminoacyl-ARNt synthétases font partie d'une famille d'enzymes très anciennes et il est généralement accepté que les premières synthétases (d'un point de vue évolutif) étaient réduites aux seuls domaines catalytiques des synthétases dites modernes (Rould et al., 1989). Comme nous l'avons vu, au cours de l'évolution les synthétases ont acquis un certain nombre de domaines augmentant leur activité et spécificité catalytique (domaine de liaison à l'anticodon) ainsi que des domaines d'édition. Mais comme nous le verrons plus tard, les synthétases eucaryotiques ont également acquis une myriade de domaines additionnels n'ayant aucun lien avec la réaction d'aminoacylation, et qui leurs confèrent diverses activités additionnelles toutes aussi cruciales. Le postulat actuel propose que l'acquisition de ces domaines c'est faite par accumulation progressive en fonction de la complexité des organismes eucaryotes. Ces acquisitions ont ainsi permis aux aaRSs de s'associer en complexe afin d'utiliser avec parcimonie les ressources énergétiques, pour augmenter l'efficacité de la traduction et plus globalement pour étendre la complexité et la sophistication des organismes émergents.

aa-ARNt	Voie Indirecte	Voie Directe
Gln-ARNt ^{Gln}	Toutes les archées, la plupart des bactéries, les organelles (mitochondrie et chloroplaste)	Tous les eucaryotes et certaines bactéries
Asn-ARNt ^{Asn}	La plupart des bactéries et les archées	Tous les eucaryotes, certaines bactéries et archées, organelles
Cys-ARNt ^{Cys}	Archées méthanogènes	Tous les eucaryotes et bactéries, la plupart des archées, organelles
Sec-ARNt ^{Sec}	Quelques eucaryotes, bactéries et archées	Aucune identifiée à ce jours

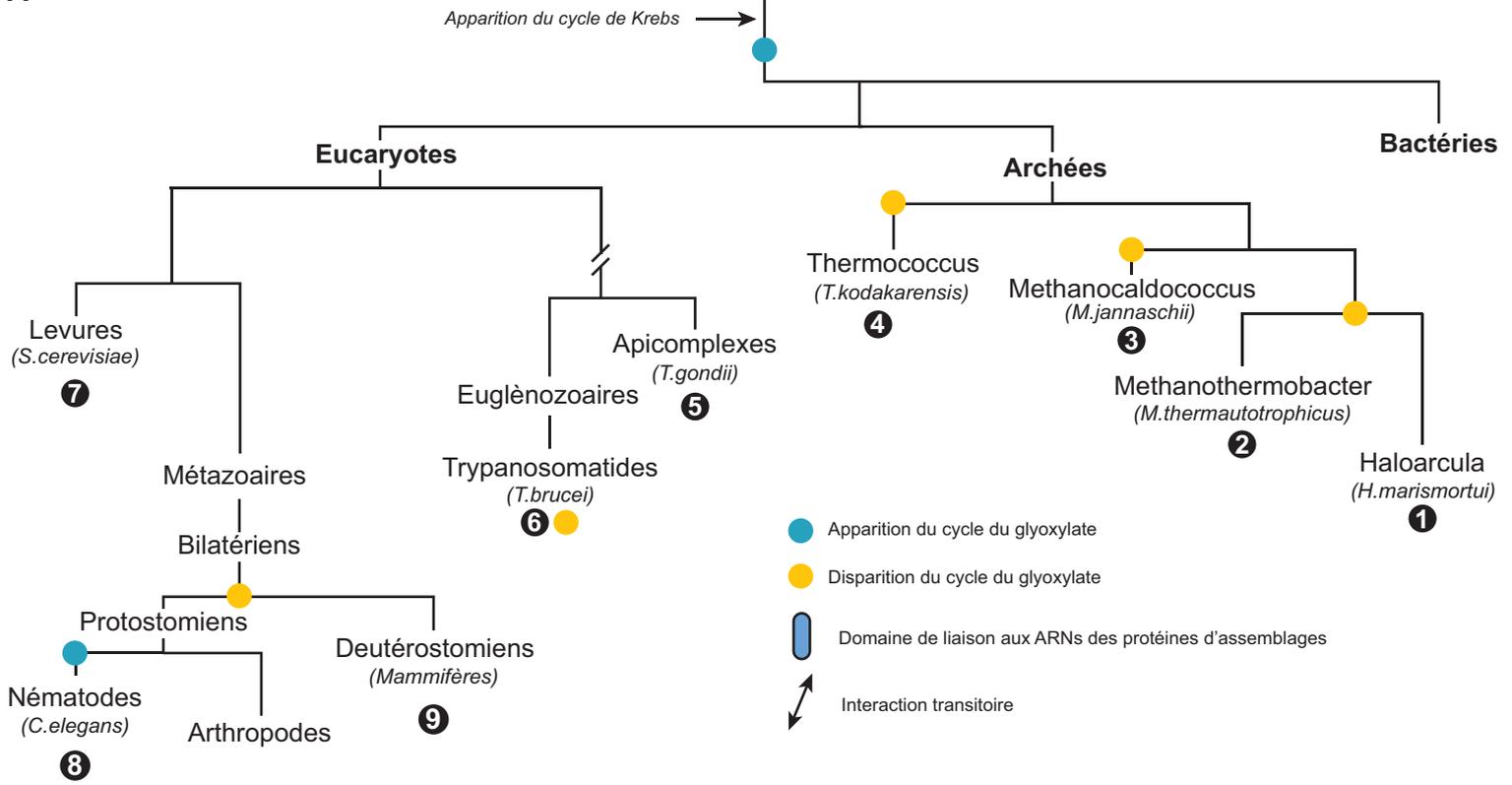
Figure 12: Tableau des voies directes et indirectes d'aminocyclation.

I.4.1 Origines et rôles

L'ajout de domaines dans les synthétases a rendu leur assemblage sous forme de complexes possible d'un point de vue physique : c'est le moyen par lesquelles elles s'assemblent. La cause, c'est-à-dire la raison biologique de la formation de tels complexes, n'est quant à elle pas aussi évidente. Récemment le groupe du Pr. Paul Fox a néanmoins proposé une hypothèse intéressante selon laquelle l'émergence des complexes multisynthétasique (MSC) est corrélée au métabolisme des organismes (Eswarappa and Fox, 2013). Plus particulièrement, l'apparition du cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique) essentiel pour les organismes aérobies et la perte du cycle du glyoxylate, semblent coïncider avec l'apparition des MSC. Lorsque l'on regarde les voies de biosynthèse des acides aminés, on remarque que sur les dix acides aminés issus du cycle de Krebs, huit correspondent à des synthétases du complexe multisynthétasique chez les mammifères (voir section suivante). Le Glutamate, la glutamine, l'arginine et la proline sont dérivés de l' α -cétoglutarate tandis que l'aspartate, la méthionine, la lysine et l'isoleucine sont dérivés de l'oxaloacétate. La leucine, neuvième acide aminé fait figure d'exception puisqu'il n'est pas issu du cycle de Krebs mais du pyruvate, produit final de la dégradation du glucose par la glycolyse. Cette théorie est confirmée par la présence d'un MSC chez les archées *Haloarcula marimortui*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicus* et *Thermococcus kodakarensis* (Godinic-Mikulcic et al., 2011; Goldgur and Safto, 1994; Hausmann and Ibbas, 2008b; Lipman et al., 2003; Raina et al., 2012) et l'euglènozoaire *Trypanosoma brucei* (Cestari et al., 2013) chez qui le cycle du glyoxylate a été perdu. Il semblerait donc que le cycle de Krebs ait influencé de manière positive l'émergence de tel complexe. La formation des complexes ne serait alors qu'une manière trouvée par la cellule pour utiliser de manière plus efficace le pool restreint d'aa.

Curieusement, il existe un certain nombre d'organismes eucaryotes possédant un MSC chez qui le cycle du glyoxylate est toujours présent. L'exemple le plus connu est la levure *Saccharomyces cerevisiae* où un MSC (le complexe AME) a été identifié (Simos et al., 1996a). Plus récemment, l'identification de complexe chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Havrylenko et al., 2011), ou encore l'apicomplexe *Toxoplasma gondii* (van Rooyen et al., 2014b) sont autant d'exemples qui vont à l'encontre de la théorie purement métabolique de l'apparition des complexes. Bien que ces constatations n'excluent pas la possibilité d'une pression du métabolisme sur la formation des complexes, il n'en est pas moins sûr qu'un autre phénomène plus général ait pu favoriser l'association de plusieurs synthétases sous forme de complexe. Il est probable que les interactions hôtes-pathogènes aient pu motiver l'association en complexe dans le cas des apicomplexes par exemple ou encore chez les kinétoplastides du genre *Leishmania* ((Mukkada, 1977); *L. brasiliensis*, *L. donovani*, *L. mexicana* et *L. tropica*), ou encore l'émergence de la multicellularité, bien que cette dernière soit peu probable vu la complexité des MSC d'unicellulaire (Figure 13). Une étude plus approfondie de la composition des environnements naturels dans lesquels évoluent les archées, les apicomplexes ou les euglènes nous

A



B

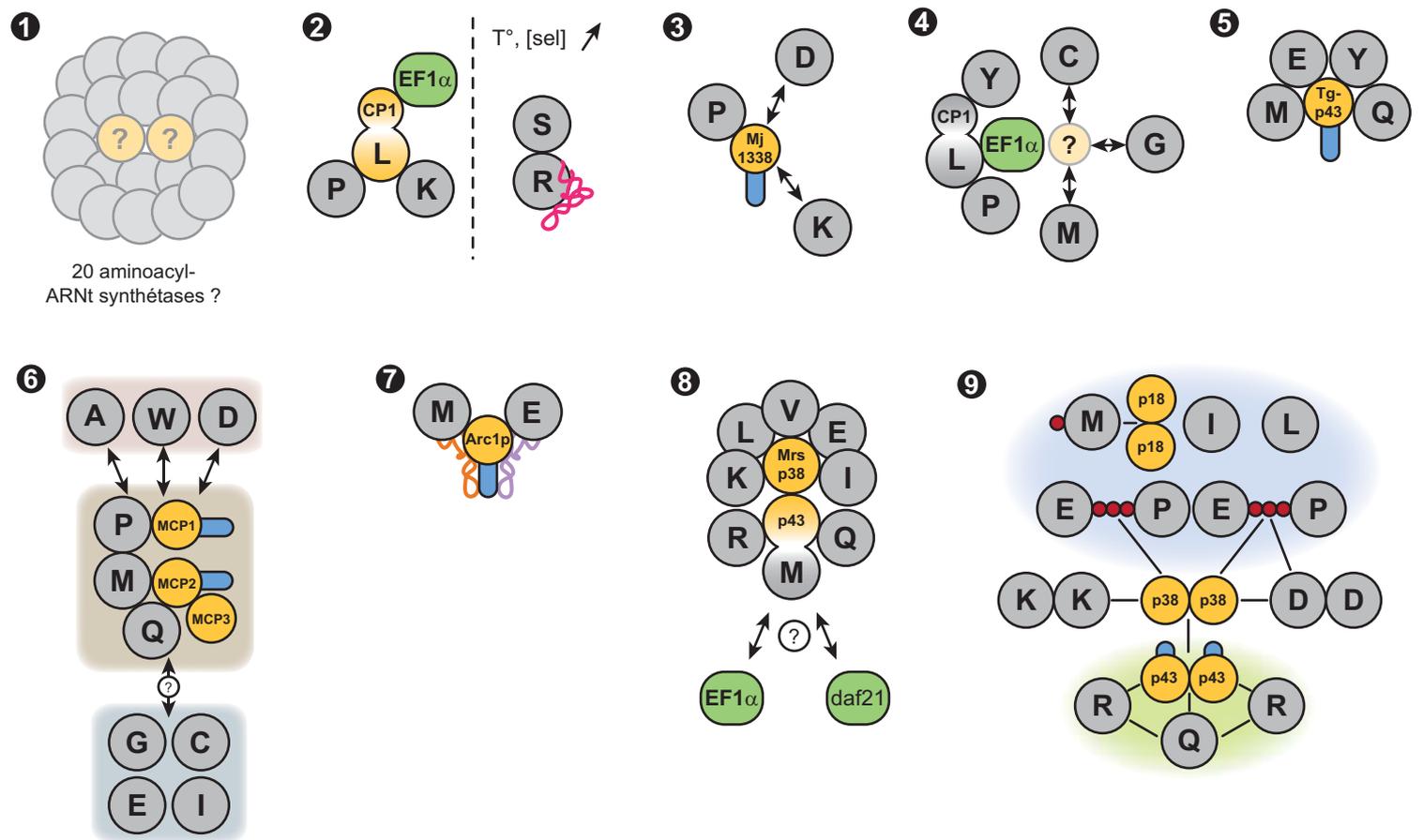


Figure 13 : Composition des complexes multisynthétasiques au cours de l'évolution.

(A) Arbre phylogénétique simplifié représentant tous les MSC identifiés à ce jour chez les archées et les eucaryotes.
 (B) Représentation schématique des MSCs, le code à une lettre des acides aminés a été utilisé pour chaque aaRS.
 Chaque chiffre en (A) associe un organisme à un schéma de son MSC en (B).

permettrait de comprendre quel est l'impact du métabolisme sur la nature des synthétases retrouvées dans les complexes.

De multiples rôles ont été attribués aux MSC. Le premier propose que le complexe permet de maintenir les aminoacyl-ARNts à proximité du ribosome afin d'accroître l'efficacité de traduction, c'est le concept du « channeling » (Kyriacou and Deutscher, 2008; Negrutskii and Deutscher, 1991). Le second suggère que le complexe soit un réservoir de synthétases qui peuvent être libérées en réponse à différents stimuli (Ray et al., 2007) et le troisième que l'association en complexe serve à augmenter l'activité catalytique des enzymes. Notons d'ailleurs que ces postulats ne sont pas exclusifs. Quatrièmement, la formation de complexe dans le noyau permettrait d'aminocyler les ARNts afin qu'ils passent directement par l'étape de contrôle de qualité nucléaire, et qu'ils soient ensuite exportés pour participer à la traduction (Nathanson and Deutscher, 2000). Bien que l'aminoylation dans le noyau soit possible (Grosshans et al., 2000; Lund and Dahlberg, 1998; Sarkar et al., 1999) aucune étude récente n'a pu mettre en évidence de manière claire et précise la présence du MSC dans le noyau.

I.4.2 Natures et diversité des complexes

L'idée que les aaRSs eucaryotes ne soient pas sous forme libre dans le cytoplasme n'est pas récente. Les premières observations faites au début des années 70-80 ont permis d'établir qu'un certain nombre de synthétases s'associaient sous forme de complexe dans des cellules de foie de rats (Deutscher, 1984). Plusieurs études faites sur d'autres mammifères ont permis d'obtenir la composition globale du complexe (Yang, 1996). Ce n'est que plus tard que l'organisation structurale et topologique du MSC de mammifère a été élucidée (Kaminska et al., 2009a; Kaminska et al., 2009b; Quevillon et al., 1999). Depuis, un nombre croissant d'études ont identifié l'existence de MSC dans tous les domaines du vivant, des archées à la levure, des nématodes aux mammifères. Bien que la composition des complexes soit la même chez les métazoaires, elle diffère grandement chez les autres organismes. En voici un aperçu.

I.4.2.1 Complexes chez les archées

Le premier MSC d'archée a été décrit chez *Haloarcula marismortui*, dans lequel un grand nombre, sinon toutes les synthétases, sont retrouvées dans un ou peut-être deux complexes (Goldgur and Safto, 1994) (Figure 13B-1). Aucune information n'est donnée quant au(x) rôle(s) de ce MSC.

Le second a été observé chez *Methanocaldococcus jannaschii* où la Prolyl-ARNt synthétase (PRS) est en complexe avec une déshydrogénase (Mj1338) de la voie de la méthanogénèse (Figure 13B-2). Mj1338 possède un domaine de liaison aux ARNts et permet de lier la PRS mais également la Lysyl-ARNt synthétase (KRS) et l'Aspartyl-ARNt synthétase (DRS) (Lipman et al., 2003).

Methanothermobacter thermautotrophicus possède un complexe stable formé de 3 synthétases et du facteur d'élongation EF1A (Figure 13B-3). Dans cette association, la Leucyl-ARNt synthétase (LRS) joue le rôle de noyau central et lie la KRS et la PRS respectivement *via* ses domaines N- et C-terminaux (Hausmann and Ibba, 2008b; Prætorius-Ibba et al., 2007). EF1A quant à lui interagit avec le domaine de correction CP1 de la LRS (Hausmann et al., 2007). L'activité d'aminoacylation de la LRS est augmentée lorsqu'elle est associée à EF1A, celle de la PRS et de la KRS sont également augmentées lorsqu'elles sont en complexe avec la LRS (Prætorius-Ibba et al., 2007). Un complexe ternaire entre la Séryl-ARNt synthétase (SRS), l'Arginyl-ARNt synthétase (RRS) et l'ARNt^R a également été observée par double-hybride de levure et résonance plasmonique de surface. L'association du dimère RRS-ARNt^R avec la SRS est rendue possible *via* le domaine C-terminal de la SRS. Dans ce complexe, l'activité d'aminoacylation de la SRS est augmentée en condition physiologique de croissance comme à température et concentration saline élevées (Godinic-Mikulcic et al., 2011).

Récemment, un MSC composé de la GRS, YRS, PRS, LRS, CRS et de la MRS a été découvert chez *Thermococcus kodakarensis* (Raina et al., 2012). Ce complexe est retrouvé dans la cellule en interaction directe avec certaines protéines de la sous-unité 30S du ribosome ainsi qu'avec les facteurs d'élongation de la traduction EF1A et EF2 et les facteurs d'initiation IF2 et 2B (Figure 13B-4). L'activité d'aminoacylation de la LRS est augmentée en présence de la PRS, de l'YRS ou d'EF1A-GTP. Les 6 aaRSs s'associent en complexe et ce en dépit de l'absence d'identification d'une protéine d'assemblage, ce qui pourrait suggérer que comme chez *M.thermautotrophicus* les aaRSs interagissent les uns avec les autres. La purification de ce MSC avec les composants de l'appareil de traduction de la cellule laisse supposer que les ARNts sont aminoacylés à proximité du ribosome pour être directement incorporés au cours de la traduction, renforçant l'hypothèse de l'importance des MSC dans le channeling des ARNts pendant la traduction.

1.4.2.2 Chez les euglènozoaires et les apicomplexes

Une équipe de Grenoble (France) a isolé le complexe multisynthétasique de l'apicomplexe *Toxoplasma gondii* (van Rooyen et al., 2014b). Formé autour de la protéine d'assemblage Tg-p43 (*Toxoplasma gondii* p43), ce complexe de 1 MDa contient la MRS, l'ERS, la QRS et l'YRS (Figure 13B-5). L'association des synthétases dans le complexe se fait *via* le domaine N-terminal GST de Tg-p43, qui partage un certain nombre d'homologies avec la protéine d'assemblage du complexe multisynthétasique humain p43 (domaine EMPAPII et liaison aux ARNts) ainsi qu'avec la protéine de levure Arc1p (domaine GST). Curieusement, la délétion du gène codant Tg-p43 est viable, et le parasite conserve la même pathogénicité qu'une souche sauvage. Aucune information concernant l'activité catalytique des synthétases n'est donnée laissant ouverte la question du rôle de ce complexe chez *T.gondii*.

Une étude publiée fin 2013 menée chez *Trypanosoma brucei* a démontré l'existence d'un MSC d'environ 1,2 MDa impliquant au moins six synthétases (PRS, MRS, QRS, ARS, DRS et WRS) et trois protéines d'assemblages MCP1-2-3 (MARS Complex-associated Proteins) (Cestari et al., 2013). L'association des synthétases dans le complexe augmente leurs activités catalytiques et la présence du complexe participe au « fitness » du parasite. La protéine MCP1, homologue du facteur d'assemblage Arc1p du MSC chez la levure, possède un domaine GST ainsi qu'un domaine de liaison aux ARNts. MCP2 est composée d'un domaine de liaison aux ARNts et est un homologue du facteur bactérien Trbp111. MCP3 est un homologue de la protéine d'édition YbaK. La présence de l'ERS, l'IRS, la GRS et la CRS dans le MSC n'a pas pu être confirmé par des expériences de purification d'affinité suivies d'identification par spectrométrie de masse, malgré leurs propensions à migrer à une masse similaire au MSC en gel natif (Figure 13B-6).

1.4.2.3 Chez la levure

Le plus petit complexe multisynthétasique retrouvé chez les eucaryotes est constitué de la MRS, de l'ERS et de la protéine d'assemblage Arc1p. Ce complexe identifié en 1996 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Simos et al., 1996a) aussi appelé AME (Arc1p-MRS-ERS), est un des complexes les plus étudiés. Historiquement, Arc1p a été identifié comme une protéine se liant aux quadruplex d'acide nucléique et nommée G4plp (Frantz and Gilbert, 1995), puis comme facteur d'export de l'ARNt (Grosshans et al., 2000; Simos et al., 1996a).

Le domaine N-terminal d'Arc1p est un domaine d'interactions protéines-protéines de type GST, et lui permet d'interagir avec la MRS et l'ERS *via* leur domaine N-terminal de type GST (Simader et al., 2006). Le domaine central riche en lysine et en alanine est un domaine d'interaction non spécifique aux ARNs (Figure 13B-7). Enfin le domaine C-terminal adopte une conformation de type OB-fold, similaire aux domaines EMAPII humain ou Trbp111 des bactéries, et permet d'interagir spécifiquement avec les ARNts. Arc1p peut lier, en plus des ARNt^{E et M}, les ARNt^{F,K,R,S,P et A} (Deinert et al., 2001). En revanche ces liaisons sont restreintes aux ARNt^{E et M} qu'il peut lier simultanément lorsqu'il est en complexe avec l'ERS et la MRS (Koehler et al., 2013). Il semblerait donc que les domaines d'interaction aux ARNts d'Arc1p agissent de concert avec le domaine de liaison à l'anticodon de chacune des synthétases.

L'association en complexe augmente de près de 100 fois l'efficacité d'aminoacylation de la MRS (Simos et al., 1996a), et d'environ 10 fois celle de l'ERS tout en augmentant l'affinité du complexe Arc1p•ERS pour l'ARNt^E (Graindorge et al., 2005). Pour se faire, Simos et collègues proposent qu'Arc1p agisse comme un pont moléculaire en stabilisant et en délivrant les ARNts dans une conformation spécifique pour faciliter la reconnaissance par les synthétases (Simos et al., 1998). Les aa spécifiques d'Arc1p lui permettant de se lier à la MRS et à l'ERS ont été cartographiés nous donnant une vision plus claire de l'association de ces trois composants (Simader et al., 2006). La

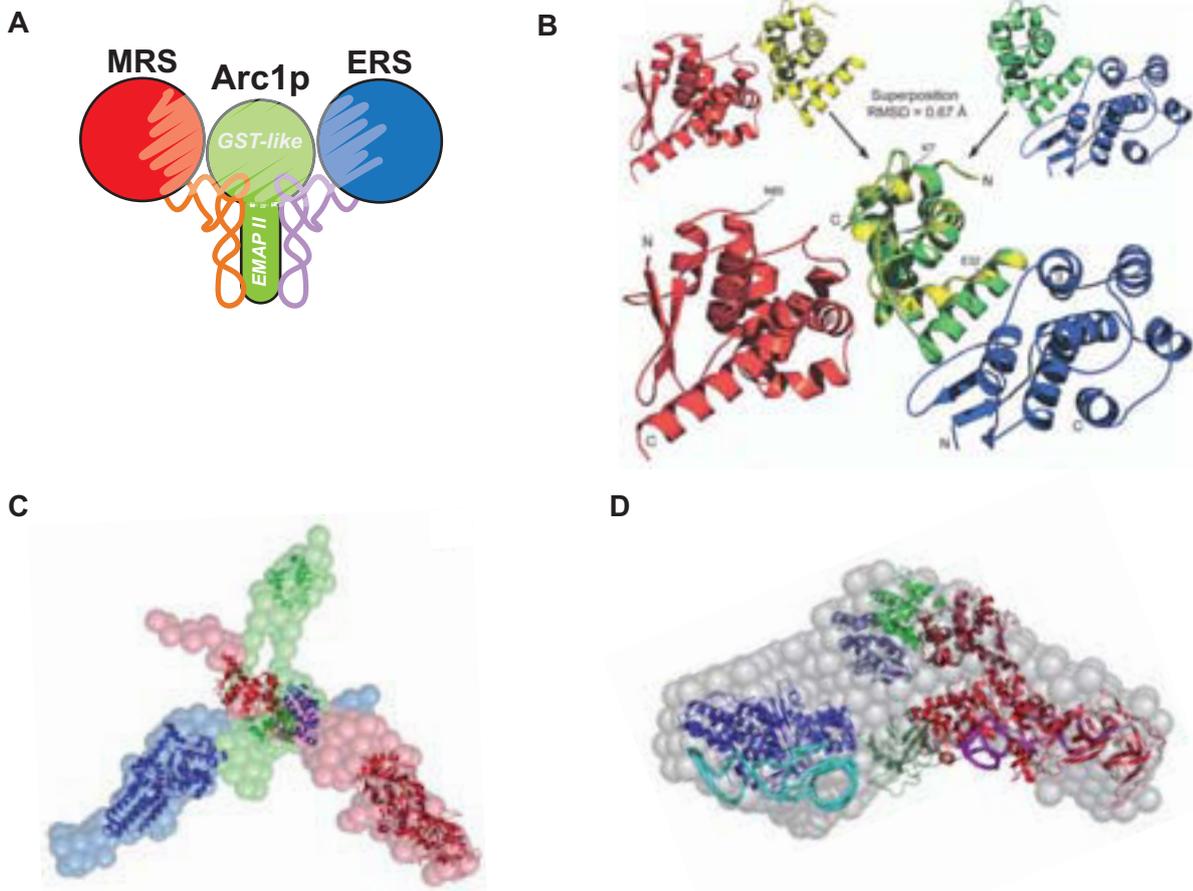


Figure 14 : Le complexe multisynthétasique AME de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

(A) Représentation schématique du complexe trimérique (Arc1p, ERS et MRS) complexés à ses ARNs homologues. (B) Structure cristallographique des domaines N-terminaux de l'ERS (en bleu) et la MRS (en rouge) en association avec le domaine N-terminal d'Arc1p (en vert) (Simader et al., 2006). Le même code couleur est utilisé pour les figures C et D. Enveloppe SAXS et modèle du complexe tétramérique Arc1p-MRS-ERS en forme de Y (Koehler et al., 2013) (C) et du trimère complexé à ses ARNs substrat (D) (Koehler et al., 2013).

structure cristallographique des domaines N-terminaux de l'hétérotrimère (Simader et al., 2006), de même que l'enveloppe obtenue par small-angle x-ray scattering (SAXS) du trimère AME avec et sans les ARNts (Koehler et al., 2013) ont été résolues. Le complexe ternaire Arc1p•MRS•ERS a une stoechiométrie de 1:1:1 et adopte une structure allongée en forme de Y (Figure 14A-C), puis après liaison des ARNts, le complexe pentamérique adopte une conformation plus compacte en forme de cloche (Figure 14D).

La délétion du gène codant Arc1p n'est pas létale pour la cellule et ne provoque qu'une faible diminution du taux de croissance à 25 et 37°C de la souche délétée sur milieux riche, ce qui semble montrer qu'Arc1p n'est qu'un cofacteur pour les deux synthétases. Nous verrons plus tard dans la Partie V que la délétion d'*ARCI* peut être létale en présence de certains métaux, bien qu'au moment de la rédaction de ce manuscrit, ce phénomène n'est pas encore bien compris. Néanmoins cette information est d'ores et déjà intéressante puisqu'elle signifie qu'Arc1p peut être impliqué dans d'autres voies de régulation en dehors du complexe AME. Par exemple, Arc1p peut être biotinylé par la protéine biotine ligase 1 (Bpl1p) sur la Lys86 du domaine N-terminal (Kim et al., 2004). Cette modification n'apporte aucun gain ou perte de fonction pour Arc1p, en revanche au cours d'expérience de purification d'Arc1p ce dernier n'est plus retrouvé en interaction avec la MRS ou l'ERS. Dans un autre registre, Arc1p peut également s'associer à des structures secondaires formées par quatre guanines dans l'ADN (G-quadruplex) (Frantz and Gilbert, 1995). La liaison d'Arc1p avec ces structures, impliquées dans la maintenance des télomères, la régulation de la transcription ou encore de la biogénèse des ARN ribosomiques, n'est pas bien comprise. Pour finir, Arc1p peut également se lier aux phospholipides, généralement considérés comme des molécules de signal ou comme modulateurs d'activités pour diverse protéines membranaires (Fernández-Murray and McMaster, 2006). (*De nombreux processus cellulaires font appel aux phospholipides et la Partie V de mon manuscrit traite de l'un d'eux.*)

En dépit de toutes les études effectuées sur le complexe AME de *S. cerevisiae* au cours des deux dernières décennies, aucun rôle additionnel n'a été mis en évidence pour ses composants. Cela provient vraisemblablement du fait que les deux aaRSs sont toujours purifiées en complexe avec Arc1p, suggérant donc qu'*a contrario* des autres MSC, le complexe AME n'est pas dynamique. Nous avons entrepris de vérifier cette hypothèse et d'analyser de manière plus approfondie le mode de régulation d'Arc1p ainsi que la dynamique du complexe AME au cours de ma thèse et mes résultats sont exposés dans la Partie II et III de ce manuscrit. Pour une lecture plus complète des fonctions d'Arc1p au sein du complexe et de ses autres implications dans la cellule, vous pouvez vous référer à (Frechin et al., 2010; Karanasios and Simos, 2010) ainsi que dans l'Article I de ce manuscrit.

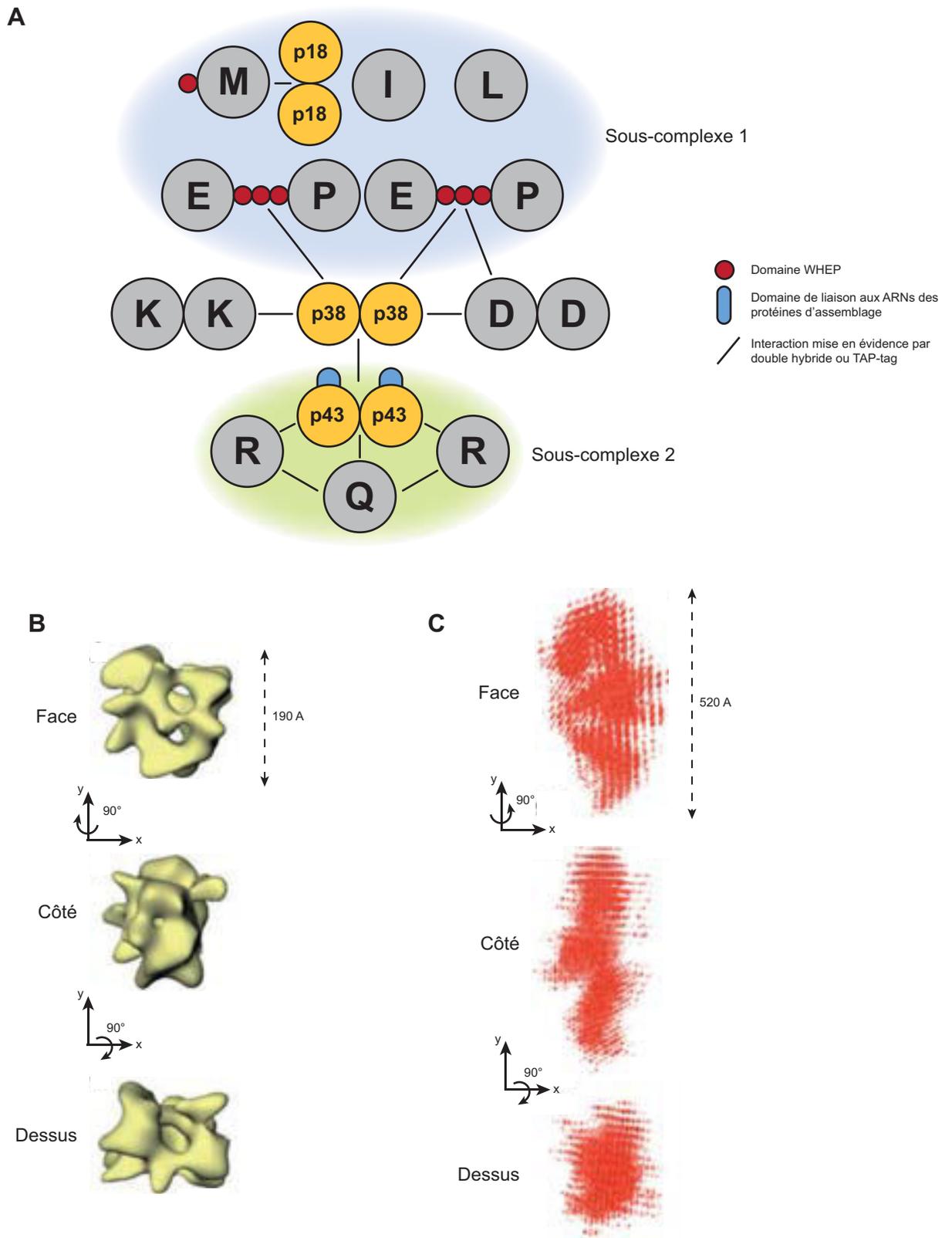


Figure 15 : Composition et structure(s) du MSC chez les mammifères.

(A) Composition et stoechiométrie du complexe tel qu'identifiée dans des cellules HeLa (Kaminska et al., 2009). Les sous complexes I et II sont retrouvés en l'absence de p38. (B) Structure tridimensionnelle déterminée par cryo-EM (B; Wolfe et al., 2005). (C) Enveloppe SAXS obtenue à partir de MSC purifiés de foie de lapin (Dias et al., 2013).

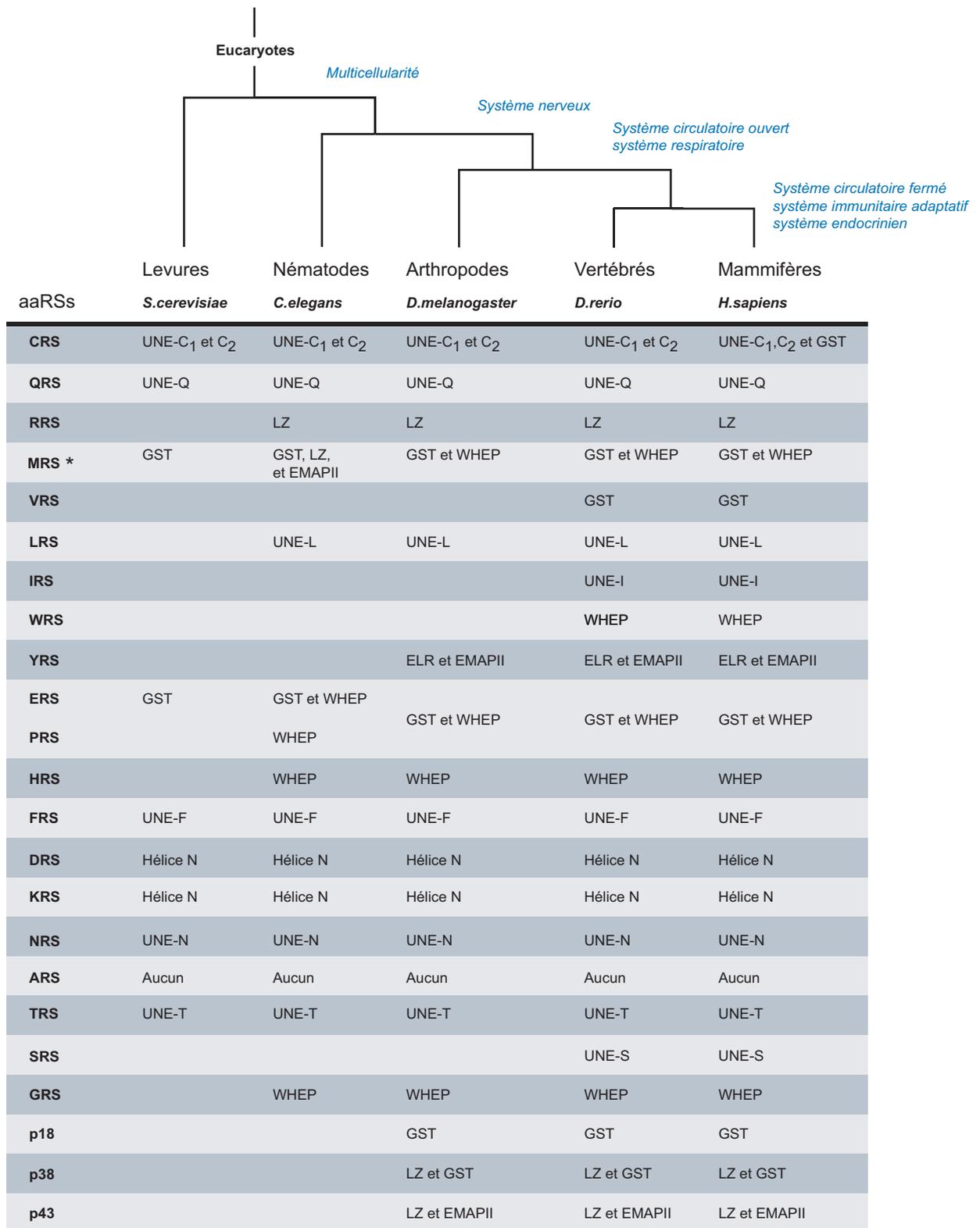
1.4.2.4 Chez les nématodes

Le vers *Caenorhabditis elegans* possède également un complexe d'environ 1 MDa (Figure 13B-8). Il est composé de la MRS, LRS, IRS, ERS, VRS, QRS, RRS, et KRS ainsi que de la protéine d'assemblage mrsp-38 (**MARS Scaffold Protein 38**) (Havrylenko et al., 2011). *A contrario* des complexes de mammifères, la protéine d'assemblage p18 ainsi que la DRS et la PRS sont absentes, mais la VRS, absente des complexes de mammifères fait partie intégrante du complexe de *C.elegans*. Autre particularité observée, la MRS est fusionnée à un domaine similaire à la protéine p43 du complexe mammifères (Havrylenko et al., 2010), jouant ainsi le rôle d'homologue de p43 pour l'association de la RRS et la QRS et d'homologue de p18 pour sa propre incorporation au complexe. En plus des composants classiques (*e.g.* protéine(s) d'assemblage(s) et aaRSs), une protéine chaperonne HSP90 (*daf-21*) et le facteur d'élongation EF1A sont co-purifiés le MSC de *C.elegans*, bien que le rôle de ces interactions ne soit pas tout à fait élucidé. Ils pourraient soit être des composants *per se* ou alors participer à l'assemblage du complexe et au channeling des aminoacyl-ARNts vers le ribosome.

1.4.2.5 Chez les mammifères et insectes

Le complexe multisynthétasique métazoaire isolé de différents organismes (drosophile, foie de lapin, foie de rat, souris, humain...) est d'une masse d'environ 1,5MDa et est toujours formé des mêmes composants : neuf synthétases RRS, QRS, ERS, PRS, DRS, IRS, MRS, LRS et KRS et trois protéines d'assemblages p43, p38, p18 (AIMP1-2-3 : **Aminoacyl tRNA synthetase complex-Interacting Multifunctional Protein**) (Bandyopadhyay and Deutscher, 1971; Kerjan et al., 1994; Lee et al., 2004). L'ensemble est structuré sous la forme de deux sous-complexes, le premier composé de l'ERS, PRS, LRS, MRS et IRS organisé autour de p18, et le second composé de la RRS et de la QRS organisé autour de p43 (Figure 13B-9, 15A). La KRS et la DRS sont directement associées à p38 (Kaminska et al., 2009a). Des expériences de purification d'affinité ont permis de déterminer la stœchiométrie du complexe à partir de foie de lapin (Dias et al., 2013). Il est composé de deux exemplaires de l'EPRS (qui est une protéine de fusion issue d'un seul gène chez les mammifères), de la KRS, de la DRS, de p43 et de p38, et d'un exemplaire de l'IRS, de la MRS, QRS, RRS, de la LRS et un de p18. La protéine p43 possède un domaine de type EMAPII permettant d'interagir avec des ARNts et des protéines. La protéine p38 est composée d'un domaine Leucine-zipper et d'un domaine GST ; et p18 est elle aussi composée d'un domaine GST.

Dans le but d'établir la structure tridimensionnelle du complexe multisynthétasique, des analyses par microscopie électronique et reconstruction 3D ainsi que par SAXS ont été réalisées et ont donné des résultats divergents (Figure 15B, C). Les expériences de microscopie électronique ont révélé un complexe asymétrique compact à trois domaines en forme de Y avec un sillon central profond (Norcum and Boisset, 2002; Trempe Norcum, 1999). Les expériences de SAXS quant à elles ont révélé un complexe très étendu avec des protubérances distribuées le long du complexe



GST : Glutathion S-transférase ; LZ : Leucine Zipper ; WHEP : domaine WRS-HRS-EPRS ; EMAPII : Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide II ; ELR : Domaine Glu-Leu-Arg ; UNE : Domaine Unique Non familier ; Hélice-N: domaine N-terminal en hélice ; Pour les synthétases, le code à une lettre a été utilisé. * : la MRS est la seule synthétase n'ayant pas retenu ses domaines.

Figure 16: Domaines et motifs acquis par les aminoacyl-ARNt synthétases au cours de l'évolution chez les eucaryotes

(Dias et al., 2013). Cette dernière est en adéquation avec l'idée d'un complexe dynamique où les synthétases peuvent se dissocier du complexe, et où d'autres facteurs pourraient interagir avec le complexe.

Il est intéressant de noter que l'absence de p18, p38 ou p43 n'est pas létale pour la cellule mais diminue le taux de croissance de près de 30%. Le seul effet notable sur le complexe est observé en l'absence de p38 : le sous-complexe 1 et 2 se dissocie et la DRS et la KRS sont exclues de ces deux sous-complexes. L'équipe du Dr. Mirande a également montré que le complexe multisynthétasique isolé à partir de cellules HeLa interagit avec l'actine et des protéines ribosomales, co-sédimente avec les polysomes et le complexe VEGA (VRS-EF1A et le facteur d'échange de guanine EF1B α - β - γ) (Kaminska et al., 2009b). Cela suggère que l'organisation du MSC se fait au niveau des filaments d'actine et que le complexe ne diffuse pas librement dans la cellule. Le fait qu'il soit lié aux polysomes est cohérent avec la théorie du channeling de l'ARNt.

I.4.3 Domaines et motifs spécifiques

En plus des domaines de liaison aux ARNts et des domaines de corrections, les synthétases ont acquis 5 domaines d'interactions protéine-protéine ainsi que de nombreux motifs uniques spécifiques des synthétases (Figure 16). Les 5 domaines correspondent à des séquences ou modules similaires à ceux retrouvés dans d'autres protéines et favorisant les interactions entre protéines. On retrouve ainsi les leucine-zipper (**LZ**), le domaine de la glutathion S-transférase (**GST**), le domaine WHEP (domaine nommé ainsi car initialement retrouvé dans la **WRS**, **HRS** et l'**EPRS**), le domaine amino-terminal en hélice (N-helix) et le domaine EMAPII (**E**ndothelial **M**onocyte-**A**ctivating **P**olypeptide **I**I). Chacun des 8 motifs est spécifique d'une seule synthétase, et ne partage aucune similarité avec un quelconque autre domaine protéique. Ces domaines sont nommés UNE-X (**U**Nique **E**lement) où X désigne une synthétase par le code à une lettre des acides aminés. Par exemple UNE-T est associé à la thréonyl-ARNt synthétase ou TRS (Guo et al., 2010a; Guo et al., 2010b).

I.4.3.1 Rôles additionnels des composants

Ces motifs uniques et domaines d'interactions ont été acquis par chacune des vingt aaRSs indépendamment au fil de l'évolution, et confèrent aux aaRSs la capacité d'accomplir un certain nombre de fonctions additionnelles en dehors de la traduction. Le fait que bon nombre de ces domaines soient uniques laisse supposer que chaque aaRS possède une fonction additionnelle spécifique (Guo et al., 2010b). Les synthétases accomplissent généralement leurs fonctions additionnelles en complexe avec une ou plusieurs protéines accessoires (Hausmann and Ibba, 2008a) et sont détaillées dans ce chapitre. Certaines fonctions sont également citées dans notre Article 2 intitulé « *Idiosyncrasies in decoding mitochondrial genome* » et sont répertoriées dans la figure 17.

I.4.3.1.1 Chez les bactéries

Chez *Deinococcus radiodurans*, au cours de la réponse aux dommages causés par des radiations, la WRS II est exprimée et s'associe à l'oxyde nitrique synthase (NOS). Cette association permet la nitration du Trp et la formation de 4-nitro-Trp (Buddha et al., 2004a; Buddha et al., 2004b). Chez *E.coli*, lorsque la concentration en alanine augmente dans le milieu, l'ARS réprime la transcription de son propre gène en se liant à une séquence spécifique près du codon d'initiation (ATG) du gène (Putney and Schimmel, 1981). De même, chez *E. coli*, la TRS peut empêcher la traduction de son propre messenger en liant la séquence 5'-non traduite qui adopte une conformation mimant l'ARNt^T. Cette liaison provoque un encombrement stérique empêchant la sous-unité 30S du ribosome de se lier à la séquence Shine-Dalgarno située à proximité (Moine et al., 1990; Romby and Springer, 2003; Springer et al., 1985).

I.4.3.1.2 Chez les levures

Les introns de groupe 1 sont des ARNs non-codant capables de s'auto-cliver. Chez *Neurospora crassa* et *Podospira anserina*, l'épissage des introns de groupe 1 de certains ARN messenger est assisté, dans les mitochondries, par l'YRS mitochondriale (Kämper et al., 1992). Chez *S.cerevisiae* et *S.douglasii*, la LRS mitochondriale via son domaine de correction CP1 est impliquée dans l'épissage des ARN messagers en association avec la maturase bI4 (Herbert et al., 1988; Rho et al., 2002). Chez *S.cerevisiae*, en conditions de hautes températures, l'ARNt₁^K (CUU) est importé dans les mitochondries en association avec l'énoylase Eno2p et la KRS mitochondriale non maturée (pre-MSK) afin de participer à la traduction mitochondriale (Gowher et al., 2013; Kamenski et al., 2007; Kamenski et al., 2010). Il a également été montré que la GRS favorise l'étape de terminaison au cours de la transcription de certains gènes possédant une structure 3' en forme d'ARNt (Johanson et al., 2003; Magrath and Hyman, 1999). Toujours chez *S.cerevisiae*, la SRS interagit avec une protéine impliquée dans la synthèse des péroxisomes (Pex21p) (Godinic et al., 2007; Rocak et al., 2002). En dehors du fait que cette association augmente la liaison entre l'ARNt^{Ser} et la SRS et l'activité d'aminocyclation, il semblerait que le complexe SRS-Pex21p contribue à coordonner certaines voies de signalisation du stress (Godinic et al., 2007). L'YRS de *S.cerevisiae* est également impliquée dans un complexe avec Knr4p, et favorise la formation de la dityrosine au cours de la synthèse de la paroi cellulaire (Briza et al., 1986; Coluccio et al., 2004; Dagkessamanskaia et al., 2001). La LRS contrôle le complexe EGO via TORC1 en fonction de la concentration intracellulaire en leucine (Bonfils et al., 2012). Les recherches du Dr. Tao Pan ont permis d'identifier un rôle tout à fait singulier pour la MRS (Wiltrout et al., 2012). En réponse à un stress oxydatif, la MRS aminoacyle un grand nombre d'ARNts hétérologues avec de la méthionine, qui sont ensuite utilisés pendant la phase d'élongation de la traduction et incorporés dans les polypeptides en cours de synthèse. La substitution de résidus non-méthionine par des méthionines dans les protéines est utilisée ici comme un moyen de « défense » contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Bien que la MRS soit complexée à Arc1p chez

S.cerevisiae, cette interaction n'est pas nécessaire pour l'activité de mésacylation (Wiltrout et al., 2012). Ce mécanisme est conservé chez les bactéries et chez les mammifères où il est notamment activé au cours de la réponse immunitaire (Jones et al., 2011; Netzer et al., 2009).

I.4.3.1.3 Chez les mammifères

Qu'elles fassent partie du MSC ou qu'elles soient constitutivement libres dans le cytoplasme, presque toutes les aaRSs et les trois AIMP participent à une myriade de voies de signalisations en dehors de l'aminacylation. Seules quatre aaRSs (la CRS, la FRS, l'IRS et la RRS) n'ont pas encore de fonctions additionnelles associées. En revanche, l'EPRS, la KRS, la QRS, la DRS, la MRS, la LRS et les trois AIMP appartenant toutes au MSC, exercent des rôles additionnels. Ces nouvelles fonctions sont exercées lorsque les aaRSs sont relâchées du complexe suite à des modifications post-traductionnelles et peuvent être exécutées dans le cytoplasme, dans le noyau ou encore dans le milieu extracellulaire après sécrétion (pour revues (Brown et al., 2010; Guo and Schimmel, 2012; Guo et al., 2010b; Hausmann and Ibba, 2008a; Pang et al., 2014; Park et al., 2010; Park et al., 2005b; Park et al., 2008; Smirnova et al., 2012)). Elles sont aussi diverses que l'utilisation de la LRS en tant que senseur d'acides aminés *via* le complexe mTORC1 (Han et al., 2012), le rôle angiogénique de l'YRS (Cheng et al., 2008; Greenberg et al., 2008; Wakasugi et al., 2002a) et angiostatiques de la WRS (Kise et al., 2004; Otani et al., 2002; Wakasugi et al., 2002b) ou encore la régulation de la réponse immunitaire par la KRS et la production d'Ap₄A (Yannay-Cohen et al., 2009). La KRS mitochondriale est impliquée dans l'assemblage et l'empaquetage de l'ARN_t^K nécessaire à la réplication du virus VIH-1 (Kobbi et al., 2011). La GRS humaine, *via* son domaine de liaison à l'anticodon, active l'initiation de la traduction de messagers du poliovirus en se liant à une IRES. Toutes les fonctions identifiées à ce jour sont résumées dans la figure 17, me permettant de focaliser ce paragraphe sur les fonctions non canoniques de la MRS, de l'EPRS et des protéines d'assemblage qui sont les éléments communs au complexe de levure, qui est au centre de mon sujet de thèse.

La MRS est composée d'un domaine catalytique semblable à celui de ses homologues bactérien et levure. Elle possède également un domaine N-terminal impliqué dans les interactions protéine-protéine de type GST (Rho et al., 1999) similaire au domaine d'interaction de la MRS avec Arc1p chez la levure. En C-terminal, la MRS contient un domaine WHEP important pour des interactions entre protéines et avec des acides nucléiques, ainsi que deux signaux d'adressage nucléaire ⁸⁹⁷KKKK⁹⁰⁰ et ⁷²⁴PWKRIKG⁷³⁰ (Ko et al., 2000; Rho et al., 1998; Rho et al., 1996). C'est la protéine d'assemblage p18 qui permet l'ancrage de la MRS dans le MSC dans le sous-complexe 1 (Kaminska et al., 2009a). En réponse à divers signaux de croissance, la MRS est importée dans le nucléole où elle participe à la synthèse des ARN ribosomiques (Ko et al., 2000). Une autre étude a montré qu'en réponse à un stress UV, la MRS est phosphorylée par GCN2 ce qui entraîne son inactivation et donc un arrêt de la traduction. Ce mécanisme permet ainsi à la cellule de réparer les dommages causés à l'ADN *via* p18 et p53 (Kwon et al., 2011).

Organisme	aaRSs	Partenaire(s)	Fonction non canonique	Référence
Bactérie				
<i>D.radiodurans</i>	TRS II	Oxyde nitrique synthase (NOS)	Nitration du Trp et formation de 4-nitro-Trp	Bouddha et coll., 2004a-b
<i>E.coli</i>	ARS	ADN génomique	Répression transcriptionnelle	Putney et coll., 1981
	TRS	ARN messenger	Répression traductionnelle	Springer et coll., 1985 Moine et coll., 1990
<hr/>				
Levure				
<i>N.crassa</i> <i>P.anserina</i>	YRS	ARN messenger	Epissage alternatif des introns de groupe I	Kämper et coll., 1992
<i>S.cerevisiae</i>	LRS (CP1)	ARN messenger maturase bl4	Epissage alternatif des introns de groupe I	Herbert et coll., 1988 Rho et coll., 2002
	pré-mKRS	Eno2, ARNt ₁ ^K	Import mitochondrial de l'ARNt ₁ ^K	Tarassov et Entelis., 1992 Entelis et coll., 2006 Koleniskova et coll., 2010
	GRS	ADN génomique	Terminaison de la transcription	Magrath et coll., 1999 Johanson et coll., 2003
	SRS	Pex21p	Augmente la liaison de la SRS avec l'ARNt ^S et la capacité d'aminocyclation	Godinic et coll., 2007
	YRS	Knr4p	Formation de dityrosine et biosynthèse de la paroi cellulaire	Briza et coll., 1986 Dagkessamanskaia et coll., 2001 Coluccio et coll., 2004
	LRS	TORC1	Régulation des acides aminés via le complexe EGO	Bonfils et coll., 2012
	ERS	GatFAB	Contrôle de la traduction mitochondriale via formation du Q-ARNt ^Q	Fréchin et coll., 2009 Enkler et coll., Unpublished
	MRS	Rpb1, Rpb7	Régulation de la transcription des gènes du complexe III et V de la chaîne respiratoire	Enkler et coll., Unpublished
		Arc1p	Mésacylation des ARNt en réponse à un stress	Wiltrot et coll., 2012
<hr/>				
Mammifère				
<i>H.sapiens</i>	VRS	EF1 _α , EF1B _{α,β,γ}	?	Motorin et coll., 1988 Venema et coll., 1991 Bec et coll., 1994 Negrutskii et coll., 1999
	DRS	EF1 _α	?	Reed et coll., 1994 Reed et Yang., 1994
	KRS, DRS	p38, EF1 _α	?	Guzzo et Yang., 2003
	EPRS	NSAP1, GAPDH, L13a	Inhibition de la traduction de protéines pro-inflammatoires	Sampath et coll., 2004 Ray et coll., 2007
	mKRS	Gag VIH-1	Assemblage du virus et empaquetage de l'ARNt ₃ ^K	Kaminska et coll., 2007 Kobi et coll., 2011
	KRS	MITF, HINT, 67LR (laminin receptor)	Régulation de l'inflammation et de la transcription, cell migration	Park et coll., 2005 Lee et coll., 2004 Lee et Razin., 2005 Yannay-cohen et coll., 2009 Kim et coll., 2012
	MRS	ARNr 5S	Synthèse des ARN ribosomiques	Ko et coll., 2000
	YRS	Récepteurs membranaires	Rôle angiogénique	Wakasugi et coll., 2002 Cheng et coll., 2008 Greenberg et coll., 2008
	WRS	Cadhérine VE	Rôle angiostatique	Wakasugi et coll., 2008 Otani et coll., 2002 Kise et coll., 2004

Organisme	Synthétase	Partenaire(s)	Fonction non canonique	Référence
	QRS	ASK1	Rôle anti-apoptotique	Ko et coll., 2001
	HRS	Récepteurs chémokines	Auto-antigène au cours d'inflammations chroniques	Howard et coll., 2002
	LRS	RagD (mTORC1)	Homéostasie des acides aminés	Han et coll., 2012
	SRS	Récepteurs chémokines	Rôle angiogénique (par chémotraction)	Fukui et coll., 2009 Herzog et coll., 2009
	NRS	Récepteurs chémokines, PI3K/Akt	Auto-antigène, rôle anti-apoptotique	Howard et coll., 2002 Park et coll., 2009
<i>D. rerio</i>	SRS	?	Développement cardiovasculaire	Herzog et coll., 2009 Fuki et coll., 2009
Protéines d'assemblages				
Mammifère				
	p18	ATM/ATR	Suppresseur de tumeurs	Park et coll., 2005
	p38	p53, Parkin, TRAF2	Différenciation des cellules pulmonaires, facteur pro-apoptotique, rôle anti-tumoral	Kim et coll., 2003 Ko et coll., 2005 Han et coll., 2008 Choi et coll., 2009
	p43	Récepteurs, GP96, ?	Activation de la réponse pro-inflammatoire, maturation et activation des cellules dendritiques, régénération des tissus dermiques	Park et coll., 2002 Kim et coll., 2008 Brown et coll., 2010 Guo and Schimmel., 2013
<i>S. cerevisiae</i>	Arc1p	Pi3P	?	Fernández-Murray et coll., 2006

Figure 17: Tableau des fonctions non canoniques des aaRSs chez les bactéries, levures et mammifères.

? : Aucun rôle n'a pu être identifié pour ces complexes. En ce qui concerne la VRS, DRS et KRS chez les mammifères, bien qu'aucun rôle n'ait été identifié, l'interaction avec les différents facteurs détaillés ici augmente l'activité catalytique des synthétases.

L'EPRS est également une enzyme du MSC, présente sous la forme d'une protéine de fusion où l'ERS et la PRS sont reliées par une répétition successive de trois domaines WHEP (R1-R2-R3) de 50 aa chacun (Cerini et al., 1991). En plus des domaines catalytiques de l'ERS et de la PRS, l'ERS possède un domaine de type GST. Bien que les origines de la fusion des deux aaRSs soient encore un mystère, les domaines WHEP sont impliqués dans des interactions protéine-ADN, protéine-ARN et protéine-protéine et ont une structure en hélice-coude-hélice (Cahuzac et al., 2000; Rho et al., 1998). La stimulation des monocytes humains par les interférons- γ provoque le détachement de l'EPRS du MSC après activation de la voie ERK2 et phosphorylation des sérines 886 et 999 dans les domaines WHEP respectivement par la cycline Cdk5 et la kinase AGC (Arif et al., 2011; Arif et al., 2009). Une fois libre, elle interagit avec NSAP1, L13a et la GAPDH pour former le complexe GAIT (γ -interferon Activated Inhibitor of Translation) (Sampath et al., 2004). Ce complexe GAIT reconnaît des structures en tige-boucle appelées « éléments GAIT » dans les régions 3'UTR des ARNms impliqués dans la réponse inflammatoire pour bloquer leur traduction (Mukhopadhyay et al., 2009). Ces 3'UTR sont notamment retrouvés dans les messagers de la céruloplasmine, de VEGF-A ou des DAP kinases. Il a récemment été suggéré que l'EPRS puisse jouer un rôle dans le métabolisme des lipides en réponse à différentes phosphorylations des domaines WHEP distinctes de celles impliquant l'EPRS dans la réponse GAIT (P. Fox communication congrès *AaRS Hakoné 2013*).

P18 (AIMP3) est une des protéines d'assemblage du MSC. Elle est considérée comme l'homologue fonctionnel d'Arc1p chez la levure puisqu'elle joue le jeu d'ancre cytosolique de la MRS dans le sous-complexe 1 *via* son domaine GST. P18 est également importée dans le noyau en réponse à un stress UV ou en réponse à des dommages causés à l'ADN (Kwon et al., 2011; Park et al., 2005a). Suite à l'irradiation UV, Gcn2 réduit l'activité catalytique de la MRS par phosphorylation au niveau de la S266, opérant un changement de conformation qui libère p18 du MSC (Kwon et al., 2011). Dans le noyau, p18 active les kinases ATM/ATR pour surexprimer p53 (Park et al., 2005a) et joue ainsi le rôle de suppresseur de tumeur.

P38 (AIMP2) est la protéine d'assemblage qui se situe au cœur du MSC et interagit notamment avec l'EPRS. Elle possède un domaine LZ ainsi qu'une N-helix en N-terminal, et un domaine GST en C-terminal. En réponse au facteur de croissance TGF- β , p38 contrôle la différenciation des cellules pulmonaires (Kim et al., 2003), et joue également un rôle crucial dans la prolifération et la mort cellulaire au cours de la réponse aux dommages causés à l'ADN, en tant que facteur pro-apoptotique *via* p53 (Han et al., 2008). Etant un substrat de l'E3 ubiquitine ligase Parkin (Ko 2005), p38 agit comme un facteur anti-tumoral en régulant l'ubiquitination du récepteur TRAF2, impliqué dans la mort induite par le facteur TNF- α (Choi et al., 2009).

La protéine p43 (AIMP1) est l'homologue de séquence d'Arc1p puisqu'elle possède un domaine de type EMAP2 en C-terminal permettant d'interagir avec de l'ARN et des protéines ainsi qu'un domaine LZ et N-helix. P43 peut être sécrétée des cellules endothéliales et immunitaires et jouer

le rôle de cytokine au cours de l'inflammation. Ainsi p43 active la réponse pro-inflammatoire et la sécrétion de TNF- α chez les monocytes et macrophages (Park et al., 2002). Elle est également impliquée dans la maturation et l'activation des cellules dendritiques au cours de la réponse immunitaire assistée par les lymphocytes Th1 (Kim et al., 2008). Il existe d'autres exemples impliquant p43 dans divers processus physiologique suggérant que p43 est un élément majeur dans la régénération des tissus dermiques (Guo and Schimmel, 2013).

I.4.4 Variants, physiocrines et régulation homéostatique

Un nombre croissant d'études font état d'un nouveau type de molécules impliquées dans la régulation de certains processus cellulaires. Ces molécules correspondent à des fragments naturels de synthétases, obtenues par protéolyse ou par épissage alternatif (Guo and Schimmel, 2013). Ainsi la protéine p43 et l'YRS sont clivées par des protéases cellulaires et ces nouveaux peptides sont impliqués dans des fonctions autres que la traduction.

Certains autres variants sont obtenu par épissage alternatif donnant naissance à une nouvelle protéine, c'est le cas de l'HRS et de son variant l'HisRSCD, de la WRS et de la WRS^{Act}, de p38 et de DX2 ou encore l'EPRS et de son variant l'EPRS^{N1}. On parle de physiocrines lorsque ces variants sont sécrétés en dehors de la cellule et agissent comme des cytokines. Ces variants naturels sont exprimés pour réguler l'activité non canonique de leurs protéines d'origine, on parle alors de régulation homéostatique. Par exemple DX2 joue le rôle de facteur anti-apoptotique en étant un compétiteur de p38 pour la liaison à p53 (Choi et al., 2011; Choi et al., 2012). L'EPRS^{N1} est un variant exprimé pour contrebalancer l'inhibition de la traduction du messenger de VEGF-A réalisée par le complexe GAIT auquel participe l'EPRS (Yao et al., 2012). J'ai moi-même entrepris d'étudier le variant EPRS^{N1}, et les résultats que j'ai obtenus sont exposés dans la Partie IV de ce manuscrit.

Pour clore cette partie sur les fonctions non canoniques des synthétases j'aimerais vous parler d'une étude récente qui a mis en évidence la présence d'ARNm d'aaRSs dans les exosomes (Wang et al., 2013). Les exosomes sont des vésicules de transport utilisées par les cellules pour communiquer entre elles et faire des échanges de matériel génétique (ARNm, microARN) (Montecalvo et al., 2012; Valadi et al., 2007). Les ARNm de 15 aaRSs (ARS, RRS, NRS, DRS, CRS, QRS, EPRS, GRS, HRS, IRS, MRS, SRS, TRS, YRS, VRS) ont également été retrouvés dans ces vésicules ainsi que le messenger d'un variant de la QRS (privé de son domaine de liaison à l'anticodon). Le plus intéressant vient de l'observation que ce messenger ait été sélectionné spécifiquement pour être empaqueté dans les exosomes. Ce nouveau type d'échanges d'aaRSs souligne encore une fois la grande diversité de régulation et des effets de ces molécules.

I.4.5 Aminoacyl-ARNt synthétases et dysfonctionnements cellulaire

L'implication des synthétases dans un des processus les plus fondamentaux de la cellule ne permet pas d'imaginer un quelconque bouleversement de leur activité qui resterait sans conséquences graves pour la cellule. C'est pourquoi un grand nombre de dysfonctionnements et maladies sont liés à des mutations dans les gènes codant les synthétases. Ces mutations (faux sens, non-sens ou silencieuses) touchent aussi bien les gènes d'aaRSs cytosoliques que mitochondriales codées par le génome nucléaire. Nous verrons à travers différents exemples qu'il est parfois difficile de comprendre l'étiologie de la maladie, les mutations pouvant avoir lieu soit dans un domaine lié à l'activité d'amination soit un domaine impliqué dans une fonction additionnelle. Le résultat de telles mutations peut mener à un gain de fonction, une perte de fonction primaire (amination) ou secondaire (fonction non canonique) ou encore une agrégation des enzymes entre elles ou avec de nouveaux partenaires (Yao and Fox, 2013). Une sélection de quatre revues permet d'avoir une vision globale et exhaustive du sujet, je vous recommande donc (Antonellis and Green, 2008; Guo and Schimmel, 2013; Park et al., 2008; Yao and Fox, 2013).

Un certain nombre de mutations touchant les aaRSs sont aussi reliées à des maladies du système nerveux. Ainsi la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est associée à des mutations du gène codant la GRS, l'ARS, l'YRS et la KRS (Antonellis and Green, 2008; Zhao et al., 2012). Des mutations au niveau du gène codant la DRS mitochondriale provoquent une leuco-encéphalopathie (Labauge et al., 2011), et celles touchants la RRS mitochondriale provoquent une hypoplasie ponto-cérébelleuse (Cassandrini et al., 2013). La sclérose latérale amyotrophique semble être connectée à une mutation de la KRS et la maladie de Parkinson semble impliquer la protéine d'assemblage AIMP2 (p38) (Ko et al., 2005).

Il existe une multitude d'exemples reliant un défaut d'expression ou d'activité d'une synthétase à une forme de cancer. Dans les cancers du côlon, la MRS est surexprimée, bien que le lien entre cette surexpression et l'augmentation de l'initiation de la traduction n'ait pas été établi. La CRS est impliquée dans les lymphomes anaplasiques, l'IRS dans les cancers colorectaux. Il semblerait également que certaines mutations dans les ARNts et la LRS mitochondriale soient impliquées dans le développement du diabète de type 2.

Les synthétases sont également la cible d'auto-antigènes, responsables de maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, les myopathies inflammatoires ou encore les inflammations des poumons. Les auto-anticorps sont souvent dirigés contre l'HRS, la TRS, L'ARS, L'IRS, la FRS, la GRS et la DRS bien qu'on ne comprenne pas tout à fait la raison pour laquelle ces aaRSs soient devenu immunogéniques. Une hypothèse propose que l'existence de similitude dans la conformation des synthétases favorise la reconnaissance d'un épitope particulier. Il semblerait également que la

plupart des synthétases identifiées dans les maladies auto-immunes soient la cible du granzyme B, une protéase qui génère un certain nombre de substrat reconnus comme auto-antigènes.

I.4.6 Discussion générale sur les complexes

En regard de la figure 13, nous pouvons noter que tous les MSCs n'ont pas la même composition au fil de l'évolution. La PRS par exemple est retrouvée chez les archées et les euglènes mais nulle part ailleurs. De même la MRS fait partie du MSC des levures et est maintenue chez tous les métazoaires. Il semble donc que la formation des complexes soit bien plus qu'une simple accréation de synthétases, mais soit plutôt le fruit d'ajout et de retrait en fonction de l'organisme et de son métabolisme. De même l'hypothèse de la formation des MSCs en fonction de la multicellularité et de l'augmentation de la complexité des organismes ne semble pas vraisemblable puisque de nombreux MSCs ont été identifié chez des organismes unicellulaires comme des archées et la levure. En revanche, chez les unicellulaires il semblerait que l'association en complexe soit une stratégie permettant d'augmenter l'efficacité d'aminacylation des aaRSs complexées, tandis que chez les multicellulaires, elle soit une stratégie permettant de restreindre les aaRSs à faire de l'aminacylation et les empêcher d'accomplir leurs fonctions additionnelles. Se pose alors la question du rôle du MSC chez la levure alors que nous avons vu que la MRS et l'ERS ont des fonctions non canoniques bien que ce soit un unicellulaire. Nous pouvons également nous demander pourquoi certaines aaRSs (SRS, ARS, GRS, HRS, TRS, YRS, WRS et NRS) ont des rôles additionnels alors qu'elles ne sont pas dans le MSC, alors que la RRS et l'IRS font partie du MSC mais ne possède encore aucune fonction non canonique identifiée à ce jour.

Une étude récente a tenté de définir la structure du MSC de *T.gondii* par cryo-EM en solution (van Rooyen et al., 2014b). Les auteurs de cet article ont néanmoins conclu que, du fait de la dynamique du complexe, une structure claire et définie ne pouvait pas être dressée. Ces observations posent une question intéressante : n'existe-t-il pas différents sous-complexes dans la cellule en fonction des besoins en traduction ou de la nécessité des composants du MSC d'accomplir leurs rôles additionnels ? Nous pourrions aussi imaginer que certains composants puissent être libres (*e.g.* pas en interaction dans le MSC) après traduction et qu'ils puissent directement être modifiés pour accomplir leurs fonctions additionnelles. Nous savons que dans certains cas précis comme au cours de la réponse aux IFN γ , l'EPRS est libérée du complexe suite à la phosphorylation de résidus dans les domaines WHEP. De même p18, p38 et p43 peuvent sortir du complexe et avoir des localisations cellulaires variées pour accomplir leurs rôles additionnels. On peut donc imaginer que le complexe est une entité extrêmement dynamique et mixte, à partir de laquelle des protéines peuvent se détacher pour accomplir une fonction additionnelle ou y être intégrées lorsqu'elles sont à sa périphérie. Il pourrait donc y avoir une hétérogénéité au sein des complexes dans la cellule.

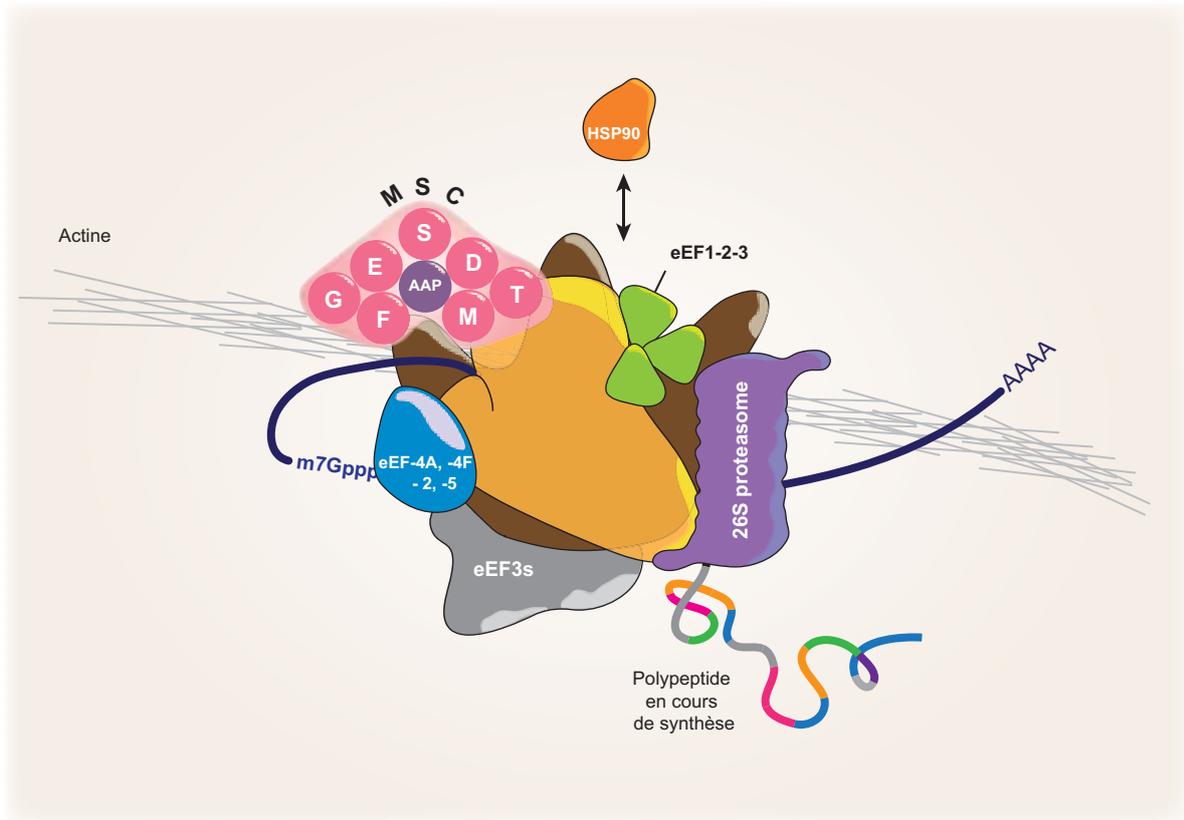
1.4.6.1 Le translasome

Nous avons vu que la traduction utilise le ribosome (ses 82 protéines et ses 4 ARNr), le MSC et tous les facteurs nécessaires à l'élongation du polypeptide en cours de synthèse (facteurs d'élongation, ARNts...). Plusieurs équipes ont ainsi suggéré qu'une traduction efficace passe par une coordination parfaite de tous ces éléments. Un nouveau concept propose que les polysomes soient associés de manière physique au MSC ainsi qu'aux facteurs d'initiation, d'élongation et au protéasome (Figure 18A). Ce « supercomplexe » identifié chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* a été nommé le translasome (7-8MDa ; (Sha et al., 2009)) et identifié par chromatographie d'affinité en tandem (TAP) à partir d'une souche exprimant des facteurs eIF3e- et eIF3m-TAP. Le translasome est composé du ribosome 80S, des facteurs d'initiation eIF1, -2 et -3, des facteurs d'élongation eEF2, -4A, -4F, -5 et d'eEF3. En plus des éléments « classiques » retrouvés en association avec le ribosome, cette étude a également identifié le protéasome 26S et ce qui semblerait être un complexe multisynthétasique. Le tout semble s'associer à l'actine dans le cytoplasme. Le MSC supposé de *S.pombe* semble être composé autour du cofacteur d'assemblage SPAC30C2.04 (identifié comme un cofacteur de la MRS et de l'ERS) et la TRS, SRS, MRS, DRS, FRS, ERS, GRS co-purifient avec le translasome ce qui ne signifie néanmoins pas que toutes ces aaRSs sont des composants d'un MSC. Une comparaison de séquence nous montre que SPAC30C2.04 partage 41% d'identité avec Arc1p, mais le domaine EMAPII (liaison aux ARNts) partage beaucoup plus d'homologie (environ 75%) que le domaine GST (54%) (Figure 18B). Il semblerait donc que SPAC30C2.04 contienne bien les domaines nécessaires à sa participation à un MSC. Une caractérisation plus approfondie de ce MSC nous permettrait de mieux connaître ses composants et surtout d'identifier son rôle. Ce que nous pouvons néanmoins dire, c'est que *S.pombe* ne possède pas les enzymes nécessaires au cycle du glyoxylate (Fiechter et al., 1981). Or, en regard des synthétases impliquées dans le MSC, quatre sur sept sont associées à des aa issus du cycle du glyoxylate (TRS, MRS, DRS, ERS). La sérine et la glycine sont issues du 3-phosphoglycérate, et la phénylalanine du phosphoenolpyruvate, deux intermédiaires en amont du pyruvate dans la glycolyse. La théorie purement métabolique de l'apparition des MSC ne peut donc pas s'appliquer ici non plus.

De pareilles analyses effectuées chez *S.cerevisiae* ont également mis en évidence que le protéasome 26S formait un complexe avec les polysomes, les facteurs d'initiation et d'élongation, la tubuline ainsi qu'avec la MRS et l'ERS (Guerrero et al., 2008). Dans cette étude, Arc1p n'a pas été identifié.

Le complexe que l'on pourrait également considérer comme un translasome a été mis en évidence chez le poisson *Morone saxatilis* par spectrométrie de masse et bio-informatique (Reading et al., 2013). De même, la co-purification des sous-unités ribosomiques avec une HSP90, le facteur EF1A et le complexe MSC de *C.elegans* tend à prouver que le translasome existe aussi chez d'autres organismes (Havrylenko et al., 2011). La co-purification du MSC de foie de lapin avec EF1A,

A



B

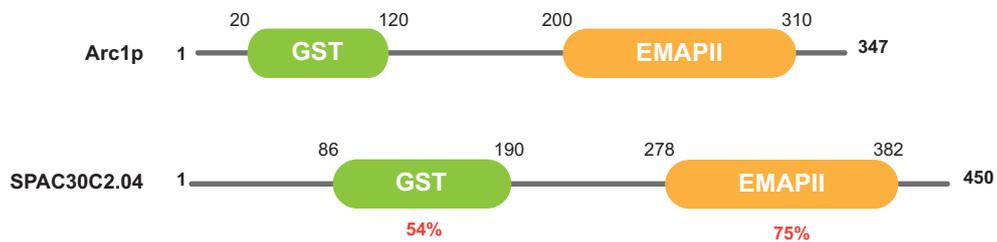


Figure 18 : Schéma du translasome identifié chez *Schizosaccharomyces pombe*.

(A) Description du translasome et de ses composants tel qu'il a été mis en évidence par Sha et al., 2009.
 (B) Comparaison des domaines GST et EMAPII entre la protéine d'ancrage du complexe AME Arc1p et SPAC30C2.4 identifiée par spectrométrie de masse lors de la purification du translasome et référencée comme une protéine Arc1p-like.

l'actine et des sous-unités du ribosome (Kaminska et al., 2009b) semble confirmer cette hypothèse. Tout cela laisse entendre qu'il y a bien un mécanisme de contrôle du channelling des ARNts et des aaRSs vers le ribosome et *vice versa* (Negrutskii and Deutscher, 1991) pour une traduction efficace. La présence du protéasome dans le translasome peut s'expliquer par la nécessité de dégrader certaines protéines néo-synthétisées contenant des erreurs (Chuang et al., 2005; Zhou et al., 1998).

I.5 Le métabolisme fermentaire et la transition diauxique

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme unicellulaire capable de produire de l'énergie à travers la fermentation des sucres (glucose, fructose, maltose...) ou par oxydation des produits de la fermentation, c'est-à-dire le glycérol, l'éthanol et le lactate (Johnston and Carlson, 1992). Quoiqu'il en soit la levure utilisera préférentiellement une source de carbone fermentescible à toute autre source de carbone qui doit être métabolisée par oxydation (Zaman et al., 2008). La fermentation du glucose et du fructose est privilégiée à tout autre mono-, di- et trisaccharides. Cela va permettre à la levure de produire rapidement de l'énergie et de générer tous les précurseurs essentiels aux processus anaboliques de la cellule.

Les levures qui se développent dans un milieu riche en glucose vont tout d'abord le fermenter en éthanol et en glycérol par la glycolyse puis, lorsque le glucose devient limitant dans le milieu, la levure va entrer dans une reprogrammation massive de son transcriptome et de son protéome appelé la «transition diauxique» (Zaman et al., 2008). Le passage au métabolisme respiratoire va permettre à la levure d'utiliser les produits de la fermentation pour générer l'ATP par phosphorylation oxydative. La respiration est également caractérisée par une augmentation de la biogénèse des mitochondries, lieu d'ancrage des complexes de la chaîne respiratoire, principal producteur d'énergie (ATP) en respiration, et où se déroule le cycle de Krebs.

Ces changements transcriptionnels et métaboliques induits par la transition diauxique sont orchestrés par des réseaux complexes de régulation qui contrôlent des processus interconnectés. Les trois voies principales qui régulent l'utilisation du glucose et la transition vers la respiration sont les voies PKA, TOR et Snf1-4.

I.5.1 Les voies Ras/PKA, TOR et Snf1-4

La voie Ras/Protéine Kinase A est composée d'un complexe central nommé PKA, qui est un hétérotétramère composé de sous-unités catalytiques (Tpk1-2 et 3p) et d'une sous-régulatrice (Bcy1p). Bcy1p agit comme un substrat pour la PKA, et inhibe son activité en absence d'AMP cyclique (AMPc) (Zaman et al., 2008). En fermentation, l'adénylate cyclase Cyr1p synthétise l'AMPc à partir de l'ATP produit par glycolyse, et la liaison de l'AMPc avec Bcy1p provoque la dissociation du complexe Bcy1-PKA. Les sous-unité catalytiques de la PKA peuvent alors activer la transcription des

gènes responsables de la biogénèse des ribosomes, de protéines ribosomiques et de gènes de la glycolyse afin de promouvoir la croissance cellulaire, tandis qu'elles inactivent la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress et des gènes de la gluconéogénèse, responsables de l'entrée en phase stationnaire. Cyr1p est activée par les GTPases Ras1- et 2-GTP et Gpa2-GTP, présentes sous forme phosphorylée et donc active en présence de glucose dans le milieu.

La voie TOR (**T**arget **O**f **R**apamycin) est composée de deux complexes contenant les kinases Tor1p et Tor2p (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012; Zaman et al., 2008). Le complexe TORC2 est formé de Tor2p ainsi que d'Avo1-2-3p, de Bit61p et de Lst8p et régule l'organisation du cytosquelette d'actine et la polarité cellulaire. Le complexe TORC1, composé de Tor1p, Kog1p, Lst8p et Tco89p, régule la prolifération cellulaire et la transition entre la croissance et la quiescence (De Virgilio and Loewith, 2006; Wullschleger et al., 2005). Il est admis que TORC1 joue un rôle important dans la régulation de l'azote intracellulaire puisqu'une inhibition de son activité par la drogue rapamycine provoque les mêmes effets qu'une carence en azote sur la transcription, le développement et le métabolisme de la levure. Le rôle précis de TORC1 dans les voies de régulation de l'azote en revanche n'est pas très bien défini et il semblerait que TORC1 agissent en parallèle de la voie NCR (**N**itrogen **C**atabolite **R**epression) qui est la voie générale de régulation de l'azote (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

La voie TOR joue un rôle important dans l'adaptation de la cellule à la respiration en régulant l'expression de certains gènes du cycle de Krebs et notamment ceux menant à la synthèse de l' α -cétoglutarate à partir de l'acétyl-CoA (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). L' α -cétoglutarate est un élément central du métabolisme respiratoire puisqu'il va être le précurseur de plusieurs métabolites dont notamment le glutamate.

Ainsi la voie TOR semble être un coordinateur de différentes voies de régulations qui sont au centre du métabolisme de la levure, comme la voie NCR et la transition diauxique, qui permet de coordonner le cycle de Krebs et le métabolisme de l'azote.

La voie Snf1-4 est composé d'un hétérotrimère comprenant la protéine kinase Snf1p qui est la sous-unité catalytique, une sous-unité régulatrice Snf4p et trois autres sous-unité Gal83p, Sip1p et Sip2p. Cette voie de régulation est activée en l'absence de glucose et est essentielle pour la croissance en présence de sources de carbone non fermentescible comme le glycérol ou l'éthanol (Zaman et al., 2008). En concentration faible de glucose, trois protéines kinase (Sak1p, Elm1p et Tos3p) activent Snf1p par phosphorylation. Snf1p phosphorylée interagit alors avec la sous-unité régulatrice Snf4p et forme le complexe Snf1-4. La localisation subcellulaire du complexe Snf1-4 dépend de son association avec une des trois sous-unités Gal83p, Sip1p et Sip2p (Vincent et al., 2001). Au cours de la transition diauxique, Snf1-4 en complexe avec Gal83p, est importé dans le noyau, où cette kinase va moduler l'expression d'une myriade de gènes essentiels à la respiration ou encore pour le stockage du

glucose. Ces régulations s'opèrent à travers l'activation de plusieurs facteurs de transcription comme Adr1p qui active la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme de l'éthanol et la β -oxydation des acides gras (Young et al., 2003), Cat8p et Sip4p qui activent la transcription des gènes de la gluconéogénèse (Schüller, 2003), ou la répression des facteurs Mig1p/Hxk2p qui répriment certains gènes impliqués dans l'expression des transporteurs d'hexoses (Ahuatzi et al., 2004; Ahuatzi et al., 2007).

A l'opposé des voies TOR et Ras/PKA qui répondent à des signaux métaboliques généraux et contrôlent de manière globale la transcription et la traduction cellulaire, la voie Snf1-4 répond à un signal beaucoup plus précis qui est le type de source de carbone disponible dans le milieu. De cette manière la voie Snf1-4 agit sur la transcription de gènes spécifiques impliqué dans l'adaptation au substrat carboné, et participe donc au remodelage du paysage intracellulaire propice, entre autre, au bon fonctionnement des voies TOR et Ras/PKA.

I.5.2 Les mitochondries et la respiration chez la levure *S.cerevisiae*

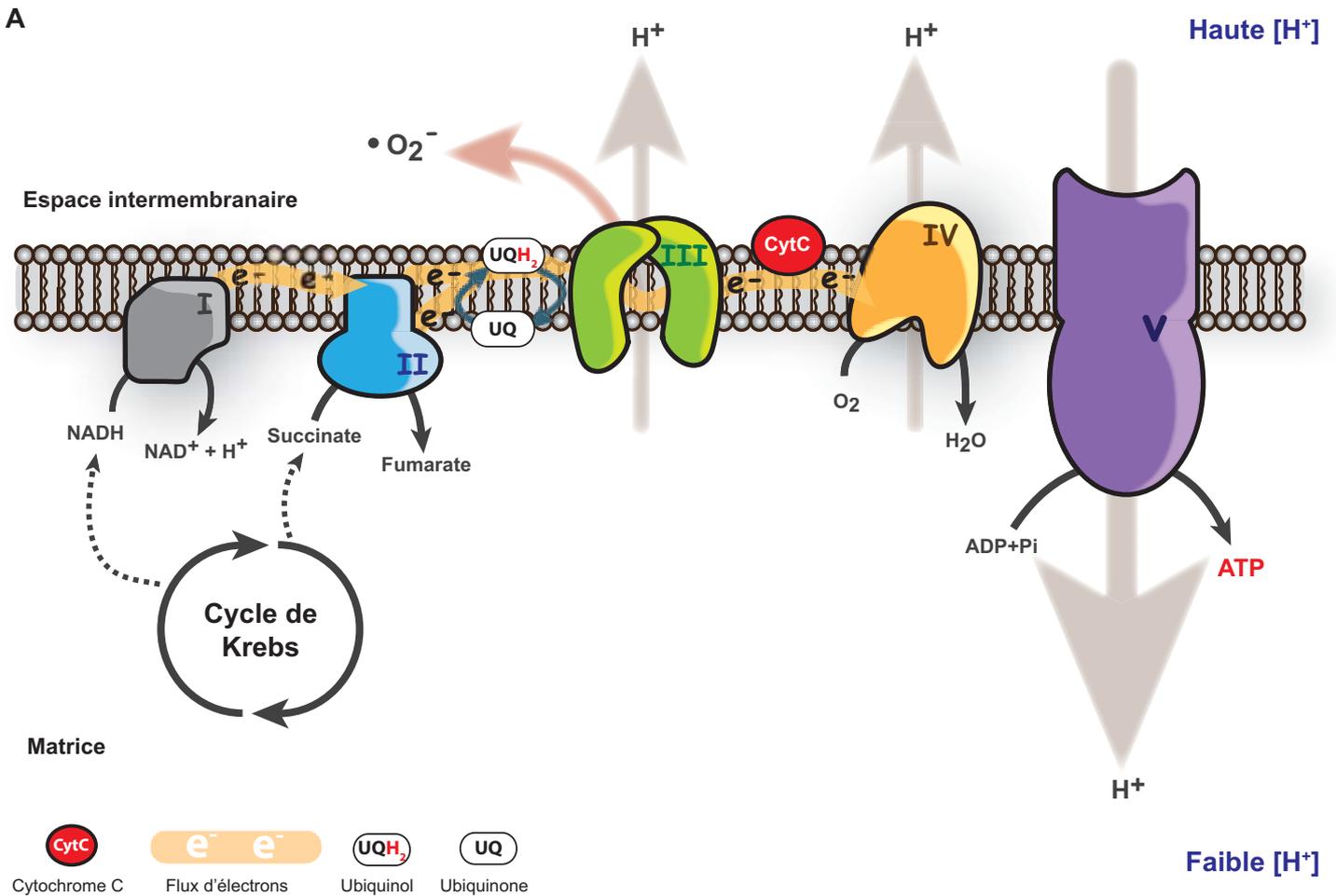
I.5.2.1 Origines

Les théories sur l'origine de la mitochondrie chez les eucaryotes sont nombreuses, mais la plus plausible semble être celle de l'endosymbiose. Selon cette théorie, les mitochondries sont issues d'une endosymbiose entre une α -protéobactérie aérobie du genre *Rickettsia* (*Rickettsia prowazekii*) et une cellule proto-eucaryote anaérobie (Andersson et al., 1998; Gray, 1998). Des expériences de datation moléculaire ont permis de définir que l'endosymbiose a eu lieu il y a approximativement 1,5 ou 2 milliards d'années (Sicheritz-Pontén et al., 1998).

I.5.2.2 Les différents rôles de la mitochondrie au sein de la cellule

La mitochondrie est un organite essentiel à la cellule au cours de la respiration et ce pour différentes raisons. Tout d'abord elle est le siège de la production majeure d'ATP par phosphorylation oxydative, processus qui couple le transfert d'électrons, générés par oxydation de deux produits du cycle de Krebs (le NADH et le succinate), à travers les complexes de la chaîne respiratoire (CR) intégrés dans la membrane interne, à la création d'un gradient de protons à travers la membrane (Figure 19) (Ferne et al., 2004; Galluzzi et al., 2012; Mitchell, 1961; Reichert and Neupert, 2004). Ce gradient électrochimique généré au cours de la phosphorylation oxydative est utilisé par la F_1 - F_0 -ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP (Mitchell, 1961; Reichert and Neupert, 2004).

En plus de la phosphorylation oxydative, la mitochondrie est le siège d'un grand nombre d'autres voies métaboliques, comme la production d'acétyl-CoA par β -oxydation des acides gras (Houten and Wanders, 2010) ou à partir du pyruvate glycolytique, la synthèse des hèmes à partir du succinyl-CoA (produit du cycle de Krebs) (Ajioka et al., 2006), la biogénèse des centres fer/souffre



B

	NADH oxydase	Succinate déshydrogenase	Cytochrome bc1	Cytochrome c oxydase	ATP synthase	
Sous-unités codé dans la mitochondrie	Aucune	Aucune	CYTb	COX1 COX2 COX3	ATP6 ATP8 ATP9	
Sous-unités codées dans le noyau	NDI1	EMI5 SDH1 SDH2 SDH3 SDH4	RIP1 COR1 QCR2 QCR6 QCR7 QCR8 QCR9 QCR10 CYT1	COX4 COX5A COX5B COX6 COX7 COX8 COX9 COX12 COX13	ATP1 ATP2 ATP3 ATP4 ATP5 ATP7 ATP14 ATP15 ATP16	ATP17 ATP18 ATP19 ATP20 ATP21
				CYC7 CYC1		

Figure 19 : La chaîne respiratoire de levure et les gènes qui la composent.

(A) Schéma de la chaîne respiratoire (B) Tableau récapitulatif des gènes nucléaires et mitochondriaux des composants de la chaîne respiratoire.

incorporés dans des protéines mitochondriales et, après export, dans des protéines cytosolique (Lill and Mühlhoff, 2005), ou encore le catabolisme des aa par le cycle de l'urée (Watford, 1991).

La mitochondrie est aussi impliquée dans d'autres processus cellulaire en dehors de son rôle dans le métabolisme. Elle participe notamment, au même titre que le réticulum endoplasmique, au stockage du calcium, nécessaire à certaines réactions bioénergétiques et à la mise en place de la mort par apoptose (Orrenius et al., 2003; Pinton et al., 2008). Le contrôle de certains stress cellulaires, comme la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS), est également effectuée par la mitochondrie. Bien que les ROS soient un produit naturel dérivé de la respiration, participant à de nombreuses voies de signalisations (Dai et al., 2014; Dalton et al., 1999; Hamanaka and Chandel, 2010), ils provoquent également des dommages à l'ADN, ils conduisent à la peroxydation des lipides et à l'oxydation des protéines. La « détoxification » des ROS est assurée en partie par la mitochondrie, grâce à différentes protéines comme la superoxide dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) en oxygène (O_2) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les catalases (protéines à hèmes), les thiorédoxines et les glutathions qui décomposent, par réactions d'oxydoréduction, l' H_2O_2 en O_2 et H_2O (Balaban et al., 2005; Galluzzi et al., 2012).

1.5.2.3 Dynamique et ultra-structure de la mitochondrie

De structures tubulaires, les mitochondries sont des compartiments subcellulaires entourés d'une double membrane lipidique, présents généralement au nombre de 1 à 50 exemplaires en fonction des conditions de croissance. En effet les mitochondries forment un réseau dynamique à travers la cellule *via* des événements de fusion et de division par fission (Nunnari et al., 1997). Le diamètre tubulaire moyen du réseau varie de 339 nm à plus de 360 nm au cours du passage de la fermentation à la respiration, passage qui conduit à une augmentation de trois fois du volume mitochondrial dans la cellule (Egner et al., 2002).

La mitochondrie contient deux compartiments, la matrice entourée par la membrane interne et l'espace intermembranaire, compris entre la membrane interne et la membrane externe (Figure 20). Le génome mitochondrial se trouve dans la matrice, ainsi que toutes les protéines nécessaires à son maintien et sa réplication, de même que les protéines impliquées dans les différentes voies métabolique que je décrirai plus tard. La matrice est délimitée par la membrane interne formée de protéines (80%), de lipides (20%) dont la quasi-totalité sont des cardiolipides, la rendant imperméable aux ions (Joshi et al., 2009). Elle contient un certain nombre de protéines impliquées dans la translocation des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire vers la matrice (TIM : **T**ranslocase of the **I**nnner **M**embrane), ou encore le repliement des protéines envoyées dans la membrane interne. La membrane interne contient également les complexes de la CR, principal producteur d'ATP au cours de la respiration, et est structurée d'une manière assez particulière sous forme de crêtes. Cette organisation, rendue possible grâce à la présence du complexe MINOS

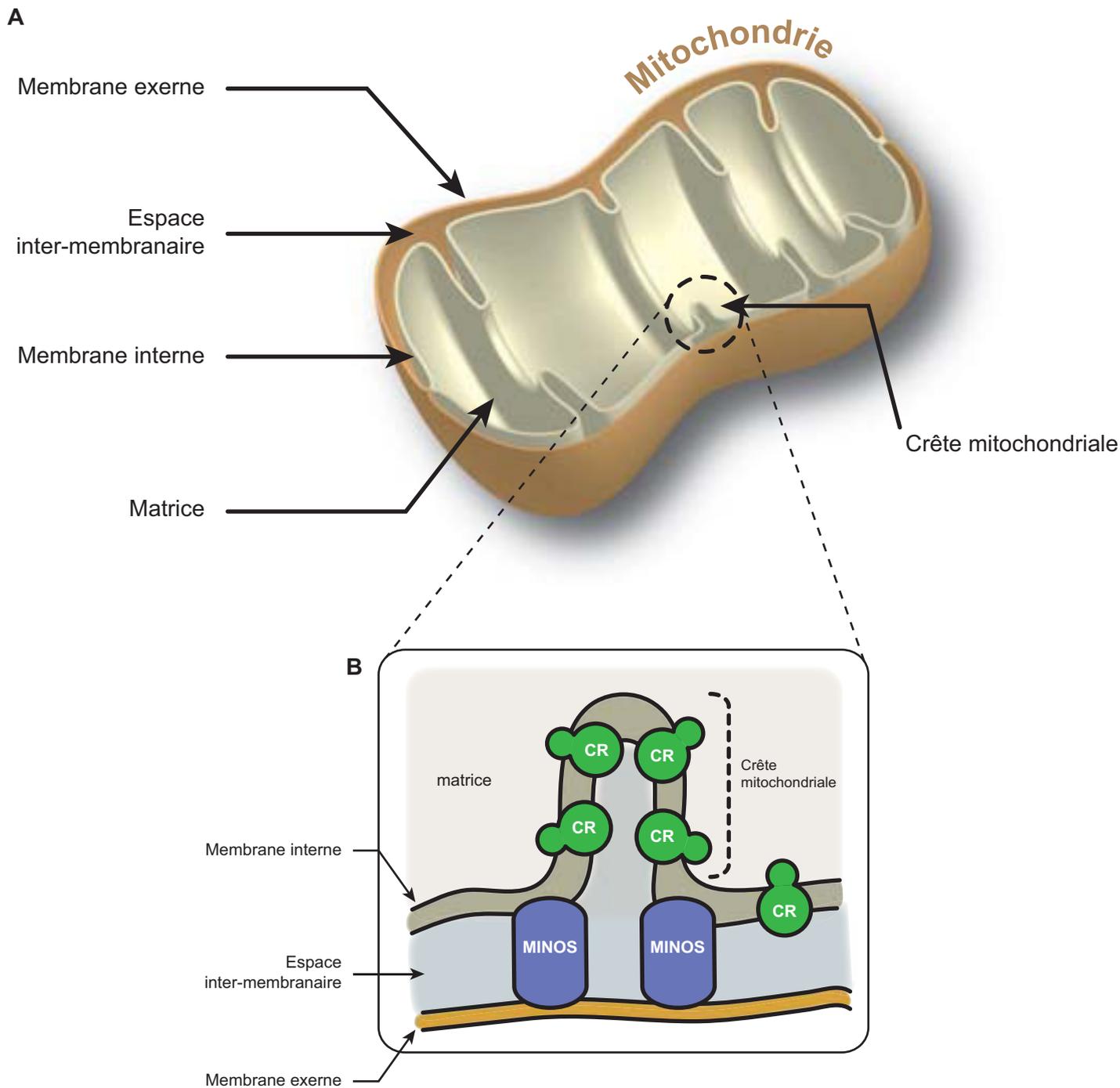


Figure 20 : Représentation d'une mitochondrie, de ses différents compartiments et de son organisation interne.

(A) Schéma d'une mitochondrie en 3D et ses 5 composantes. (B) Vue simplifiée de l'organisation interne d'une crête mitochondriale formé grâce à la présence du complexe MINOS (Mitochondrial Inner Membrane Organizing System) et des chaînes respiratoires (CR).

(**Mitochondrial Inner Membrane Organizing System**), augmente la surface totale de la membrane et permet de contenir un très grand nombre de complexes respiratoires permettant de maximiser la production d'énergie (van der Laan et al., 2012). L'espace inter-membranaire se situe entre la membrane interne et externe. C'est un compartiment aqueux dans lequel se trouve un grand nombre de protéines impliquées dans le transport et la maturation des protéines importantes comme celles de la CR. C'est également un espace dédié à la détoxification des ROS par la SOD1 (**SuperOxyde Dismutase 1** ; (Herrmann and Riemer, 2010)) et à la régulation des conditions d'oxydo-réduction dans l'IMS (grâce à des thiorédoxines ; (Vogtle et al., 2012)) essentielles à l'import mitochondriale et à l'adaptation aux besoins physiologique de la cellule (Curran et al., 2004; Koehler, 2004). La membrane externe est composée de lipides mais également d'une grande quantité de protéines, formant des pores (comme la porine par exemple) laissant passer les métabolites, les systèmes d'import des protéines dans la mitochondrie (TOM : **T**ranslocase of the **O**uter **M**embrane), ou encore les complexes impliqués dans le repliement des protéines membranaires (Chacinska et al., 2009; Schmidt et al., 2010).

Il est intéressant de noter que la mitochondrie interagit physiquement avec le réticulum endoplasmique (RE) *via* le complexe ERMES (**ER-Mitochondria Encounter System**), par l'association d'une protéine membranaire du réticulum (Mmm1p) avec des protéines de la membrane externe de la mitochondrie (Mdm10-12-34p et Gem1p) (Kornmann et al., 2009; van der Laan et al., 2012). Cette association entre le RE et la mitochondrie semble être importante pour le transfert et le métabolisme des lipides, ainsi que pour le transfert des ions Ca^{2+} vers la mitochondrie.

I.5.3 Expression et import des protéines mitochondriales

Il existe principalement quatre voies d'import mitochondrial, permettant de diriger les précurseurs des protéines mitochondriales synthétisés dans le cytoplasme vers la matrice (*i*), la membrane interne (*ii*), l'espace intermembranaire (*iii*) ou la membrane externe (*iv*). Ces voies font appel à des séquences peptidiques d'adressage présentes dans les protéines clivées (préséquence) ou non (signaux internes) après import. La position et la nature de ces séquences varient en fonction de la destination finale des protéines. Pour être importées dans les différents compartiments de la mitochondrie, les protéines doivent être prises en charge par des complexes d'import, les protéines de moins de 5kDa quant à elles peuvent diffuser à travers les pores protéiques situés dans la membrane externe et constitués par la porine. Les signaux et voies d'import ont récemment fait l'œuvre de deux revues exhaustives (Becker et al., 2012a; Chacinska et al., 2009) (Figure 21).

Les protéines importées dans la matrice mitochondriale possèdent une préséquence d'environ 10 à 60 aa formant une hélice- α amphiphile située dans la partie N-terminale de la préprotéine et généralement clivée après import (Becker et al., 2012a). Ces préséquences sont reconnues par les récepteurs Tom20p et Tom22p du complexe TOM, puis passe à travers le pore du complexe formé par

Préséquences et certaines variations	Représentation des séquences	Voie d'import	Destination
Préséquence en hélice α amphiphile clivée après import		TOM TIM23 PAM	Matrice
Préséquence en hélice α amphiphile clivée après import + peptide hydrophobe		TOM TIM23 (PAM)	Membrane interne
Préséquence en hélice α amphiphile + peptide hydrophobe clivés après import		TOM TIM23 (PAM)	Espace inter-membranaire
Signaux non-clivable de protéines hydrophobiques			
Signal β		TOM SAM	Membrane externe (Tonneaux β)
Signal N-terminal		TOM Mim1	Membrane externe (Hélice α)
Signal C-terminal		?	
Signal interne		(TOM) (SAM)	
Multiple signaux internes		TOM TIM22	Membrane interne (transporteurs de métabolites)
Séquence interne + région hydrophobe		TOM TIM23	Membrane interne
Signaux internes pour l'espace inter-membranaire			
Signal interne riche en cystéine		TOM MIA	Espace inter-membranaire

Figure 21 : Signaux d'adressage et destination des précurseur de protéines mitochondriales.

Les séquences d'adressage et signaux internes sont clivés ou non par les peptidases mitochondriales (PM) ou par les peptidases de la membrane interne (PMI). Il y a trois signaux majeurs d'adressage, i) les préséquences, ii) les signaux non-clivables retrouvés dans les protéines hydrophobiques et iii) les protéines contenant des signaux internes riches en cystéine. Presque tous les précurseurs empruntent le complexe TOM (Translocase of Outer Membrane) pour traverser la membrane externe puis le complexe TIM (Translocase of Inner Membrane). Certains précurseurs sont ensuite pris en charge soit par la PAM (Presequence translocase-Associated Motor), soit par le complexe MIA (Mitochondrial Inner-membrane space Assembly pathway) ou encore par le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) en fonction de leur destination dans la mitochondrie.

Tom40p (Figure 22A). Les protéines sont ensuite prises en charge par le récepteur Tim50p et le complexe TIM23 qui permettent, grâce au potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) et à l'ATP, de transloquer les protéines dans la matrice où les préséquences seront clivées par des protéases mitochondriales. Le passage des précurseurs du complexe TIM23 vers la matrice est facilité par la PAM (Presequence translocase-Associated Motor) et des chaperonnes mitochondriales (mtHSP70).

Les transporteurs de métabolites, insérés dans la membrane interne de la mitochondrie, sont reconnus par le récepteur Tom70p et importés par le complexe TOM. Dans l'espace inter-membranaire, les protéines sont prises en charge par des petites chaperonnes TIM puis transférées au complexe TIM22 qui insère les transporteurs dans la membrane interne en utilisant le $\Delta\Psi$ comme source d'énergie.

Les protéines destinées à l'espace intermembranaire contiennent généralement une préséquence en hélice- α ainsi qu'un segment transmembranaire qui sera clivé ou une séquence interne riche en cystéine (Figure 22B). Les protéines contenant une préséquence sont généralement reconnues par les récepteurs Tom20p et Tom22p du complexe TOM, puis transférées au complexe TIM23 *via* Tim50p. Elles sont ensuite insérées dans la membrane grâce à leur segment transmembranaire. Ces protéines sont ensuite clivées par une peptidase membranaire afin de libérer la protéine dans l'espace inter-membranaire. La majorité des protéines de l'espace inter-membranaire contiennent des motifs spécifiques riches en cystéines. Ces protéines précurseurs sont importées par le complexe TOM (Tom70-40) dans un état réduite (-SH) et entrent dans l'espace inter-membranaire par la voie MIA (Mitochondrial Inner-membrane space Assembly pathway). Mia40p interagit alors avec les protéines importées en formant des ponts disulfures qui permettent aux protéines de se replier puis d'être libérées sous formes matures. Les électrons libérés au cours de l'interaction entre Mia40p et la protéine précurseur sont transférés à Erv1p qui les transfère au cytochrome *c* de la chaîne respiratoire.

En ce qui concerne les protéines adressées à la membrane externe, elles contiennent soit un segment en tonneau- β , soit différentes séquences à l'extrémité N- ou C-terminale se repliant en hélice- α . Les protéines à tonneau- β sont importées par le complexe TOM (Tom20-22-40p), transférées à de petites chaperonnes TIM dans l'espace inter-membranaire qui délivre les précurseurs au complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery). Les protéines Sam50p et Sam55p permettent alors d'insérer les feuillets β des protéines dans la membrane. Les protéines à hélice- α sont reconnues par le récepteur Tom70p et directement transmises à la protéine membranaire Mim1p qui permet l'insertion des précurseurs dans la membrane externe.

Bien avant d'être importées dans la mitochondrie, les précurseurs des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire doivent être traduits dans le cytoplasme. Des expériences menées dans les années 70 ont identifié à la surface de la mitochondrie un certain nombre de ribosomes traduisant des ARNms de protéines mitochondriales codé par le génome nucléaire

(Kellems et al., 1974; Kellems et al., 1975). Depuis, environ 500 espèces d'ARNms codés par le génome nucléaire ont été répertoriés à la surface de la mitochondrie et renommés « ARNms localisés à la mitochondrie » (MLR : **M**itochondrially **L**ocalized **m**RNA) (Gonsalvez et al., 2005; Marc et al., 2002; Margeot et al., 2005; Saint-Georges et al., 2008). Environ 150 MLRs sont amenés et traduits à la surface de la mitochondrie par l'intermédiaire de la protéine Puf3p (Devaux et al., 2010; Gadir et al., 2011; Quenault et al., 2011). Cette dernière fait partie des protéines de la famille PUF (**P**umilio and **F**BF) qui regroupe un ensemble de protéines (6 chez la levure de Puf1p à Puf6p) capables de se lier aux ARNs et aux protéines *via* leur domaine de type PUM-HD (**P**UMilio **H**omology **D**omain) (Edwards et al., 2001; Wang et al., 2001a). Ces protéines sont impliquées dans la stabilisation et la dégradation des ARNms et dans la localisation des ARNms dans la cellule (Wharton and Aggarwal, 2006; Wickens et al., 2002). Les MLRs restants (environ 450) sont également traduits à la surface des mitochondries mais s'y localisent par un mécanisme indépendant de Puf3p. En plus des MLRs, les autres ARNms codant des protéines mitochondriales sont traduits dans le cytoplasme puis les protéines néosynthétisées sont apportées à la mitochondrie par l'intermédiaire de chaperonnes cytosoliques (Hsp40p et -70p).

I.5.4 Les complexes de la chaîne respiratoire

La CR est composée de cinq complexes multi-protéiques ancrés dans la membrane interne de la mitochondrie. En plus de ces complexes, deux transporteurs permettent de transférer les électrons entre les complexes, l'ubiquinone et le cytochrome *c*. Le gradient de proton généré au cours du transfert des électrons entre les différents complexes va permettre au cinquième complexe, l'ATP synthase, de produire l'ATP. Les gènes codants ces protéines sont d'origine génétique mixte puisqu'ils sont codés à la fois par le génome nucléaire et mitochondrial. L'ensemble des gènes ainsi qu'un schéma représentatif de la CR sont présentés dans la figure 19.

Le complexe I, *a contrario* des mammifères n'est pas présent chez *S.cerevisiae* mais est remplacé par une NADH oxydase faisant face à la matrice mitochondriale composée de la sous-unité Ndi1p. Le complexe I oxyde une molécule de NADH permettant la récupération de deux électrons, directement transférés à l'ubiquinone (que l'on appelle ubiquinol une fois réduite), et qui diffuse ensuite dans la membrane interne vers le complexe III (ou cytochrome *bc1*). Le complexe II, ou succinate déshydrogénase, récupère également un électron à partir du succinate puis le transfère à l'ubiquinone. Les électrons issus des deux premiers complexes sont apportés au complexe III qui les transfère au complexe IV (ou cytochrome *c* oxydase) par l'intermédiaire du cytochrome *c* qui fait la navette entre ces 2 complexes en diffusant dans la membrane interne. L'oxydation de l'ubiquinol et du cytochrome *c* permet aux complexes III et IV d'expulser des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient de protons. Ce gradient est ensuite utilisé par l'ATP synthase qui permet de coupler la translocation d'un proton de l'espace intermembranaire vers la matrice avec

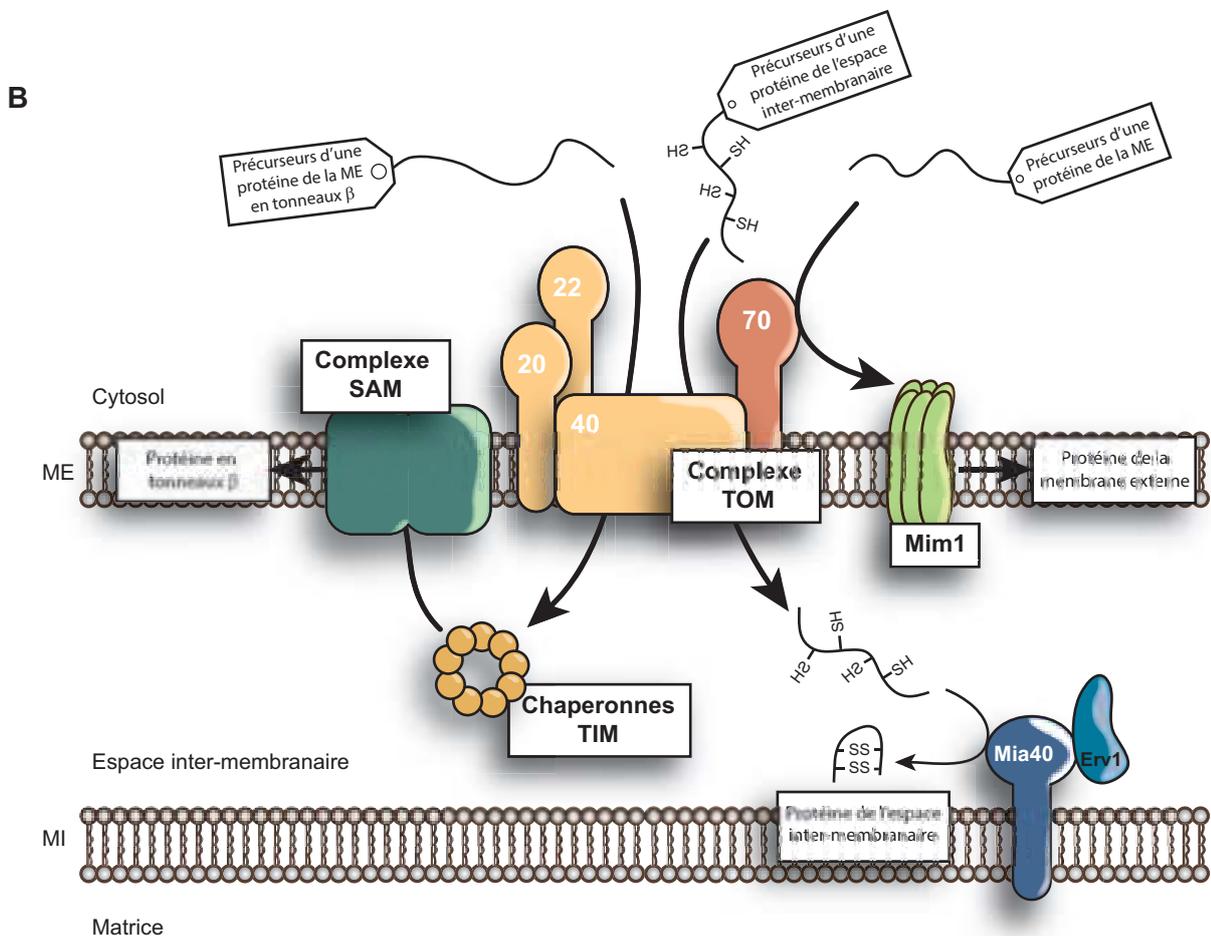
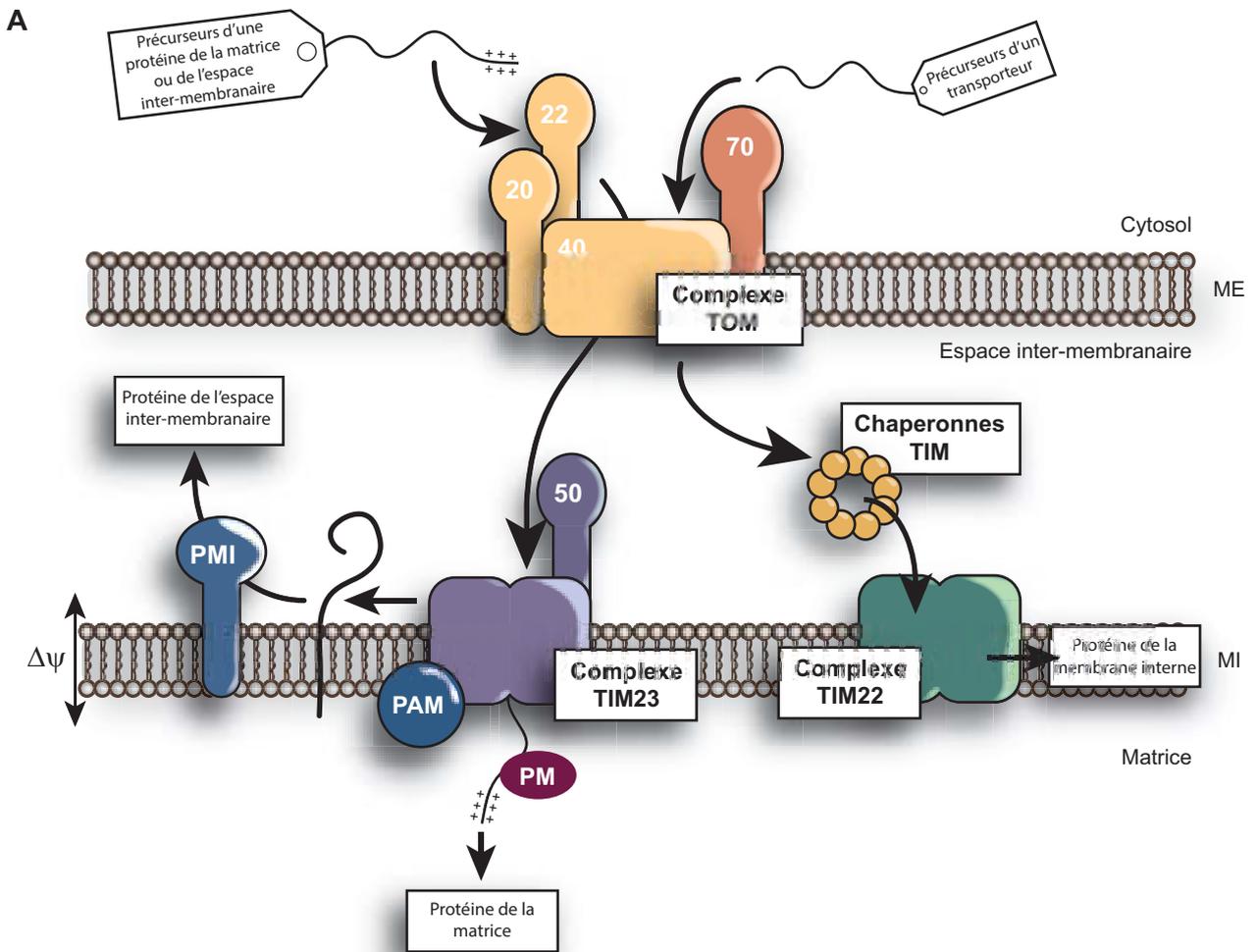


Figure 22 : Les différentes voies d'import mitochondrial chez la levure.

(A) Import des protéines destinées à la matrice mitochondriale, à la membrane interne et à l'espace intermembranaire. Les protéines de l'espace intermembranaire sont intégrées à la membrane interne sous la forme de pré-protéines qui sont ensuite clivées par la peptidase de la membrane interne pour être libérées dans l'espace intermembranaire. (B) Import des protéines destinées à la membrane interne dépendant de la voie MIA (Mitochondrial Inner-membrane space Assembly pathway), et des protéines insérées dans la membrane externe. Les numéros présents sur les différentes sous-unités correspondent à aux noms de la protéine (par exemple le numéro 20 correspond à la protéine Tom20p du complexe TOM, etc.)

la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP. L'oxydation des produits du cycle de Krebs (NADH et succinate) est ainsi « couplée » à la production d'ATP en respiration.

Les complexes peuvent également s'associer en « supercomplexes » avec différentes stœchiométries (Stuart, 2008). Chez la levure, le complexe III s'associe avec le complexe IV en stœchiométries III₂-IV₁ ou III₂-IV₂, de même le complexe V peut former des dimères ou s'oligomériser (Stuart, 2008) au sein des crêtes mitochondriales.

Chez la levure, le complexe III est également impliqué dans la génération de ROS (Chen et al., 2003; Drose and Brandt, 2008; Lenaz et al., 2010) notamment lorsque la stœchiométrie d'assemblage de ce complexe n'est pas respectée ou lors d'un dysfonctionnement dans le transfert des électrons au cytochrome *c* (Coenen et al., 2001).

I.5.5 Synchronisation du génome nucléaire et mitochondrial

La mitochondrie contient environ 1000 protéines différentes, dont la quasi-totalité est synthétisée dans le cytoplasme (99%) et une infime partie (1%) dans la matrice mitochondriale. Ces dernières sont codées par le génome mitochondrial. Chez la levure *S. cerevisiae*, le génome mitochondrial (85,8 kb) code pour des ARNts, des ARNrs (15S et 21S), 7 protéines de la chaîne respiratoire (*COX1*, *-2 et -3*, *CYTB*, *ATP6*, *-8 et -9*) et *VARI* qui code pour une protéine ribosomique de la petite sous-unité du ribosome (Foury et al., 1998).

Le bon déroulement des fonctions mitochondriales est maintenu grâce à l'expression, dans des concentrations adéquates, des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire et celles codées par le génome mitochondrial. Ces mécanismes de coordination et de régulation intergénomique incluent les voies antérograde (du noyau vers la mitochondrie) et rétrograde (de la mitochondrie vers le noyau ; Figure 23). La voie antérograde coordonne l'expression des gènes mitochondriaux codés par le génome nucléaire en réponse à des signaux endogènes (dans la cellule) et environnementaux « perçus » par le noyau (Cannino et al., 2007; Woodson and Chory, 2008). La voie rétrograde régule l'expression de gènes nucléaires en réponse à des *stimuli* d'origine mitochondriale ou environnementale (Liu and Butow, 2006).

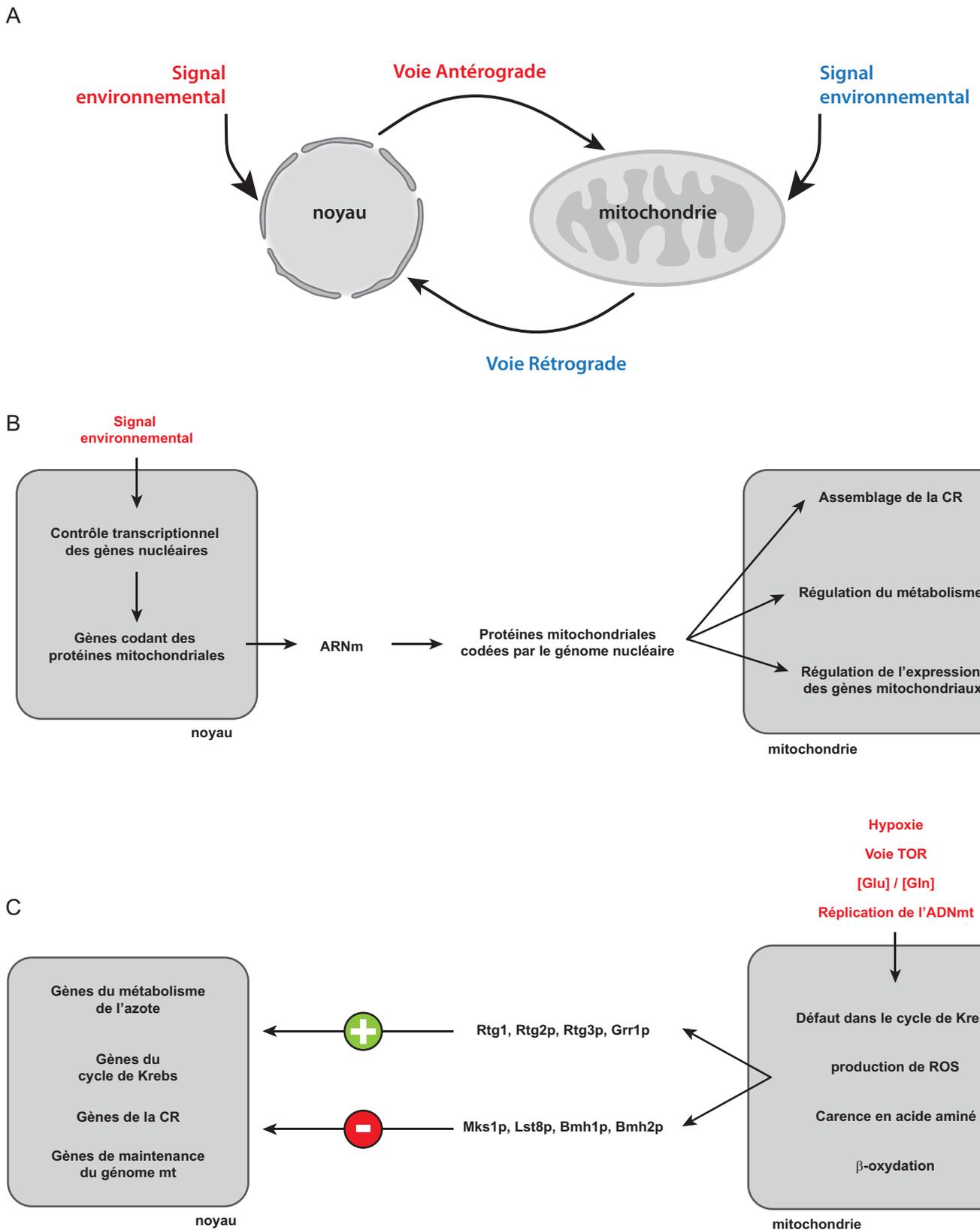


Figure 23 : Les voies antérograde et rétrograde chez la levure.

(A) Schéma général de la voie antérograde (du noyau vers la mitochondrie) et de la voie rétrograde (de la mitochondrie vers le noyau). (B) Voie antérograde et rétrograde (C), les signaux déclencheurs et les effecteurs des voies.

I.6 Mon sujet de thèse

Comme nous l'avons vu, le complexe AME a déjà fait l'objet de nombreuses études, mais aucune d'entre elles n'a pu mettre en évidence la dynamique du complexe. De même les rôles additionnels que pourraient avoir ses composants n'ont pas été étudiés, tandis que la dynamique du MSC de mammifère et les fonctions non canoniques de ses composants ont été très amplement documentées. Au cours de ma thèse, et sur la base du travail déjà réalisé par l'ancien doctorant Mathieu Fréchin (Fréchin et al., 2009) j'ai entrepris d'étudier la régulation transcriptionnelle d'*ARCI* au cours de la croissance de la levure. En parallèle de cela, je me suis également demandé si la MRS pouvait exercer une fonction non canonique en dehors du complexe AME, tout comme l'ERS dans les mitochondries. L'ensemble de notre étude a permis de montrer qu'en respiration, le complexe AME se dissocie, Arc1p diminuant la MRS et l'ERS sont libre dans le cytoplasme. La MRS est importée dans le noyau et joue le rôle de régulateur de la transcription de nombreux gènes des complexes de la CR en synergie avec l'ERS qui active la traduction des gènes mitochondriaux. Ces travaux ont d'ailleurs fait l'objet d'un article en cours de publication intitulée : « Expression of nuclear and mitochondrial genes encoding ATP synthase is synchronized by disassembly of a multisynthetase complex » et que vous trouverez dans le chapitre suivant. Comme nous le verrons cette étude apporte les premiers éléments de réponse à une question longtemps restée en suspens : celle de la régulation de l'expression et de l'assemblage coordonnée de l'ATP synthase. L'assemblage du complexe III et IV sont bien documentés et font toujours l'objet de beaucoup d'attention (Fox, 2012; Lapuente-Brun et al., 2013; Zara et al., 2009), tout comme l'assemblage des sous-unités du complexe V (Cui et al., 2014; Fox, 2012; Habersetzer et al., 2013; Rak et al., 2009), mais la régulation de l'expression de certains de ces composants bien que dépendante de la voie HAP (Buschlen et al., 2003) est très peu étudiée.

Le deuxième axe de ma thèse a porté sur l'étude de l'EPRS^{N1}, l'homologue humain de l'ERS chez la levure. Au cours de la respiration chez la levure, l'ERS cytosolique est importée dans la mitochondrie et participe à la voie indirecte de transamidation du $\text{mtQ-ARNt}^{\text{Q}}$, essentiel à la traduction mitochondriale (Fréchin et al., 2009). Curieusement, une étude menée chez les mammifère a révélé l'existence d'un variant transcriptionnel de l'EPRS nommée EPRS^{N1} (Yao et al., 2012). Ce dernier, composé de l'ERS humaine et d'une extension C-terminale n'a jamais été retrouvée dans le MSC et ressemble à l'ERS de levure. Comme la mitochondrie humaine ne possède pas de QRS mais possède une GatCAB, nous avons imaginé que cette EPRS^{N1} pouvait être le variant importé dans les mitochondries humaines pour former le $\text{mtQ-ARNt}^{\text{Q}}$. Or une étude a démontré que l'ERS mitochondriale humaine joue le rôle d'ERS-ND dans la voie indirecte de formation du $\text{mtQ-ARNt}^{\text{Q}}$ (Nagao et al., 2009). Toutefois nous avons voulu vérifier notre hypothèse, pour cela nous avons exprimé l'EPRS^{N1} fusionnée à la GFP et déterminé sa localisation dans des cellules humaines. Nous avons également pu montrer que l'EPRS^{N1} est capable de compléter l'absence de l'ERS cytosolique chez la levure, en fermentation ainsi qu'en respiration, prouvant par la même occasion que l'EPRS^{N1} est capable de mésacyler l'ARNt^Q mitochondrial chez la levure.

Cette étude pose la question de l'évolution et de la conservation des voies de transamidations ainsi que du système de décodage des codes génétiques mitochondriaux. Ces deux thèmes ont été abordés dans deux publications auxquelles j'ai participé. La première traite de l'amidotransférase GatFAB retrouvée dans les mitochondries de levure, de sa structure particulière au regard de ces homologues bactériens et organellaires (Araiso et al., 2014), tandis que la seconde aborde les stratégies élaborées par différents organismes pour décoder leur génomes mitochondriaux. Cette revue traite de la traduction mitochondriale et de ces particularités sous différents aspects comme l'usage des codons, l'import et l'expression des ARNts mitochondriaux et des aaRSs mitochondriales (Huot et al., 2014).

Au cours de ma thèse, je me suis également intéressé à la protéine Cex1p qui a été identifiée comme un cofacteur de l'export des ARNts aminoacylés chez la levure (McGuire and Mangroo, 2007, 2012). De plus il a été montré que la délétion des gènes *CEX1* et *ARCI* est létale chez la levure (McGuire and Mangroo, 2007), signifiant que Cex1p intervient dans la même voie métabolique que Arc1p, en l'occurrence dans l'export de l'ARNt aminoacylé. Dans le cadre d'un partenariat avec l'équipe du Pr. Osamu Nureki (Université de Tokyo, Japon), nous avons pu déterminer la structure cristallographique de Cex1p (Nozawa et al., 2013). Nous avons également entrepris de caractériser Cex1p, ses différents domaines et à notre grande surprise il semblerait que Cex1p ne soit pas qu'un facteur de l'export de l'ARNt. L'ensemble des résultats sont exposés dans la partie V de ma thèse.

Partie II

Analyse du complexe AME chez *Saccharomyces cerevisiae*

II.1 Apport de mon travail de thèse à la problématique

Lors de mon arrivée au laboratoire, Mathieu Fréchin, qui effectuait sa thèse, avait montré que lorsque la levure passe d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire (transition diauxique), le taux d'Arc1p diminue dans la levure (Fréchin et coll., 2009). Suite à cette baisse, l'ERS est relâchée du complexe et est activement importée dans la mitochondrie où elle glutamyle l'ARNt^{Gln} mitochondrial (_mARNt^Q). Ce glutamyl-_mARNt^Q (E-_mARNt^Q) est ensuite pris en charge par une amidotransférase ARNt-dépendante trimérique appelée GatFAB, qui va amidier le E acylant le _mARNt^Q en Q. Le Q-_mARNt^Q est ensuite pris en charge par le facteur d'élongation EF-Tu mitochondrial pour alimenter la traduction mitochondriale.

La relocalisation mitochondriale de l'ERS est donc cruciale pour la levure puisque sans elle la cellule ne peut synthétiser le Q-_mARNt^Q et meurt en respiration. En plus d'avoir montré que le complexe AME est dynamique, cette étude nous a renseigné sur le stimulus déclenchant la disruption du complexe AME : la transition diauxique, qui permet à la levure de passer du métabolisme fermentaire au métabolisme respiratoire. Deux questions principales ont alors été à l'origine de mon travail de thèse. Nous avons voulu savoir *i*) comment se faisait la répression de l'expression d'*ARC1* en respiration et si, *ii*) au cours de cette baisse d'Arc1p, la MRS était elle aussi relâchée du complexe et se relocalisait dans un autre compartiment (mitochondrie, noyau...) de la cellule. Dans l'hypothèse où la MRS se relocaliserait dans un autre compartiment, notre objectif était également d'identifier la ou les différente(s) fonction(s) que cette aaRS pouvait y exercer.

Nous avons tout d'abord tenté d'identifier la voie de régulation qui permet de réprimer la transcription du gène *ARC1* en respiration. Pour cela nous avons analysé par RT-qPCR les variations du taux d'ARN messager (ARNm) d'*ARC1* tout au long de la croissance d'une levure (fermentation – transition diauxique – respiration). Ensuite nous avons fait la même analyse à l'aide de souches viables (en respiration) privées de gènes codants des facteurs de transcription connus pour être impliqués dans l'adaptation de la levure au changement de substrat carboné. De cette manière, nous avons comparé ces résultats pour identifier quels facteurs de transcription étaient responsables de l'expression d'*ARC1*, et pu en déduire la cascade d'événements qui entraîne sa répression en respiration. Pour compléter cette étude nous avons suivi la variation du taux de protéine dans la levure au cours de sa croissance par cytométrie en flux, à l'aide d'une souche de levure exprimant au génome la protéine de fusion Arc1p-GFP. Cette étude m'a permis de montrer qu'en fermentation, les facteurs de transcription Mig1p/Hxk2p participent à la transcription du gène *ARC1*. En respiration, le complexe Snf1/4 se lie à Gal83p pour être importé dans le noyau où la kinase Snf1p inactive Mig1p/Hxk2p par phosphorylation, ce qui entraîne une forte diminution de la transcription d'*ARC1*. Cette diminution est suivie par une baisse du taux d'Arc1p dans la cellule.

La relocalisation éventuelle de la MRS a été étudiée de deux manières. Nous avons tout d'abord observé par microscopie confocale une souche exprimant au génome la protéine de fusion MRS-GFP et comparé la localisation de la MRS-GFP après croissance en fermentation et en respiration. Nous avons ensuite confirmé ces résultats par immuno-détection après transfert de protéine sur membrane de PVDF, à la suite d'une purification des organites de cette souche poussée en fermentation et en respiration. Cette analyse m'a permis de montrer qu'en respiration, la MRS relâchée du complexe AME se relocalise dans les noyaux des cellules de levure.

Afin de déterminer si le désassemblage du complexe AME et la relocalisation synchrone des deux aaRSs dans leurs compartiments respectifs était essentielle pour la cellule, nous avons mis au point une stratégie s'inspirant du dominant négatif. En exploitant les données structurales publiées montrant l'interaction des domaines N-terminaux (N-ter) des composants du complexe AME (Simader et al., 2006) nous avons créé 4 souches différentes : (1) une souche **ARC**, exprimant de manière constitutive *ARC1*, et ce indépendamment du métabolisme de la levure et qui retient donc constamment la MRS et l'ERS dans le cytoplasme; (2) une souche **nE** dans laquelle la MRS est constamment retenue dans le cytoplasme alors que l'ERS est constitutivement relâchée. Cette souche a été créée à partir de la souche **ARC** dans laquelle le domaine N-ter de liaison de l'ERS à Arc1p est exprimé de manière constitutive, permettant de libérer l'ERS endogène par compétition pour la liaison à Arc1p ; (3) une souche **nM** où inversement, l'ERS est constamment retenue dans le cytoplasme alors que la MRS est constitutivement relâchée. Cette souche a été créée à partir de la souche **ARC** dans laquelle le domaine N-ter de liaison de la MRS à Arc1p est exprimé de manière constitutive, permettant de libérer la MRS endogène par compétition pour la liaison à Arc1p. (4) une souche **nE/nM** dans laquelle les deux aaRSs ne sont plus retenues par Arc1p. Cette souche a été créée à partir de la souche **nE** dans laquelle le domaine N-ter de liaison de la MRS à Arc1p a été également exprimé de manière constitutive. Ces différentes souches ont ensuite été mises en croissance sur milieu fermentaire et respiratoire, nous donnant ainsi une indication sur la viabilité de nos constructions. Afin de vérifier que notre système de compétition intracellulaire pour Arc1p fonctionne, nous avons effectué plusieurs expériences contrôles. La liaison à Arc1p des fragments de l'ERS et de la MRS a été confirmée par chromatographie en Gel-filtration couplée à des mesures des activités d'aminacylation de la MRS et de l'ERS. *In vivo*, la relocalisation des aaRSs a été vérifiée, pour chaque souche, par purification des organites (mitochondries et noyaux) et par immuno-détection après transfert des protéines sur membrane de PVDF. L'analyse de la capacité des différentes souches: sauvage, **ARC**, **nE**, **nM** et **nE/nM**, à croître en milieu respiratoire, nous a permis de comprendre que c'est la synchronicité du relarguage et de la relocalisation des deux aaRSs qui est un élément crucial lors de la transition diauxique. En effet, parmi les 4 souches que nous avons créées seules 2 (**nE** et **nM**) sont désynchronisées et se sont ces souches **nE** et **nM** qui présentent un défaut respiratoire. La souche **nM** en particulier est incapable d'effectuer plus de deux générations en milieu respiratoire.

L'ensemble de ces souches (sauvages, **ARC**, **nE**, **nM** et **nE/nM**) a donc fait l'objet d'une étude comparative approfondie de leurs fonctions respiratoires. Différentes approches ont été utilisées comme l'analyse de la composition des complexes de la chaîne respiratoire en gel de polyacrylamide en condition native (BN-PAGE), la mesure de l'activité de ces complexes respiratoires et la production d'ATP par l'ATPase (complexe V) ou encore la mesure de l'efficacité de la traduction *in organello*. Dans le but de comprendre certains défauts que nous observions, nous avons également entrepris une étude plus approfondie, par microscopie électronique et immunomarquage couplée à des billes d'or. Pour compléter cette analyse, nous avons suivi la production d'éthanol dans différentes souches au cours de leurs croissances.

Cette analyse approfondie a montré qu'en forçant la MRS à être importée dans le noyau tout en retenant l'ERS dans le cytosol (souche **nM**), la transcription de l'ensemble des gènes des sous-unités du complexe III était augmentée alors que celle du gène codant Atp1p (sous-unité de la tête catalytique F_1 de l'ATPase) était réprimée. Cette répression induit un défaut d'assemblage des sous-unités Atp2p et Atp3p du domaine F_1 l'ATPase. Nous avons observé par microscopie électronique et marquage par immunogold, qu'Atp2p ne pouvant s'assembler avec ses partenaires forme des corps d'inclusion dans la mitochondrie, et qu'Atp3p est vraisemblablement dégradée par le protéasome mitochondrial. En parallèle de ces défauts d'expression et d'assemblage de sous-unités du F_1 de l'ATP synthase, l'absence de l'ERS dans la mitochondrie (car elle est retenue à Arc1p dans la souche **nM**) engendre une baisse drastique et ciblée des sous-unités Atp9p et dans une moindre mesure Atp8p, deux sous-unités essentielles du rotor F_0 de l'ATPase. Nous avons essayé de comprendre pourquoi cette rétention de l'ERS dans le cytoplasme, qui entraîne bien évidemment globalement la traduction mitochondriale conduit également à une diminution ciblée de la synthèse d'Atp9p et d'Atp8p. Cela est notamment dû au fait que ces deux gènes se distinguent des autres gènes codés par le génome mitochondrial par un nombre élevé de codons glutamine et par une localisation de ces codons à des positions stratégiques pour une lecture efficace par le mitoribosome.

La souche **nM** se caractérise donc par une absence quasi-complète des 2 domaines de l'ATPase, le rotor F_0 et la tête catalytique F_1 , et par la maintenance anormalement élevée du complexe III. Nous avons pu mettre en évidence que c'est bien la diminution drastique de la production d'ATP qui est à l'origine de la létalité de la souche **nM** en respiration puisqu'en empêchant l'expression d'Atp1p d'être sous la dépendance de la MRS (changement de promoteur) les cellules de la souche **nM** sont capables à nouveau de respirer.

Cette étude montre que la dynamique du complexe AME participe au dialogue entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial qui permet de coordonner l'expression et l'assemblage des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Ce dialogue est indépendant de signaux provenant des organites, et est directement relié au métabolisme de la levure. En effet c'est *via* les

voies de perception du glucose que se fait la régulation d'*ARC1* et donc la rétention des aaRSs dans le cytoplasme. Cette étude a également démontré que ce MSC de levure, à l'instar des autres complexes déjà identifiés, est dynamique et qu'il joue également le rôle d'une plateforme de rétention pour des aaRSs qui exerceront des fonctions alternatives lorsqu'elles seront relâchées du complexe. Ces rôles additionnels sont ceux d'un facteur de transcription pour la MRS nucléaire et d'un régulateur global de la traduction mitochondriale pour l'ERS. Enfin, cette étude a révélé un aspect tout à fait nouveau concernant la dynamique des MSC. Contrairement au MSC des mammifères où la libération des aaRS ne se fait généralement qu'après phosphorylation de l'aaRS qui sera libérée, dans le MSC de levure la libération et relocalisation des deux aaRSs dans leurs compartiments respectifs s'effectue par une baisse de l'expression de la protéine d'assemblage du complexe.

II.2 Article 1 : Expression of nuclear and mitochondrial genes encoding ATP synthase is synchronized by disassembly of a multisynthetase complex

Manuscrit actuellement en revision dans la revue Molecular Cell : MOLECULAR-CELL-D-13-01774

Expression of nuclear and mitochondrial genes encoding ATP synthase is synchronized by disassembly of a multisynthetase complex

Mathieu Frechin^{1,5†*}, Ludovic Enkler^{1*}, Emmanuel Tetaud^{2,6*}, Daphné Laporte¹, Bruno Senger¹, Corinne Blancard^{2,6}, Philippe Hammann³, Gaétan Bader¹, Sandra Clauder-Münster⁴, Lars Steinmetz⁴, Robert Pierre Martin¹, Jean-Paul di Rago^{2,6‡} and Hubert Dominique Becker^{1†‡}

¹UMR ‘Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie’, CNRS, Université de Strasbourg, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. ²Université Victor Segalen Bordeaux 2, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS, UMR5095, 1, rue Camille Saint Saëns, 33077, Bordeaux Cedex, France. ³Plateforme Protéomique de l’Esplanade, Université de Strasbourg, CNRS- FRC1589, IBMC, 15 Rue René Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex, France. ⁴European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Genome Biology Unit, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany. ⁵UPR ‘Architecture et Réactivité de l’ARN’, Université de Strasbourg, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15, Rue René Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex, France. ⁶Université Bordeaux Ségalen, 146 rue Léo Saignat, F-33077 Bordeaux, France

† Correspondence to:

Pr. Hubert Becker

Tel: +33 (0)3 68 85 14 70

Fax: +33 (0)3 88 65 13 65

Email: h.becker@unistra.fr

Dr. Mathieu Frechin

Tel: +41 44 63 53 101

Fax: +41 44 63 56 811

Email: mathieu.frechin@uzh.ch

Present address: Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland

* Contributed equally to the work

‡ Contributed equally to the work

Running title: Synchronization of respiratory chain and ATP synthase subunits expression

Key words: nucleus-mitochondria inter-genomic crosstalk, synchronization of gene expression, OXPHOS complexes, F₁F₀ ATP synthase, Snf1/4 kinase, aminoacyl-tRNA synthetase complex, Arc1p, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

In eukaryotic cells, oxidative phosphorylation involves multisubunit complexes of mixed genetic origin. Assembling these complexes requires an organelle independent synchronizing system for the proper expression of nuclear and mitochondrial genes. Here we show that proper expression of the F₁F₀ ATP synthase (complex V) depends on a cytosolic complex (AME) made of two aminoacyl-tRNA synthetases (cERS and cMRS) attached to an anchor protein, Arc1p. When yeast cells adapt to respiration the Snf1/4 glucose-sensing pathway inhibits *ARC1* expression triggering simultaneous release of cERS and cMRS. Free cMRS and cERS relocate to the nucleus and mitochondria, respectively, to synchronize nuclear transcription and mitochondrial translation of ATP synthase genes. Strains releasing asynchronously the two aminoacyl-tRNA synthetases display aberrant expression of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of complex V resulting in severe defects of the oxidative phosphorylation mechanism. This work shows that the AME complex coordinates expression of enzymes that require intergenomic control.

Highlights

- 1. The Snf1/4 pathway triggers synchronous disassembly of the AME complex in respiration**
- 2. In respiration cERS and cMRS relocate to mitochondria and nucleus respectively**
- 3. Desynchronized AME complex disassembly causes aberrant F₁F₀ ATP synthase assembly**
- 4. Expression of nuclear and mitochondrial respiratory genes are regulated by cERS and cMRS**

Introduction

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) constitute a family of ubiquitous enzymes essentially known for their primary function in protein synthesis through tRNA aminoacylation (Söll and Schimmel, 1974). In recent years, many aaRSs have been found to perform additional and equally crucial tasks through recruitment of various functional modules during evolution (Ibba and Söll, 2000; Schimmel and Ribas De Pouplana, 2000; Brown et al., 2010). These non-canonical functions of aaRSs include cellular processes that exploit their primary aa-tRNA synthesizing function like amino acid or cell wall synthesis (Roy et al., 2003; Stewart et al., 1971). Other unconventional functions have been associated to a distinctive feature of aaRSs in higher eukaryotes, their capacity to assemble into large multisynthetase complexes (MSC) (Negrutskii et al., 1994; Kaminska et al., 2009) and perform additional tasks (Guo and Schimmel, 2013; Guo et al., 2010; Park et al., 2008). The concept has emerged during the last decade that MSCs are reservoirs for releasable and multifunctional aaRSs (Ray et al., 2007; Park et al., 2008; Hausmann and Ibba, 2008). Sequestration inside MSCs confines aaRSs' activities to their primary role of tRNA aminoacylation while they can carry out alternative regulatory roles upon release (Sampath et al., 2004; Park et al., 2008).

A cytosolic MSC, that we named AME, has been found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It is made of a cytosolic glutamyl- (cERS) and a cytosolic methionyl-tRNA synthetase (cMRS) bound to the anchor protein Arc1p, initially described as a cofactor of tRNA nuclear export (Simos et al., 1996). Recently, we discovered that upon switching from fermentation to respiration, expression of Arc1p is strongly decreased, generating free cERS molecules that are then imported into mitochondria. Inside mitochondria, cERS mischarges the mitochondrial tRNA^{Gln} (_mtRNA^Q), which is then converted into glutaminyl-tRNA^{Gln} (Q-

mtRNA^{Q}) by the GatFAB, the mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase (AdT) (Frechin et al., 2009). As there is no other source of $\text{Q-mtRNA}^{\text{Q}}$ in mitochondria, cERS is essential to translate proteins encoded by the mitochondrial genome (mtDNA).

In every eukaryote, the main function of the mtDNA is the production of a few proteins involved in mitochondrial ATP production through the process of oxidative phosphorylation (OXPHOS). These proteins assembled with nuclear-encoded proteins into four complexes (I, III, IV, V) embedded within the mitochondrial inner membrane. Complexes I-III, together with complex II that has a pure nuclear origin, transfer electrons to oxygen coupled to proton translocation across the inner membrane. The resulting transmembrane proton gradient is used by the ATP synthase (complex V) to synthesize ATP from ADP and inorganic phosphate. In the yeast *S. cerevisiae*, seven OXPHOS subunits are encoded by the mtDNA: the complex III cytochrome *b* subunit, three complex IV subunits (Cox1p, Cox2p, Cox3p) and three ATP synthase subunits (Atp6p, Atp8p, Atp9p) (summarized in Figure S3A).

Due to the dual genetic origin of the OXPHOS system, a coordinated expression of its nuclear DNA- (nDNA) and mtDNA-encoded components is of crucial importance to avoid accumulation of unassembled OXPHOS subunits or partial assembly intermediates, which may have detrimental consequences. For instance, if the F_O proton-translocating domain of ATP synthase is not properly connected to the F_1 sector of this enzyme where the ATP is synthesized, this could result in proton leaks through the inner membrane (duvezin-caubet et al. 2003). Although the assembly of the mitochondrial OXPHOS system has been extensively studied (Ackerman and Tzagoloff, 2005; Fox, 2012), mechanisms that ensure a synchronized expression of its nDNA- and mt-DNA encoded subunits have thus far not been described.

Here we show that the Snf1/4 glucose-sensing pathway regulates the assembly/disassembly of the AME complex in response to the respiratory needs of the cell by

shutting off expression of the Arc1p anchor upon shift to respiratory metabolism. This is the first example of an MSC able to release multiple aaRSs in a synchronized fashion. We further show that the release of cMRS and cERS from Arc1p is followed by the relocation of the two aaRSs into the nucleus and mitochondria, respectively. Interestingly, strains unable to release synchronously the two aaRSs display aberrant expression of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of the F₁ and F₀ domains of ATP synthase. These results indicate that the AME system allows the cells to coordinate the expression of genes located in the nucleus and mitochondria.

Results

Diauxic shift triggers Arc1p down-regulation and relocation of cERS and cMRS to the mitochondria and the nucleus respectively

Saccharomyces cerevisiae ferments glucose into ethanol and carbon dioxide (first exponential phase, Figure 1A) (Otterstedt et al., 2004). Then low glucose triggers a molecular and cellular remodelling program called diauxic shift (DS) allowing cells to metabolise non-fermentable carbon sources like ethanol, glycerol and lactate through oxidative phosphorylation (second growth phase, Figure 1A) (Zaman et al., 2008). Reverse transcription real-time PCR (RT-qPCR) shows that *ARCI* transcript decrease during the DS, while those of cERS (*GUS1*) and cMRS (*MES1*) remain unchanged (Figure 1B). As a result, Arc1p accumulation is decreased by 90% (Figure 1C, inset into Figure 1C, Figure S1A-S1F). To know how *ARCI* expression is modulated, we analysed *ARCI* mRNA levels in strains deleted for genes controlling the three major nutrient-sensing pathways, Snf1/4, TOR- and PKA (Zaman et al., 2008) (Table S1). Relative RT-qPCR quantification showed that the Snf1 kinase, the nuclear-import factor Gal83 and the Mig1•Hxk2 transcription factor complex are

required to repress *ARC1* transcription upon switch to respiration (Figure 1D, Table S2 and Figure S1G (Hedbacker et al., 2008)). Fitting our data into the well-established Snf1/4 network (Figure S1G) (McCartney et al., 2001, Zaman et al., 2008) suggests that transcription of *ARC1* is activated by Mig1•Hxk2 (Santangelo et al., 2006; Schuller et al., 2003) (Figure 1E) whereas repression results from activation of the Snf1/4 complex and nuclear exclusion of Mig1•Hxk2 (Figure 1F).

Out of the three AME complex components, only Arc1p is subjected to a major down regulation at the DS (Figure 1B-1D, Figure S1F, Table S2; Frechin et al., 2009). As a consequence, the proportion of free cERS and cMRS, *i.e.* unbound to Arc1p, increases drastically. We previously showed that free cERS largely relocates to mitochondria (Figure 2A; Frechin et al., 2009). To determine the fate of free cMRS, we compared by confocal microscopy the distribution of a cMRS-GFP fusion under its endogenous promoter in fermenting and respiring yeast cells. The fusion protein co-localized with Hoechst-stained nuclei in respiring cells but not in fermenting cells (Figure 2B). Using anti-cMRS antibodies, nuclear accumulation of cMRS was estimated as 15-fold more important in respiring *vs.* fermenting cells (Figure 2C). The first 55 amino acids of cMRS harbour a bi-partite nuclear localization signal responsible for this nuclear relocation (Figure 2D). Indeed, when GFP was fused to this sequence it entirely relocated to the nucleus (Figure 2D). Interestingly, the RNA Pol II regulatory components Rpb1 and -7 co-eluted with cMRS in tandem affinity purification of nuclear extracts (Figure 2E, Figure S2A and S2B), indicating that the purpose of the nuclear relocation of cMRS in respiring yeast cells might be to modulate the expression of nuclear genes.

Construction of strains with a desynchronized assembly/disassembly of AME

To evaluate the biological role of the synchronized disassembly of AME at the DS, we constructed the following strains: (i) ARC, in which both cMRS and cERS remain largely anchored to Arc1p regardless of the metabolic state of the cell, (ii) nE/nM, in which most cERS and cMRS are always free, (iii) nE, in which release of cERS is constitutive while cMRS remains largely bound to Arc1p, and (iv) nM, in which most of cERS is retained in the cytosol by Arc1p while cMRS is permanently released (Figure 2F, see Material and methods). These four strains can be split in two sets of strains, one composed of the ARC and nE/nM strains, in which we can evaluate the effect of the simple release or sequestration of both aaRSs; and one composed of the nE and nM strains in which we can assess the effect of the desynchronized release of either one or the other aaRS. They were obtained by rendering the expression of Arc1p constitutive (Figure S2C), and using plasmids expressing peptides that correspond to the N-terminal Arc1p-binding domain of cERS or cMRS (Simader et al., 2006) to prevent the full length aaRSs to bind to Arc1p (see Materials and Methods). The expected distribution of cMRS and cERS in cells of these strains was confirmed by: (i) size-exclusion chromatography of total cellular extracts coupled to measurements of tRNA aminoacylation activities mediated by cMRS and cERS (Figure 2G), and (ii) western blotting of nucleus- and mitochondria-enriched fractions respectively (Figures 2H and -2I, Figure S2D).

Influence of desynchronized AME disassembly on mitochondrial function.

The ARC, nE/nM, nE, and nM strains grew well on fermentable carbon sources (glucose and galactose; Figure 3A and -3B left panels). On respiratory carbon sources (glycerol, glycerol/ethanol, lactate), growth of the nM strain was severely compromised whereas the three others grew relatively well with respect to WT (Figure 3A and -3B right panels, Figure S3B and S3C). The respiratory deficiency of the nM strain was further confirmed by its inability to consume ethanol produced during growth on galactose (Figure 3C and 3D). Upon additional overexpression of the N-terminal Arc1p binding domain of

cERS in the nM strain (yielding the nE/nM Strain), efficient respiratory growth was restored (Figure 3B), suggesting that resynchronizing the release of both aaRSs is vital when yeast cells switch to the respiratory metabolism. Moreover, the overexpression of the N-terminal Arc1p binding domain of cMRS alone in a WT or *arc1Δ* strain did not alter growth in respiration (Figure S3D). Therefore when both aaRSs are retained by Arc1p or permanently released from it, the respiratory growth is not significantly impacted. The same holds when cMRS is retained on Arc1p while cERS is free. The most severe impact was observed when cMRS alone was allowed to reach the nucleus while cERS cannot relocate to mitochondria (nM strain, Figure 3A).

Biochemical analysis of mitochondria was required to better evaluate the consequences on mitochondrial function of disturbing the AME complex disassembly. Mitochondria were prepared from cells grown in galactose, which is a fermentable substrate that does not elicit repression of mitochondrial function (Polakis et al., 1965, Ostergaard et al., 2000). We first measured oxygen consumption of the mitochondria using NADH as an electron donor, at state 3 (*i.e.* in the presence of ADP, phosphorylating conditions), state 4 (*i.e.* without addition of ADP, basal respiration), and in the presence of the membrane potential uncoupler CCCP (*i.e.* conditions at which respiration is at its maximum). Oxygen consumption was also measured using ascorbate/TMPD that delivers electrons directly at the level of cytochrome *c* oxidase (complex IV). With respect to the WT, the respiratory activity was diminished by 15% in the ARC strain, increased by 5-10% in the nE and nE/nM strain, whereas a 40-50% deficit was measured in the nM strain (Figure 3E). In all strains, respiration was efficiently (3-4 fold) stimulated by CCCP, indicating a normal passive permeability to protons of the mitochondrial inner membrane.

We measured the rate of ATP hydrolysis in permeabilized mitochondria (Figure 3F). Most (70-90%) of this activity is normally sustained by the F₁ component of the ATP

synthase. Mitochondrial ATPase activity was normal in the ARC, nE and nE/nM strains, and was efficiently inhibited by oligomycin, a specific inhibitor of the proton-translocating domain of ATP synthase, from which it can be inferred that F₁ and F₀ are correctly coupled in these strains (Figure 3F). In the nM strain, mitochondrial ATPase activity was also sensitive to oligomycin, but was strongly reduced by 85% with respect to the WT (Figure 3F). We next analyzed the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) by fluorescence quenching of rhodamine 123. $\Delta\Psi$ was efficiently maintained by the proton-pumping activity of the respiratory chain (RC) in all strains (Figure 3G). A correct energization of the inner membrane by the proton pumping activity of the ATP synthase coupled to F₁-mediated ATP hydrolysis was also observed but only in the ARC, nE and nE/nM strains. The inability of the nM strain to energize the membrane with ATP is consistent with its low F₁-ATPase activity.

Finally, we probed the capacity of the different strains to assemble the OXPHOS complexes by BN- and SDS-PAGE analyses. These complexes were present in normal amounts in ARC, nE and nE/nM strains, whereas the nM strain had a strongly reduced content in fully assembled ATP synthase (Figure 4A). This defect correlates with low steady-state levels of some ATP synthase subunits, like Atp1p (α -F₁) and Atp9p (Figure 4B and -S4A). The protein partner of Atp1p, the β -F₁ subunit of ATP synthase (Atp2p), showed a normal accumulation. Since unassembled Atp2p has a strong propensity to aggregate, it was expected to find aggregates of this protein in the nM strain because of its reduced content in Atp1p. Indeed, large matrix-localized inclusion bodies that strongly reacted to gold-conjugated antibodies directed against Atp2p (Figure 4C-J Figure S4B right and left panels) and that were not labeled with antibodies against Atp1p (Figure S4C) were observed in the nM strain.

Influence of desynchronized AME disassembly on mitochondrial and nuclear gene expression.

[³⁵S]-L-methionine pulse labeling on cycloheximide-treated cells grown on galactose was performed to evaluate the capacity of the AME modified strains to synthesize the proteins encoded by the mtDNA. A striking feature of the nM strain was a strong decrease in Atp9p synthesis (Figure 5A), whereas the other strains did not show any defect in mitochondrial translation (Figure 5A). These results indicated that the low content of Atp9p in the nM strain is possibly due to a poor synthesis of this protein. We also investigated mitochondrial translation in pure respiratory conditions, six hours after switching the cells in a glycerol/ethanol medium (Figure 5B and -S5A). In these conditions, the nM strain showed a strong and general decrease in mitochondrial protein synthesis, which is possibly due to the very poor capacity of this strain to produce ATP by oxidative phosphorylation (when grown in galactose they can produce ATP by fermentation, Figure S5B). Interestingly, with respect to the WT, the rate of mitochondrial translation was increased by 40% and 54% in respiring nE and nE/nM cells respectively, which may be due to their higher mitochondrial content in cERS (Figure 5B).

As for Atp9p, the reduced accumulation of Atp1p in the nM strain was apparently due to a decreased rate of synthesis of this protein. Indeed, *ATP1* transcripts were much less (5-fold) abundant in this strain with respect to the WT (Figure 5C, Table S3). Although accumulation of the Atp3p subunit of ATP synthase was reduced in the nM strain, *ATP3* transcripts accumulated normally. This indicates that Atp3p is more susceptible to proteolytic degradation, as was observed in other mutants unable to assemble the F₁ (Lefebvre-Legendre et al., 2001). Consistent with the normal accumulation of Atp2p in the nM strain, accumulation of the *ATP2* transcripts was unaltered with respect to WT.

A strong F₁ defect like the one observed in the nM strain normally leads to low contents in complexes III and IV (Couplan et al., 2011), which is believed to reflect a regulatory mechanism that balances the expression of ATP synthase and respiratory enzymes.

In one such mutant (*fmc1Δ*), we found that most of the nuclear-encoded subunits of these complexes are poorly expressed (Couplan et al., 2011). Intriguingly, many of the nuclear transcripts encoding complex III subunits were not down- but instead up-regulated in the nM strain compared to the ARC strain (up to 10-fold, see Figure 5D) while they are down-regulated in the nE or ARC strains as compared to WT (Figure 5E), and those of complex IV subunits were not affected (Figure S5C, Table S4-S6). These data may explain why the nM strain retains a good content in respiratory enzymes despite its major defect in F₁.

Ectopic expression of ATP1 alleviates the respiratory phenotype of the nM strain

Since the most striking effects in the nM strain were a compromised expression of Atp1p and Atp9p, we aimed to know if ectopic versions of their genes, *i.e.* no longer under their normal regulatory sequences, could restore the respiratory function in this strain. For these experiments, we used an *ATP1* gene under the dependence of the *PGK* promoter and a nuclear version of the mitochondrial *ATP9* that can complement a strain lacking this gene (Bietenhader et al. 2012). Ectopic expression of Atp1p restored the ability of strain nM to grow on respiratory substrates (Figure 6A), whereas the nuclear *ATP9* gene was unable to do so (Figure 6A). The ATP synthase subunits that were in decreased amounts in the nM strain became more abundant with the ectopic *ATP1* gene (Figure 6B), the synthesis of Atp9p in mitochondria was improved (Figure 6C) and less Atp2p inclusion bodies were found in cells (Figure 6D, S6B). These results indicate that the main factor responsible for the respiratory deficiency of the nM strain is a defective expression of Atp1p. Around 70% of wild type Atp1p amounts in the nM strain are able to restore equivalent levels of Atp3p, -4p and -9p, while allotopic Atp9p expression fails to do so (Figure 6B). These results are further confirmed using [³⁵S]-L-methionine pulse labeling of mitochondrial proteins from cycloheximide-treated cells. Equivalent amounts of radiolabeled proteins from each strain

grown in SCGal 2% were used in order to be independent of global mitochondrial translation, separated by SDS-PAGE and subjected to autoradiography (Figure 6C). In this experiment we observe that expression of Atp1p restores Atp6p, -8p and -9p levels while allotopically expressed Atp9p does, by far, not accumulate to the wild type level. Finally, Atp1p ectopic expression reduces the number of Atp2p-containing inclusion bodies found in the nM mitochondria in agreement with the restoration of the required stoichiometry between the α -F₁ (Atp1p) and β -F₁ (Atp2p) subunits of the F₁ domain of ATP synthase (Figure 6D).

Strikingly, re-synchronizing the mitochondrial import of cERS with the nuclear import of cMRS (from nM to nE/nM strain) results in a suppression of the nM respiratory defects comparable to that obtained by ectopic expression of Atp1p (Figure 4B and -4G, Figure 3B-G) and restores global mitochondrial translation of the nM strain (Figure 5A and -5B, Figure S5B). A recent study demonstrated that F₁ promotes F₀ mitochondrial translation (Rak and Tzagoloff., 2009). Thus the very low mitochondrial translation in the nM strain due to the confinement of cERS in the cytoplasm and low Atp1p expression, result in a too weak F₀ translation to allow sufficient ATP synthase assembly and activity. Consequently, there are two ways to complement the respiratory growth phenotype of the nM strain, first re-expressing Atp1p and as a consequence F₀ expression, or second, a general increase of mitochondrial translation by releasing cERS (nE/nM strain) to restore sufficient F₀ levels to sustain ATP synthase assembly and function.

Discussion

Multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes (MSC) have been found in all eukaryotes studied so far including fungi (Simos et al., 1996), unicellular parasites (Cestari et al., 2013; van Rooyen et al., 2014), worms (Havrylenko et al., 2011) and mammals (Bandyopadhyay and Deutscher, 1971). Investigations carried out to find a functional rationale for the accretion of aaRSs and auxiliary proteins into MSCs were so far only

restricted to the mammals although the rationale for their existence is still unclear, they seem to be dynamical edifices releasing aaRS able to exert other functions than tRNA charging upon release.

The present study reveals that the yeast MSC named the AME complex is also dynamic: at the diauxic transition, its two aaRSs components (cERS and cMRS) are released due to a strong down regulation of the anchor protein Arc1p by the glucose-sensing Snf1/4 pathway (Figure 1B-F). We show that released cERS and cMRS partially relocate into mitochondria and the nucleus, respectively (Figure 2A-D). We further showed that in the nucleus cMRS regulates transcription of some genes of the OXPHOS, and that cERS activates mitochondrial translation upon import (Figure 7). This is the only known case of a synchronized release of multiple aaRSs from a MSC and subsequent relocation to two distinct cellular compartments, nucleus and mitochondria.

In mammals, the accretion of aaRSs into MSCs has no effect on their tRNA charging efficiency and specificity (Mirande et al., 1983). On the opposite, *S. cerevisiae* cMRS and cERS are respectively 500- and 10-fold more efficient in tRNA charging when assembled into the AME complex than in free forms (Simos et al., 1996; Graindorge et al., 2005). Since generation of the initiator Met-tRNA^{Met} by cMRS is a rate-limiting step in protein synthesis, the disappearance of Arc1p at the DS should decrease the rate of cytosolic protein synthesis. Since respiring yeast cells grow much (3-fold) slower than fermenting cells, the former necessarily synthesize proteins at a slower rate than the latter. Whether this adaptation of the rate of protein synthesis to the metabolic state of the cell involves a reduction in the tRNA charging activities of cMRS and/or cERS caused by the disassembly of the AME complex is an interesting hypothesis. It was shown that the rapid inhibition of protein synthesis following glucose depletion is controlled by several transcription factors among which Hxk2p, one of the two transcription factors also inhibiting *ARC1* transcription (Ashe et al. 200). This

suggests that the AME complex dynamics participate to the intimate connection existing between the metabolic status of the yeast cell and its translational activity.

A key feature of the DS is the induction of a profound remodeling of the cellular proteome with a strong enrichment in hundreds of mitochondrial proteins that become essential to provide energy (Haurie et al. 2003). We hypothesized that the AME complex might be involved in this cellular reprogramming. Indeed, upon release from Arc1p, cERS is partly imported into mitochondria where, together with the GatFAB tRNA-dependent amidotransferase (AdT), it generates the mitochondrial Q-mtRNA^Q necessary for mitochondrial protein synthesis (Frechin et al. 2009). Given that Q-mtRNA^Q can only be formed by this pathway, the glucose-dependent expression of *ARC1* might thus provide a means to regulate the rate of mitochondrial translation according to the metabolic state of the cell by modulating the amounts of cERS in mitochondria. Consistent with this, the rate of mitochondrial translation was significantly increased (by 50%) when cERS was prevented to interact with Arc1p by the competitive binding of peptides that correspond to the N-terminal Arc1-binding domain of cERS (Figure 5B).

Stimulating mitochondrial function at the DS requires also nuclear gene expression modifications, which is notably mediated by the yeast HAP transcriptional factor that modulates the expression of hundreds of mitochondrial proteins encoded in the nuclear genome. Considering that cMRS and cERS are synchronously released from Arc1p at the DS, and that released cMRS partly relocates to the nucleus, we suspected that cMRS could also play a role in adapting nuclear gene expression when yeast cells rely on their mitochondria to meet their ATP requirements.

To test this hypothesis we engineered strains allowing us to modify the binding and release of cMRS and cERS to/from Arc1p (Figure 2F-I) and determined how such modifications impact mitochondrial function (Figure 3-5). When release of both aaRSs was

blocked by rendering Arc1p's expression constitutive (ARC strain), no major defects in the energy-transducing activity of mitochondria were observed. Since inactivation of mitochondrial translation in yeast leads to the loss of functional mtDNA (Barros et al., 2011), it can be inferred that the ARC cells still import enough cERS molecules into their mitochondria to maintain an efficient organellar protein synthesis activity. Not surprisingly, no deleterious effects on mitochondrial function were observed when both aaRSs were prevented to interact with Arc1p by the simultaneous competitive binding of peptides that correspond to their respective N-terminal Arc1p-binding domains (nE/nM strain), which in fact mimics what normally occurs in yeast cells adapting to respiration.

We then tested the consequences of a desynchronized release of cMRS and cERS from Arc1p. When cMRS only was retained by Arc1p, the cells kept an almost normal respiratory capacity (nE strain). However, when cMRS was allowed to reach the nucleus while cERS was mostly retained in the cytosol (nM strain), mitochondrial function was severely compromised due to a strong and selective decrease in ATP synthase content (Figure 3A-G and Figure 4A and -4B). These results indicate that the role of the AME complex is not restricted to a general control of mitochondrial function according to the metabolic state of the cell, but seems to have also a more specific action in ATP synthase biogenesis. It also shows that the synchronicity of the release is essential when adapting to respiration (Figure 3A and -3B).

The ATP synthase defect in strain nM apparently resulted from a concomitant failure to express two of its subunits, Atp9p (Figure 4B and -5A) and Atp1p (Figure 4B), which belong respectively to the F_O proton-translocating domain and the F₁ catalytic sector of the enzyme. Atp9p is mitochondrially encoded (Figure S3A) and is present in 10 copies (8 in mammals) per F_O domain. It forms a ring in the inner membrane that is involved in proton translocation coupled to the generation of a mechanical force that is used to promote ATP synthesis in the F₁. Atp1p is nuclear-encoded (Figure S3A) and is present in three copies that

together with three Atp2 subunits form the catalytic core of F₁. All the other ATP synthase subunits are in only one copy.

Somewhat remarkably, expression of an ectopic *ATP1* gene under the control of the promoter of the constitutively expressed *PGK1* gene was able to restore substantially Atp9p synthesis and respiratory competence in strain nM (Figure 6A, -6B and -6C). These results, together with our transcriptomic data (Figure 5C and Table S6) indicate that *ATP1* is a main and quite specific target controlled by AME. The restoration of Atp9p synthesis indicates that the down regulation of this protein in the nM strain may simply be a secondary consequence of the failure to express *ATP1*. However previous studies have shown that yeast strains lacking *ATP1* (*atp1*Δ) are able to synthesize Atp9p. Instead, *atp1*Δ strains fail to express the two other mitochondrial ATP synthase genes, *ATP8* and *ATP6*, due a translational block (Rak et al., 2009a). The proteins encoded by *ATP6* (Atp6p) and *ATP8* (Atp8p), like Atp9p, are essential for the proton translocating function of F_O (Rak et al., 2009b). It has been proposed that their F₁-mediated translational control provides a means to avoid accumulation of free F_O particles, which could otherwise have dramatic consequences by dissipating the mitochondrial membrane potential (Rak et al., 2009a). It seems thus unlikely that the block in Atp9p synthesis in the nM strain is simply due to the failure to express *ATP1*, but is rather a direct consequence of the desynchronized disassembly of AME.

It is interesting to note that the enzymatic partner of cERS in mitochondria, the GatFAB AdT seems to have also a specific action in the expression of ATP synthase in addition to its conventional role in mitochondrial translation. Indeed, mutations in the GatF subunit of GatFAB can impair respiratory growth by specifically blocking Atp8p translation, a defect that could be suppressed by a nuclear version of the *ATP8* gene (Barros et al., 2011). This defective expression of Atp8p was ascribed to misincorporation of glutamate residues at glutamine codons followed by a rapid degradation of the aberrant protein. The *ATP8* ORF has

a high content in glutamine codons (6.3 %, Table S7), one of which is in third codon position of the mRNA. The early placement in mRNAs of codons for which the amounts of corresponding aa-tRNA species is insufficient is especially detrimental to ribosomal elongation (Cannarozzi et al., 2010; Tuller et al., 2010), which may explain the strong dependency of *ATP8* mRNA translation towards the cERS-AdT pathway. While Atp9p has a moderate content in glutamine (1.3 %, Table S7), it is to be noted that a glutamine codon immediately follows the initiator methionine and that this protein is in 10 copies in the ATP synthase whereas Atp8 and Atp6p are in only one copy. A proper expression of the Atp9p-oligomer should thus also be highly demanding in Q_{-m}tRNA^Q.

The low levels of *ATP1* transcripts in the nM strain indicate that the defective expression of this subunit results from a decreased transcriptional activity or a reduced stability of these transcripts (Figure 5C and Table S6). Like yeast cMRS, human cMRS is sequestered within a MSC and can be released from it by a variety of stimuli, after which it relocates to the nucleolus to activate gene transcription (Ko et al., 2000). It is thus a reasonable hypothesis that a proper expression of *ATP1* in yeast is controlled by the nuclear relocation of cMRS. However, intriguingly, *ATP1* expression was never compromised in strains where cMRS was prevented to reach the nucleus. This expression was compromised only when cMRS was released from Arc1p while cERS remained mostly attached to Arc1p. This indicates that the cMRS-mediated expression of *ATP1* is activated by some retrograde signal induced by cERS in mitochondria, possibly as a means to equilibrate the production of the F₁ and F₀ sectors of ATP synthase.

Further work will be required to understand mechanistically how ATP synthase expression is influenced by the AME complex. However it can already be inferred from the data presented here that this MSC has a specific action in the biogenesis of this major mitochondrial enzymatic system. A key feature of this control is a concerted modulation of

nDNA- and mtDNA-encoded subunits of the ATP synthase. Our work highlights the existence of an additional degree of complexity in the dynamics of MSCs: the simultaneous release of several response factors. Synchronously releasing several aaRSs might give the cell the ability to coordinate responses mediated by several regulatory networks within one or several compartments of the cell. The increased number of aaRSs and MSC assembly factors in higher eukaryotes may be viewed as a mean to expand the diversity of the response repertoire to stimuli.

Aknowledgments

The work was supported by the French National Program “Investissement d’Avenir” administered by the “Agence National de la Recherche” (ANR), “MitoCross” Laboratory of Excellence (Labex), funded as ANR-10-IDEX-0002-02 [to H.B].; the ANR-09-BLAN-0091-02 [to H.B.] and the ANR Chloro/Mito CES to [J.P.d.R.] ; the University of Strasbourg [to H. B.]; the JST-CNRS Japanese-French Cooperative Program on ‘Structure and Function of Biomolecules’ [to H.B.] and the CNRS. M.F. was supported by a fellowship from the Ministère de l’Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie and by the Association Française contre les Myopathies. L.E. and G.B. are supported by the Ministère de l’Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. D.L. is supported by the ANR-10-IDEX-0002-02 “Investissements d’Avenir” program.

Methods

Engineering of the ARC, nE, nM and nE/nM strains

The *ARC1*, *N_ERS* and *N_MRS* DNA were subcloned into p425GPD (*ARC1*) and p424GPD. A *arc1Δ* strain was transformed with the p425GPD-*ARC1* recombinant plasmid and subsequently transformed either with the empty p424GPD, p424GPD- *N_ERS* or p424GPD- *N_MRS* plasmids yielding respectively the ARC, nE and nM strains. For p424GPD- *N_ERS*, the 190 first aa do not contain the putative mitochondrial targeting sequence located directly downstream in the native N-terminus of cERS. To generate de nE/nM strain, the *TRP1* auxotrophic marker of the p424GPD-*N_MRS* was changed to *HIS3* and the resulting p423GPD-*N_MRS* was expressed in a nE strain. The control wild type strain was WT cotransformed with the p425GPD and p424GPD empty plasmids. For more detailed methods see Supp Material and methods section.

Freezing and freeze substitution for ultrastructural studies (MET)

The yeast pellets were placed on the surface of a copper EM grid (400 mesh) coated with formvar. Each grid was very quickly submersed in liquid propane precooled and held at -180°C using liquid nitrogen. Loops were transferred in a pre-cooled solution of 4% osmium tetroxide in dry acetone in a 1.8 ml polypropylene vial at -82°C for 72h (substitution), warmed gradually to room temperature, followed by three washes in dry acetone. The samples were infiltrated progressively with araldite (epoxy resin Fluka). Ultrathin sections were contrasted with lead citrate. Specimens were observed with a HITACHI 7650 (80 kV) electron microscope (Electronic Imaging Pole of Bordeaux Imaging Center). The percentage of inclusion bodies, was calculated from the observation of 150 to 200 mitochondria per strain. The percentage of inclusion bodies found in the WT strain was less than 0.1%.

Immunogold electron microscopy

Yeasts cells were cryofixed and freeze substituted with acetone plus 0.1% uranyl acetate for 3 days at -82°C. Samples were rinsed with acetone at -20°C and embedded progressively at -20°C in LR Gold resin (EMS). Resin polymerization was carried out at -20°C for 3 days under UV illumination. Ultrathin LR Gold sections were collected on Formvar-coated nickel grids. Sections were first incubated in TBS 20 mM pH 7.8 for 5 min and then 15 min in NH₄Cl 500 mM in TBS 20 mM pH7.8. After rinsing, the grids were incubated with antibodies against the ATP synthase α or β subunit (1:2,500) for 1 hour at room temperature and then with an anti-rabbit conjugated to 10 nm gold particles (1:20) (BioCell) for another hour at room temperature. The sections were rinsed with TBS 20 mM pH 7.8, incubated 15 min in glutaraldehyde 1%, rinse and contrasted for 5 min with 2% uranyl acetate in water followed by 1% lead citrate for 1 min. Specimens were observed with an HITACHI 7650 electron microscope (Electronic Imaging Pole of Bordeaux Imaging Center).

References

- Ackerman, S.H., and Tzagoloff, A. (2005). Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 80, 95-133.
- Ackerman, S.H., and Tzagoloff, A. (1990) Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria. *J Biol Chem* 17, 20773-30778.
- Arif, A., Jia, J., Mukhopadhyay, R., Willard, B., Kinter, M., Fox, P.L., (2009). Two-site phosphorylation of EPRS coordinates multimodal regulation of noncanonical translational control activity. *Mol Cell* 35, 164-80.

- Ashe, M.P., De Long, S.K., and Sachs, A.B. (2000). Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol. Biol. Cell.* *11*, 833-848.
- Barros MH, Rak M, Paulela JA, Tzagoloff A. (2011). Characterization of Gtf1p, the connector subunit of yeast mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase. *J. Biol. Chem.* *286*, 32937-47.
- Bietenhader, M., Martos, A., Tetaud, E., Aiyar, R.S., Sellem, C.H., Kucharczyk, R., Clauder-Münster, S., Giraud, M.F., Godard, F., Salin, B., Sagot, I., Gagneur, J., Déquard-Chablat, M., Contamine, V., Hermann-Le Denmat, S., Sainsard-Chanet, A., Steinmetz, L.M., di Rago, J.-P. (2012). Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution. *PLoS Genet.* *8*, e1002876.
- Brown, M.V., Reader, J.S. and Tzima, E. (2010). Mammalian aminoacyl-tRNA synthetases: Cell signaling functions of the protein translation machinery. *Vascular pharmacology* *52*, 21-26.
- Cannarozzi, G., Schraudolph, N.N., Faty, M., von Rohr, P., Friberg, M.T., Roth, A.C., Gonnet, P., Gonnet, G., Barral, Y. (2010). A role for codon order in translation dynamics. *Cell.* *141*, 355-67.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* *278*, 36027-36031.
- Coenen, M.J., van den Heuvel, L.P., and Smeitink, J.A. (2001). Mitochondrial oxidative phosphorylation system assembly in man: recent achievements. *Curr Opin Neurol* *14*, 777-781.
- Couplan, E., Aiyar, R.S., Kucharczyk, R., Kabala, A., Ezkurdia, N., Gagneur, J., St Onge, R. P., Salin, B., Soubigou, F., Le Cann, M., Steinmetz, L. M., di Rago, J. P., Blondel, M.

- (2011). A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. *108*, 11989-94.
- D'Autréaux, B., Toledano, M.B. (2006). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. *8*, 813-24.
- Duvezin-Caubet, S., Caron, M., Giraud, M.-F., Velours, J., and di Rago, J.-P. (2003). The two rotor components of yeast mitochondrial ATP synthase are mechanically coupled by subunit δ . *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13235-13240.
- Emaus, R.K., Grunwald, R., Lemasters, J.J. (1986) Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim. Biophys. Acta*. *850(3)*, 436-448.
- Eswarappa, S.M., Fox. P.L. (2013). Citric acid cycle and the origin of MARS. *Trends Biochem Sci*. *38*, 222-8.
- Forsburg, S.L., and Guarente, L. (1989). Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Cell Biol* *5*, 153-180.
- Fox, T.D. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics* *192*, 1203-1234.
- Frechin, M., Kern, D., Martin, R.P., Becker, H.D., and Senger, B. (2010). Arc1p: anchoring, routing, coordinating. *FEBS Lett* *584*, 427-433.
- Frechin, M., Senger, B., Braye, M., Kern, D., Martin, R.P., and Becker, H.D. (2009). Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev* *23*, 1119-1130.

- Galani, K., Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E.C., and Simos, G. (2001). The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J* 20, 6889-6898.
- Golinelli-Cohen, M.P., and Mirande, M. (2007). Arc1p is required for cytoplasmic confinement of synthetases and tRNA. *Mol Cell Biochem* 300, 47-59.
- Graindorge, J.S., Senger, B., Tritch, D., Simos, G. and Fasiolo, F. (2005). Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* 44, 1344-52.
- Guo, M., and Schimmel, P. (2013). Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nat Chem Biol* 9, 145-153.
- Guo, M., Yang, X.L., and Schimmel, P. (2010). New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation. *Nat Rev Molecular Cell Biol* 11, 668-674.
- Hausmann, C.D. and Ibba, M. (2008). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev* 32, 705-21.
- Hedbacker, K., Carlson, M. (2008) SNF1/AMPK pathway in yeast. *Front. Biosci.* 13, 2408-20.
- Ibba, M. and Söll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 617-50.
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M., Rodenburg, R. J. T. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 35, 211-225.
- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Le Marechal, P., Negrutskii, B. and Mirande, M. (2009). Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J Biol Chem* 284, 6053-60.
- Ko, Y.G., Kang, Y.S., Kim, E.K., Park, S.G., and Kim, S. (2000). Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *J Cell Biol* 149, 567-574.

- Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H., Velours, J., Slonimski, P.P., Di Rago, J.-P. (2001). Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F1-ATPase in heat stress conditions. *J Biol Chem.* 276, 6789-6796.
- Lefebvre-Legendre, L., Salin, B., Schaëffer, J., Brèthes, D., Dautant, A., Ackerman, S.H., di Rago, J.-P. (2005). Failure to assemble the alpha 3 beta 3 subcomplex of the ATP synthase leads to accumulation of the alpha and beta subunits within inclusion bodies and the loss of mitochondrial cristae in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 280, 18386-92.
- Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 40, 159-185.
- Mattiazzi, M., Vijayvergiya, C., Gajewski, C.D., DeVivo, D.C., Lenaz, G., Wiedmann, M., Manfredi, G. (2004). The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet.* 13, 869-79.
- McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* 276, 36460-36466.
- Mirande, M., Cirakoğlu, B. and Waller, J-P. (1983). Seven mammalian aminoacyl-tRNA synthetases associated within the same complex are functionally independent. *Eur. J. Biochem.* 131, 163-170.
- Negrutskii, B.S., Stapulionis, R. and Deutscher, M.P. (1994). Supramolecular organization of the mammalian translation system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 964-8.
- Ostergaard, S., Olsson, L., Johnston, M., and Nielsen, J. (2000). Increasing galactose consumption by *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering of the *GAL* gene regulatory network. *Nat Biotechnol.* 18, 1283-86.

- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Stahlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., and Gustafsson, L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep* 5, 532-537.
- Park, S.G., Schimmel, P. and Kim, S. (2008). Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11043–11049.
- Paul, M.-F., Tzagoloff, A. (1995). Mutations in RCA1 and AFG3 inhibit F1-ATPase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 373, 66-70
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Polakis, B.S., Bartley, W., and Meek, G.A. (1965) Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources. *Biochem. J.* 97, 298
- Rack, M., Tetaud, E., Godard, F. Sagot, I., Salin, B., Duvezin-Caubet, S., Slonimski, P.P., Rytka, J., Di Rago, J.-P. (2007) Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 15, 10853-10864.
- Rak M, Gokova S, Tzagoloff A. (2011). Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase. *EMBO J.* 30, 920-30.
- Rak M, Tzagoloff A. (2009a). F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 18509-14.
- Rak, M., Zeng, X., Briere, J.J., and Tzagoloff, A. (2009b). Assembly of F0 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 108-116.
- Ray, P.S., Arif, A. and Fox, P.L. (2007). Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 32, 158–164.

- Rho, S.B., Lincecum Jr., T.L. and Martinis, S.A., (2002). An inserted region of leucyl-tRNA synthetase plays a critical role in group I intron splicing. *EMBO J.* *21*, 6874–6881.
- Roy, H., Becker, H.D., Reinbolt, J., Kern, D.(2003). When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* *17*, 9837-42
- Ryan, M.T., and Hoogenraad, N.J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* *76*, 701-722.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C.A., Chavatte, L., Kinter, M., Ting, S.M., Dignam, J.D., Kim, S., Driscoll, D.M. and Fox, P.L. (2004). Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* *119*, 195–208.
- Santangelo, G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 253-282.
- Schimmel, P. and Ribas De Pouplana, L. (2000). Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 207–209.
- Schuller, H.J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* *43*, 139-160.
- 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., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M. and Hurt, E.C. (1996). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J* *15*, 5437-48.
- Söll, D. and Schimmel, P.R. (1974) Aminoacyl-tRNA synthetases. *The Enzymes* *10*, 489–538.

- Stewart, T.S., Roberts, R.J. and Strominger, J.L. (1971) Novel species of tRNA. *Nature* 230, 36–38.
- Tuller, T., Carmi, A., Vestsigian, K., Navon, S., Dorfan, Y., Zaborske, J., Pan, T., Dahan, O., Furman, I., Pilpel, Y. (2010). An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell*. 141, 344-54.
- Wakasugi, K.. and Schimmel, P. (1999). Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* 284, 147–151.
- Yin, Y., Yang, S., Yu, L., and Yu, C.A. (2010). Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 285, 17038-17045.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42, 27-81.

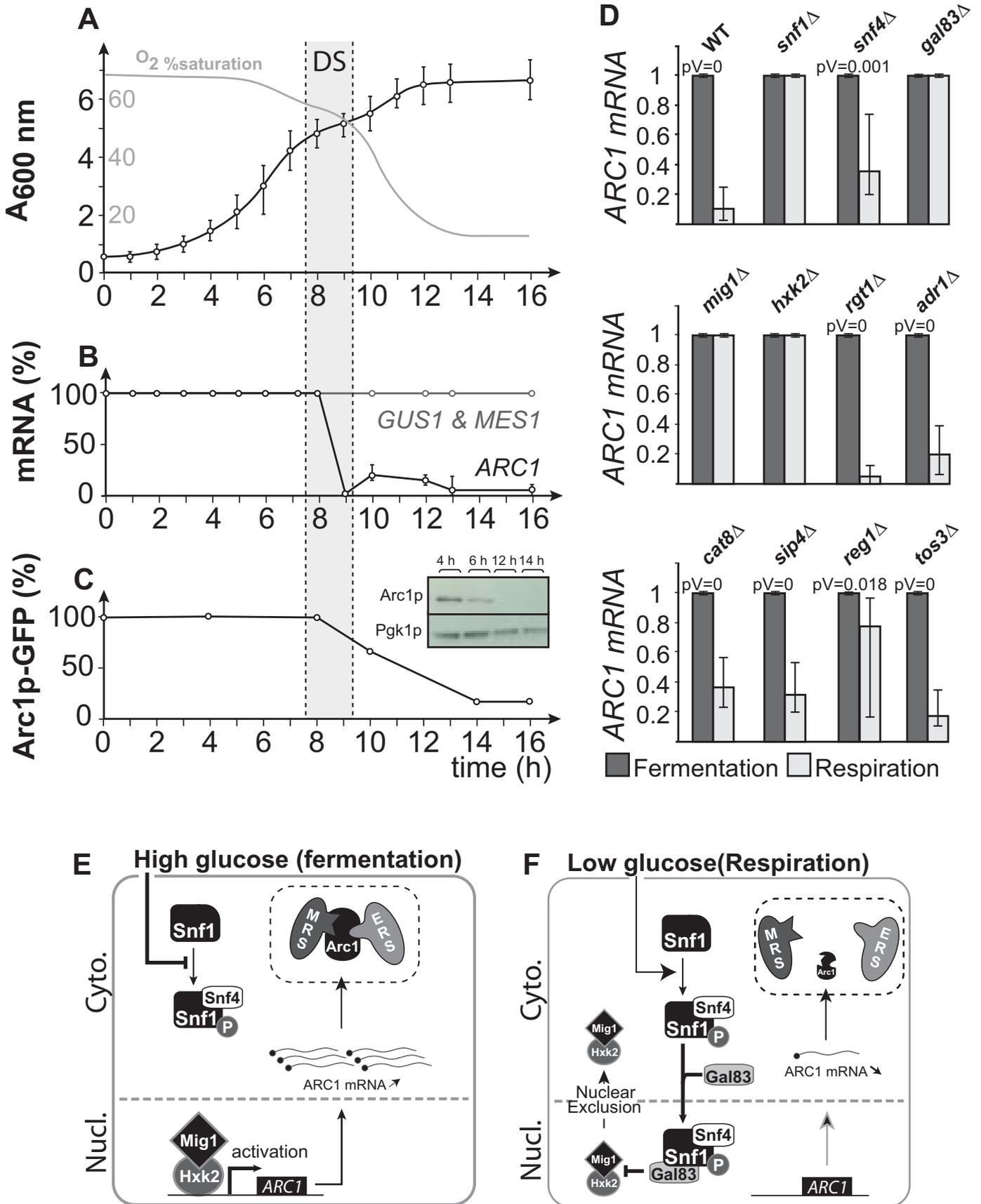


Figure 1, Frechin et al.

Figure 1. AME complex disassembly is induced by Snf1/4 kinase-mediated transcription inhibition of *ARC1* at the diauxic shift.

(A) Wild type *S. cerevisiae* growth curve on SCGlc medium (n=3). The diauxic shift (DS) marks the transition from fermentation (first exponential phase) to respiration (second exponential phase). (B) RT-qPCR quantification of *ARC1*, *GUS1* (cERS) and *MES1* (cMRS) mRNAs (n=3). Before the DS the p-values of each mRNA quantification compared to its quantification at t=0 are > 0.05 (thus considered as not different), after the DS, the p-values are > 0.05 for *GUS1* and *MES1* and < 10⁻³ for *ARC1*. (C) FACS and Immunoblot (inset) quantification of Arc1-GFP (under control of its own promoter) and Arc1p (with anti Arc1p antibodies) respectively. For the FACS quantification only the mean Arc1-GFP signal value is shown, see Figure S2A for the full distribution of single cell Arc1-GFP values. (D) RT-qPCR quantification of *ARC1* mRNA in fermentation (dark grey) and respiration (light grey) in strains deleted from genes of the Snf1/4 pathway components (SEM, pVal see supplemental table S2 n=4). (E and F) Implementation of our data in D into the well-documented Snf1/4 pathway (Zaman *et al.*, 2008).

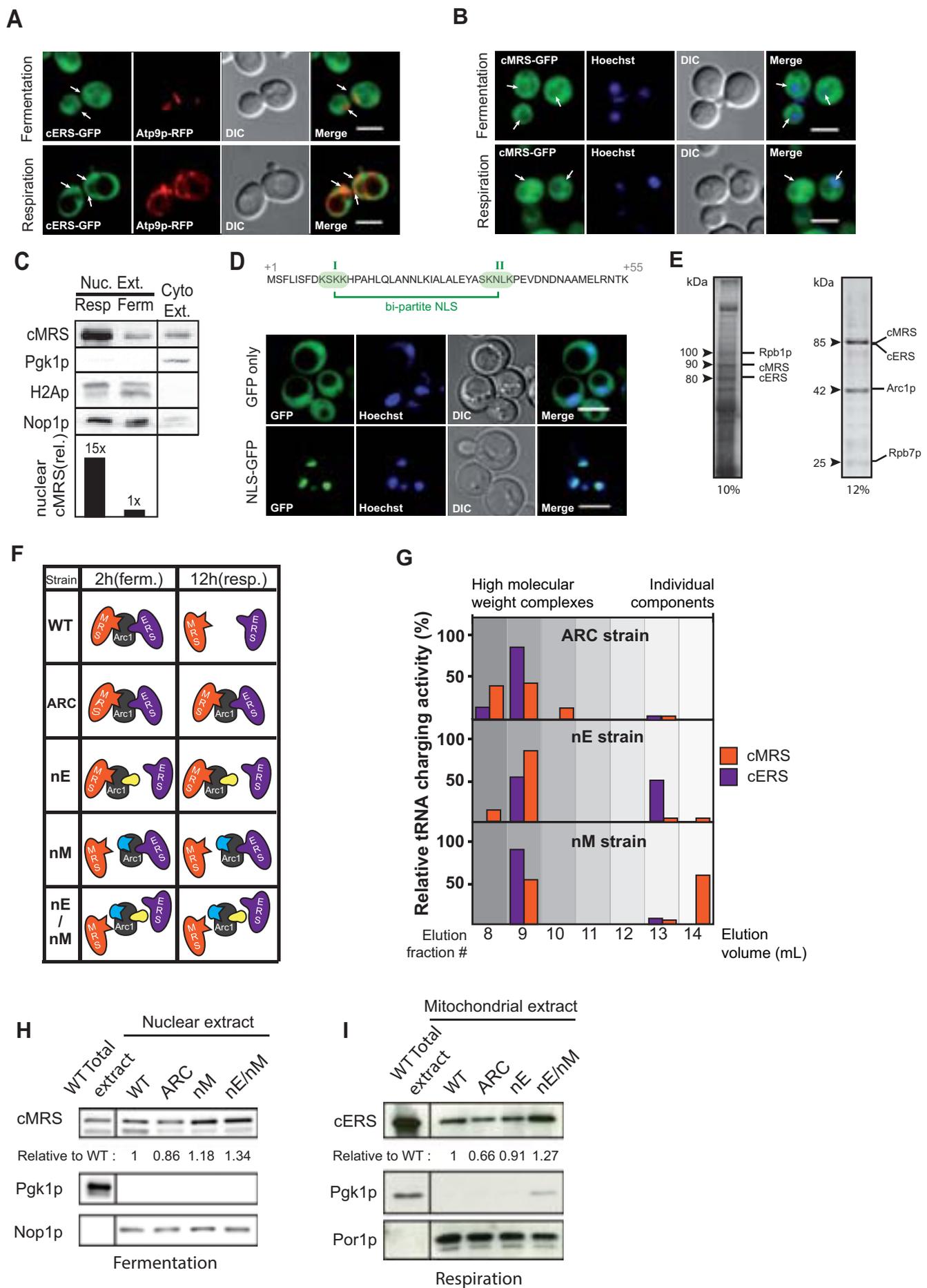


Figure 2, Frechin et al.

Figure 2. Reprogramming disassembly of the AME complex and subcellular relocation of cMRS and cERS by expressing competing Arc1p-binding domains.

(A) Co-localization (arrowheads) of GFP-tagged cERS with Atp9-RFP. (B) Co-localization (arrowheads) of GFP-tagged cMRS with Hoechst-stained nuclei, 24% of yeast cells in respiration conditions show this relocalization (n=200). (C) Immunoblot quantification of cMRS levels in normalized (NOP1, H2A) purified (PGK) nuclear extracts from fermenting (ferm) and respiring (resp) cells. (D) Confocal co-localization with Hoechst-stained nuclei of GFP alone or GFP-tagged nuclear localization sequence of cMRS (NLS-GFP). The NLS (Top) is contained within the first 55 amino acids, all cells show the same pattern. (E) 10% (right) and 12% (left) PAGE of cMRS-TAP interactants pulled down using Tandem Affinity Purification on nuclear protein extracts and identified using mass spectrometry. For spectrum count see supplemental Figure S2. (F) Schematic view of the released or sequestered state of cERS and cMRS in fermenting (ferm) and respiring (resp) wild-type and reprogrammed (ARC, nE, nM and nE/nM) strains. (G) Size-exclusion chromatography of total protein extracts from the ARC, nE and nM strains. Presence of cMRS or cERS in an Arc1p-bound (high molecular weight) or free state (low molecular weight) is monitored by the tRNA^{Met} (for cMRS) or tRNA^{Glu} (for cERS) aminoacylation activity of each fraction. (H) Immunoblot analysis of the nuclear relocation of artificially released cMRS in the nM and nE/nM strains compared to WT and ARC strains in fermentation (SCGlc 2%). (I) Same analysis for artificially released cERS relocalization in the mitochondria in nE and nE/nM strains in respiration (SCGly 2%).

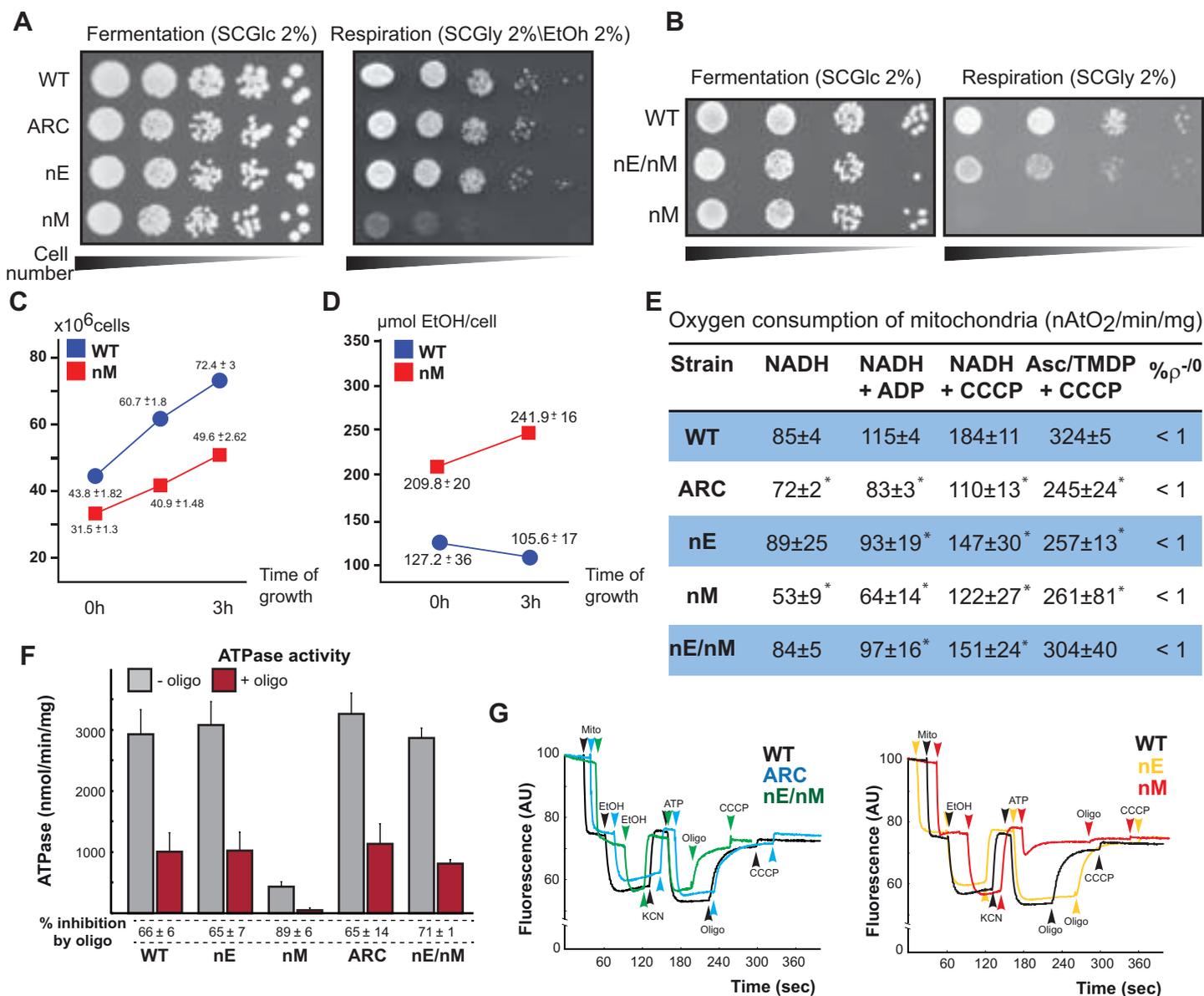


Figure 3, Frechin et al.

Figure 3. Desynchronized disassembly of the AME complex impairs growth on respiratory media due to a severely diminished ATPase activity.

(A and B) Drop tests of WT, ARC, nE, nM and nE/nM strains on SCGlc 2% and SCGly 2%/EtOH 2% (A) or SCGly 2% (B). (C) Growth rate comparisons on SCGal 2% and (D) ethanol titration between the WT (blue circle) and nM (red square) strains (n=3). (E) Oxygen consumption was measured on isolated mitochondria; percentage of Rho 0 cells (% ρ^{-0}) are shown (n=3). (F) Measurements of oligomycin-dependent (+) and -independent (-) ATPase activities on purified mitochondria (SEM, n=3). (G) Rhodamine 123 fluorescence quenching on isolated mitochondria. All enzymatic assays (C, D, E, F and G) were done on extracts prepared from cells grown on SCGal 2%. pValues from figure 3E were calculated with a Student Z test, *pval<0,001.

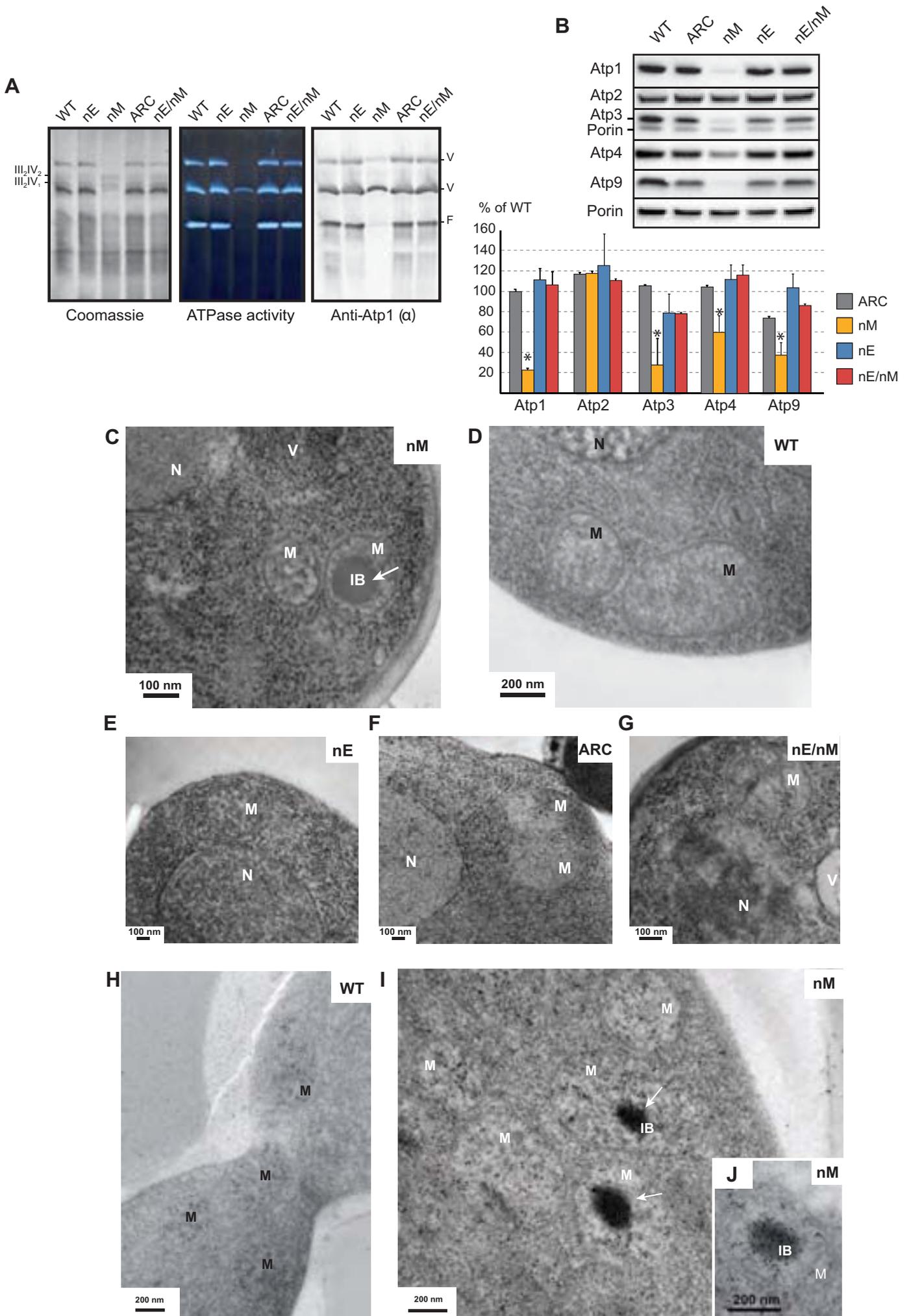


Figure 4, Frechin et al.

Figure 4. Desynchronized AME complex disassembly impairs expression of nuclear- (F₁) and mitochondrial-encoded (F₀) ATP synthase subunits, assembly of the ATP synthase enzyme and promotes formation of Atp2-containing inclusion bodies.

(A) Digitonin-solubilized mitochondrial extracts from WT, ARC and nE/nM strains and desynchronized strains (nE and nM) were subjected to BN/PAGE prior to Coomassie blue and immunoblot analysis using anti-Atp1p antibodies staining. ATPase complexes (V₁: monomers; V₂: dimers) and free F₁ were monitored by ATPase activity. The complexes III and IV (III₂-IV₂; III₂-IV₁; III₂) were monitored by BN-PAGE (Coomassie). Cells were grown on SCGal 2%. (B) Immunoblot and related quantifications (SEM, *pVal < 10⁻⁴ compared to WT, n=4) of ATP synthase subunits Atp1p, -2p, -3p, -4p and -9p in total cell extracts normalized against porin abundance of strains grown in SCGal 2%. This shows decreased synthesis of Atp1p, -3p, -4p and -9p subunits in the nM strain. (C, D, E, F and G) Electron microscopy images of WT and desynchronized strains grown in SCGal 2%. M: mitochondria; N: nucleus; Arrow indicates presence of inclusion bodies (IB) if cMRS is artificially released and cERS confined to the cytoplasm (nM strain) and not when both cMRS and cERS are artificially released (nE/nM strain). (H, I and J) Immunogold detection of Atp2p (β-F₁ subunit) carried out on electron microscopy slides of the WT (H) and nM (I, J) cells grown in SCGal 2% shows that inclusion bodies (IB, arrows) within nM mitochondria (M) contain aggregated Atp2p subunits.

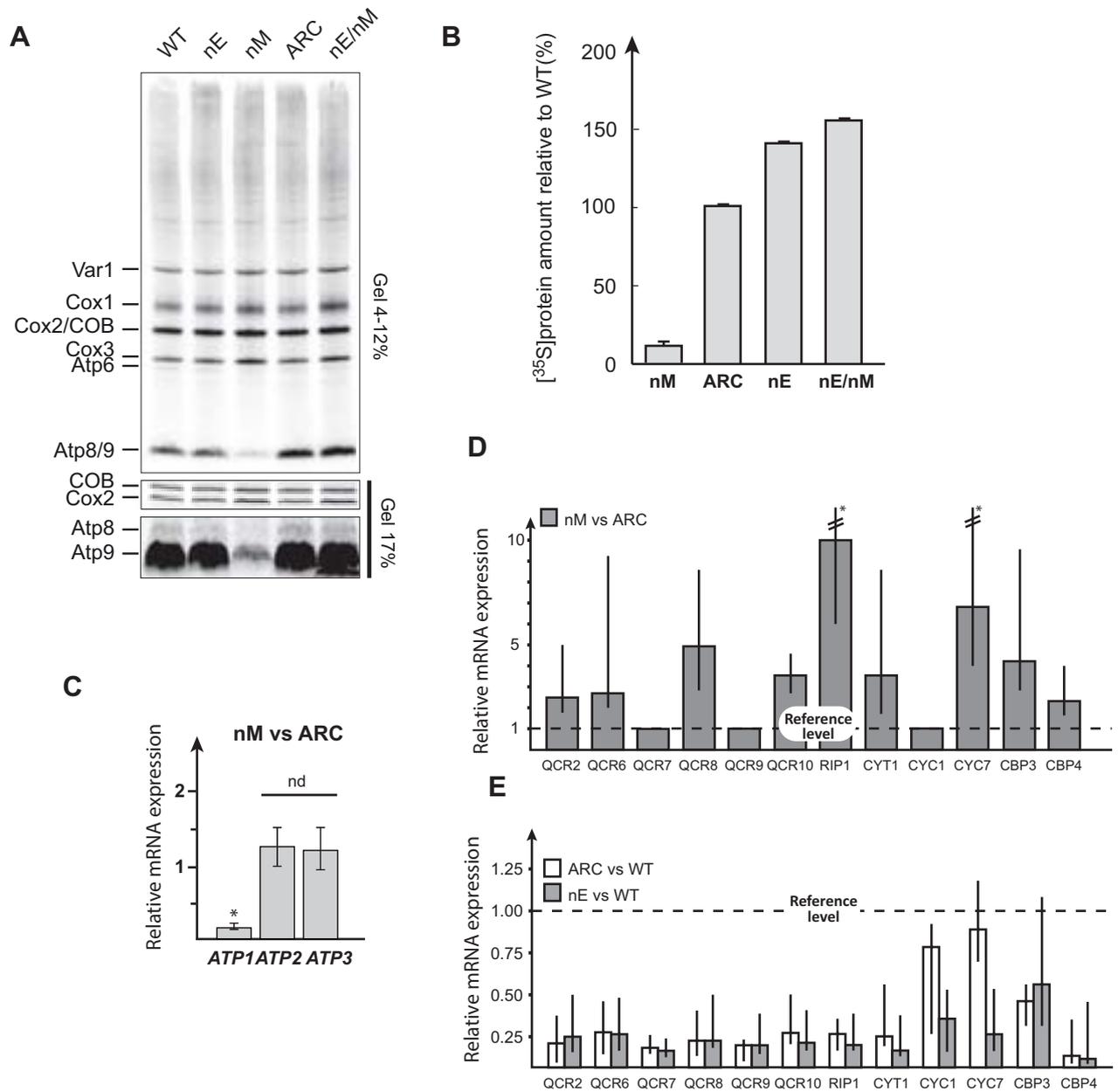


Figure 5, Frechin et al.

Figure 5. cMRS down-regulates transcription of *ATP1* and sustains nuclear-encoded complex III genes expression while mitochondrial cERS adjusts the rate of mitochondrial *de novo* protein synthesis.

(A) [³⁵S] Methionine pulse labeling of proteins translated in mitochondria (30,000 cpm per lane) shows relative variation of single protein translation within each strain grown in SCGal 2% independent of global mitochondrial translation. (B) Relative to WT rate of mitochondrial *de novo* protein synthesis measured in strain constitutively sequestering (nM) or releasing (nE) cERS or both cMRS and cERS (nE/nM). Total protein extracts were prepared from cells incubated in the presence of [³⁵S] methionine and cycloheximide to inhibit cytosolic protein synthesis prior to 12% SDS-PAGE. Radiolabeled protein synthesized in the ARC and nE strains were compared to the WT (grown in SCGly 2% EtOH 2%), after 20min of incubation (SEM, pVal<10⁻³ compared to WT, n=3). (C) RT-qPCR comparative quantification of *ATP1*, -2, and -3 mRNAs in the nM compared to ARC strain grown in SCGal 2% (*pVal<10⁻³, nd: not different, pVal>0.05; SEM, n=6). (D) RT-qPCR quantification of mRNAs of complex III components when cMRS is artificially released (nM strain) vs confined in the cytoplasm (ARC strain) or (E) when cMRS is artificially confined in the cytoplasm (ARC or nE strain) vs naturally released (WT) in respiration (normal release of cMRS), (SEM, *pVal see supplemental table S3, n = 4).

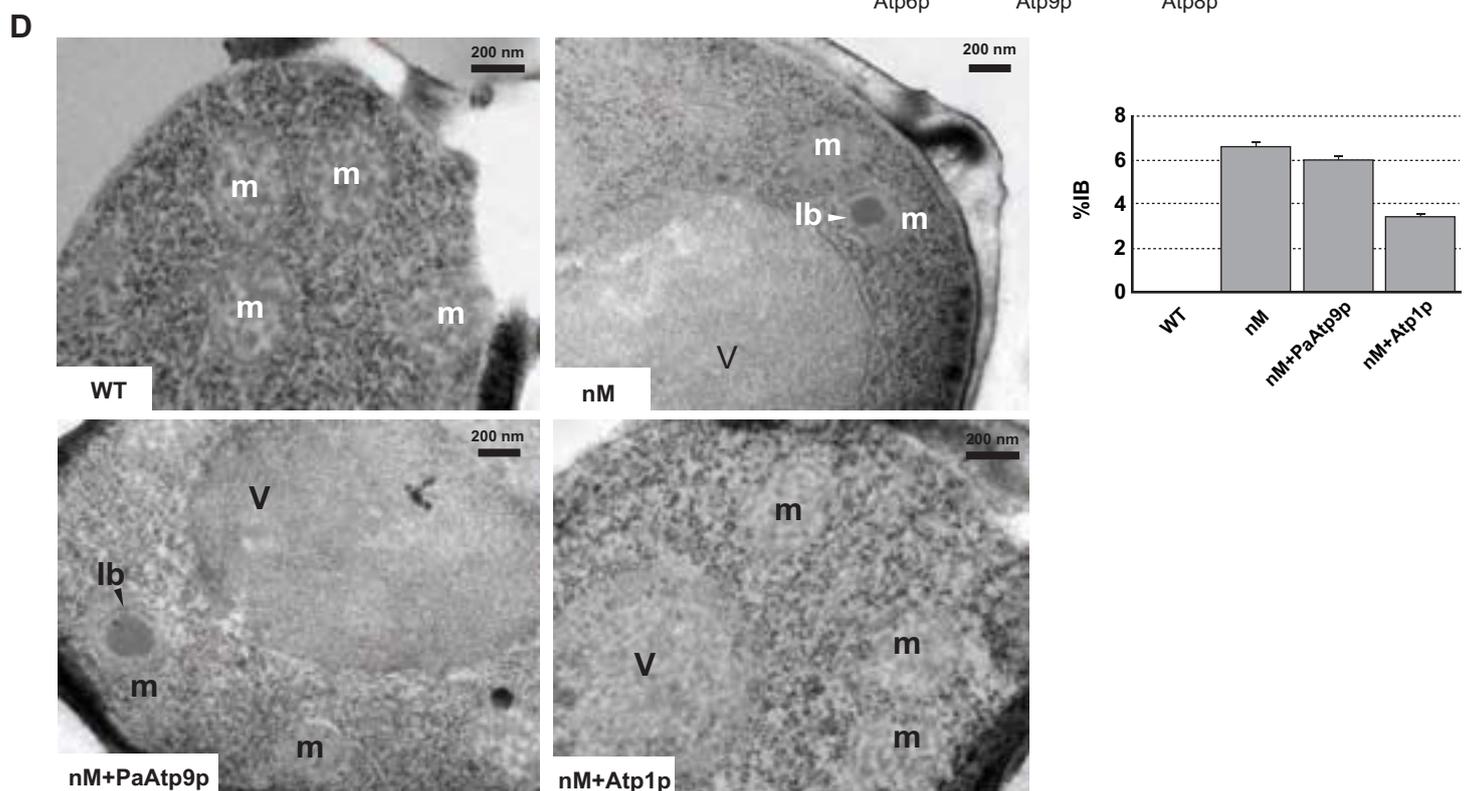
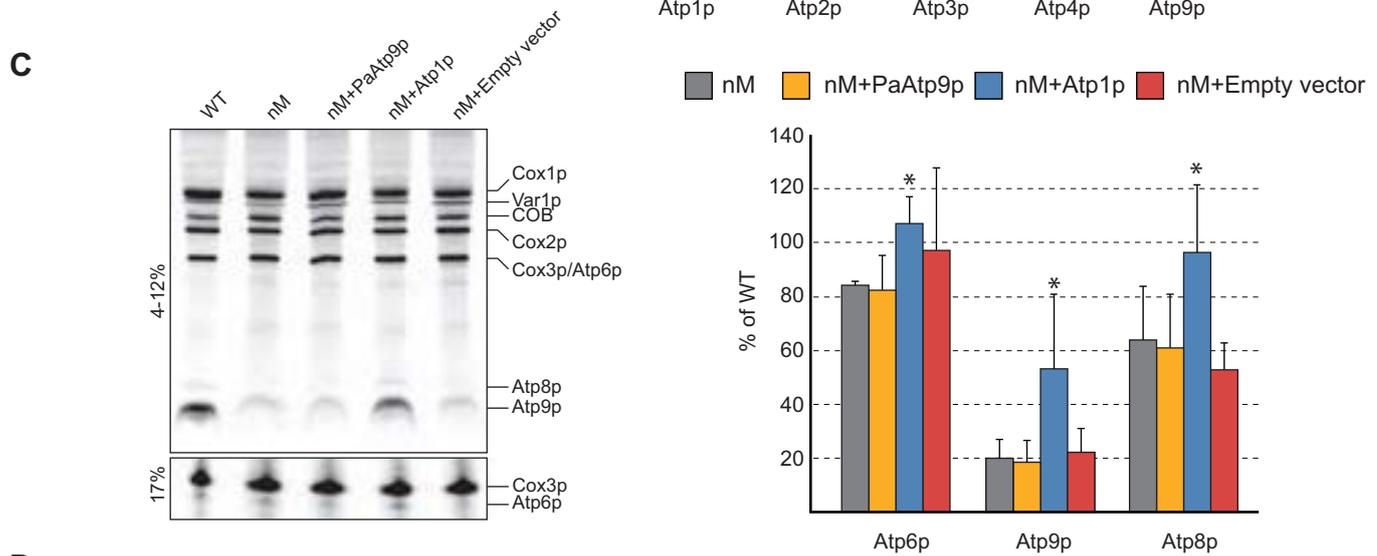
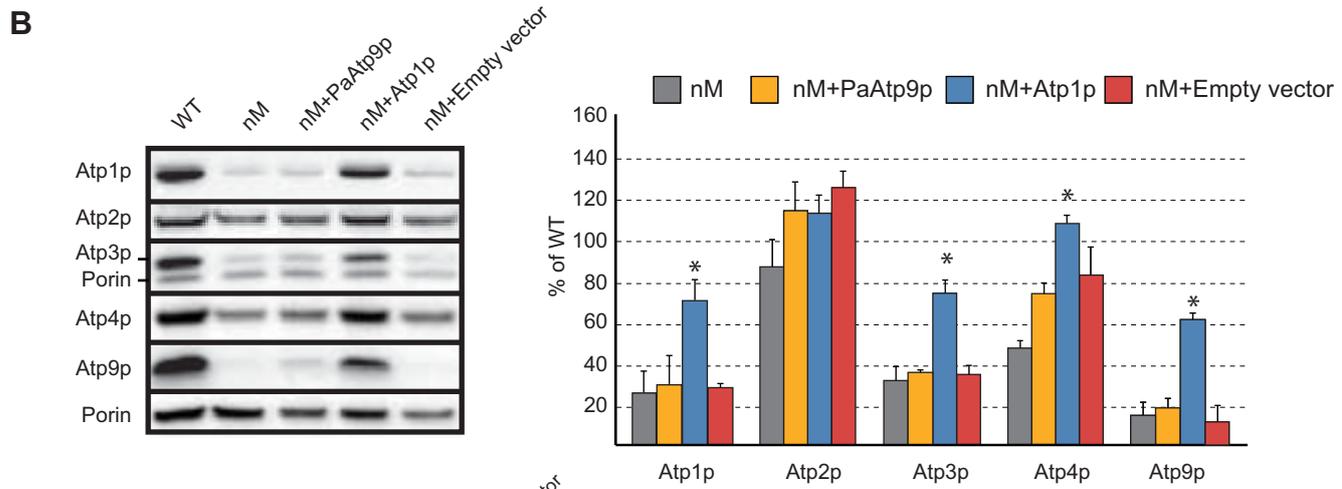
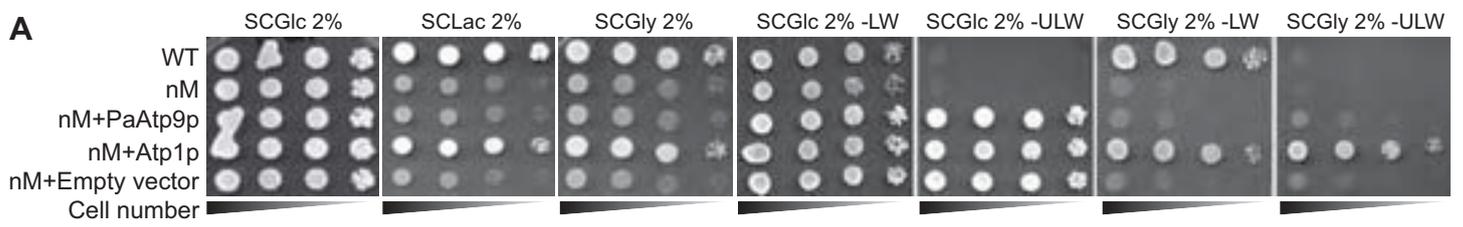


Figure 6, Frechin et al.

Figure 6. Re-expression of normal Atp1p levels in the nM strain partly rescues the defective respiration phenotypes.

(A) Growth test of WT and nM strains rescued for *ATP1* or *-9* expression on fermentative (Glc) or respiration (Gly) media. (B) Immunoblot and related quantifications (SEM, *pVal<10⁻³ compared to nM, n=3) of ATP synthase subunits Atp1p, -2p, -3p, -4p and 9p in total cell extract of strains grown in SCGal 2% shows that the decreased synthesis of Atp1p, -3p, -4p and 9p subunits in the nM strain can be restored by Atp1p expression. (C) [³⁵S] Methionine pulse labeling of proteins translated in mitochondria (30,000 cpm per lane) and related quantifications (SEM, *pVal<10⁻³ compared to nM, n=4) in WT and nM strains grown on SCGal 2% and rescued for *ATP1* or *-9* expression shows relative variation of single protein translation within each strain independent of the global mitochondrial translation. (D) Electron microscopy and related quantifications of mitochondria with IB in the nM strain, or nM + allotopic expression of Atp9p or expression of Atp1p, compared to WT.

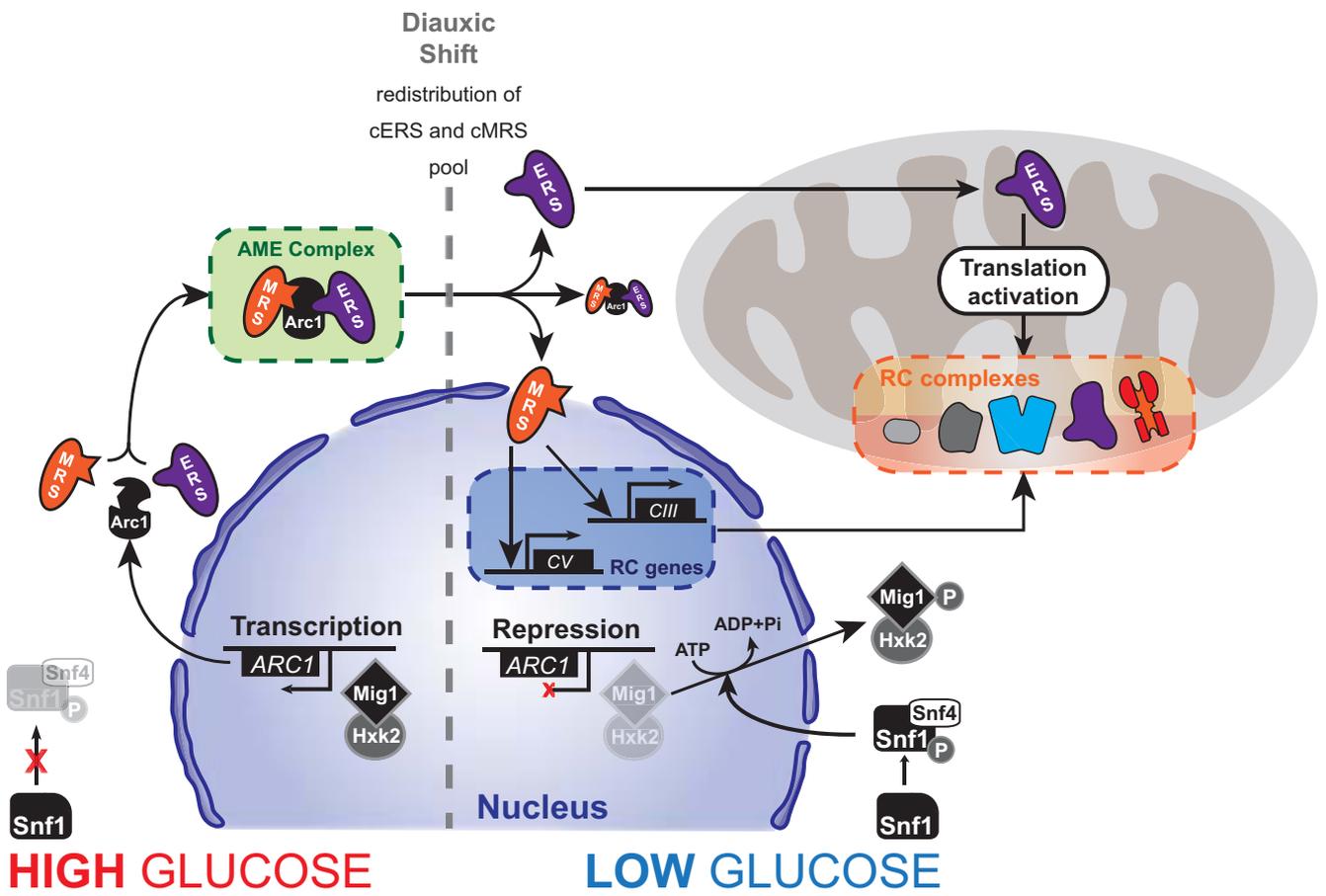


Figure 7, Frechin et al.

Figure 7. Schematic of AME regulation and disassembly upon shift to respiration and its link with OXPHOS expression and assembly.

Model of the coordinated *inter*-genomic expression of the OXPHOS subunits mediated by the synchronized relocation of cERS and cMRS upon Snf1/4 kinase-mediated disassembly of the AME complex.

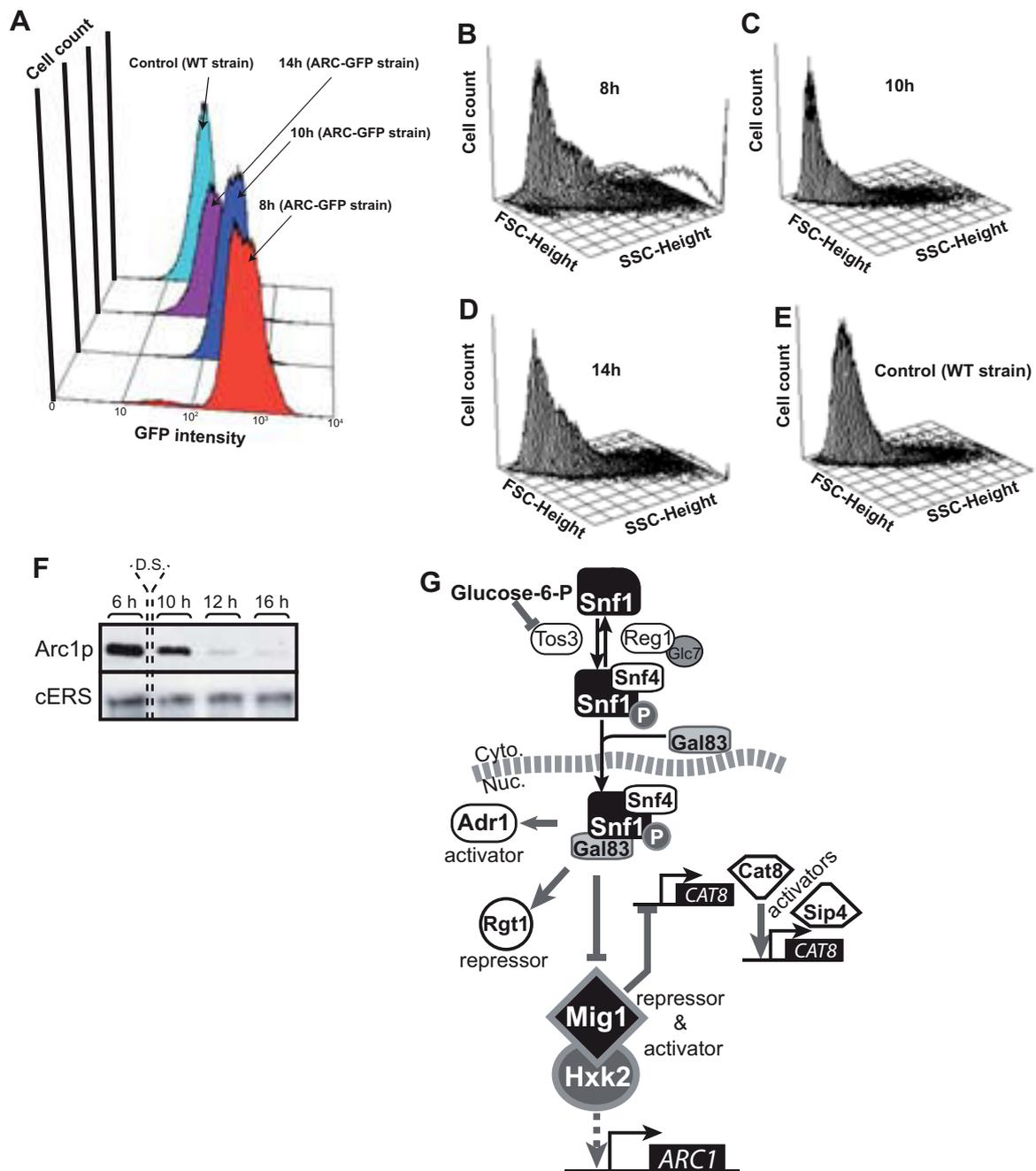


Figure S1. FACS monitoring of Arc1p-GFP accumulation in fermenting and respiring WT cells and schematic description of the regulatory pathway controlling *ARC1* expression, related to Figure 1. (A) GFP signal in a strain expressing a chromosomally tagged Arc1p, measured by FACS, and their relative forward and side scatter measurements (B, C, D and E). GFP signal of a WT strain was used as a control. (F) Immunoblot quantification of Arc1-GFP (under control of its own promoter) and cERS with anti-Arc1p and anti-cERS antibodies respectively. Cells were grown in YPD and aliquots were taken before (6 h) and after (10-16 h) the diauxic shift (DS). (G) Schematic description of the Snf1/4 pathway and its related transcription factors adapted from Zaman et al., 2008. Note that the *snf4* Δ does not fully restore the *ARC1* mRNA levels. The role of the Snf4p regulatory subunit is to activate the Snf1p catalytic subunit by inhibiting the autoinhibitory interaction of the C-terminal regulatory domain of Snf1p with its catalytic N-terminal domain. However, Snf4p does not influence the phosphorylation state of Snf1p and therefore its activation by the upstream Snf1p activating kinases (Celenza et al., 1989; Jiang and Carlson, 1996). By removing Snf4p, the Snf1p catalytic subunit is less but still active, hence the intermediate effect on *ARC1* transcription inhibition we observe in the *snf4* Δ .

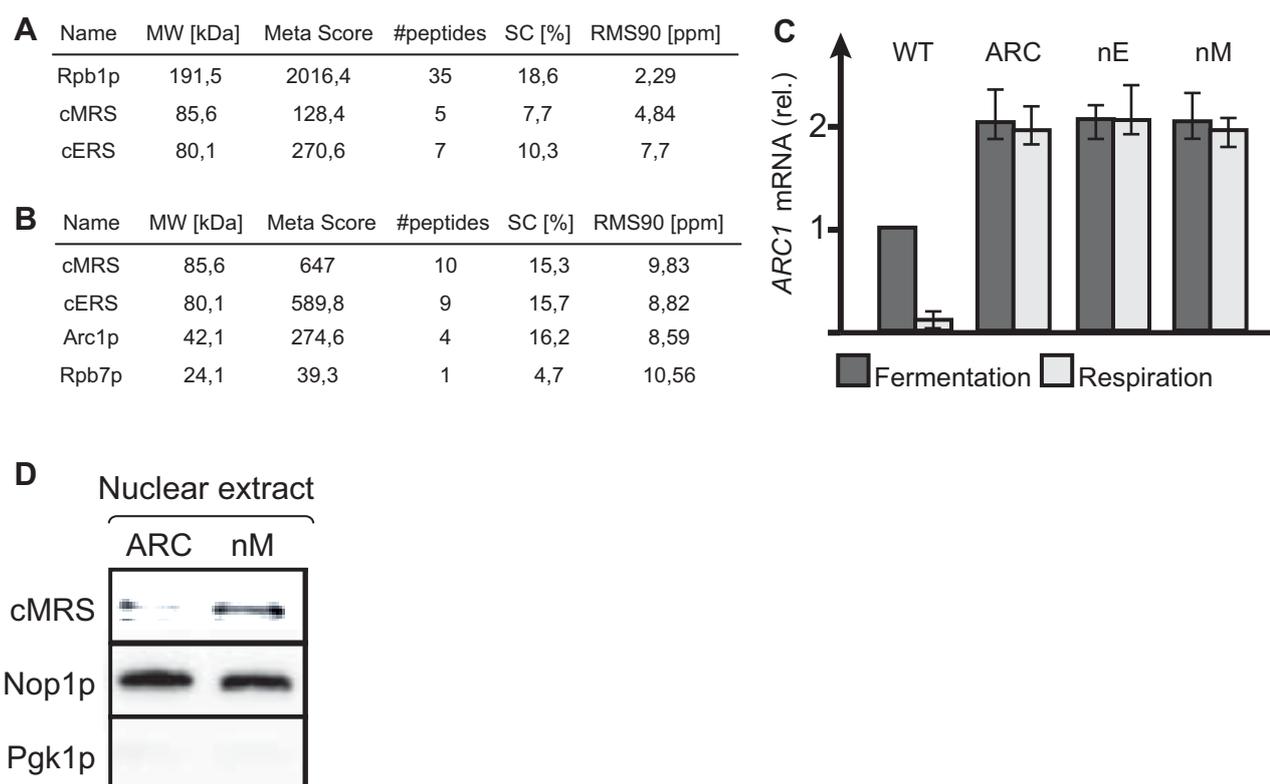


Figure S2. Interactants, expression and relocation the AME complex components in fermenting and respiring ARC, nE and nM strains, related to Figure 2. (A, B) Spectrum count obtained by mass spectrometry analysis from nuclear extract proteins after tandem affinity purification. (C) Comparative qRT-PCR quantification of *ARC1* mRNA in fermenting (dark grey) and respiring (light grey) WT, ARC, nE and nM strains (SEM, $pVal < 10^{-3}$ compared to WT in fermentation, $n=4$). (D) Immunoblot analysis shows nuclear relocation of artificially released (nM strain) or bound (ARC) cMRS in fermentation with Nop1p as nuclear and loading control and Pgk1p as cytosolic marker in SCGlc 2%.

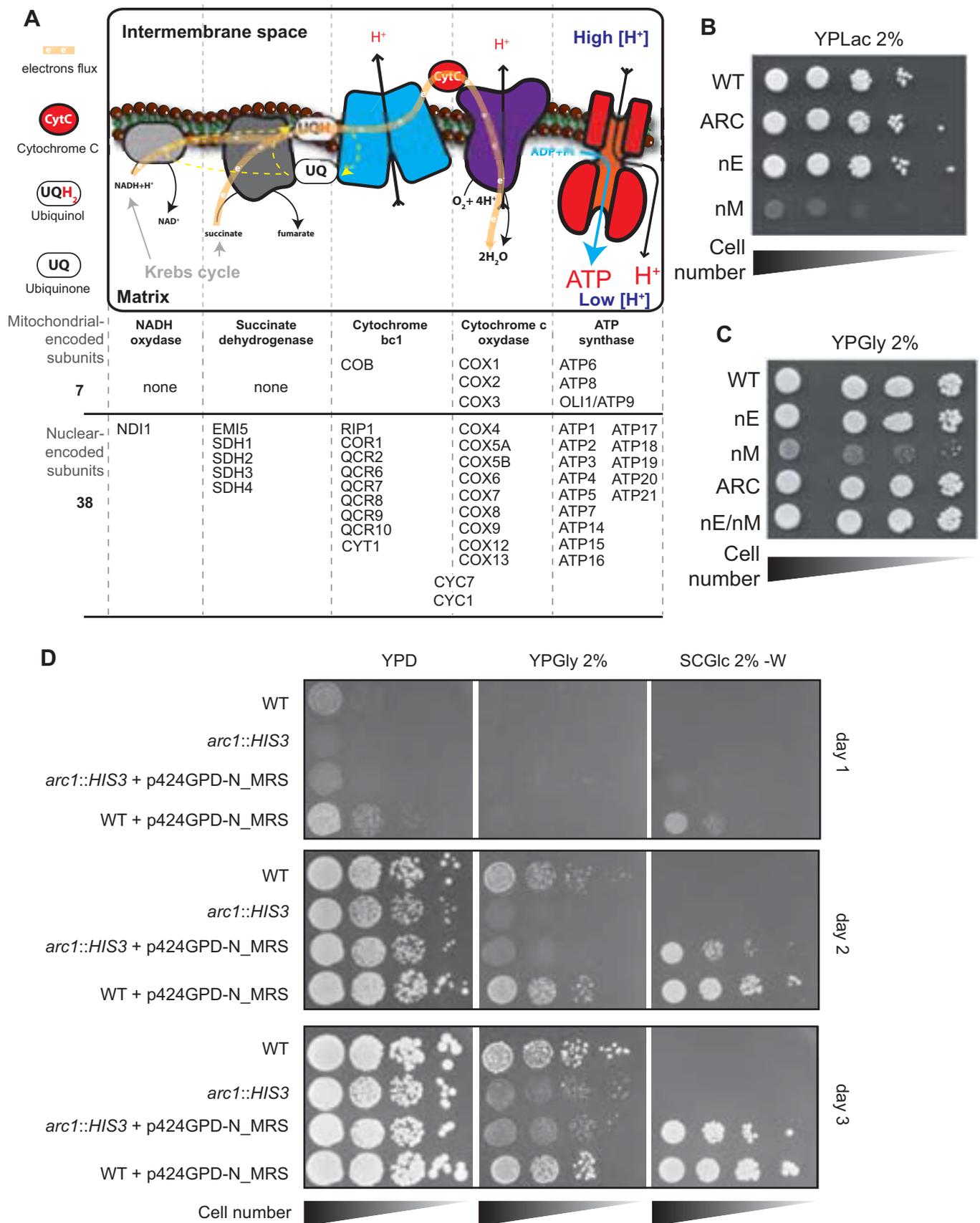


Figure S3. Description of the yeast respiratory chain and growth phenotypes of the ARC, nE, nM and nE/nM strains, related to figure 3. (A) Detailed schematic description of the respiratory chain, substrates, electron flow and ATP synthesis. Names and genes encoded by the nuclear and the mitochondrial genome of each OXPHOS complex are listed below. (B and C) Growth of the WT and desynchronized strains on respiratory media, after 3 days. (D) Drop tests showing that overexpression of the N_MRS domain in the WT and *arc1Δ* (*arc1::HIS3*) strains does not impair fermentative (YPD, SCGlc 2%) and respiratory (YPGly) growth.

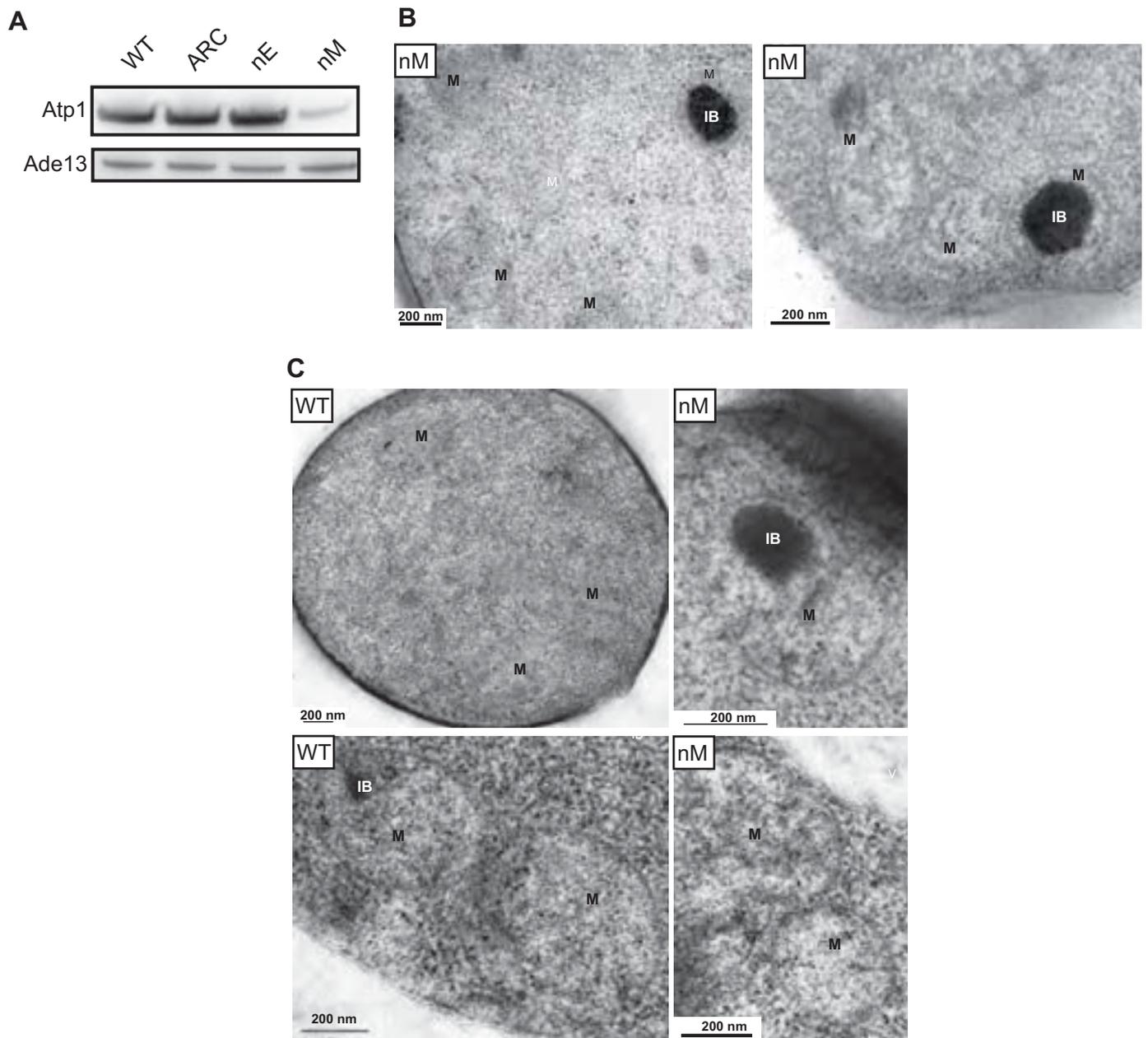


Figure S4. Expression of the mitochondrial- and nuclear-encoded genes of ATPase is impacted in the nM strain leading to formation of mitochondrial inclusion bodies containing Atp2p aggregates, related to Figure 4. (A) Atp1p was monitored by immunoblot on total cell extract in WT, ARC, nE, nM and nE/nM grown in SCGly 2%. (B and C) Immunogold detection of Atp2p (B) and Atp1p (C) was carried out on electron microscopic slides on nM or WT cells grown in SCGal 2%. M: mitochondria; IB: inclusion bodies.

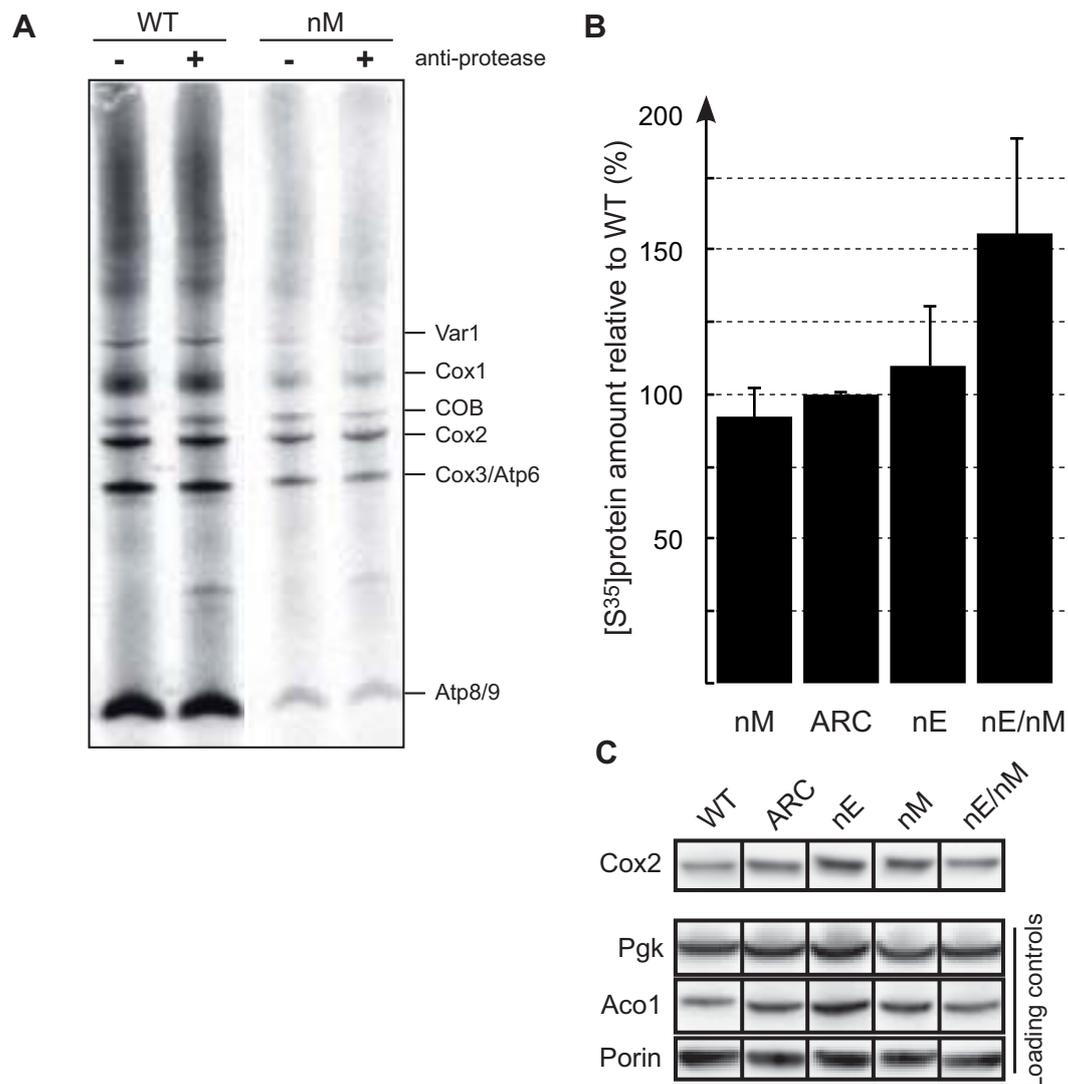
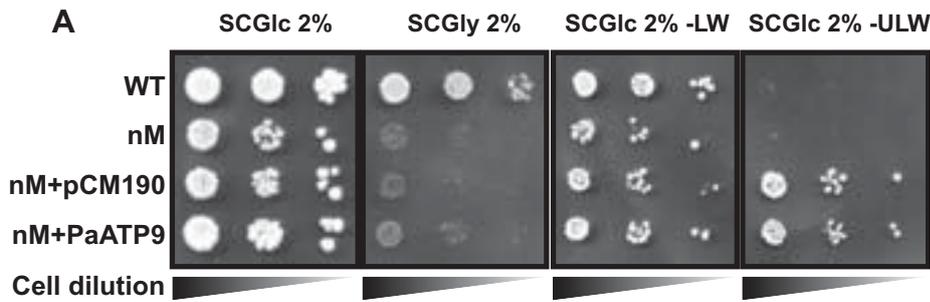


Figure S5. The rate of mitochondrial *de novo* protein synthesis is modulated by the level of cERS mitochondrial import in cells grown on glycerol or galactose media, related to Figure 5. (A) Mitochondrial *de novo* protein synthesis in the WT and nM strains grown on SCGly 2%. Total protein extracts were prepared from the same number of cells grown for only 2 generations (the nM strain is only able to grow 2 generations on glycerol) in the presence of [³⁵S] methionine/Cystein mix and cycloheximide to inhibit cytosolic protein synthesis prior to 12% SDS-PAGE (see figure 4A) and in the presence (+) or absence (-) of protease inhibitors and PMSF. (B) Relative to WT rate of mitochondrial *de novo* protein synthesis measured in strain constitutively sequestering (nM) or releasing (nE) cERS or both cMRS and cERS (nE/nM). Total protein extracts were prepared from cells grown in SCGal 2% and incubated in the presence of [³⁵S] methionine/Cystein mix and cycloheximide to inhibit cytosolic protein synthesis prior to 12% SDS-PAGE (see figure 4A). Radiolabeled protein synthesized in the nM, nE and nE/nM strains were compared to the WT, after 20 min of incubation (n=3-5). (C) Cox2p were monitored by immunoblot on total cell extract in WT, ARC, nE, nM and nE/nM grown in SCGly 2%.



B

	# Cell	# Mito.	# IB	Mean (%)	SD (%)
RS453	200	463	0	<0,1	ND
nM	50	151	10	6,6	0,2
nM+ATP9	50	166	10	6	0,2
nM+ATP1	50	176	6	3,4	0,12

Figure S6. Allotopic expression of *ATP9* in the nM strain does not rescue the respiratory-defective phenotype, but ectopic expression of *ATP1* does, related to Figure 6.

(A) Growth of WT, nM and nM transformed by either empty vector (pCM190) or *ATP9* (PaATP9) on fermentative (SCGlc 2%) and respiratory media (SCGly 2%) shows that allotopic expression of *ATP9* has no effect in rescuing the respiration defective phenotype of the nM strain. (B) Detail of inclusion bodies calculation per cell and per mitochondria reckoned. Mean and standart deviation (SD) are shown in percentage of inclusion bodies (IB).

Supplemental information

Title: Expression of nuclear and mitochondrial genes encoding ATP synthase is synchronized by disassembly of a multisynthetase complex

Mathieu Frechin, Ludovic Enkler, Emmanuel Tetaud, Daphné Laporte, Bruno Senger, Corinne Blancard, Philippe Hammann, Gaétan Bader, Sandra Clauder-Münster, Lars Steinmetz, Robert Pierre Martin, Jean-Paul di Rago and Hubert Dominique Becker.

Supplemental Figures S1 to S6 are FACS analyses, qRT-PCR experiments, PAGE and western blots analyses, EM pictures and Pulse chase experiments performed to determine the expression levels of the AME components and of the OXPHOS subunits and to understand the impact of the downregulation of *ARCI* and the further relocation of the cMRS and cERS inside their respective compartments.

Supplemental Tables S1 to S7 are strains used in this paper, qRT-PCR results of all strains and conditions tested in this paper; and also analysis of the percentage of glutamine codons in each mitochondrial gene.

Additional experimental procedures and **additional References** are also listed.

Table S1: Yeast strains used or engineered during this study

Strain	Genotype	Source
RS453 (WT)	<i>Mata</i> , <i>ade2-1 his3-11,15 ura3-52 leu2-3,112 trp1-1</i>	Euroscarf
<i>tos3</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ygl179c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>reg1</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ydr028c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>snf1</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ydr477w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>snf4</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ygl115w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>gal83</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>yer027c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>mig1</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ygl035c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>adr1</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ydr216w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>cat8</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ymr280c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>sip4</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>yjl089w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>hxx2</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ygl253w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>tpk1</i> Δ^b	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>yjl164c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>tpk2</i> Δ^b	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ypl203w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>tpk3</i> Δ^b	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ykl166c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>tor1</i> Δ^c	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>yjr066w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>pkh1</i> Δ^c	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ydr490c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>gpa1</i> Δ^b	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>yhr005c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>ras1</i> Δ^b	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>yor101w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>yak1</i> Δ^b	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>yjl141c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>rgt1</i> Δ^a	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ykl038w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>arc1</i> Δ	<i>Mata</i> , <i>his3</i> $\Delta 1$; <i>leu2</i> $\Delta 0$; <i>lys2</i> $\Delta 0$; <i>ura3</i> $\Delta 0$; <i>ygl105w::kanMX4</i>	Euroscarf

pNOP-ARC1	<i>Mata</i> , <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>lys2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>ygl105w::kanMX4</i> , <i>pRS316-pNOP-ARC1</i>	this work
ARC	<i>Mata</i> , <i>ade2-1 his3-11,15 ura3-52 leu2-3,112 trp1-1</i> , <i>p425GPD-ARC1</i> , <i>p424GPD</i>	this work
nM	<i>Mata</i> , <i>ade2-1 his3-11,15 ura3-52 leu2-3,112 trp1-1</i> , <i>p425GPD-ARC1</i> , <i>p424GPD-N_MRS</i>	this work
nE	<i>Mata</i> , <i>ade2-1 his3-11,15 ura3-52 leu2-3,112 trp1-1</i> , <i>p425GPD-ARC1</i> , <i>p424GPD-N_ERS</i>	this work
nE/nM	<i>Mata</i> , <i>ade2-1 his3-11,15 ura3-52 leu2-3,112 trp1-1</i> ; <i>ygl105w::kanMX4</i> , <i>p425GPD-ARC1</i> , <i>p424GPD-N_ERS</i> , <i>p423GPD-N_MRS</i>	this work
MRS-TAP	<i>MATa ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52</i> , <i>YGR264c-TAP:URA3</i>	CellZome
ARC-GFP	<i>MATa, his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0, <i>YGL105w-GFP</i> : <i>HIS3MX6</i>	Invitrogen
MRS-GFP	<i>MATa, his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0, <i>YGR264c-GFP</i> : <i>HIS3MX6</i>	Invitrogen

a. Knock out strains for genes involved in the following pathways: Snf1/4 (^a), PKA(^b) and TOR (^c).

Table S2: Quantification of *ARC1* mRNA during adaptation to respiration in strains deleted of essential genes of the TOR, PKA and Snf1/4 pathways.

	Expression	p-value	Std Error	<i>ARC1</i> transcription inhibition
Wild type	0.106	0.000	0.021-0.315	yes
<i>snf1</i> Δ	1.03	0.921	0.908-1.232	no
<i>snf4</i> Δ	0.364	0.001	0.217-0.71	yes
<i>gal83</i> Δ	0.938	0.914	0.824-1.1	no
<i>mig1</i> Δ	1.06	0.889	0.653-1.242	no
<i>hxx2</i> Δ	1.104	0.930	0.934-1.169	no
<i>rgt1</i> Δ	0.06	0.000	0.001-0.153	yes
<i>adr1</i> Δ	0.210	0.000	0.081-0.392	yes
<i>cat8</i> Δ	0,371	0.000	0.227-0.586	yes
<i>sip4</i> Δ	0.319	0.000	0.205-0.557	yes
<i>reg1</i> Δ	0.790	0.018	0.169-0.961	yes
<i>tos3</i> Δ	0.185	0.000	0.106-0.348	yes
<i>pkh1</i> Δ	0.047	0.000	0.005-0.368	yes
<i>tor1</i> Δ	0.065	0.005	0.035-0.111	yes
<i>tpk1</i> Δ	0.062	0.002	0.007-0.388	yes
<i>tpk2</i> Δ	0.032	0.002	0.018-0.056	yes
<i>gpa2</i> Δ	0.062	0.000	0.007-0.467	yes

<i>ras1Δ</i>	0.132	0.000	0.080-0.216	yes
--------------	-------	-------	-------------	-----

a. qRT-PCR quantification of *ARC1* mRNA was performed as described in the experimental procedures and legend to Fig. 1D, using *ACT1*, *NUP57*, *MES1* and *GUS1* as internal references. Std: standard.

Table S3 related to Figure 5: Comparative quantification of *ATP1,-2,-3* and *RIP1* genes transcription in ARC and nM strains in SCGal 2%.

Gene	Expression	p-value	Std Error	variation
<i>ATP1</i>	0,193	0,002	0,146 - 0,265	down
<i>ATP2</i>	1,435	0,035	1,064 - 1,992	up
<i>ATP3</i>	1,410	0,012	1,154 - 1,824	up

a. Measurements were done as described in the experimental procedures and legend to Fig. 5C, using four genes as internal references, *ACT1*, *GUS1*, *NUP57* and *MES1*. no: no variation, down: inhibition, up: induction.

Table S4 related to Figure 5: Comparative quantification of nuclear respiratory chain genes transcription in WT and ARC strains.

Gene	Expression	p-value	Std Error	variation
<i>FMC1</i>	0,547	0,049	0,284 - 1,091	no
<i>ATP1</i>	0,496	0,001	0,366 - 0,688	down
<i>ATP2</i>	0,606	0,007	0,432 - 0,886	nc
<i>ATP3</i>	0,340	0,000	0,148 - 0,609	down
<i>ATP4</i>	1,276	0,633	0,747 - 2,256	no
<i>ATP5</i>	2,269	0,025	1,818 - 2,968	nc
<i>ATP7</i>	0,781	0,605	0,434 - 1,330	no
<i>ATP12</i>	0,758	0,116	0,526 - 1,094	no
<i>ATP17</i>	0,284	0,002	0,116 - 0,681	down
<i>ATP19</i>	0,390	0,003	0,235 - 0,636	down
<i>ATP22</i>	1,224	0,700	0,374 - 4,279	no
<i>INH1</i>	2,758	0,330	0,803 - 9,812	no
<i>STF1</i>	0,563	0,121	0,349 - 0,881	no
<i>STF2</i>	0,428	0,252	0,157 - 1,082	no
<i>NDI1</i>	0,985	0,963	0,609 - 1,473	no
<i>NDE1</i>	0,743	0,429	0,459 - 1,271	no
<i>NDE2</i>	0,207	0,063	0,081 - 0,490	nc
<i>SDH1</i>	1,205	0,881	0,820 - 2,123	no
<i>SDH2</i>	1,576	0,137	1,074 - 2,701	no
<i>SDH3</i>	1,117	0,826	0,452 - 2,429	no
<i>SDH4</i>	1,008	0,913	0,603 - 1,787	no

<i>ACPI</i>	0,739	0,171	0,593 - 0,977	no
<i>OXA1</i>	1,661	0,124	1,123 - 2,306	no
<i>COX4</i>	1,170	0,707	0,768 - 2,380	no
<i>COX5B</i>	1,601	0,212	0,959 - 3,051	no
<i>COX6</i>	0,833	0,696	0,467 - 1,479	no
<i>COX7</i>	0,726	0,551	0,374 - 1,289	no
<i>COX8</i>	1,842	0,013	1,292 - 3,062	nc
<i>COX9</i>	1,117	0,925	0,763 - 1,975	no
<i>COX11</i>	2,038	0,229	1,052 - 3,705	no
<i>COX12</i>	0,841	0,452	0,619 - 1,380	no
<i>COX13</i>	1,107	0,789	0,777 - 1,808	no
<i>COX14</i>	1,661	0,423	0,891 - 2,824	no
<i>COX15</i>	0,744	0,353	0,444 - 1,518	no
<i>COX16</i>	1,825	0,524	0,797 - 4,121	no
<i>COX17</i>	2,296	0,025	1,515 - 2,969	nc
<i>COX19</i>	1,324	0,490	0,695 - 2,531	no
<i>QCR2</i>	0,23	0,000	0,055-0,356	down
<i>QCR6</i>	0,276	0,000	0,101-0,468	down
<i>QCR7</i>	0,151	0,000	0,123-0,257	down
<i>QCR8</i>	0,239	0,000	0,1-0,405	down
<i>QCR9</i>	0,194	0,000	0,05-0,246	down
<i>QCR10</i>	0,271	0,000	0,219-0,495	down
<i>RIP1</i>	0,279	0,000	0,124-0,325	down
<i>CYT1</i>	0,265	0,000	0,23-0,53	down
<i>CYC1</i>	0,778	0,021	0,257-0,9	down
<i>CYC7</i>	0,852	0,028	0,712-1,209	down
<i>CBP3</i>	0,485	0,000	0,313-0,563	down
<i>CBP4</i>	0,08	0,000	0,01-0,331	down
<i>MBA1</i>	0,615	0,015	0,5-0,698	down

a. Measurements were done as described in the experimental procedures and legend to Fig. 5E, using four genes as internal references, *ACT1*, *GUS1*, *NUP57* and *MES1*. no: no variation, down: inhibition, nc: not clear.

Table S5 related to Figure 5: Comparative quantification of nuclear respiratory chain genes transcription in the WT and nE strains.

Gene	Expression	p-value	Std Error	variation
<i>FMC1</i>	0,426	0,059	0,190-0,981	nc
<i>ATP1</i>	0,447	0,001	0,278-0,742	down
<i>ATP2</i>	0,376	0,002	0,227-0,614	down
<i>ATP3</i>	0,318	0,002	0,206-0,553	down
<i>ATP4</i>	0,996	0,815	0,621 - 1,871	no
<i>ATP5</i>	2,038	0,108	1,609 - 2,654	no

<i>ATP7</i>	0,884	0,858	0,463 - 1,433	no
<i>ATP12</i>	0,540	0,010	0,333-0,861	nc
<i>ATP17</i>	0,229	0,000	0,097 - 0,620	down
<i>ATP19</i>	0,565	0,019	0,359 - 0,878	nc
<i>ATP22</i>	0,479	0,067	0,188 - 1,358	no
<i>INH1</i>	2,203	0,425	0,623 - 7,848	no
<i>STF1</i>	0,418	0,000	0,253 - 0,655	nc
<i>STF2</i>	0,354	0,096	0,127 - 0,846	nc
<i>NDI1</i>	0,852	0,494	0,612 - 1,309	no
<i>NDE1</i>	0,796	0,653	0,484 - 1,394	no
<i>NDE2</i>	0,367	0,092	0,138 - 0,753	no
<i>SDH1</i>	0,872	0,692	0,593 - 1,479	no
<i>SDH2</i>	1,267	0,677	0,592 - 2,356	no
<i>SDH3</i>	0,812	0,676	0,305 - 1,665	no
<i>SDH4</i>	0,653	0,292	0,417 - 1,247	no
<i>ACPI</i>	0,377	0,031	0,250 - 0,548	nc
<i>OXA1</i>	1,591	0,191	1,087 - 2,481	no
<i>COX4</i>	0,581	0,329	0,368 - 1,139	no
<i>COX5B</i>	1,194	0,855	0,703 - 2,422	no
<i>COX6</i>	0,714	0,451	0,421 - 1,274	no
<i>COX7</i>	0,734	0,646	0,392 - 1,240	no
<i>COX8</i>	1,399	0,387	0,918 - 2,161	no
<i>COX9</i>	1,107	0,961	0,771 - 2,011	no
<i>COX11</i>	1,859	0,208	1,341 - 3,061	no
<i>COX12</i>	0,801	0,372	0,589 - 1,312	no
<i>COX13</i>	1,167	0,583	0,795 - 1,828	no
<i>COX14</i>	0,987	0,893	0,635 - 1,644	no
<i>COX15</i>	0,463	0,198	0,302 - 1,021	no
<i>COX16</i>	1,036	1,000	0,682 - 1,758	no
<i>COX17</i>	2,066	0,108	1,501 - 2,938	no
<i>COX19</i>	1,309	0,458	0,751 - 1,938	no
<i>QCR2</i>	0,252	0,000	0,216 - 0,496	down
<i>QCR6</i>	0,263	0,000	0,152 - 1,476	down
<i>QCR7</i>	0,121	0,000	0,110 - 0,236	down
<i>QCR8</i>	0,234	0,000	0,123 - 0,510	down
<i>QCR9</i>	0,195	0,000	0,103 - 0,398	down
<i>QCR10</i>	0,240	0,000	0,180 - 0,415	down
<i>RIP1</i>	0,211	0,000	0,134 - 0,370	down
<i>CYT1</i>	0,132	0,000	0,107 - 0,352	down
<i>CYC1</i>	0,384	0,000	0,121 - 0,533	down
<i>CYC7</i>	0,279	0,000	0,125 - 0,527	down
<i>CBP3</i>	0,520	0,012	0,293 - 1,082	down
<i>CBP4</i>	0,041	0,000	0,008 - 0,493	down
<i>MBA1</i>	0,907	0,935	0,504 - 1,439	no

a. Measurements were done as described in the experimental procedures and legend to Fig. 5E, using four genes as internal

references, *ACT1*, *GUS1*, *NUP57* and *MES1*. no: no variation, down: inhibition, nc: not clear.

Table S6 related to Figure 5: Comparative quantification of nuclear respiratory chain genes transcription in the ARC and nM strains in fermentation.

Gene	Expression	p-value	Std Error	variation
<i>FMC1</i>	1,187	0,739	0,505-2,963	no
<i>ATP1</i>	0,385	0,058	0,136-0,844	no
<i>ATP2</i>	0,741	0,140	0,483-1,098	no
<i>ATP3</i>	1,281	0,832	0,468-6,663	no
<i>ATP4</i>	2,087	0,077	0,935-6,324	no
<i>ATP5</i>	0,777	0,217	0,511-1,141	no
<i>ATP7</i>	1,767	0,253	0,630-5,613	no
<i>ATP12</i>	1,303	0,506	0,542-3,112	no
<i>ATP17</i>	0,898	0,686	0,504-1,742	no
<i>ATP19</i>	1,011	0,970	0,583-1,877	no
<i>ATP22</i>	1,034	0,875	0,668-1,671	no
<i>INH1</i>	0,819	0,583	0,342-1,623	no
<i>STF1</i>	1,501	0,225	0,688-2,988	no
<i>STF2</i>	1,357	0,309	0,823-2,592	no
<i>NDI1</i>	1,241	0,331	0,782-1,898	no
<i>NDE1</i>	0,907	0,779	0,409-2,147	no
<i>NDE2</i>	2,021	0,222	0,680-6,617	no
<i>SDH1</i>	1,439	0,235	0,834-2,730	no
<i>SDH2</i>	1,238	0,433	0,757-2,047	no
<i>SDH3</i>	1,343	0,281	0,762-2,184	no
<i>SDH4</i>	1,290	0,372	0,653-2,501	no
<i>ACPI</i>	1,808	0,074	0,778-3,977	no
<i>OXA1</i>	1,311	0,42	0,857-2,477	no
<i>COX4</i>	1,411	0,054	1,01-2,117	no
<i>COX5B</i>	1,644	0,179	0,839-3,68	no
<i>COX6</i>	1,432	0,426	0,502-2,965	no
<i>COX7</i>	1,413	0,078	0,999-2,057	no
<i>COX8</i>	0,712	0,369	0,334-1,566	no
<i>COX9</i>	0,922	0,894	0,265-4,69	no
<i>COX11</i>	1,601	0,565	0,573-5,509	no
<i>COX12</i>	1,432	0,347	0,677-3,267	no
<i>COX13</i>	1,075	0,838	0,498-2,563	no
<i>COX14</i>	1,566	0,112	0,856-2,777	no
<i>COX15</i>	1,957	0,295	0,649-8,844	no
<i>COX16</i>	2,616	0,115	0,54-9,179	no
<i>COX17</i>	1,459	0,382	0,583-2,744	no
<i>COX19</i>	1,508	0,096	0,881-2,494	no
<i>QCR2</i>	2,501	0,002	1,901-5,093	up
<i>QCR6</i>	2,612	0,001	2,002-9,213	up
<i>QCR7</i>	1,034	0,907	0,954-1,132	no

<i>QCR8</i>	4,812	0,000	2,905-8,60	up
<i>QCR9</i>	0,993	0,889	0,852-1,225	no
<i>QCR10</i>	3,607	0,000	2,701-4,512	up
<i>RIP1</i>	9,709	0,000	6,025-18	up
<i>CYT1</i>	3,417	0,000	1,864-8,540	up
<i>CYC1</i>	1,200	0,953	0,991-1,602	no
<i>CYC7</i>	6,808	0,000	4,336-15	up
<i>CBP3</i>	4,101	0,000	2,910-9,507	up
<i>CBP4</i>	2,207	0,003	1,753-4,052	up
<i>MBA1</i>	1,225	0,893	1,02-1,549	no

a. Measurements were done as described in the experimental procedures and legend to Fig. 5D, using four genes as internal references, *ACT1*, *GUS1*, *NUP57* and *MES1*. no: no variation, down: inhibition, nc: not clear, up: induction.

Table S7: Glutamine codon usage in *S. cerevisiae* mitochondrial genes.

Gene	Number of total codons	Number of Gln codons	Position of first Gln codon	Percentage of Gln codons
<i>ATP9</i>	76	1	2	1.3
<i>ATP8</i>	48	3	3	6.3
<i>ATP6</i>	259	5	15	1.9
<i>COB</i>	385	6	22	1.6
<i>COX1</i>	534	9	3	1.6
<i>COX2</i>	251	9	8	3.6
<i>COX3</i>	269	4	10	1.5
<i>VARI</i>	398	4	85	1

a. Updated from Malgorzata et al., 2011

Methods

Media

The following rich media were used for the growth of yeast strains: 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone, 40 mg/L adenine, 2% (w/v) glucose (Glc), 2% (w/v) galactose (Gal), 2% (w/v) glycerol (Gly) or 2% (w/v) lactate (Lac). The glycerol medium was buffered at pH 6.2 with 50 mM potassium phosphate pH 7.2, and 2% (w/v) ethanol was added after sterilization. We also used complete synthetic medium

(SC) composed of 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.5% (w/v) ammonium sulfate, 2% (w/v) Glc or Gal and 0.8% (w/v) of a mixture of amino acids and bases from Formedium (Norfolk, UK). The solid media contained 2% (w/v) agar.

Growth conditions and monitoring of the diauxic shift in glucose medium

A yeast culture composed of SCGlc medium seeded at $A_{600\text{ nm}} = 0.5$ with a saturated WT starter was grown during 16 hours at 30°C in a Unitron incubator (Infors). The growth curve was obtained by monitoring the $A_{600\text{ nm}}$ over time. The specific two-steps pattern of the diauxic shift is only seen in optimal oxygenation conditions by filling a 1 L or 5 L Erlen with 50 mL or 250 mL of medium in order to obtain the highest surface for liquid-gas exchange. Evolution of the O_2 saturation was monitored in a Labfors® bioreactor (Infors) in SCGlc medium with optimal oxygenation conditions. SCGlc is composed of 6,75 g.L⁻¹ of Yeast Nitrogen Base, 2 g.L⁻¹ of Drop-Out mix without: Ade (A), His (H), Leu (L), Trp (W) and Ura (U) (US Biological), supplemented with 20 mg.L⁻¹ of A, H, U 50 mg.L⁻¹ or W, 250 mg.L⁻¹ of leucine and 20 g.L⁻¹ of glucose. Sterilisation was always performed by filtration on 0.22 µm cartridges (Millipore). The curves are the result of four independent growth experiments.

Relative q-PCR experiments:

All total mRNA samples were prepared with trizol® (Invitrogen), all cDNAs were prepared using AMV reverse transcriptase (MP biomedical) with 6 µg of total RNA and a 16-mer poly-dT oligoDNA, following recommendations of manufacturers. All q-PCR reaction mixtures were performed with 5 × HOT Pol® EvaGreen® qPCR Mix Plus Rox (Euromedex) and quantifications were performed in a MX3005P

thermocycler (Stratagene). Data were analyzed with the REST software (Pfaffl et al., 2002). Each value for *ARC1*, *GUS1* and *MES1* mRNA amounts over time (Fig. 1B) was obtained by measurement of the quantity of the three transcripts contained in total mRNA preparation from 10 mL aliquots of a WT culture. *ACT1*, *NUP57* and *NOPI* were used as internal references. Measurements of *ARC1* mRNA transcript in various knock-out strains was also performed on 10 mL cultures grown in fermentation or respiration (respectively 4 or 12 hours). Preparation of mRNA samples for quantification of the transcription of nuclear-encoded partners of the RC in the ARC and nE strains was made using 10 mL of a culture of each strain grown in SCGlc 2% - L -W during 16h in order to adapt to respiration. *ACT1*, *NUP57*, *GUS1* and *MES1* were used as internal references.

Live image acquisition using confocal microscopy

One mL of the cMRS-GFP strain grown in SCGlc -H until 2-3 $A_{600\text{ nm}}$ (fermentation) or 7-8 $A_{600\text{ nm}}$ (respiration) was stained with 3 μL of Hoechst (5 mg/mL) during 10 min, then pelleted and washed with fresh medium. For Atp9p-RFP, the MTS of *Neurospora crassa ATP9* was fused to RFP in C-ter in a pRS426. A 10 μL -aliquot was then resuspended, put on coverslips and observed with a Zeiss LSM510 confocal microscope, using a 63 \times objective. Images were processed with the AIM3.2 software.

Purification of nuclei and preparation of nuclear protein extracts.

Yeast cells were pelleted at 1,500 $\times g$ for 10 min, resuspended in 1 volume of Sorbitol buffer, transferred in 50 mL Falcon vials previously filled with glass beads and broken using a FastPrep[®] (MP Biomedicals) with a program of 6 pulses of 25 seconds each at 6 m.s^{-1} . Broken cells were then centrifuged twice at 290 $\times g$ for 10 min and then twice at 430 $\times g$ for 10 min. One additional centrifugation at 1,200 $\times g$ for 5

min was necessary in order to progressively eliminate cell fragments and keep nuclei in the supernatant. Nuclei were then pelleted at 2,900×g for 15 min, resuspended in one volume of fresh sorbitol buffer and subjected to two additional differential centrifugation cycles composed of the two successive steps of 10 min at 1,200×g and 2,900×g in order to eliminate remaining cell debris. For immunodetection purposes, nuclear protein extracts were prepared as follows: fresh nuclei, resuspended in lysis buffer, were disrupted by sonication (VibraCell BioblockScientific) and centrifuged during 90 min at 105,000×g in order to pellet all cytosolic contaminants adsorbed on membrane fragments. Sorbitol buffer is composed of 1.1M Sorbitol and lysis buffer of 50 mM Hepes-Na, pH7.2 and 50 mM NaCl, both contains also 5 mM β-Mercaptoethanol and the Complete protease inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche).

Immunodetection and FACS measurements

WT S100 extracts were used as controls for visualizing the proportion of the cytosolic fraction of cMRS and for Arc1p quantification. For all extracts, protein concentration was determined using Bradford, and 10–15 µg of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% gel prior to electroblotting onto Hybond-P membrane (Amersham). Detection was carried out using HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse goat antibodies (Bio-Rad) and ECL-plus reagents (Amersham) according to the manufacturer's instructions. We used rabbit anti-cMRS primary antibodies (1:5,000) to quantify the amount of cMRS in each extract. To control the relative quantity and purity of the nuclear extracts, we used as a nuclear protein marker: the phosphorylated Histone 2A and the Nop1 nucleolar protein, which were detected using mouse anti-pH2A (1:1,000) and mouse anti-Nop1 (1:2,000) both from Abcam; and as a cytosolic marker: PGK, revealed using mouse anti-PGK (1:2,000). The quantifications of Arc1p and cERS, used as controls, were done using anti-Arc1p (1:5,000) and anti-

cERS (1:5,000) rabbit antibodies. Evolution of the Arc1-GFP signal in classical conditions was monitored in a FACS Calibur (BD Biosciences) by measuring the mean fluorescence generated by 1×10^5 Arc1-GFP cells grown in SCGlc -His with 2% Glucose. Aliquots were taken every 2-4 h during 16 h.

Engineering of the ARC, nE and nM strains and oximetry measurements

The *ARC1*, *N_ERS* and *N_MRS* DNA fragments were synthesized by Genscript and subcloned into p425GPD (*ARC1*) and p424GPD (*N_ERS* and *N_MRS*) between the *SalI* and *SacI* restriction sites. A $\Delta arc1$ strain was transformed with the p425GPD-*ARC1* recombinant plasmid and subsequently transformed with either the empty p424GPD, p424GPD- *N_ERS* or p424GPD- *N_MRS* plasmids yielding respectively the ARC, nE and nM strains. For p424GPD- *N_ERS* construction, the DNA sequence of the 190 first aa of cERS were used. This sequence corresponds to cERS Arc1p-binding domain but does not contain the putative mitochondrial targeting sequence located immediately downstream. For p424GPD- *N_MRS* construction, the DNA sequence of the 201 first aa of cMRS were used since it corresponds to cMRS Arc1p-binding domain (Simader et al., 2006). The control WT strain was co-transformed with the empty p425GPD and p424GPD plasmids. These four strains were grown in SCGal -Leu -Trp with 2% Galactose until $A_{600 \text{ nm}} = 2$ and 300 μL aliquots of each culture were mixed with 700 μL of fresh medium in the hermetic chamber of an Hansatech oxygraph oximeter. Rates of O_2 consumption were measured for a normalized quantity of cells from each strain, after addition of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) at the final concentration of 2 μM and corrected by subtraction of 2 mM KCN-insensitive respiration.

Engineering of pVC2-*ATP1* and pCM190-Pa*ATP9* plasmids

To reintroduce the *ATP1* gene into mutant nM, we replace the *URA3* marker of the plasmid pVC2-*ATP1* (Wu et al. 2014) with a DNA cassette including KanMX3 which confer kanamycin resistance (Voth et al. 2003). *ATP9* sequence from *Podospira anserina* (ATP9-5) was cloned into plasmid pCM190 (Gari et al. 1997) to give plasmid Pa*ATP9* (Bietenhader et al. 2012).

Analysis of the distribution of free and Arc1p-bound cMRS and cERS in the ARC, nE and nM strains using size-exclusion chromatography.

S100 extracts of the different strains were analysed on a SuperdexTM 200 10/300 GL (GE Healthcare) gel-filtration column using an AKTA FPLC system (GE Healthcare). Fractions were analyzed for their capacity to form [¹⁴C]Glu-tRNA (cERS specific activity) or [³⁵S]Met-tRNA (cMRS specific activity) in order to evaluate the proportion of Arc1p-bound or free forms of cMRS and cERS. As expected, in the nE and nM strains, the proportion of free cERS and cMRS increases whereas in the ARC strain the two aaRSs remain anchored in the complex with Arc1p.

In vivo labeling of mitochondrial translation products

These experiments were performed as previously described (Zeng et al. 2007). Briefly, strains were grown to early exponential phase (10^7 cells/mL) in 10 mL of galactose-rich media. The cells were harvested by centrifugation and washed twice with a low sulfate medium (W0-AS, W0 without ammonium sulfate; Claisse et al., 1974). Cells were resuspended in 0.5 mL of W0-AS containing 1% galactose, supplemented with the corresponding auxotrophic markers but without methionine and cystein and 1 mM of a freshly prepared solution of cycloheximide and incubated at 20°C for 5 min; then 50 μ Ci of [³⁵S]methionine-[³⁵S]cysteine Mix (1,000 Ci/mmol,

Perkin Elmer) was added. The reaction was stopped after 20 min, by the addition of 75 μ L of 1.85 M NaOH, 1 M β -mercaptoethanol, and 0.01 M phenylmethylsulfonyl fluoride. An equal volume of 50% trichloroacetic acid was added, and the mixture was centrifuged in a microcentrifuge for 5 min at 14,000 rpm. The pellet consisting of precipitated proteins was washed once with 0.5 M Tris pH 8.9 and once with water and resuspended in 50 μ L of sample buffer (2% (v/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 2.5% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.06 M Tris-HCl pH 6.8 and 0.002% (w/v) bromophenol blue). The proteins were then separated on a polyacrylamide gel (Laemmli et al., 1970) and the resulting 12% gel was dried and revealed by scanning the 1-h-exposed image plate with a Fuji Bioimager. Amounts of [³⁵S]-methionine-containing proteins in each lane were quantified using the ImageQuant software.

Immunodetection of cytoplasmic and mitochondrial proteins

Western blot analyses were performed as previously described (Arselin et al., 1996). For all extracts, protein concentration was determined using Bradford, and 10–15 μ g of proteins were separated by SDS-PAGE on a 10% or 12% gel prior to electroblotting onto Hybond-P membrane (Amersham). Detection was carried out using HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse goat antibodies (Bio-Rad), at a concentration of 1:2,000. We used ECL-plus reagents (Amersham) according to the manufacturer's instructions. We used rabbit anti-cMRS primary antibodies (1:5,000) to quantify the amount of cMRS in each nuclear extract and rabbit anti-cERS (1:5,000) to quantify the amount of cERS in each mitochondrial extract. To control the relative quantity and purity of our nuclear extracts, we used as a nuclear protein marker the Nop1 nucleolar protein (detected using mouse anti-Nop1 (1:2,000) from Abcam), and as a mitochondrial marker Por1 (detected with mouse anti-Por1 (1:2,000) from Abcam). As a cytosolic marker, we used PGK at 1:5,000 dilution.

Polyclonal antibodies raised against yeast ATP synthase were used at a dilution of 1:50,000 for detection of Atp1 and Atp2 subunits, and at a dilution of 1:10,000 for detection of Atp3 and Atp4 subunits. Monoclonal antibodies against yeast porin and Cox2p (Molecular Probes) were used at a dilution of 1:5,000. Rabbit anti-Aco1 and anti-Atp9 were used at 1:50,000 and 1:10,000 dilutions respectively.

Mitochondria purification

Isolated mitochondria were prepared by the enzymatic method (Guerin et al., 1979). The protein amounts were determined by the Lowry method in the presence of 5% (v/v) SDS (Lowry et al., 1951).

Blue native and colorless native polyacrylamide gel

BN- and CN-PAGE experiments were carried out as described previously (Schagger et al., 1991). Briefly, mitochondrial extracts solubilized with digitonin to a protein ratio of 2 (g/g) were separated in a 3-13% acrylamide continuous gradient gel. After electrophoresis, the gel was either stained with Coomassie Blue or incubated in a solution of 5 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 0.05% (w/v) lead acetate, 50 mM glycine-NaOH, pH 8.4 to detect the ATPase activity (Grandier-Vazeille et al., 1996) or transferred to poly(vinylidene difluoride) membranes and analyzed by Western blotting using conditions described above.

Bioenergetics and oxymetry

Oxygen consumption rates were measured with a Clark electrode in the respiration buffer (0.65 M mannitol, 0.36 mM EGTA, 5 mM Tris-phosphate pH 7, 10 mM Tris-maleate, pH 6.8) as previously described (Rigoulet et al., 1979). For ATP synthesis rate measurements, mitochondria (0.15 mg/mL) were placed in a 1mL

thermostatically controlled chamber at 28°C in respiration buffer. The reaction was initiated by addition of 4 mM NADH and 1 mM ADP and stopped by addition of 3.5% perchloric acid and 12.5 mM EDTA. The samples were then neutralized to pH 6.5 by addition of KOH and 0.3 M MOPS. ATP was quantified in a luciferin/luciferase assay (Perkin Elmer) with an LKB bioluminometer. The specific ATPase activity was measured at pH 8.4 by using a previously described procedure (Somlo et al., 1968). The participation of the F₁F₀-ATP synthase in ATP production or hydrolysis was assessed by oligomycin addition (20 µg/mg of protein). Variations in transmembrane potential ($\Delta\Psi$) were evaluated in the same buffer by measuring the fluorescence quenching of rhodamine 123 with a SAFAS (Monte Carlo, Monaco) fluorescence spectrophotometer (Emaus et al., 1986).

Ethanol quantitation

Ethanol dosage was carried out using the Ethanol Assay Kit (Abcam) following manufacturer's instructions. In brief, cells were grown on ScGal 2% to appropriate A_{600nm}, a 100µl aliquot was spun 1min at 13,000g to pellet cells and the supernatant was diluted 100 times. The reaction for ethanol titration was then carried out with 10µL of the dilution.

Protein digestion for nano-LC-MS/MS studies

Protein bands were manually excised from the gels and transferred into 96-well microtitration plates. Excised gel samples were cut in small pieces and washed three times by incubation in 25 mM NH₄HCO₃ for 15 min and then in 50% (v/v) acetonitrile containing 25 mM NH₄HCO₃ for 15 min. Samples were then dehydrated with 100% acetonitrile and then reduced with 10 mM DTT during 1 h before being alkylated with 55 mM iodoacetamide for 1 h in the dark. Gel pieces were washed

again with the destaining solutions described above. 0.250 µg of modified trypsin (Promega, sequencing grade) in 25 mM NH₄HCO₃ were added to the dehydrated gel spots depending on protein amount. After 30 min incubation at room temperature, 20 µL of 25 mM NH₄HCO₃ were added on gel pieces before incubation overnight at 37°C. Peptides were then extracted from gel pieces in 20 µL of 50% acetonitrile / 5% formic acid.

Nano-LC-MS/MS analysis.

For nano-LC-MS/MS analysis, the dried extracted peptides were transferred in vials compatible with nano-LC-MS/MS analysis (Ultimate 3000, Dionex and MicroTOF-Q, Bruker). The method consisted in a 60-min gradient at a flow rate of 300 nL/min using a gradient from two solvents: A (0.1% formic acid in water) and B (0.08% formic acid in acetonitrile). The system includes: a 300 µm × 5 mm PepMap C18 precolumn (Dionex) in order to pre-concentrate peptides and a 75 µm × 150mm C18 column (Dionex) used for peptide elution. MS and MS/MS data were acquired in a data-dependent mode using Hystar (Bruker) and processed using Mascot software (Matrix Science). Consecutive searches against the NCBI nr database first and then against the *S. cerevisiae* taxonomy were performed for each sample using an intranet version of Mascot 2.0. Peptide modifications allowed during the search were: N-acetyl (protein), carbamidomethylation(C) and oxidation (M). The other parameters were: peptide tolerance = 0.4 Da, MS/MS tolerance = 0.4 Da, 2 missed cleavage sites by trypsin allowed. Proteins showing two peptides with a score higher than the query threshold (p-value<0.05) were automatically validated with Proteinscape (Bruker). Each protein identified by only one peptide was checked manually using the classical fragmentation rules.

Supplemental bibliography

Arselin, G., Vaillier, J., Graves, P.V., and Velours, J. (1996). ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J Biol Chem* 271, 20284-20290

Bietenhader M, Martos A, Tetaud E, Aiyar RS, Sellem CH, Kucharczyk R, Clauder-Münster S, Giraud MF, Godard F, Salin B, Sagot I, Gagneur J, Déquard-Chablat M, Contamine V, Hermann-Le Denmat S, Sainsard-Chanet A, Steinmetz LM, di Rago JP. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002876. Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution.

Celenza, J. L., Eng, F. J. and Carlson, M. (1989). Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 9, 5045-5054

Claisse, M. L., and Pajot, P. F. (1974). Presence of cytochrome c1 in cytoplasmic "petite" mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 49, 49-59

Emaus, R.K., Grunwald, R., and Lemasters, J.J. (1986). Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: a spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 850, 436-448

Garí E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E. *Yeast.* 1997 Jul;13(9):837-48. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.

- Guerin, B., Labbe, P., and Somlo, M. (1979). Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol* 55, 149-159
- Grandier-Vazeille, X., and Guerin, M. (1996). Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal Biochem* 242, 248-254
- Jiang, R. and Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev* 10, 3105-3115
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Rigoulet, M., and Guerin, B. (1979). Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate. *FEBS Lett* 102, 18-22
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-231).
- Simader, H., Hothorn, M., Köhler, C., Basquin, J., Simos, G., Suck, D. (2006). Structural basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed

- by crystal structures of two binary sub-complexes. *Nucleic Acid Res.* 34, 3968-3979.
- Somlo, M. (1968). Induction and repression of mitochondrial ATPase in yeast. *Eur J Biochem* 5, 276-284.
- Voth WP, Jiang YW, Stillman DJ. *Yeast*. 2003 Aug;20(11):985-93. New 'marker swap' plasmids for converting selectable markers on budding yeast gene disruptions and plasmids.
- Wu Q, Andrianaivomananja T, Tetaud E, Corvest V, Haraux F. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1837(6):761-7. Interactions involved in grasping and locking of the inhibitory peptide IF1 by mitochondrial ATP synthase.
- Zeng, X., Neupert, W., and Tzagoloff, A. (2007) The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase. *Mol Biol Cell* 18, 617-626

Partie III

Impact du complexe AME sur le complexe III de la chaîne respiratoire

III.1 Introduction au sujet

J'aimerais à présent vous exposer une partie de mon travail réalisé au cours de l'étude du complexe AME et son rôle dans l'expression et l'assemblage de la CR mitochondriale. Je me dois de remercier Mikhail Vyssokikh et Emmanuel Tétaud pour leur aide technique et les nombreuses discussions que nous avons eues.

Les travaux sur les souches désynchronisées du complexe AME ont démarré sur un constat : la souche **nM** est incapable de dépasser 2 générations lorsqu'elle est mise à croître sur milieu respiratoire. A cette époque nous étions loin d'imaginer que l'incapacité de cette souche à respirer venait d'un défaut d'expression et d'assemblage de l'ATP synthase dans la cellule. Nous avons suivi la première hypothèse, soutenu par un pan entier de littérature, qui propose que la respiration est associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et que ces ROS peuvent conduire à la létalité (Bell et al., 2007; Galluzzi et al., 2012; Lenaz et al., 2010; Pereira et al., 2008).

III.2 Résultats

III.2.1 La souche nM produit une quantité importante de ROS

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle la souche **nM** produit une quantité anormale de ROS par rapport aux souches sauvages (WT : RS453), **ARC** et **nE**, j'ai entrepris de visualiser les radicaux libres produits dans ces souches par fluorescence. Les souches ont été cultivées en milieu synthétique contenant 2% de galactose comme source de carbone (SCGal 2%) jusqu'en phase exponentielle de croissance à 30 °C, puis traitées pendant 20 minutes avec du 2',7'-diacétate de dichlorofluoresceine (DCF), un marqueur qui devient fluorescent après oxydation dans la cellule. Des images prises en microscopie confocale nous montrent que la fluorescence du DCF est similaire entre les souches WT, **ARC** et **nE**, tandis qu'elle est beaucoup plus importante pour la souche **nM** (Figure 24A). Un panel de plusieurs images a été pris pour chaque souche afin de quantifier la fluorescence observée. Nous pouvons voir dans la figure 24B que la fluorescence émise par le DCF est la même entre les souches WT, **ARC** et **nE** tandis qu'elle est 2,5 fois plus importante dans la souche **nM**. Ces expériences montrent que l'oxydation du DCF est plus important dans la souche **nM**, démontrant que la souche **nM** produit une quantité plus importante de ROS que les souches WT, **ARC** ou **nE**.

III.2.2 Les ROS produit dans la souche nM sont issus du complexe III de la CR

Comme nous l'avons déjà vu, les ROS sont produits de manière naturelle dans la cellule et jouent un rôle dans certaines voies de régulations (Blokhina and Fagerstedt, 2010; Hekimi et al., 2011)

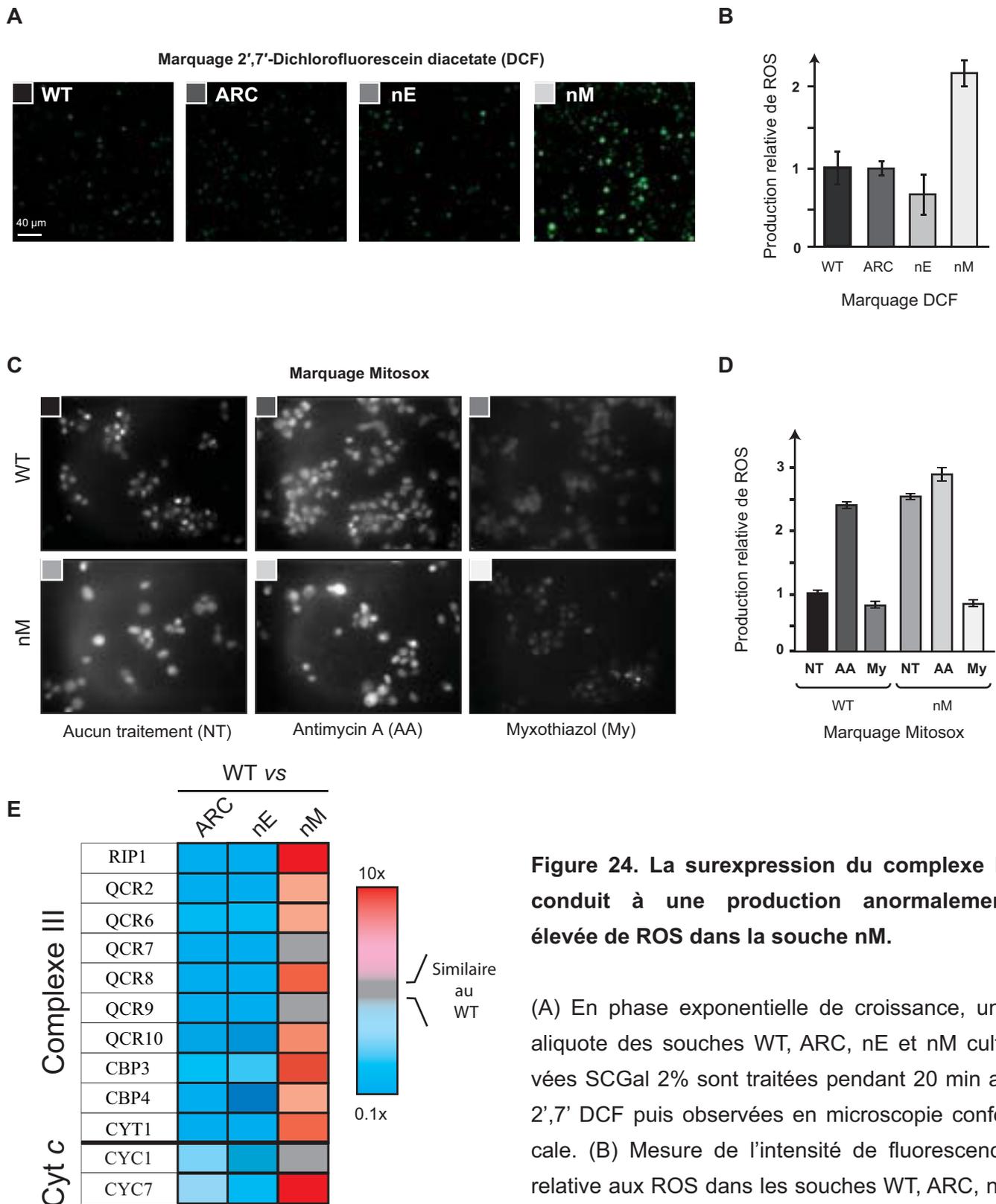


Figure 24. La surexpression du complexe III conduit à une production anormalement élevée de ROS dans la souche nM.

(A) En phase exponentielle de croissance, une aliquote des souches WT, ARC, nE et nM cultivées SCGal 2% sont traitées pendant 20 min au 2',7' DCF puis observées en microscopie confocale. (B) Mesure de l'intensité de fluorescence relative aux ROS dans les souches WT, ARC, nE et nM d'après les images prises en (A). (C) Marquage au MitoSOX des souches WT et nM cultivées en SCGal 2% jusqu'en phase exponentielle de croissance et supplémentées ou non de drogues spécifiques du complexe III, l'Antimycine A (AA) et le Myxothiazol (My) pendant 20 min. (D) Mesure de l'intensité de fluorescence relative aux ROS dans les souches WT et nM après marquage au MitoSOX. (E) Etude de l'expression des gènes nucléaires codant les sous-unités du complexe III de la CR par RT-qPCR. Les résultats exposés pour les souches **ARC**, **nE** et **nM** ont été normalisés par rapport à une souche WT. Les souches ont été cultivées en SCGlu 2%. Cyt c: cytochrome c.

(Hamanaka and Chandel, 2010; Patten et al., 2010). Chez la levure *S.cerevisiae* les ROS sont principalement produit par le complexe III de la CR qui comporte deux sous-unités catalytiques Rip1p et le cytochrome *b*, et un transporteur d'électron qui est le cytochrome *c1* (Bell et al., 2007; Chen et al., 2003; Drose and Brandt, 2008). Pour vérifier que le complexe III est bien responsable de la production des ROS dans la souche **nM**, j'ai à nouveau visualisé et quantifié la production de ROS par microscopie mais cette fois-ci avec du MitoSOX, une sonde fluorescente qui réagit spécifiquement avec les anions superoxydes, et en utilisant deux drogues spécifiques du complexe III, l'Antimycine A (AA) et le myxothiazol (My). L'antimycine A bloque le passage des électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome *b* dans le complexe III ce qui provoque une « fuite » des électrons vers l'espace intermembranaire et conduit à la production de ROS, tandis que le myxothiazol empêche Rip1p de transférer les électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome *c1* ce qui conduit à une baisse de la production de ROS (Figure 25). La figure 24C montre à nouveau que l'intensité de fluorescence émise par le MitoSOX est plus importante dans la souche **nM** par rapport à la WT (panels de gauche) ce qui signifie que la souche **nM** produit plus de ROS que la WT, lorsqu'elles sont cultivées en SCGal 2% à 30 °C. Un traitement de 20 minutes avec 200 µM d'AA augmente la fluorescence de la souche WT et de la souche **nM**, ce qui confirme le rôle de l'AA dans la production de ROS (panels du centre). Les souches traitées avec 200 µM de myxothiazol pendant 20 minutes présentent une baisse drastique de la fluorescence correspondant à une baisse de production de ROS (panels de droite). La mesure des intensités de fluorescence nous montre que la souche **nM** produit à nouveau 2,5 fois plus de ROS que la souche WT (Figure 24D). De plus le traitement à l'AA augmente de près de 2,5 fois la production de ROS dans la souche WT mais pas dans la souche **nM** où seule une faible augmentation est observée, ce qui signifie que la production de ROS est déjà à son « maximum » dans cette souche. Comme observé en microscopie, le traitement au myxothiazol réduit la production de ROS en dessous du niveau de celle de la souche WT dans les souches WT et **nM** traitées. Ces expériences m'ont permis de montrer que la quantité anormale de ROS dans la souche **nM** est issue du complexe III.

Lorsque la stœchiométrie du complexe, ou la quantité de complexe III par rapport aux autres complexes, n'est pas respectée, une partie des électrons qui transitent au niveau du complexe III ne sont plus délivrés au cytochrome *c1* et « fuient » hors de la CR, réagissent avec des molécules d'oxygène et forment les ROS (Coenen et al., 2001; Drose and Brandt, 2008; Jonckheere et al., 2012). On peut donc se demander si une surexpression des gènes nucléaires codant les sous-unités du complexe III conduit à une quantité anormale de ces complexes dans la CR et serait à l'origine des ROS dans la souche **nM**. Pour vérifier cela nous avons réalisé une étude transcriptomique sur tous les gènes nucléaires codant les composants de la CR (exposé dans l'Article 1) dans les souches WT, **ARC**, **nE** et **nM** cultivées en SCGlc 2% c'est-à-dire en fermentation. Les résultats obtenus pour le complexe III, et normalisés par rapport à une souche WT, sont exposés dans la figure 24E et nous montrent que l'expression de tous les gènes est réprimée dans les souches **ARC** et **nE**, tandis qu'une

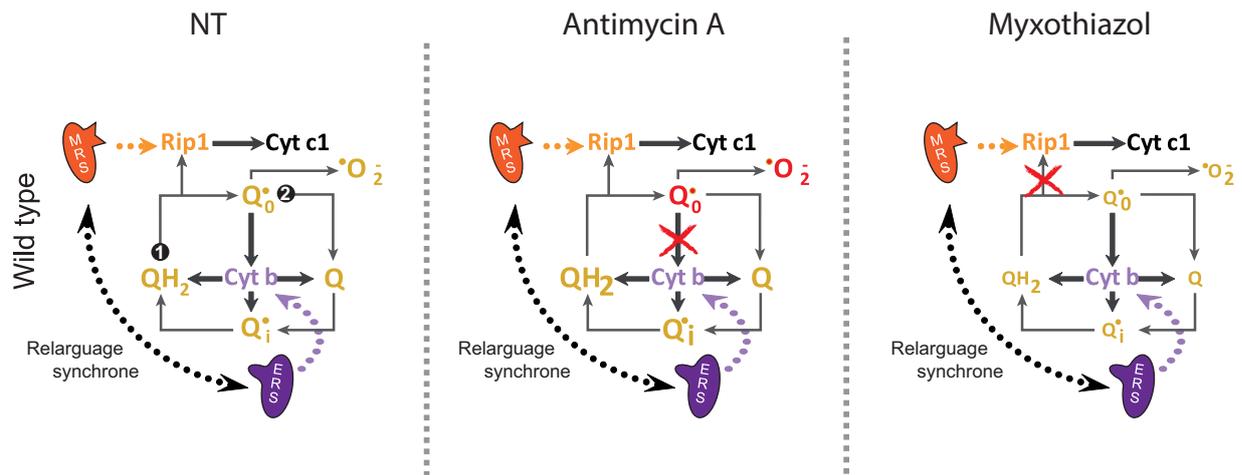


Figure 25. Description schématisée du cycle de la quinone dans le complexe III et de l'effet de l'Antimycin A et du Myxothiazol sur le transfert d'électron.

NT : Non traité ; QH₂: ubiquinol ; Q: ubiquinone ; Q₀ et Q_i sont des sites de liaison à l'ubiquinone, Q₀ est le site d'oxydation de l'ubiquinol et Q_i le site de réduction de l'ubiquinone; Cyt b : cytochrome b

① L'ubiquinol arrive au niveau du complexe III, le premier électron est transféré à Rip1p puis au cytochrome *c1* ce qui génère le radical semi-ubiquinone. ② Le second électron de la semi-ubiquinone est ensuite transféré au cytochrome b. L'ubi-semiquinone peut également transférer un électron à une molécule d'oxygène, générant un anion superoxyde (O₂⁻).

grande majorité des gènes sont surexprimés dans la souche **nM**, notamment la sous-unité Rip1p qui est responsable du transfert des électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome *cI*. Cela suggère donc que c'est bien la surexpression des composants du complexe III qui est responsable de surproduction de ROS dans la souche **nM**.

III.2.3 La mort de la souche **nM** en respiration n'est pas due aux ROS

Afin de vérifier si les ROS pouvaient être à l'origine de la létalité de la souche **nM** après les 2 générations qu'elle peut faire sur milieu respiratoire, j'ai entrepris de faire pousser les souches WT, **ARC**, **nE**, **nM** et **nE/nM** sur un milieu respiratoire contenant 2% de glycérol supplémenté ou non de 5 mM de N-acétylcystéine (NAC), un puissant antioxydant (Figure 26A). Nous pouvons voir que la souche **nM** est incapable de pousser sur milieu respiratoire (SCGly 2% + agar) même lorsqu'il est supplémenté en NAC. Pour s'assurer que rien ne pouvait interférer avec le mécanisme d'action ou la stabilité du NAC au cours de ces expériences, nous avons testé différents lots et différentes manières d'ajouter le NAC dans le milieu (Figure 26B). Sur milieu synthétique fermentescible (SCGlc 2%) et semi-respiratoire (SCGal 2%) supplémentés ou non en NAC les trois souches WT, **nE** et **nM** poussent très bien, tandis que sur milieu respiratoire (SCGly 2%) avec ou sans NAC, la souche **nM** est toujours incapable de pousser. L'incapacité du NAC à restaurer la croissance de la souche **nM** en respiration nous indique que ce ne sont pas les ROS qui tuent cette souche en respiration.

Une analyse plus approfondie des dysfonctionnements dans la souche **nM** par cryo-EM (microscopie électronique) a révélé que les mitochondries de cette souche contiennent des corps d'inclusions (6,6% par rapport à une WT) qui réagissent aux anticorps dirigés contre Atp2p. Dans le but d'écarter l'implication des ROS dans ce phénomène, un traitement au NAC de la souche **nM** cultivée en SCGal 2% a été réalisé, puis des images de microscopie électronique ont, de nouveau, été acquises. Une fois de plus, les corps d'inclusions sont toujours présents dans la souche **nM** malgré le traitement au NAC (Figure 27 A, B). Une des particularités de la souche **nM**, détectée par des expériences de traduction *in vivo* en présence de [S^{35}]Met, réside également dans l'absence quasi-complète des sous-unités Atp8- et 9p de l'ATP synthase (Figure 28A, 5 premières colonnes). L'impact des ROS dans l'absence de ces deux sous-unités a également été écarté puisque l'utilisation de NAC ne permet pas non plus de rétablir l'expression d'Atp8- et 9p dans la souche **nM** (Figure 28A, deux dernières colonnes).

Bien que les ROS ne soient pas à l'origine de la mort de la souche **nM** en respiration, ils sont tout de même produits en quantité importante dans cette souche. Cela m'a amené à analyser le fonctionnement du complexe III isolé à partir de cellules WT et **nM** cultivées en fermentation. En réalité, ces expériences sont réalisées sur des mitochondries purifiées, puis l'activité spécifique du

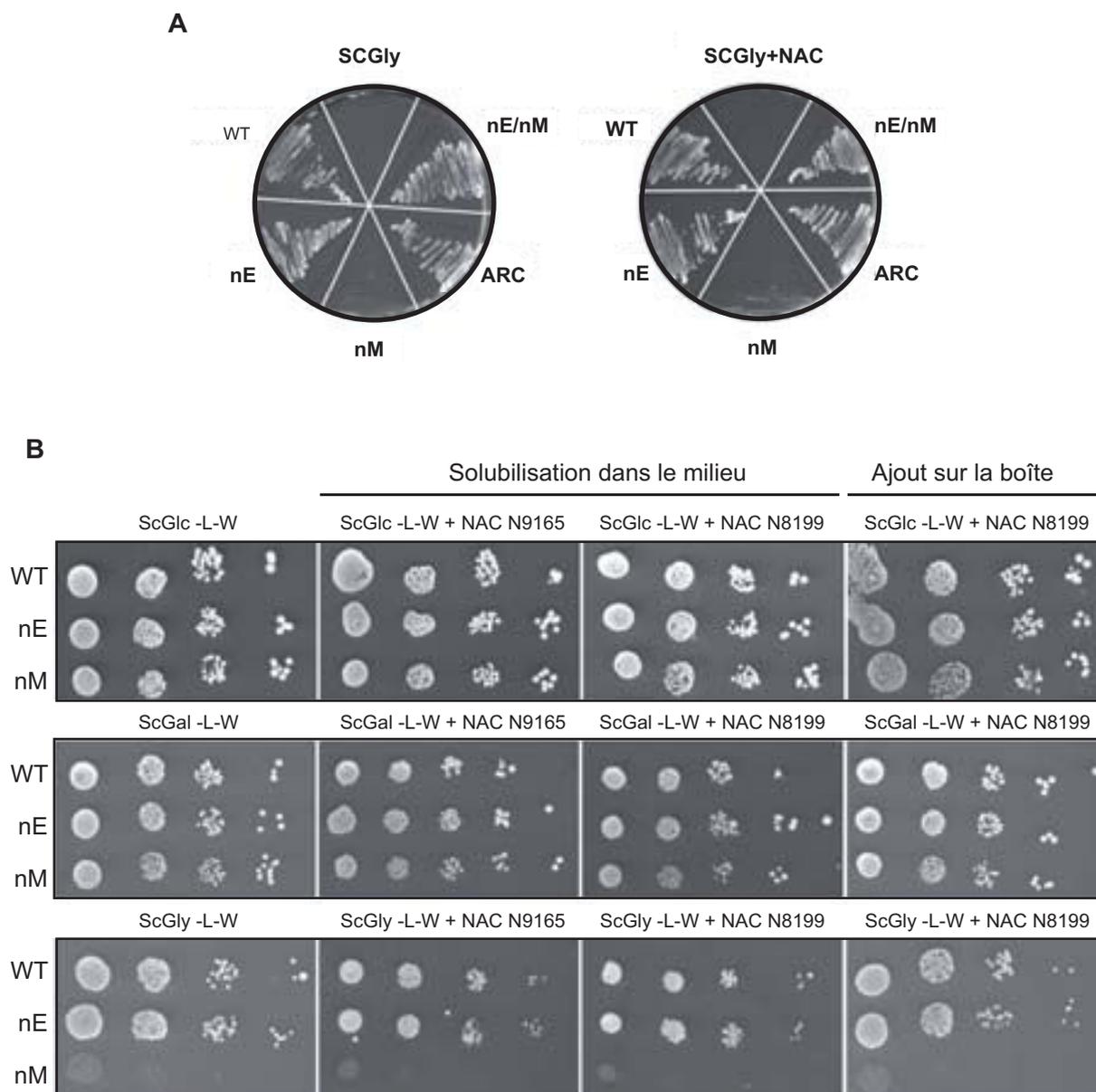


Figure 26. Le N-Acétyl cystéine (NAC) ne permet pas à la nM de pousser en respiration.

(A) Croissance des souches **WT**, **ARC**, **nE**, **nM** et **nE/nM** sur milieu respiratoire (SCGly 2%) en l'absence (panel de gauche) ou en présence de 5 mM de NAC. (B) Croissance des souches **WT**, **nE** et **nM** sur milieu SCGlc- Gal- ou Gly 2% en l'absence (colonne de gauche) ou présence de 5 mM de NAC solubilisé dans la gélose ou directement déposé sur la gélose. N9165 and N8199 correspondent aux numéros de lots de NAC utilisés. Les images ont été prises après deux jours (SCGlc et Gal) et trois jours (SCGly 2%) de croissance.

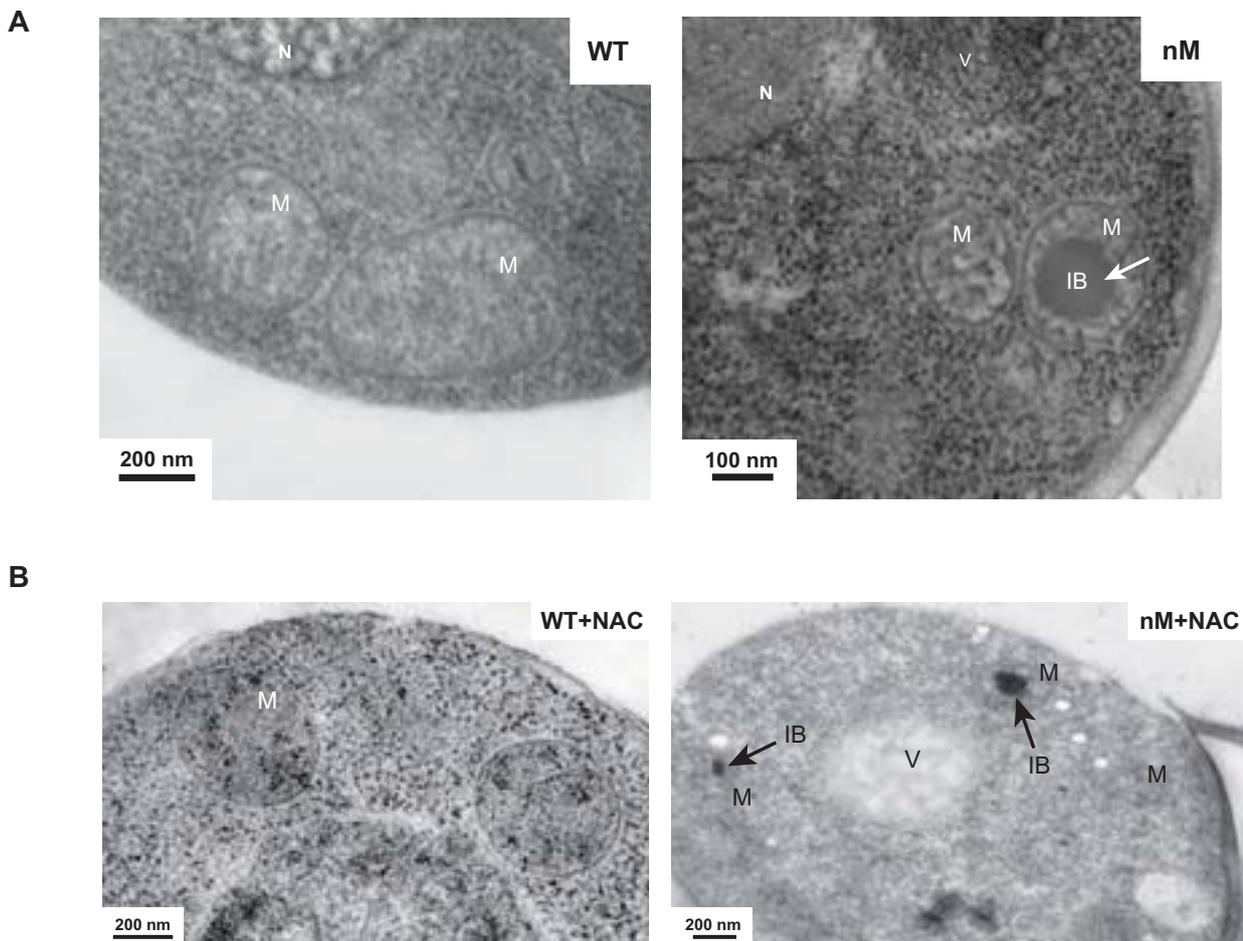


Figure 27. L'utilisation du NAC n'inhibe pas la formation des corps d'inclusions dans la nM.

(A) Les images de microscopie électronique réalisées sur la souche **WT** (panel de gauche) et la souche **nM** (panel de droite) cultivées en SCGal2% mettent en évidence la présence de corps d'inclusion dans les mitochondries de la souche **nM** (IB, flèche blanche). (B) Les images de microscopie électronique réalisées sur la souche **WT** (panel de gauche) et la souche **nM** (panel de droite) cultivées en SCGal2% supplémenté avec 5 mM de NAC montrent que les corps d'inclusions sont toujours présents (IB, flèche blanche). M: mitochondrie; N: noyau; les flèches indiquent les corps d'inclusion (IB).

A

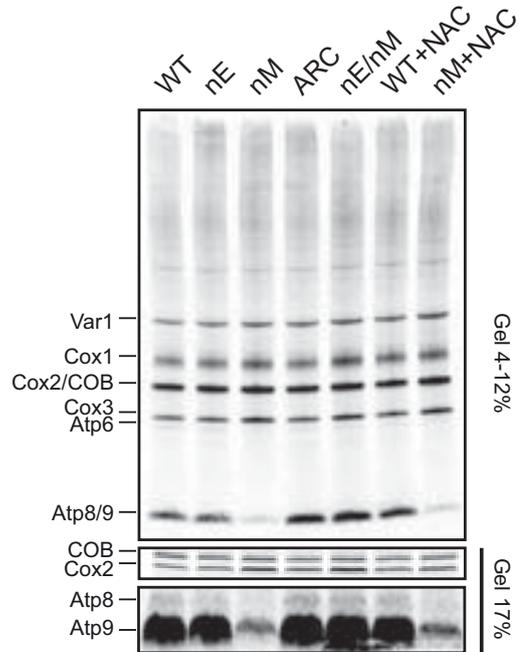


Figure 28. Traduction *in vivo* des protéines mitochondriales de levure en présence ou non de NAC.

(A) Marquage des protéines néosynthétisées dans la mitochondrie en présence de méthionine radioactive ($[S^{35}]Met$) à partir de levures cultivées en SCGal 2% en présence (5 premières colonnes) ou non (deux dernières colonnes) de 5 mM de NAC.

complexe III est étudiée après inhibition des autres complexes par l'utilisation de drogues comme la roténone (pour le complexe I), le malonate (pour le complexe II), le KCN (pour le complexe IV) ou l'oligomycine (pour l'ATP synthase). Les analyses fonctionnelles du complexe III consistent à mesurer la réduction du cytochrome *c*, l'accepteur d'électrons (en excès au cours de la réaction) du complexe III en présence d'ubiquinol (le donneur d'électrons). Il existe différents variants de l'ubiquinol en fonction de la longueur de la chaîne latérale polyprénylée, pouvant aller de 0 à 10 carbones (on parle alors du fameux Coenzyme Q₁₀). Au cours de mes analyses, j'ai utilisé le Q₀ (aucune chaîne latérale) qui diffuse librement dans les membranes mitochondriales, et le Q₂ (deux carbones dans la chaîne latérale) qui est retenu de manière plus spécifique dans la membrane. On observe dans la figure 29A qu'en utilisant le Q₀, le complexe III de la **nM** est moins efficace dans le transfert des électrons vers le cytochrome *c* que dans une souche WT. En revanche, en utilisant le Q₂, nous observons que le complexe III de la souche **nM** est plus prompt à réduire le cytochrome *c* que dans la souche WT, il est donc plus actif lorsque l'ubiquinol est présent de manière stable dans la membrane mitochondriale (Figure 29A, panel de gauche). L'utilisation du Q₂, plus « proche » des espèces retrouvées dans les mitochondries de levures que le Q₀ qui diffuse et transite librement entre les différents compartiments de la mitochondrie, suggère que le complexe III semble être plus actif dans la souche **nM**.

III. 3 Discussion et perspectives

Ces analyses suggèrent donc que le complexe III est *i*) soit plus abondant dans les mitochondries de la souche **nM**, *ii*) soit que certaines sous-unités sont surnuméraires au sein des complexes. Les immuno-détections faites sur la sous-unité Rip1p semblent indiquer qu'elle est présente en plus grande quantité dans les extraits bruts de **nM** par rapport à une WT, bien que rien ne prouve qu'elle soit associée au complexe III (Figure 29C et D). Une quantité plus importante de complexe III dans la membrane mitochondriale n'a pas non plus été démontrée et pourrait être démontrée par gel natif.

Cette étude parallèle m'a permis de montrer que la souche **nM** se caractérisait par une production anormalement élevée de ROS dans un milieu semi-respiratoire (SCGal 2%) mais que ces derniers n'étaient pas responsables de la mort de cette souche en respiration. J'ai néanmoins pu montrer que ces ROS étaient produits par le complexe III, bien qu'aucune explication n'ait pu être donnée sur l'origine de cette production. On peut néanmoins proposer que comme le complexe III est normalement réprimé dans une souche pauvre en ATP synthase, maintenir son expression dans une souche qui ne possède pas ou très peu d'ATP synthase (**nM**), provoque une accumulation et une fuite d'électrons qui mène à la production d'une quantité importante de ROS (Couplan et al., 2011).

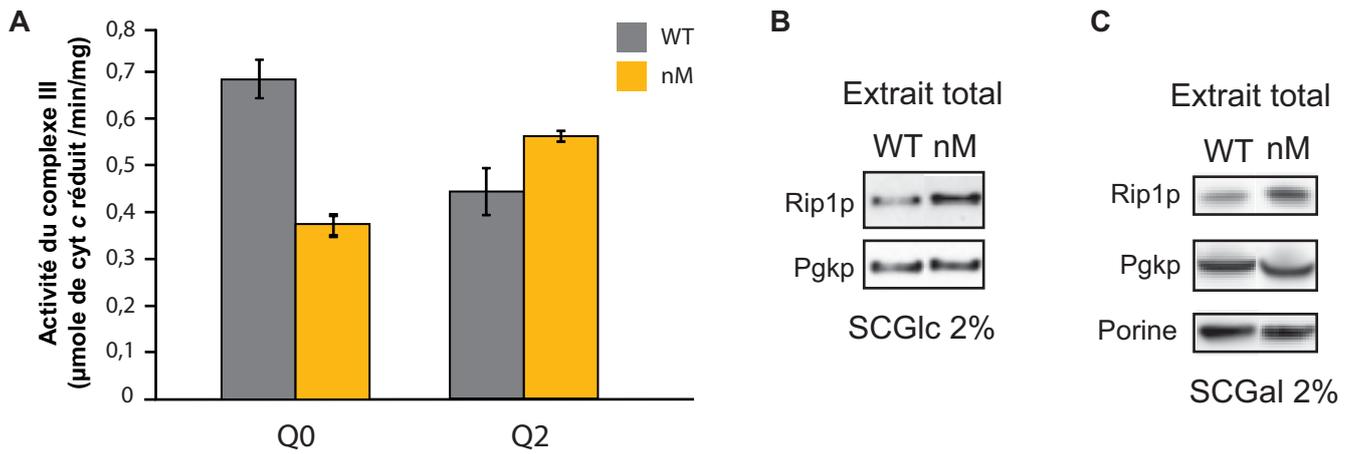


Figure 29. Le complexe III est plus actif dans la souche nM et présente une accumulation plus importante de Rip1p par rapport à une souche WT.

(A) Test d'activité du complexe III à partir de mitochondries isolées de souche WT et nM cultivées en SCGlc%. Les mesures de réduction du cytochrome c (accepteur d'électrons) en présence d'ubiquinol Q0 ou Q2 (donneurs d'électrons) sont réalisées par suivi de l'absorbance du cytochrome c réduit à A_{550nm} dans un spectrophotomètre. (B-C) Immunodétection de la sous-unité Rip1p du complexe III et de contrôle de charge cytosolique (Pgkp) et/ou mitochondrial (Porine) sur des extraits protéiques de levure cultivées en milieu contenant du glucose (B) ou du galactose (C).

Plusieurs études ont révélé l'existence d'un dialogue entre l'ATP synthase et les complexes de la CR, et un grand nombre de mutants présentant une ATP synthase défectueuse présentent une baisse d'expression des complexes III et IV (Lefebvre-Legendre et al., 2005; Rak et al., 2007) et une surproduction de ROS (Mattiuzzi et al., 2004). Une fois de plus, cela nous montre que l'expression de l'ATP synthase doit être coordonnée à celle des autres complexes de la CR, au risque de produire une trop grande quantité de ROS. D'autres exemples montrent également que dans un contexte pauvre en ATP synthase (mutant *fmc1Δ* ne pouvant plus assembler ATP1- et 2p dans l'ATP synthase), l'expression des complexes III et IV est diminuée (Lefebvre-Legendre et al., 2001).

Ces découvertes ouvrent à présent un grand nombre de possibilités pour de futures analyses. Il sera tout d'abord impératif de mettre en évidence si oui ou non il y a plus de complexe III dans les mitochondries de la souche **nM**, et de déterminer si Rip1p est une sous-unité surnuméraire dans les complexes III ou si elle peut être libre ou en interaction avec un pool restreint de protéines dans la membrane interne. La souche **nM** est un excellent outil pour tenter de comprendre les mécanismes de détoxification des ROS et surtout leurs impacts sur les dommages causés à l'ADN et le vieillissement, encore que son impact sur le vieillissement soit remis en question (Hekimi et al., 2011; Lapointe and Hekimi, 2010). L'expression ectopique d'*ATP1* dans la souche **nM** permet de restaurer la croissance en milieu respiratoire (Article 1). Cette souche **nM-ATP1** constitue un outil parfait pour vérifier par des expériences de MitoSOX, si la production de ROS est toujours aussi importante que dans une souche **nM**, ce qui nous permettrait de conclure sur l'origine physiologique de leur production (due à un défaut d'ATP synthase ou à un déséquilibre d'expression des sous-unités du complexe III). De plus une analyse des transcrits nucléaires du complexe III sur la souche **nM-ATP1** nous renseignerait sur le rôle de l'ATP synthase dans l'expression et l'activité du complexe III et permettrait ainsi mieux comprendre le rôle de l'ATP synthase dans la régulation de l'expression des autres complexes de la CR.

III.4 Matériels et méthodes

III.4.1 Milieux de culture

Les milieux synthétiques utilisés pour la croissance des levures sont composés de 0,67% (p/v) de yeast nitrogen base supplémenté en sulfate d'ammonium (YNB, MP Bio) sans aa, 2% (p/v) de glucose (Glc), de galactose (Gal) ou de glycérol (Gly) et 0,08% (p/v) et d'une quantité appropriée d'une mixture d'aa (MP Bio). Les milieux solides contiennent 2% (p/v) d'agar, et les milieux (solides et liquides) utilisés pour les tests antioxydants sont supplémentés avec 5 mM de N-acétyl cystéine (Sigma).

III.4.2 Acquisition des images de microscopie et mesure de ROS

Pour les mesures de ROS, les souches **WT**, **ARC**, **nE** et **nM** ont été cultivées dans des milieux synthétiques appropriés tenant compte des marqueurs d'auxotrophie (Aucun : **WT** ; -L : **ARC** ; -L-W : **nE** et **nM**) jusqu'en phase exponentielle de croissance. Une aliquote de 1 mL de chaque culture est traitée avec 10 μM de 2', 7'-DCF ou 200 nM de MitoSOX (Molecular Probes) pendant 20 min. Pour les expériences au MitoSOX, 1 μM d'Antimycine A (Sigma) ou 1 μM de Myxothiazol (Sigma) ont été ajoutés au milieu puis incubés pendant 30 min à 30 °C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1600 $\times g$ pendant 2 min puis suspendues dans du milieu frais et déposées entre lame et lamelle. Le signal de fluorescence a été acquis par un microscope à épifluorescence ZEISS (AXIO Observer d1) et les images ont ensuite été quantifiées par le programme Image J.

III.4.3 Préparation des extraits protéiques totaux et immunodétection

A partir de 50 mL de cultures de levures effectuées en milieu synthétique, les cellules sont reprises dans 2 mL de tampon de broyage (100 mM Tris-HCl pH 6.8 ; 150 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA) supplémenté d'inhibiteurs de protéases « cOmplete, Mini, EDTA-free » (chymotrypsine, thermolysine, papaïne, trypsine, extrait pancréatique, ROCHE). L'extrait est transféré dans des tubes de 2 mL contenant un volume des billes de verre égal au volume sec de cellules. Les cellules sont lysées par agitation dans un FastPrep (6 cycles de 6 m/s pendant 30 secondes). L'extrait protéique total est obtenu par sédimentation des débris cellulaires 5 min à 430 $\times g$ à température ambiante (TA) puis le surnageant est centrifugé 2 h à 105000 $\times g$ à 4 °C. La concentration relative en protéine est mesurée au réactif de Bradford (Roti-NanoQuant, ROTH) à $\text{DO}_{595\text{nm}}$.

Les expériences d'immunodétection ont été réalisées en utilisant 10-15 μg d'extraits protéiques séparés sur gel SDS-PAGE 10 ou 12% puis transférés sur membrane PVDF (Trans-Blot BioRad). La présence de Rip1p dans les extraits a été révélée en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-Rip1 (1:2500 ; fourni par le Dr. Vincenzo Zara de l'université de Lecce, Italie), celle de la Pgc grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-Pgc (1:5000) et celle de la porine par un anticorps monoclonal de souris anti-Por1 (1:5000, Molecular probes). La détection des anticorps primaires est réalisée en utilisant des anticorps secondaires anti-souris couplés à la HRP puis révélés par l'ECL-plus (BioRad) en suivant les instructions du revendeur.

III.4.4 Tests d'activités du complexe III de la CR

Les mitochondries de levures cultivées en SCGlc 2% ont été purifiées selon (Gregg et al., 2009). L'activité du complexe III est mesurée dans un spectrophotomètre à $A_{550\text{nm}}$. 25 μg de mitochondries purifiées sont utilisés en présence de 50 μM de cytochrome *c* oxydé comme accepteur

d'électron et 50 μM d'ubiquinone (Q_0 ou Q_2) réduite chimiquement comme donneur d'électrons dans un milieu contenant 20 mM KH_2PO_4 (pH7.4), 1 mM d'EDTA et 0,5 mM de KCN. L'ajout de 0,5 μM d'Antimycine A permet de distinguer entre la réduction du cytochrome *c* par le complexe III et par la réduction aspécifique par l'ubiquinol.

III.4.5 Etude transcriptomique des gènes nucléaires du complexe III de la CR

La préparation des échantillons ainsi que les méthodes de mesure des transcrits ont été réalisés selon le protocole décrit dans la section Matériels et Methodes de l'Article 1.

III.4.6 Microscopie électronique à transmission

La préparation des échantillons et l'acquisition des images sont détaillées dans la section Matériels et Methodes de l'Article 1.

III.4.7 Traduction *in vivo* mitochondriale

Ces expériences ont été réalisées comme décrites précédemment (Zeng et al., 2007) et une description détaillée est également présentée dans la section Matériels et Methodes de l'Article 1.

Partie IV

Etude de l'EPRS^{N1} chez les mammifères et son rôle dans les mitochondries

IV. 1 Introduction au sujet

IV.1.1 L'EPRS et les domaines WHEP

Dans des organismes aussi divers que les levures, les eugléozoaires ou encore les mammifères, un certain nombre de synthétases s'assemblent en complexe multi-protéiques autour d'une ou de plusieurs protéines d'assemblage (à l'exception de *M. thermotrophicus* où le complexe s'assemble autour de la LRS). Chez les mammifères, le MSC est composé de huit aaRSs (MRS, IRS, LRS, QRS, KRS, DRS, RRS et EPRS) et de trois protéines d'assemblage (p18, p38, p43). J'ai déjà mentionné (§ I.4.3.1.3) que certaines de ces aaRSs se dissociaient du complexe et participaient à d'autres voies de régulation en dehors de leur rôle dans l'aminoacylation, et l'EPRS est une de ces aaRSs.

L'EPRS est associée au MSC *via* son interaction avec p38 et se détache du complexe 14 à 16h après stimulation des cellules myéloïdes aux interférons γ (Kaminska et al., 2009a; Sampath et al., 2004). Cette dissociation est rendue possible grâce à la phosphorylation des Ser⁸⁸⁶ et Ser⁹⁹⁹ dans les domaines WHEP (précisément entre le 2^{ème} et 3^{ème} « WHEP repeat » (R2-R3) et entre le 3^{ème} « WHEP repeat » et la PRS (R3-PRS)). La phosphorylation de ces 2 Ser est due à l'activation de la voie ERK2 respectivement par la cycline Cdk5 et la kinase AGC (Arif et al., 2011; Arif et al., 2009). En dehors du MSC, l'EPRS interagit avec NSAP1 (NS1-Associated Protein, une ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène (hnRNP)), L13a (une protéine de la grande sous-unité ribosomique) et la GAPDH (GlycérAldéhyde 3-Phosphate DesHydrogénase) pour former le complexe GAIT (Gamma interferon Inhibitor of Translation) (Sampath et al., 2004). Ce complexe reconnaît spécifiquement les éléments GAIT localisés dans la région 3' UTR des ARNms impliqués dans la réponse inflammatoire et réprime leurs traduction (Arif et al., 2009).

La fonction non canonique de l'EPRS dépend donc de la présence des trois domaines WHEP. Bien que la structure de ces trois domaines WHEP n'ait pas encore été déterminée, les structures du domaine R1 et R2 ont été résolues par résonance magnétique nucléaire et présentent une structure relativement similaire en hélice-coude-hélice (Cahuzac et al., 2000; Jeong et al., 2000). Des tests fonctionnels réalisés sur les trois domaines ont permis de déterminer que les domaines R1 et R2 sont impliqués dans des interactions protéines-ARNs, tandis que les domaines R2 et R3 sont impliqués dans des interactions protéines-protéines (Cahuzac et al., 2000; Jeong et al., 2000; Rho et al., 1998). C'est exactement ce que nous observons dans le complexe GAIT puisque NSAP1 et L13a interagissent directement avec les répétitions R2 et R3 (Arif et al., 2009), et les éléments GAIT interagissent avec les domaines R1 et R2 grâce à la présence d'un grand nombre de leucine et lysine dans ces répétitions (Arif et al., 2009; Cahuzac et al., 2000; Jeong et al., 2000). De plus, les domaines WHEP de la MRS, de l'EPRS, de la WRS et de l'HRS se superposent parfaitement, leur conformation

est conservée dans les différentes protéines ce qui suggère que la structure en hélice-coude-hélice est importante (Guo et al., 2010a). On peut alors se demander quel est le rôle de ces domaines WHEP.

Plusieurs études fonctionnelles sur les aaRSs possédant des domaines WHEP ont permis de conclure que ces domaines n'ont presque aucune influence sur les activités catalytiques de leurs aaRSs (à l'exception de l'HRS humaine (Raben et al., 1994) et de la MRS humaine (Kaminska et al., 2001)), ce qui implique que leurs rôles se situent ailleurs et est très probablement lié à une fonction non canonique (Cerini et al., 1991; Ewalt et al., 2005; Kerjan et al., 1992; Ting et al., 1992). Outre leur implication dans la répression de la traduction (EPRS), le domaine WHEP masque l'activité angiostatique de la WRS humaine (Wakasugi et al., 2002b), et semble masquer un MTS cryptique dans la partie N-ter de la GRS humaine (C.C Wang, résultats non publiés).

Une étude génétique sur l'apparition des domaines WHEP dans les synthétases a permis de retracer leur évolution à travers l'étude de différents organismes. Cette étude propose que le domaine WHEP soit apparu bien avant la divergence entre les plantes et les animaux au niveau de l'HRS et de la GRS (Shiba, 2002). Puis au cours de l'évolution, le domaine WHEP a été transféré de l'HRS vers la PRS et l'ERS, puis de la PRS vers la WRS, tandis que le domaine de la GRS a été transféré à la MRS. L'auteur de cette étude propose d'ailleurs qu'à l'origine, le domaine WHEP ait pu être un signal d'adressage mitochondrial (MTS) car il contient une hélice α amphipathique.

IV.1.2 L' EPRS^{N1} : variant transcriptionnel et rôle dans les cellules humaines

Au cours de la réponse inflammatoire des cellules myéloïdes induite par un traitement à l'IFN- γ , les gènes de la Cp (ceruloplasmine) et de VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A) sont fortement transcrits puis traduits. Environ 14 à 16 h après le traitement aux IFN- γ , le complexe GAIT se forme pour réprimer la traduction des ARNm en se liant aux éléments GAIT de la Cp, de VEGF-A et d'autres ARNm exprimés au cours de la réponse inflammatoire (Arif et al., 2009; Jia et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2009). Une étude récente menée par la même équipe a montré que 24 h après activation de la réponse aux IFN- γ la protéine VEGF-A était toujours exprimée, et cela malgré l'inactivation traductionnelle opérée par le complexe GAIT (Yao et al., 2012). C'est au cours de ces recherches que l'équipe du Pr. P. Fox a mis en évidence l'existence d'un variant transcriptionnel, l'EPRS^{N1}, qui peut se lier de manière spécifique et plus forte aux éléments GAIT (K_D de 0,37 nM vs ~10 nM pour l'EPRS) pour permettre à une faible quantité d'ARNm d'être traduite, contrecarrant ainsi l'action du complexe GAIT.

L'EPRS^{N1} est exprimée par un mécanisme de poly-adénylation alternative médiée par la conversion du codon Tyr⁸⁶⁴ (UAU) en codon Stop (UAA), appelé aussi mécanisme PAY*

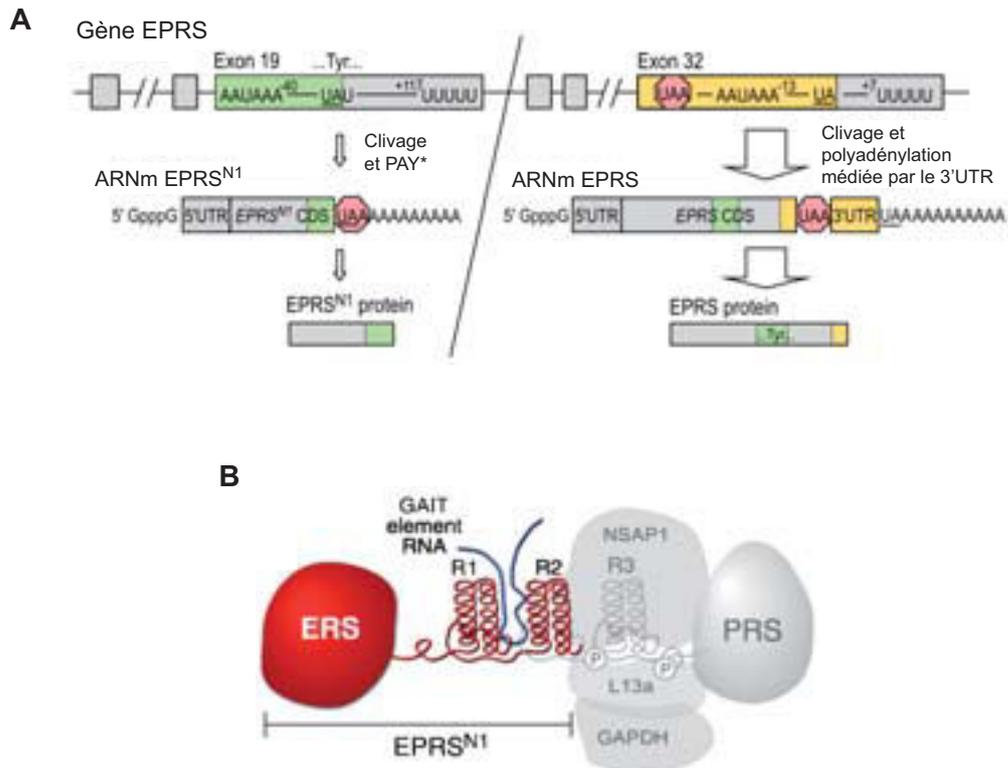


Figure 30. L'EPRS^{N1} est générée par le mécanisme PAY* et se lie aux ARNs via les domaines WHEP.

(A) Schéma du mécanisme de poly-adénylation alternative médiée par la conversion du codon Tyr864 (UAU) en codon Stop (UAA) (PAY*) en comparaison de la transcription classique menant à la synthèse de la protéine de fusion EPRS. (B) EPRS^{N1} est composée de deux répétitions WHEP et ne dispose pas de la troisième répétition. Les domaines R1-R2 sont essentiels pour la liaison aux éléments GAIT de certains ARNm (tiré de Yao et al., 2012).

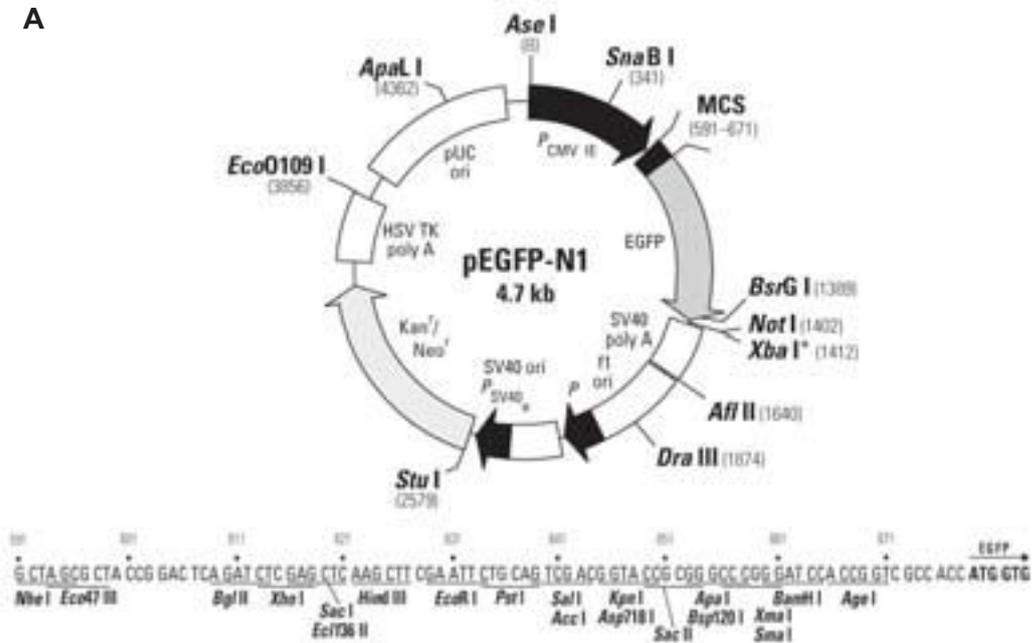
(Polyadenylation-mediated Tyr-to-stop codon conversion; Figure 30). La protéine de 95 kDa correspond à l'ERS associée à la répétition R1 et à la répétition R2 privée de ses 12 derniers aa, et se lie ainsi aux éléments GAIT *via* les domaines R1 et R2. En plus des cellules myéloïdes, l'EPRS^{N1} est également exprimée de manière constitutive dans différents types de cellules humaines comme les cellules endothéliales de veines de cordon ombilical, les cellules endothéliales microvasculaires, les cellules hépatiques HepG2, les cellules embryonnaires de rein HEK293T et les cellules HeLa, mais également chez les primates (macaques, gorilles, chimpanzés) mais pas chez d'autres mammifères comme le chien, le lapin, le bœuf, le cochon ou encore la souris (Yao et al., 2012).

L'EPRS^{N1}, dépourvue de la PRS, est constituée d'un domaine GST ainsi que d'un domaine catalytique et ressemble à l'ERS de levure. Nous avons donc pensé que l'EPRS^{N1} pouvait, comme l'ERS, être importée dans la mitochondrie humaine. En revanche il paraît peu vraisemblable que l'EPRS^{N1} participe à la voie indirecte de formation du Q-mARNt^Q. Comme chez la levure, la mitochondrie humaine ne possède pas de QRS mitochondriale et la formation du Q-mARNt^Q est assurée par une voie indirecte de transamidation impliquant une AdT mitochondriale de type GatCAB (Nagao et al., 2009). Mais il existe une différence fondamentale entre les voies de transamidation de la levure et de l'homme : l'ERS mischargeante qui va mésacyler l'ARNt^Q_{mt} est l'ERS cytosolique chez la levure (qui est importée dans la mitochondrie pour aminoacyler le mARNt^Q (Fréchin et al., 2009)) tandis que chez l'humain, c'est l'ERS mitochondriale qui forme l'E-ARNt^Q_{mt} (Nagao et al., 2009). Poussé par la curiosité j'ai entrepris d'étudier la relocalisation et les potentiels rôles de l'EPRS^{N1} en dehors du système GAIT.

IV.1.3 Origines du projet de recherche sur l'EPRS^{N1}

Des expériences préliminaires sur l'EPRS humaine avaient été menées par un ancien doctorant du laboratoire, Mathieu Fréchin, avant la publication de l'EPRS^{N1}. Ces travaux visaient à déterminer si l'ERS humaine additionnée des trois domaines WHEP (ERS^{3WHEP}) ou non (ERS^{N0}), pouvait compléter la délétion du gène *GUS1* (gène de l'ERS) chez la levure. Si l'EPRS^{N1} devait compléter une souche *gus1Δ* (ERS-shuffle) cela voudrait dire qu'elle est non seulement capable d'être importée dans la mitochondrie de levure mais également de former le E-mARNt^Q. Pour cela, l'ERS^{3WHEP} et l'ERS^{N0} ont été clonées dans un vecteur d'expression (fourni par le Dr. Mirande) puis transformées dans une souche « ERS-shuffle » décrite dans Fréchin et coll., 2009. Rapidement, une souche « shuffle » correspond à une souche privée d'un gène essentiel (ici *GUS1*) qui est transformée par deux plasmides, l'un portant le gène sauvage (*GUS1*) et le marqueur *URA3*, l'autre portant le gène de l'ERS^{3WHEP} ou de l'ERS^{N0} et un autre marqueur d'auxotrophie. La souche est étalée sur milieu contenant du 5-FOA (acide 5-fluoro-orotique): seul les clones ayant perdu le vecteur avec le gène sauvage (et *URA3*) peuvent pousser à condition que le gène porté par le second vecteur soit

A



B

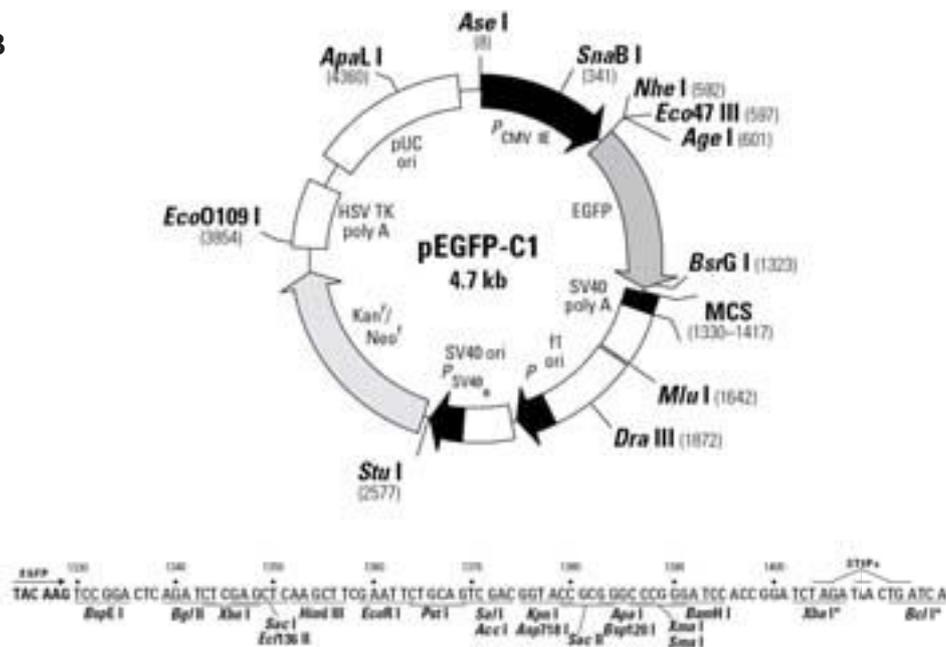


Figure 31. Vecteurs peGFP utilisés pour le clonage et l'expression de l'EPRS^{N1} dans les cellules HeLa.

(A) Vecteur peGFP-N1. Les sites indiqués en gras sont les sites uniques présents dans la cassette de clonage (MCS). L'EPRS^{N1} a été clonée dans les sites HindIII/Sall de la MCS et sera fusionnée à la GFP en C-terminal et sera nommée EPRS^{N1}-GFP. (B) Vecteur peGFP-C1. Les sites indiqués en gras sont les sites uniques de clonage de la MCS et l'EPRS^{N1} a été clonée dans les sites BamHI/Sall. La GFP sera fusionnée à l'extrémité N-terminale de l'EPRS^{N1} et sera nommée GFP-EPRS^{N1}.

fonctionnel. Cette technique se base sur la conversion du 5-FOA par le produit du gène *URA3* (enzyme impliquée dans la synthèse de l'uracile) en 5-fluoro-uracil, toxique pour la cellule. Les cellules *URA3+* sont donc tuées en présence de 5-FOA tandis que les cellules *ura3-* sont résistantes.

De cette manière, Mathieu a pu montrer que l'ERS^{3WHEP} et l'ERS^{N0} complètent la souche de levure *gus1Δ* en fermentation, tandis que seule l'ERS^{N0} complète l'absence de l'ERS en respiration. A partir de ces observations nous pouvons dire que *i)* l'ERS^{N0} est importée dans les mitochondries de levure, *ii)* qu'elle est capable d'assurer la première étape de la voie de transamidation (formation de l'E_mARNt^Q), mais que *iii)* les domaines WHEP semblent empêcher soit l'import mitochondrial soit inhiber l'activité catalytique de l'ERS^{3WHEP}. De ces résultats en revanche, aucune conclusion ne peut être tirée quant au rôle de ces deux variants dans la mitochondrie humaine et d'autres analyses seraient nécessaires afin de déterminer quel variant d'ERS (ERS^{N0-1-2}) est importé dans la mitochondrie humaine.

Au même moment (fin de l'année 2009), je faisais mon stage de deuxième année de master à l'IBMC dans le laboratoire du Pr. Becker et travaillais avec Mathieu, alors en dernière année de thèse. Le Pr. Paul Fox est venu donner une conférence à l'IBMC où il nous a présenté ses travaux, non publiés, sur le complexe GAIT et les premières expériences sur l'EPRS^{N1} qui ont été publiées quelques années plus tard (Yao and Fox, 2013). Après discussion, il nous a paru évident que l'EPRS^{N1} pouvait être la forme mitochondriale humaine participant à la voie de transamidation. Le Pr. Fox nous a alors communiqué la séquence exacte de l'EPRS^{N1} et nous avons entrepris de vérifier nos hypothèses avec ce nouveau variant.

A l'époque, c'est le Dr. Guillaume Octobre alors post-doctorant dans le laboratoire qui a entrepris de cloner l'EPRS^{N1} dans deux vecteurs d'expression humain (peGFP-C1 et -N1) pour créer une protéine de fusion à la GFP à partir du clone EPRS^{3WHEP}. A cause de la présence des trois répétitions WHEP, le clonage fut très compliqué mais nous avons finalement réussi à obtenir les deux protéines de fusion à la GFP : l'EPRS^{N1} possédant la GFP en N-terminal (peGFP-C1-EPRS^{N1}) où le gène d'intérêt est cloné en C-ter de la GFP et sera nommé EPRS^{N1}-GFP, ou en C-terminal (peGFP-N1-EPRS^{N1}) et le gène d'intérêt est cloné en N-ter de la GFP et sera nommé GFP-EPRS^{N1} (Figure 31). Malheureusement Guillaume n'a jamais eu le temps de concrétiser ces expériences afin de voir si oui ou non l'EPRS^{N1} est importée dans les mitochondries humaines et je me suis donc proposer pour continuer ce projet.

IV. 2 Résultats

IV.2.1 Expression et localisation cellulaire de l'EPRS^{N1}

La première étape de mon étude a été de vérifier si à partir des vecteurs préparés, l'EPRS^{N1} était bien exprimée dans les cellules humaines. Pour cela, épaulé par notre technicienne au laboratoire, Aline Huber, nous avons transfecté des cellules HeLa avec les deux vecteurs peGFP-N1 et -C1-EPRS^{N1}. La détection de l'EPRS^{N1}-GFP et de la GFP-EPRS^{N1} a été réalisée par western-blot à partir d'extraits brut de cellules HeLa. Comme on peut le voir figure 32, les deux protéines de fusion sont exprimées et leurs tailles (~130kDa) correspondent bien à celle de l'EPRS^{N1} (95kDa) additionnée de la GFP (27kDa). Les deux vecteurs peGFP-N1 et -C1-EPRS^{N1} peuvent donc être utilisés pour les expériences de localisation subcellulaire.

Pour déterminer la localisation subcellulaire de l'EPRS^{N1} dans les cellules humaines nous avons transfecté des cellules HeLa avec les vecteurs peGFP-N1 et -C1 exprimant l'EPRS^{N1} fusionnée à la GFP, puis nous avons observé ces cellules par microscopie confocale. Les cellules transfectées ont été observées au microscope 48h après transfection et après un traitement au MitoTracker, une sonde fluorescente spécifique des mitochondries. Comme nous pouvons le voir dans la figure 33A et 33C, le signal de fluorescence de l'EPRS^{N1}-GFP et de la GFP-EPRS^{N1} colocalise avec le MitoTracker nous indiquant que l'EPRS^{N1} est bien importée dans les mitochondries humaines. Afin de vérifier que la GFP n'est pas responsable de l'import aspécifique de l'EPRS^{N1} dans la mitochondrie, les cellules ont également été transfectées avec les vecteurs peGFP-N1 et -C1 vides (ils expriment alors la GFP seule). Comme nous le voyons figure 33B et 33D, le signal GFP est présent dans le cytoplasme et dans le noyau (la GFP faisant moins de 40kDa elle peut diffuser librement dans le noyau) mais pas dans la mitochondrie. La localisation mitochondriale de l'EPRS^{N1} a également été vérifiée par western blot à partir de mitochondries humaines purifiées (Figure 34).

IV.2.2 Rôle(s) de l'EPRS^{N1} dans les mitochondries humaines

Notre hypothèse propose que, malgré les données publiées (Nagao et al., 2009), l'EPRS^{N1} participe à l'aminocyclation du $m\text{ARNt}^Q$, même si la présence de l'EPRS^{N1} dans les mitochondries ne prouve en rien qu'elle participe à la voie indirecte de formation du $Q\text{-}m\text{ARNt}^Q$. C'est pourquoi j'ai décidé de réaliser *i)* des tests de traduction mitochondriale *in vivo* en présence de $[S^{35}]\text{Met}$ ainsi que *ii)* des tests d'aminocyclation sur de l'ARNt mitochondrial total.

Chez la levure, l'import forcé de l'ERS cytosolique dans mitochondrie (souche **nE** et **nE/nM**) augmente la traduction mitochondriale, et la rétention de l'ERS dans le cytoplasme (souche **ARC** et **nM**) réduit la traduction mitochondriale (par rapport à une souche sauvage). Pour déterminer si la

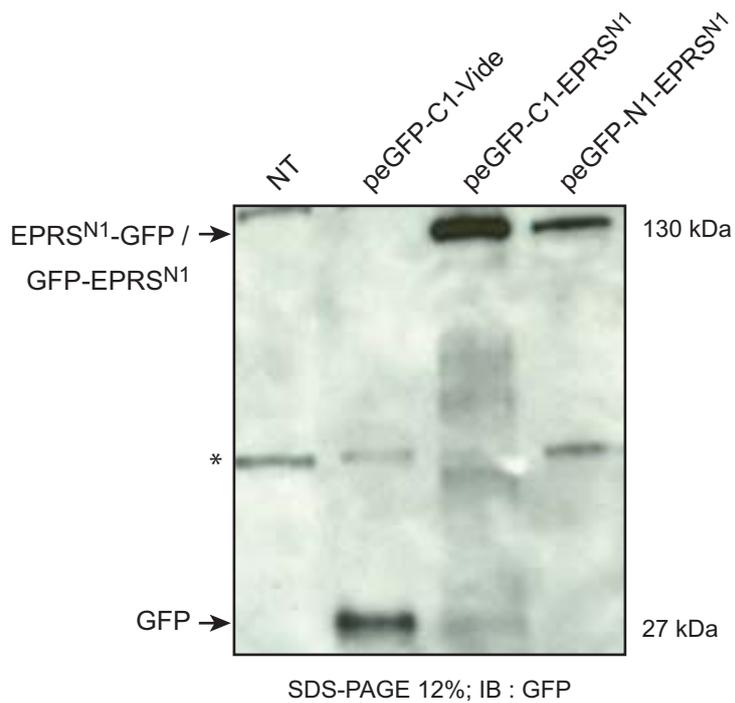


Figure 32. Vérification de l'expression de l'EPRS^{N1} dans des cellules HeLa transfectées par les vecteurs peGFP-C1-EPRS^{N1} et peGFP-N1-EPRS^{N1}.

Les cellules HeLa transfectées ou non par les vecteurs d'expression peGFP vide ou contenant le gène de l'EPRS^{N1} ont été lysées puis un extrait protéique de chaque souche est déposé sur gel SDS-PAGE 12%. La détection des protéines de fusion EPRS^{N1}-GFP et GFP-EPRS^{N1} (130 kDa) et de la GFP seule (27 kDa) est faite par western blot à l'aide d'un anticorps anti-GFP. * : bande correspondant à un artéfact de reconnaissance par l'anticorps anti-GFP.

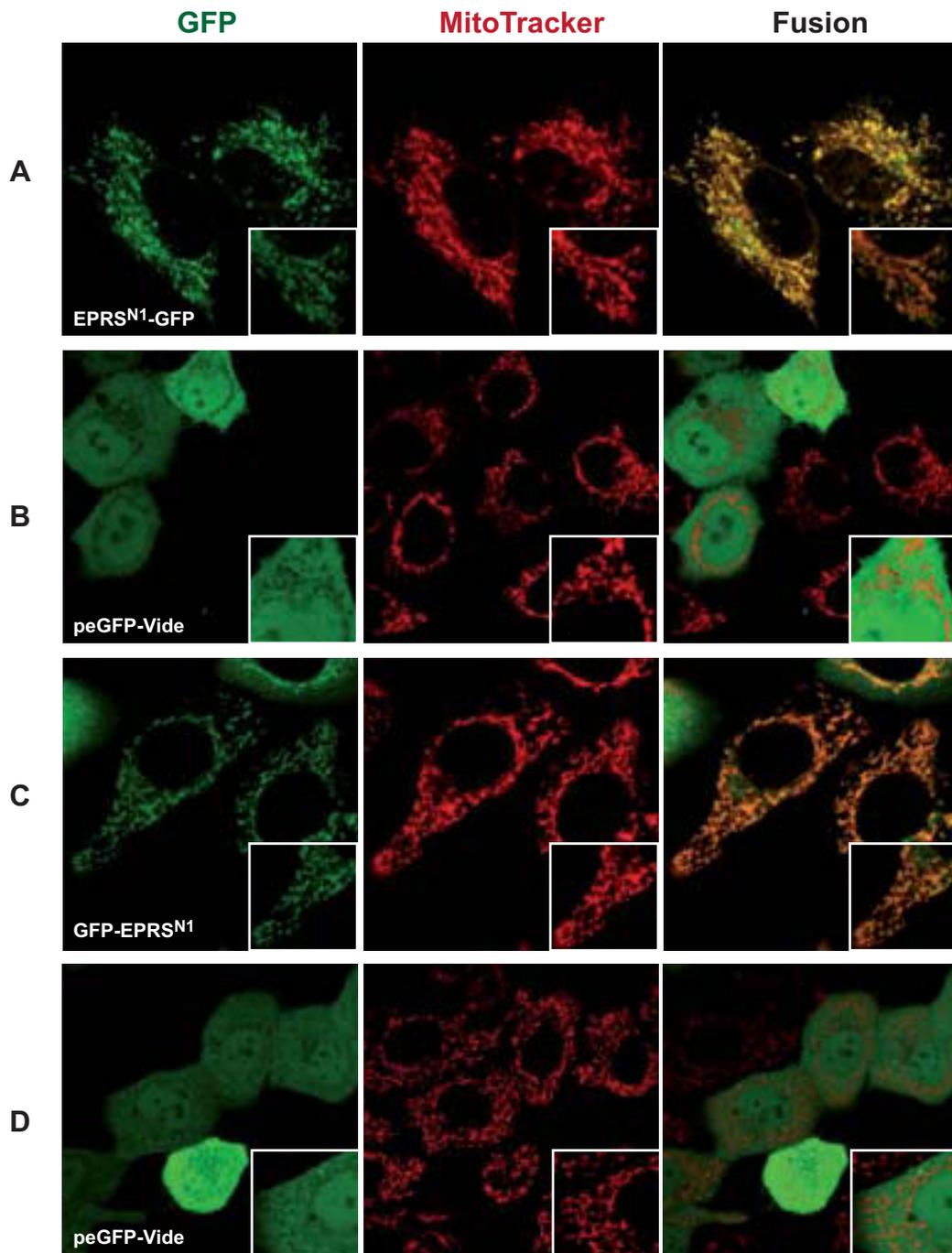


Figure 33. L'EPRS^{N1} est importée dans les mitochondries des cellules HeLa.

(A-C) L'EPRS^{N1}-GFP et la GFP-EPRS^{N1} sont localisées dans les mitochondries comme en témoignent la superposition des images acquises en GFP et au Mitotracker Red (Fusion), une sonde fluorescente se localisant dans les mitochondries. Les images prises avec les vecteurs peGFP-N1 (B) et -C1 (D) vides montrent que la GFP seule diffuse dans le cytoplasme et le noyau (GFP) mais pas dans les mitochondries (Fusion). Une section de chaque image a été agrandie afin de bien distinguer les relocalisations ou les exclusions mitochondriales (encart en bas à droite de chaque panel). Ces images ont été acquises par microscopie confocale (Zeiss LSM700, objectif 100 x plan-apochromate) et chaque image correspond à une coupe d'environ 0,7 µm d'épaisseur (unité d'Airy = 1).

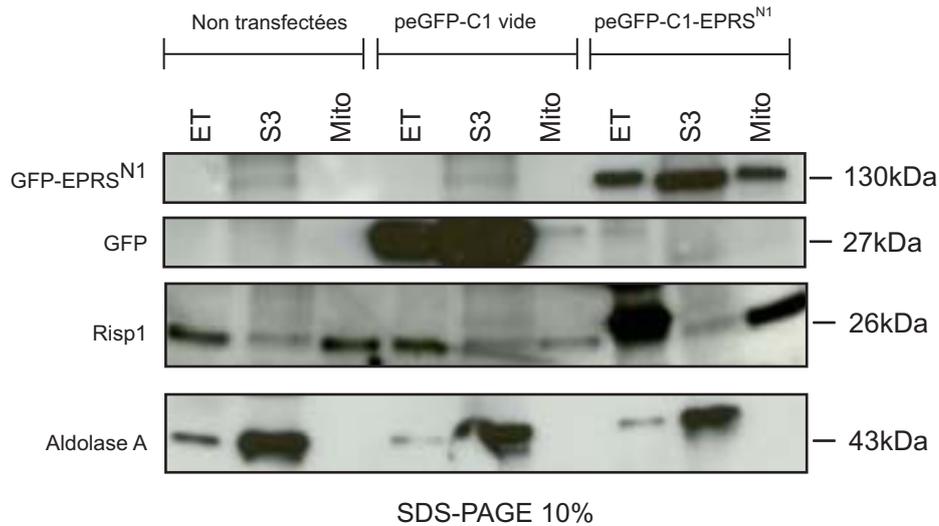


Figure 34. L'EPRS^{N1} est importée dans la mitochondrie des cellules HeLa.

Des cellules HeLa ont été transfectées ou non avec le vecteur peGFP-C1 vide ou contenant le gène de l'EPRS^{N1}. Des extraits bruts (EB), du surnageant après purification des mitochondries et traitement à la digitonine (S3) et des mitoplastes purs (Mito) ont été déposés sur gel SDS-PAGE 10%. La protéine de la membrane interne mitochondriale Risp1 et l'enzyme glycolytique Aldolase A ont été utilisés comme témoins montrant que les mitoplastes sont dépourvus de toute contamination cytosolique. ET :Extrait total; Mito: Mitochondrie.

Ps: à l'époque où ces gels ont été réalisés, nous n'avions pas encore le clone peGFP-N1-EPRS^{N1} d'où son absence ici.

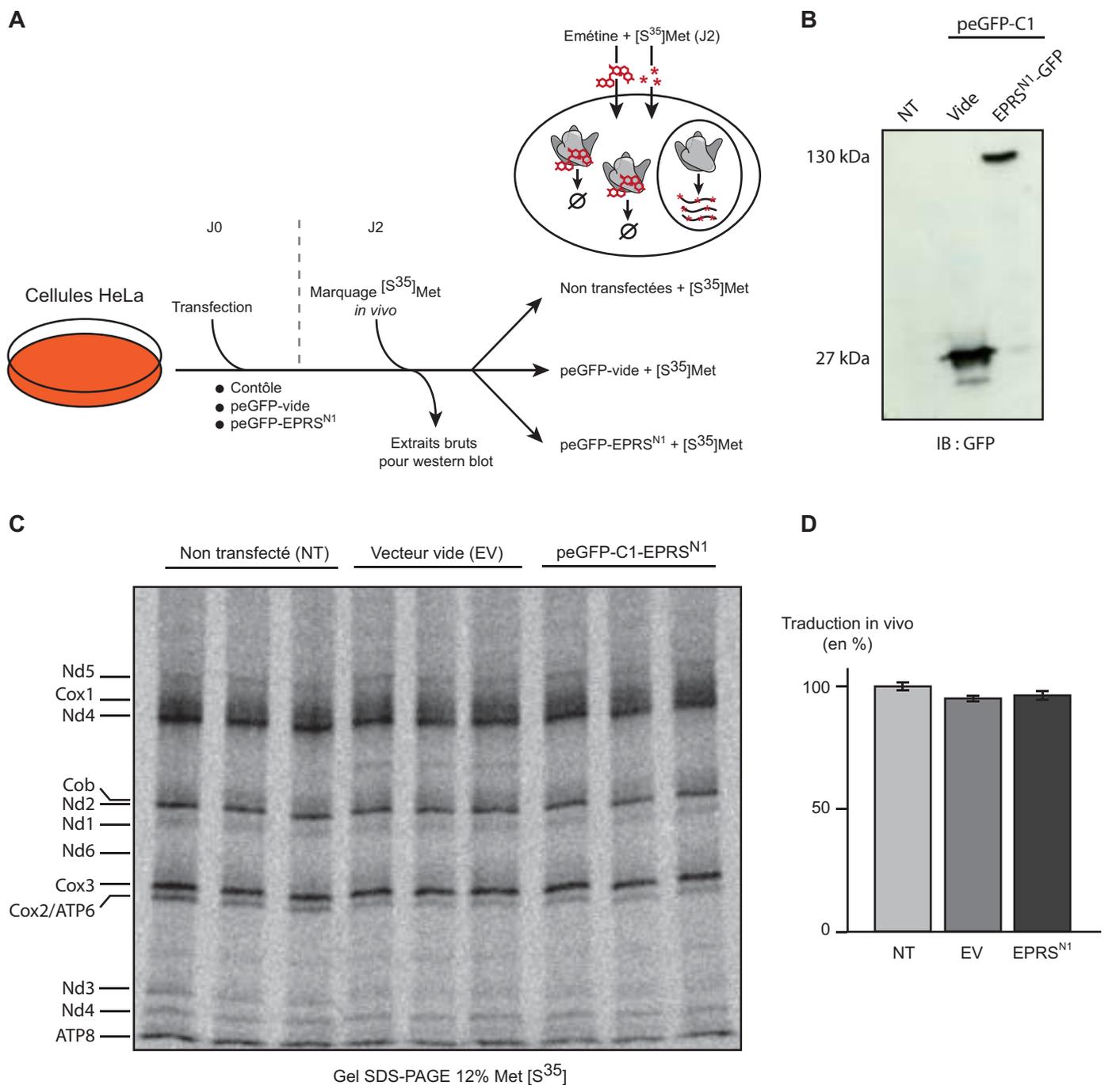


Figure 35. Mesure de la traduction protéique mitochondriale *in vivo* à la [S³⁵] Met dans des cellules HeLa exprimant l'EPRS^{N1}.

(A) Schéma de l'expérience de traduction mitochondriale *in vivo* réalisée sur des cellules HeLa transfectées ou non avec le vecteur peGFP-vide ou exprimant l'EPRS^{N1} couplée à la GFP. Deux jours après transfection, la traduction cytosolique est bloquée par traitement des cellules à l'émétine, un composé qui va cibler la sous-unité 40S du ribosome eucaryote. L'ajout de [S³⁵] Met dans le milieu de culture va permettre aux cellules de l'incorporer dans les polypeptides naissants au cours de la traduction mitochondriale uniquement. (B) Western-blot réalisé à J2 à partir d'extraits bruts de cellules HeLa transfectées ou non avec les différentes constructions peGFP permettant de révéler la présence de la GFP. (C) Gel SDS-PAGE 12% après exposition pendant 24h des extraits obtenus après traduction *in vivo*. Un triplicat de chaque expérience a été réalisé. (D) Mesure de l'intensité relative de radioactivité présente dans chaque piste (relatif à la quantité de protéines traduites). Chaque barre correspond à la moyenne de trois réplicats.

présence de l'EPRS^{N1} dans les mitochondries humaines augment la traduction, j'ai réalisé des tests de traduction mitochondrial *in vivo* à partir de cellules HeLa transfectées ou non avec le vecteur peGFP vide et le vecteur peGFP-C1 (Figure 35A). Il est important de préciser qu'à l'époque où j'ai réalisé ces expériences avec M^{elle} Aline Huber, nous ne disposions pas encore du clone peGFP-N1. Ces tests de traduction *in vivo* ont été réalisés sur des cellules transfectées 48h après transfection. Comme nous pouvons le voir dans la figure 35B, les cellules HeLa transfectées expriment bien soit la GFP seule (vecteur vide) soit l'EPRS^{N1} fusionnée à la GFP (peGFP-C1-EPRS^{N1}). Un *triplicata* de chaque traduction a été réalisé pour les cellules non transfectées, transfectées avec le vecteur vide ou contenant l'EPRS^{N1} et aucune différence d'efficacité de la traduction mitochondriale n'est observée (Figure 35C et 35D). Cela signifie qu'à *contrario* de l'ERS cytosolique de levure, l'EPRS^{N1} n'active pas la traduction mitochondriale dans nos conditions testées, c'est-à-dire en condition normale de croissance à 37 °C.

Les tests d'aminocyclation non pu être réalisés au laboratoire car nous n'avions pas d'ARNt total mitochondrial humain ni d'ARNt^Q mitochondrial humain à notre disposition ; et purifier l'ARNt^Q humain à partir de cellules en culture aurait été à la fois extrêmement coûteux et consommateur en temps. J'ai néanmoins reçu de l'ARN total de mitochondries humaines du Dr. Nina Entélis ; mais d'autres projets plus urgents m'ont détourné de ces expériences.

Néanmoins rien n'exclue que l'EPRS^{N1} ne puisse avoir un rôle dans l'aminocyclation du _mARNt^Q en conditions de stress de température ou autre(s). Pour que cela soit possible, le _mARNt^Q doit peut être subir un certain nombre de modifications avant d'être reconnu et aminocyclé par l'EPRS^{N1}. Cela est notamment le cas de l'ARNt^{K1(CUU)}, qui est importé dans les mitochondries humaines et de levures au cours d'un stress de température (37 °C) pour participer au décodage des codons lysines AAG. En effet, l'uridine en position 34 de l'ARNt^{K3(UUU)} codé par l'ADN mitochondrial est hypomodifiée à 37 °C et ne peut décoder les codons AAG (Gowher et al., 2013; Kamenski et al., 2007). Il se peut également que le _mARNt^Q ait besoin d'être modifié pour être reconnu et/ou aminocyclé par l'EPRS^{N1}.

IV.2.3 Cristallisation de l'EPRS^{N1}

En parallèle de cette étude, j'ai tenté de cristalliser l'EPRS^{N1} au laboratoire en collaboration avec le Dr. Yuhei Arais, alors post-doctorant. Pour ce faire, nous avons utilisé le vecteur exprimant l'EPRS^{N1} (pET20b) en fusion avec une étiquette comprenant 6 histidines (6-His) en C-ter de la protéine. Nous avons purifié la protéine à un degré de pureté compatible avec des études cristallographiques grâce à 3 chromatographies successives. La première étape est une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA suivie d'une chromatographie d'échange d'ions sur colonne d'héparine et d'une chromatographie d'exclusion de taille (Superdex G200). Pour les tests de cristallisation nous

avons utilisé trois kits de cristallisation (Crystal screen, Index et PEG/Ion) permettant de tester un large panel de conditions de cristallisation (variation de sels, de pH...), et nos boîtes de cristallisation ont été conservées à 20 °C et régulièrement observées au microscope pendant plusieurs mois. Malheureusement, aucune des conditions testées n'ont permis de cristalliser l'EPRS^{N1}. Peu après notre échec, nous avons rencontré Andrés Palencia de l'équipe de Stephen Cusack, cristallographe de l'EMBL de Grenoble, et nous lui avons fait part de notre intérêt dans la cristallisation de l'EPRS^{N1}, intérêt qu'il semblait partager. C'est ainsi que nous avons débuté cette collaboration et après plusieurs discussions nous avons pu établir un ensemble de constructions à tester pour la cristallisation. Pour ces expériences, Andrés va tenter d'obtenir des cristaux en utilisant l'ERS^{0WHEP}, l'EPRS^{N1}, l'EPRS^{3WHEP} ainsi que ces deux dernières constructions en présence d'un élément GAIT. Nous ne savons pas pour le moment si ces expériences ont fonctionné, le processus de cristallisation pouvant être long et les conditions à tester très nombreuses.

IV.2.4 Sous-clonage de l'EPRS^{N1} et test de viabilité chez la levure

Afin de comprendre comment l'EPRS^{N1} est importée dans la mitochondrie et quel rôle elle pourrait jouer dans cet organite, j'ai décidé de transposer mon travail réalisé sur l'humain chez la levure. L'ERS étant un gène essentiel, j'ai tout d'abord du vérifier si l'EPRS^{N1} était capable de remplacer l'ERS de levure et d'aminocycler l'ARNt^E cytosolique (_cARNt^E). J'ai donc réalisé des tests de complémentation sur 5-FOA en utilisant une souche *gus1Δ* « ERS shuffle » contenant un vecteur exprimant l'EPRS^{N1} ou l'EPRS sans les WHEP (EPRS^{0WHEP}) fusionnée (pRS315-GPD) ou non (p415-ADH) à la GFP (Figure 36). La croissance sur milieu fermentescible supplémenté en 5-FOA des quatre variants (Figure 37) prouve que l'EPRS dans ces deux formes (avec ou sans WHEP) peut aminocycler le _cARNt^E et ainsi remplacer l'ERS, tandis que la souche shuffle ne pousse pas. Les clones ayant poussé sur 5-FOA ont ensuite été cultivés sur milieu synthétique contenant tous les aa (SCGlc 2%) et sans uracile afin de vérifier qu'ils ne contiennent plus le vecteur exprimant l'ERS endogène. La souche shuffle est à nouveau déposée ici comme contrôle positif de croissance. Cela nous permet d'ores et déjà de conclure que l'EPRS^{N1} avec et sans les domaines WHEP est capable d'aminocycler le _cARNt^E. Ces mêmes clones ont été cultivés sur milieu 5-FOA Gly et SCGly 2% et poussent très bien, ce qui signifie que *i)* l'EPRS^{N1} et l'EPRS^{0WHEP} sont capables de compléter la fonction d'ERS non discriminante dans la mitochondrie et d'aminocycler le _mARNt^Q et que *ii)* l'EPRS^{N1} et l'EPRS^{0WHEP} sont activement importées dans la mitochondrie.

A partir d'extrait brut de levures cultivés en fermentation jusqu'en phase exponentielle de croissance, j'ai vérifié que les deux variants étaient exprimés sous la forme de protéines de fusion et qu'ils migraient aux tailles attendues (Figure 38). L'EPRS^{N1} et ^{-N0} sont exprimées dans la cellule bien qu'il semblerait que l'EPRS^{N1} soit moins bien exprimée. Cela peut s'expliquer par la présence des

A

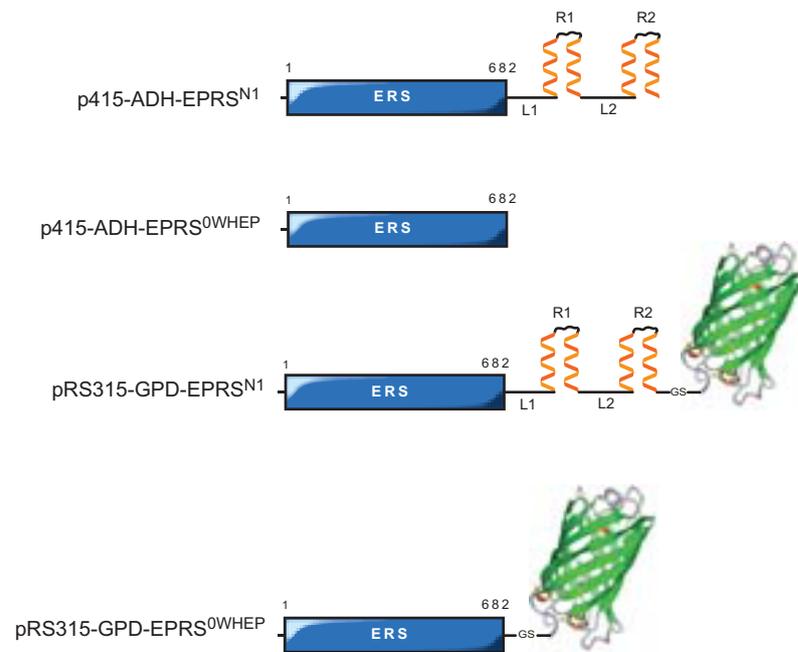


Figure 36. Constructions utilisés pour les tests de complémentation et de localisation subcellulaire chez la levure.

(A) Représentation schématique des protéines EPRS^{N1} ou EPRS^{0WHEP} fusionnés ou non à la GFP. L1 et L2 sont les linker endogènes entre l'ERS et les domaines WHEP et entre les deux répétitions WHEP (R1-R2). La structure de la GFP est issue de la Pdb, accession : 3MGF.

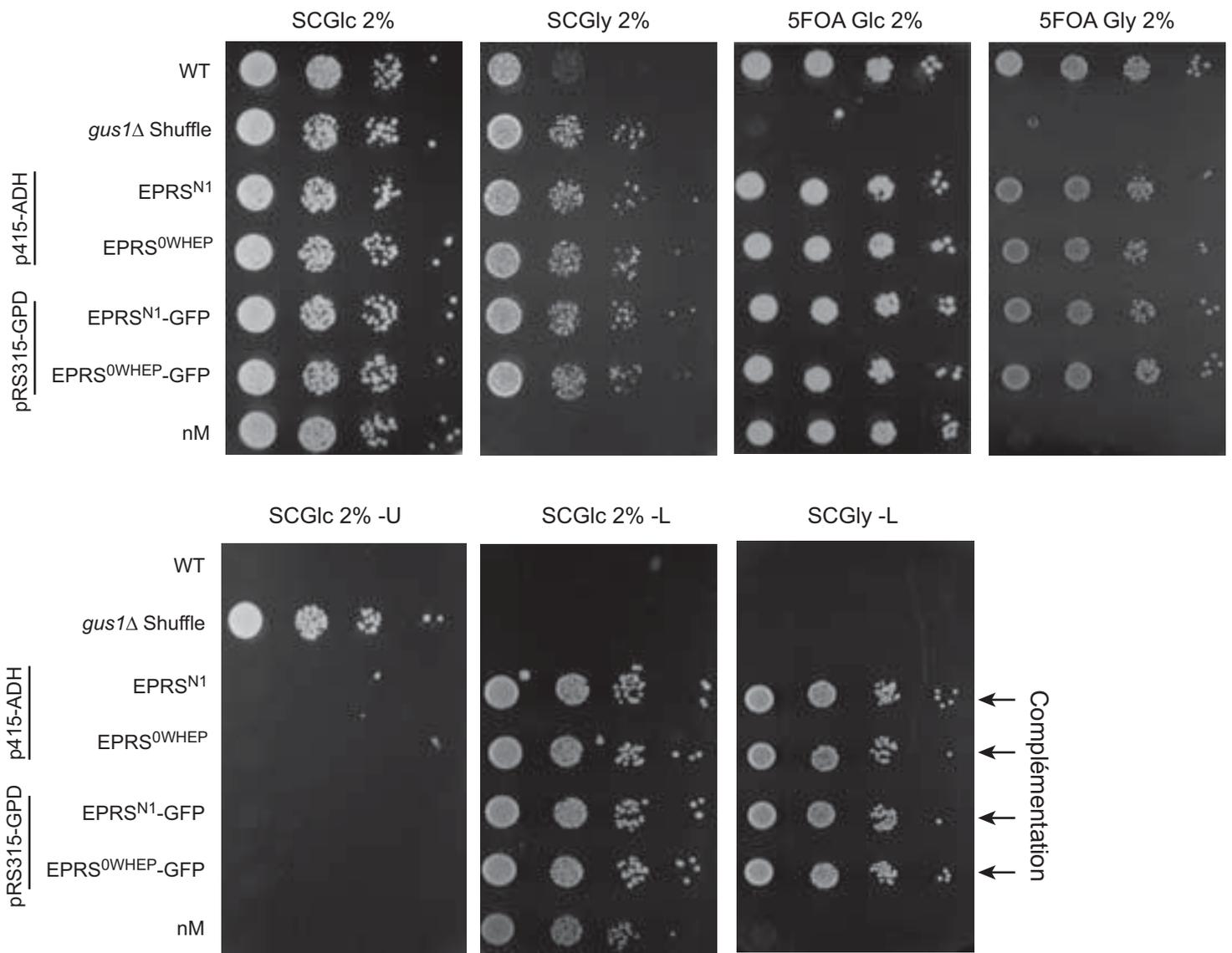


Figure 37. Tests de complémentation de l'EPRS^{N1} chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Les cellules ont été cultivées en phase exponentielle de croissance dans un milieu approprié puis un test en goutte est réalisé à partir de dilution en séries de chaque souche à la même DO_{600nm}. Les tests de croissance ont été réalisés à 30 °C et les images présent à 2 (SCGlc 2%, 5FOA Glc 2%) et 4 jours (SCGly 2% et 5FOA Gly 2%). L'expression des variants de l'EPRS^{N1} (p415 et pRS315) est réalisée dans une souche *gus1Δ*.

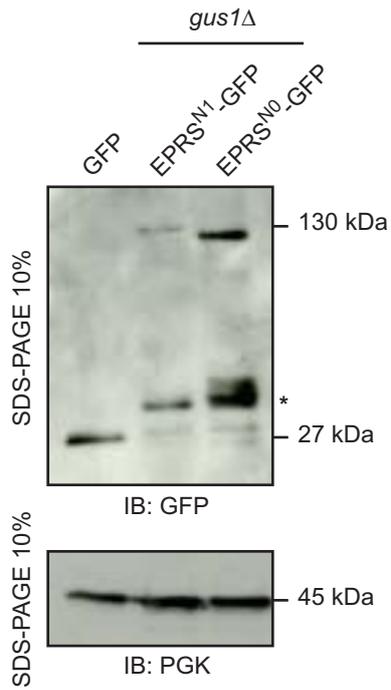


Figure 38. Tests d'expression de l'EPRS^{N1} chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Les cellules exprimant la GFP seule (pRS315-GFP-*vide*), l'EPRS^{N1} ou l'EPRS^{N0} en fusion avec la GFP (pRS315-GFP-EPRS^{N1/N0}) ont été cultivées en phase exponentielle de croissance dans un milieu fermentaire (SCGlc 2%) puis des extraits totaux de protéines ont été réalisés. Une même quantité de protéine a été déposée sur un gel SDS-PAGE 10%. * : bande pouvant correspondre à un variant issu d'un clivage de la protéine de fusion ou du à l'instabilité de la protéine dans la cellule.

répétitions WHEP qui, chez la levure, peuvent être source d'une instabilité de la protéine ou d'une traduction moins efficace. De même une bande de faible taille (environ 32 kDa) est présente dans les extraits de protéines issus des souches exprimant l'EPRS^{N1} et ^{-N0} mais pas dans l'extrait exprimant la GFP seule. Cette bande pourrait être issue d'un clivage de la protéine de fusion ou due à l'instabilité de la protéine.

IV.2.5 Localisation subcellulaire chez la levure

Les expériences de complémentation nous indiquent de manière indirecte que l'EPRS^{N1} est capable de produire à la fois le E-cARNt^E cytoplasmique et l'E-mARNt^Q mitochondrial. Pour vérifier la localisation de l'EPRS^{N1} dans la levure, j'ai observé les souches exprimant l'EPRS^{N1} ou l'EPRS^{0WHEP} fusionnées à la GFP en microscopie à épifluorescence, la présence des mitochondries a été révélée par expression ectopique de la sous-unité Atp9p de l'ATP synthase de *Neurospora crassa* fusionnée à la RFP. Les cellules ont été cultivées en fermentation ainsi qu'en respiration et comme attendu, la fluorescence des variants fusionnés à la GFP se localise dans le cytoplasme et dans les mitochondries bien que le signal mitochondrial soit difficile à distinguer du signal cytoplasmique (Figure 39). C'est en effet un des problèmes lié à l'étude des protéines doublement localisées dans une cellule, le signal des compartiments comme la mitochondrie n'est que très difficilement identifiable par rapport à un signal fort comme celui que l'on observe généralement dans le cytoplasme. Cela peut également être dû à la présence de produits de dégradation comme nous l'avons observé dans la figure 38. Les techniques comme la microscopie confocale, bien que très pratique pour observer des coupes très fines d'échantillons et ainsi étudier la relocalisation de protéines dans le noyau ou la vacuole par exemple, ne sont pas idéales pour discriminer un signal lorsque la protéine est localisée à la fois dans le cytoplasme et la mitochondrie. C'est une des raisons pour laquelle nous avons développé un nouveau système de localisation des protéines couplées à la GFP.

IV.2.6 Split-GFP et localisation de l'EPRS^{N1}

La split-GFP (ou GFP fragmentée) repose sur la séparation de la GFP en deux polypeptides distincts (les dix premiers brins β sont séparées du onzième), qui, séparément, ne sont pas capables d'émettre un signal de fluorescence. Néanmoins leur fluorescence peut être restaurée lorsque les deux polypeptides de la GFP sont suffisamment proches pour s'auto-assembler. Chaque polypeptide est ensuite fusionné à une protéine. Si les deux protéines utilisées interagissent ensemble, un signal de fluorescence peut être visualisé et dans le cas contraire, aucun signal n'est perçu (Figure 40). Ce système a été mis au point par le Dr. Yuhei Arais, post-doctorant dans le laboratoire, et fait actuellement l'objet d'une étude pour le dépôt d'un brevet, c'est pourquoi je ne pourrai pas vous

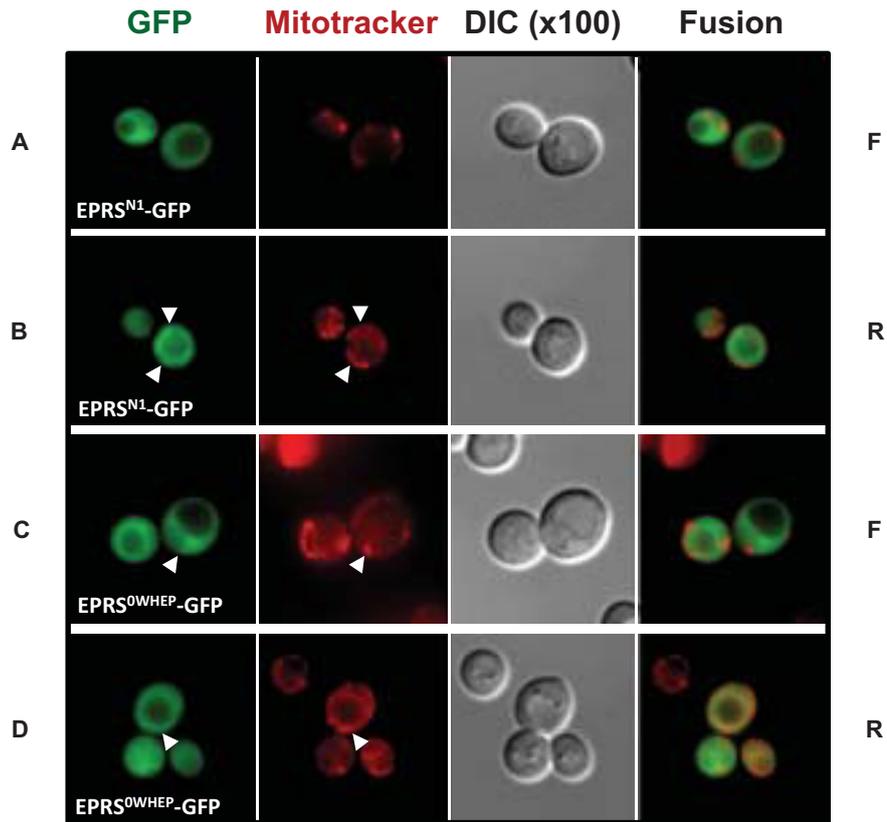


Figure 39. Localisation subcellulaire de l'EPRS^{N1} et ^{0WHEP}-GFP dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation et en respiration.

(A-D) Les levures expriment de manière constitutive l'EPRS^{N1/0WHEP} et les mitochondries ont été marquées au Mitotracker pendant 20 min. Un signal GFP est visible dans les cellules exprimant l'EPRS^{N1} et ce signal est disséminé dans toute la cellule en fermentation (A) mais également en respiration (B). Les mêmes observations peuvent être faites à partir des images de l'EPRS^{0WHEP} en fermentation (C) et en respiration (D). Ces images ne nous permettent pas de distinguer de manière claire la fraction mitochondriale de la fraction cytosolique. Les flèches blanches indiquent une co-localisation cytosolique et mitochondriale. F: fermentation; R: respiration.

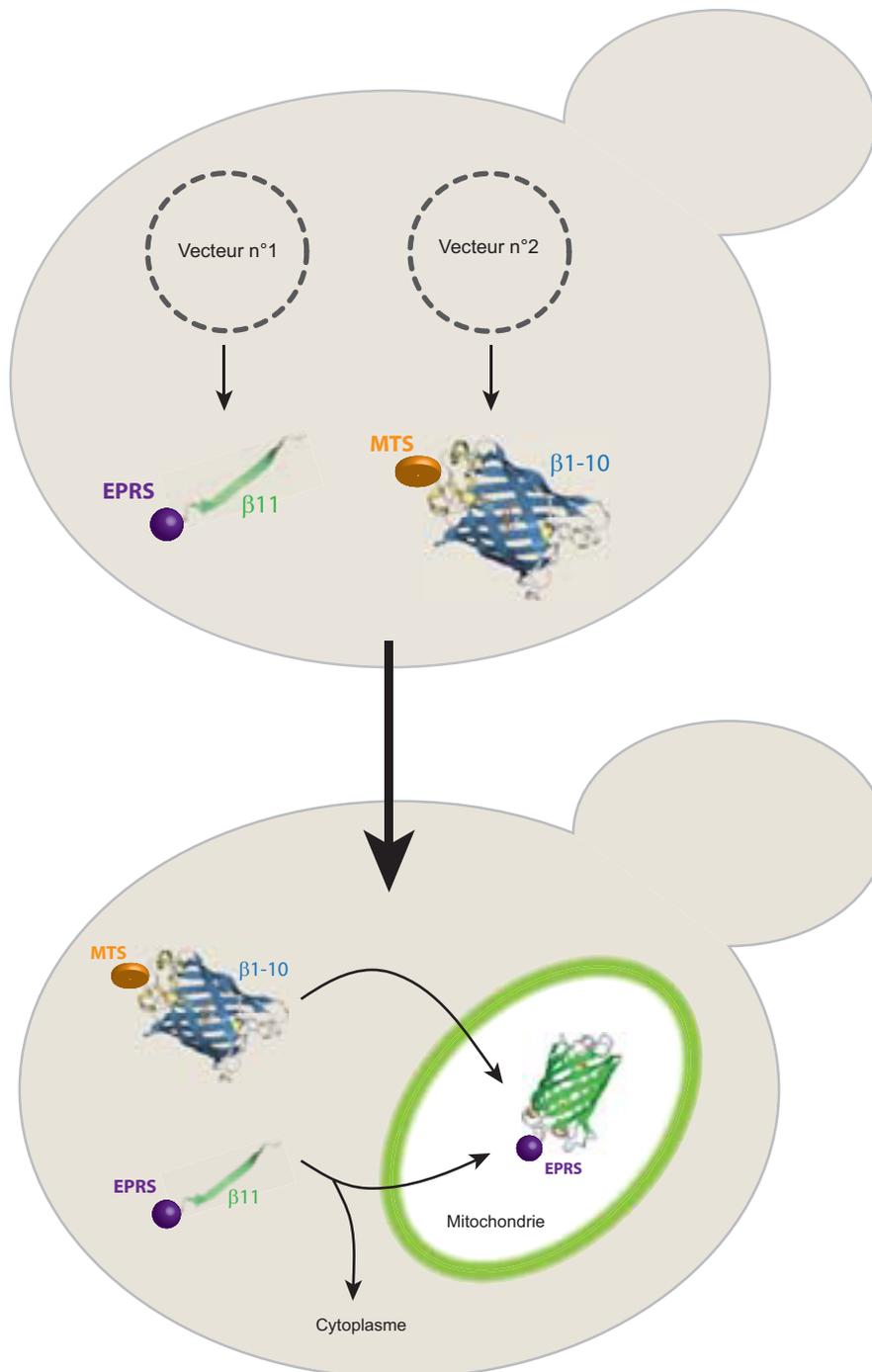


Figure 40. Schéma représentatif du système Split-GFP appliqué à l'étude de la localisation de l'EPRS^{N1}.

Le vecteur n°1 permet d'exprimer l'EPRS^{N1} en fusion à un brin β de la GFP fragmentée, le vecteur n°2 permet quant à lui d'exprimer les dix autres brins β fusionnés à un MTS fort. Lorsqu'ils sont exprimés, le polypeptide β1-10 est constitutivement importé dans les mitochondries, l'EPRS^{N1}-β11 est cytoplasmique. Si elle est importée dans les mitochondries, les deux polypeptides MTS-β1-10 et EPRS^{N1}-β11 se reconstituent et une fluorescence verte est observée uniquement dans les mitochondries par microscopie.

détailler entièrement son fonctionnement et ses composants. Ce système se base sur des exemples déjà publiés, et comprend de nombreuses améliorations en termes de stabilité des deux polypeptides, et diffère également dans l'approche puisque c'est la première fois que la Split-GFP est utilisée dans une étude de double localisation subcellulaire. Pour cela, un des deux polypeptides est fusionné à un MTS fort (vecteur n°1), ainsi lorsque la protéine fusionnée à l'autre polypeptide (vecteur n°2) est importée dans la mitochondrie, les deux polypeptides vont pouvoir s'assembler pour reconstituer la GFP qui sera capable d'émettre un signal de fluorescence. Bien que tout le travail d'ingénierie du système, de mutagenèse et de clonage ait été réalisé par le Dr. Yuhei Arais (en collaboration avec Gaétan Bader doctorant au laboratoire), j'ai beaucoup participé à la mise au point des expériences, notamment pour la double localisation des protéines (par microscopie confocale et à épifluorescence).

Les analyses de double localisation de l'EPRS^{N1}-GFP et de l'EPRS^{0WHEP} n'ont pas été concluantes en microscopie, c'est pourquoi j'ai décidé d'utiliser le système de Split-GFP pour mon étude. Pour cela, les variants EPRS^{N1} et EPRS^{0WHEP} ont été fusionnés au polypeptide ne possédant pas de MTS dans le vecteur n°2 puis cotransformés avec le vecteur n°1 exprimant l'autre fragment de la GFP fusionné au MTS (Figure 40). Il m'a tout d'abord fallu vérifier que les deux constructions EPRS^{N1} et EPRS^{0WHEP} Split-GFP étaient fonctionnelles dans la cellule et permettaient de compléter l'absence de l'ERS endogène par chasse de plasmide sur milieu 5-FOA (Figure 41). Les cellules ont ensuite été transformées avec un vecteur exprimant Atp9p-RFP afin de visualiser les mitochondries. Une analyse par microscopie à épifluorescence a été faite avec des cellules cultivées en fermentation et en respiration pour chacun des deux variants. Comme nous pouvons le voir figure 42, l'EPRS^{N1} et l'EPRS^{0WHEP} Split-GFP sont localisées à la mitochondrie en fermentation et en respiration.

IV.2.7 Tests fonctionnels chez la levure

Le fait que l'EPRS^{N1/0WHEP} complémente l'absence de l'ERS endogène signifie qu'elle est capable d'aminocycler le cARNt^E et le mARNt^Q . Pour vérifier cela, j'ai tout d'abord réalisé des tests préliminaires d'aminocyclation sur de l'ARNt total de levure afin de voir si l'EPRS^{N1} était capable d'aminocycler ces ARNt dans l'ARNt total de levure. L'EPRS^{N1} utilisée pour ces expériences est la même que celle purifiée pour les expériences de cristallographie (voir § IV.2.3 Cristallisation de l'EPRS^{N1}). Malheureusement, dans les conditions testées (50 μ M d'ARNt total, 20 μ M de [¹⁴C]Glutamate et 0.02 μ M d'EPRS^{N1}) aucune activité enzymatique n'a pu être détectée. Ne connaissant pas l'affinité de l'EPRS^{N1} pour l'ARNt^E et e_mARNt^Q de levure, ces expériences devront être répétées en augmentant les concentrations de Glu et également de l'EPRS^{N1}. Des tests d'aminocyclation à partir d'ARNt total de mitochondrie devront également être faits pour prouver que c'est bien l'import de l'EPRS^{N1} dans la mitochondrie qui active la traduction mitochondriale. Par la

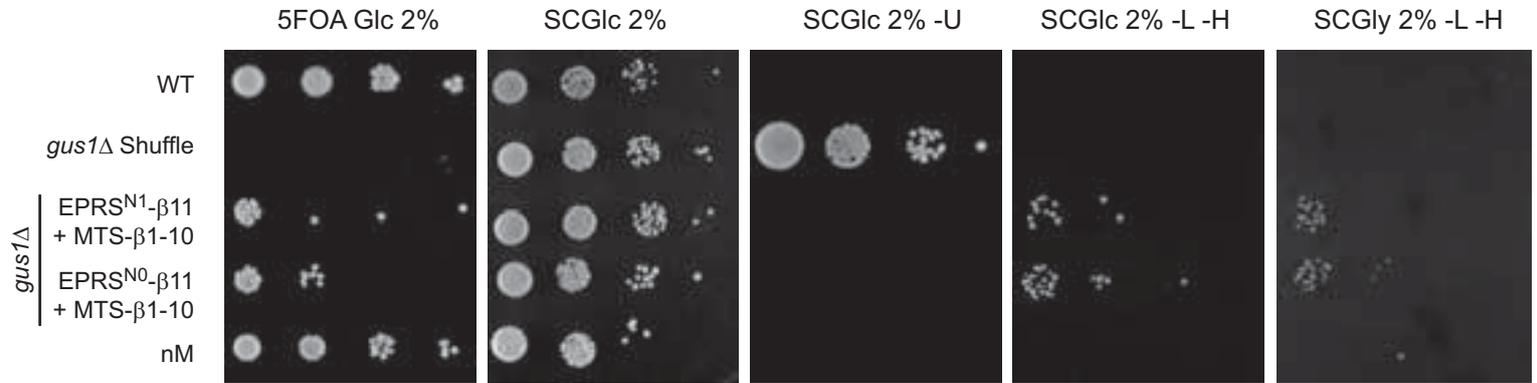


Figure 41. Tests de complémentation de l'EPRS^{N1} split-GFP chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Les cellules ont été cultivées en phase exponentielle de croissance dans un milieu approprié puis un test en goutte est réalisé à partir de dilution en séries de chaque souche à la même DO_{600nm}. Les tests de croissance ont été réalisés à 30 °C et les images présent à 2 (SCGlc 2%, -L -H et -U, 5FOA Glc 2%) et 4 jours (SCGly 2%). L'expression des variants de l'EPRS^{N1/N0} est réalisée dans une souche *gus1Δ*.

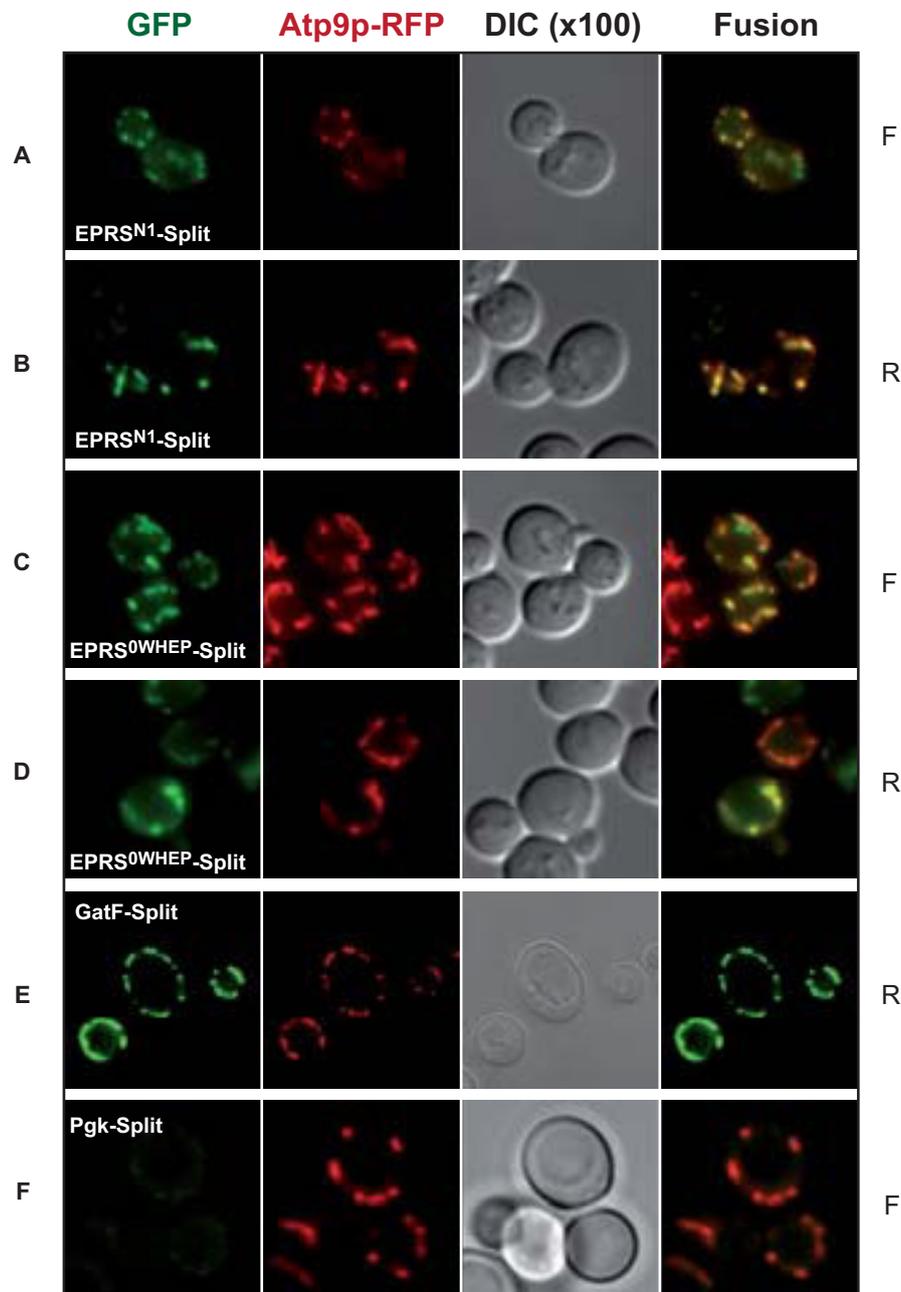


Figure 42. Localisation subcellulaire de l'EPRS^{N1} par Split-GFP dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation et en respiration.

(A-D) Les levures expriment de manière constitutive l'EPRS^{N1/0WHEP}, le fragment MTS-β1-10 ainsi que Atp9p-RFP (un marqueur mitochondrial). Un signal GFP est visible dans les cellules exprimant l'EPRS^{N1} et ce signal colocalise avec Atp9p-RFP en fermentation (A) mais également en respiration (B). Les mêmes observations peuvent être faites à partir des images de l'EPRS^{0WHEP} en fermentation (C) et en respiration (D). (E) GatF-Split a été utilisé ici comme contrôle positif, GatF étant une des sous-unité de l'AdT de type GatFAB mitochondriale. On voit que le signal GFP colocalise parfaitement avec celui d'Atp9p-RFP. (F) La protéine Pgk étant une protéine cytosolique, elle a été utilisée ici comme contrôle négatif. L'absence de fluorescence en GFP, indique que le système Split fonctionne et permet de discriminer la fractions mitochondriale de la fraction cytosolique d'une protéine doublement localisée. F: fermentation; R: respiration.

suite des expériences de transamidation en présence d'ARNt total, de l'EPRS^{N1} et de la GatFAB nous permettront d'assoir le rôle spécifique de l'EPRS^{N1} dans la formation de l'E-mARNt^Q.

IV.2.8 Test d'interaction avec Arc1p

Nous avons également voulu savoir si l'EPRS^{N1} était capable de se lier à Arc1p dans le cytoplasme de la levure. Pour cela nous avons tout d'abord effectué un alignement des séquences protéiques de l'ERS de levure et de l'EPRS^{N1} humaine sur le programme ClustalX (Figure 43). Nous avons ensuite identifié les résidus importants pour la liaison entre Arc1p et l'ERS ainsi que ceux importants pour l'interaction entre l'ERS et Arc1p (Simader et al., 2006). Comme nous pouvons le voir figure 43, sur les 17 résidus impliqués dans la liaison Arc1p-ERS, 10 sont conservés dans l'EPRS^{N1}. Sur la base de cette homologie nous avons voulu vérifier par l'expérience si cette interaction était possible. Pour cela nous avons utilisé de la protéine Arc1p purifiée et réalisé des tests d'interaction par gel filtration en présence d'EPRS^{N1} pure en présence ou en l'absence d'ARNt total de levure. Nous voyons que même en présence d'un large excès d'Arc1p, elle ne lie pas l'EPRS^{N1} (Figure 44). L'ajout d'ARNt total de levure dans le milieu de réaction ne permet pas à l'EPRS^{N1} de se lier à Arc1p, tandis qu'Arc1p interagit avec l'ARNt. Il faut tout de même noter que la proportion d'ARNt^E dans l'ARNt total est relativement faible, et que Arc1p a été montré qu'Arc1p peut se lier avec un certain nombre d'ARNt lorsqu'il n'est pas en complexe avec l'ERS et la MRS (Deinert et al., 2001). L'absence de liaison entre Arc1p et l'EPRS^{N1} peut provenir de l'absence de modification sur l'EPRS^{N1}. Quoiqu'il en soit, cette association n'empêche pas l'EPRS^{N1} d'aminoacyler les ^cARNt^E et ^mARNt^Q (Figure 37).

IV. 3 Discussion

Au cours de ces travaux, j'ai pu montrer par microscopie confocale et western-blot sur des mitochondries purifiées que l'EPRS^{N1} surexprimée dans des cellules HeLa se relocalise dans les mitochondries. Afin de mieux comprendre son rôle et son mode d'import dans la mitochondrie, j'ai décidé d'utiliser la levure comme outil. Pour se faire, j'ai tout d'abord du démontrer que l'EPRS^{N1} est l'homologue fonctionnel de l'ERS de levure par des tests de complémentation en fermentation et en respiration. Une approche par microscopie à épifluorescence a ensuite permis de confirmer la double localisation de l'EPRS^{N1} également dans la levure. Néanmoins, aucun rôle n'est pour le moment attribué à l'EPRS^{N1} dans la mitochondrie humaine et l'identification de ses interactants mitochondriaux pourrait constituer une première approche qui permettra d'identifier sa fonction. Pour cela, nous devons créer un vecteur exprimant l'EPRS^{N1} en fusion à une étiquette HA afin de rechercher par co-immunoprécipitation les interactants de l'EPRS^{N1} chez l'humain et chez la levure.

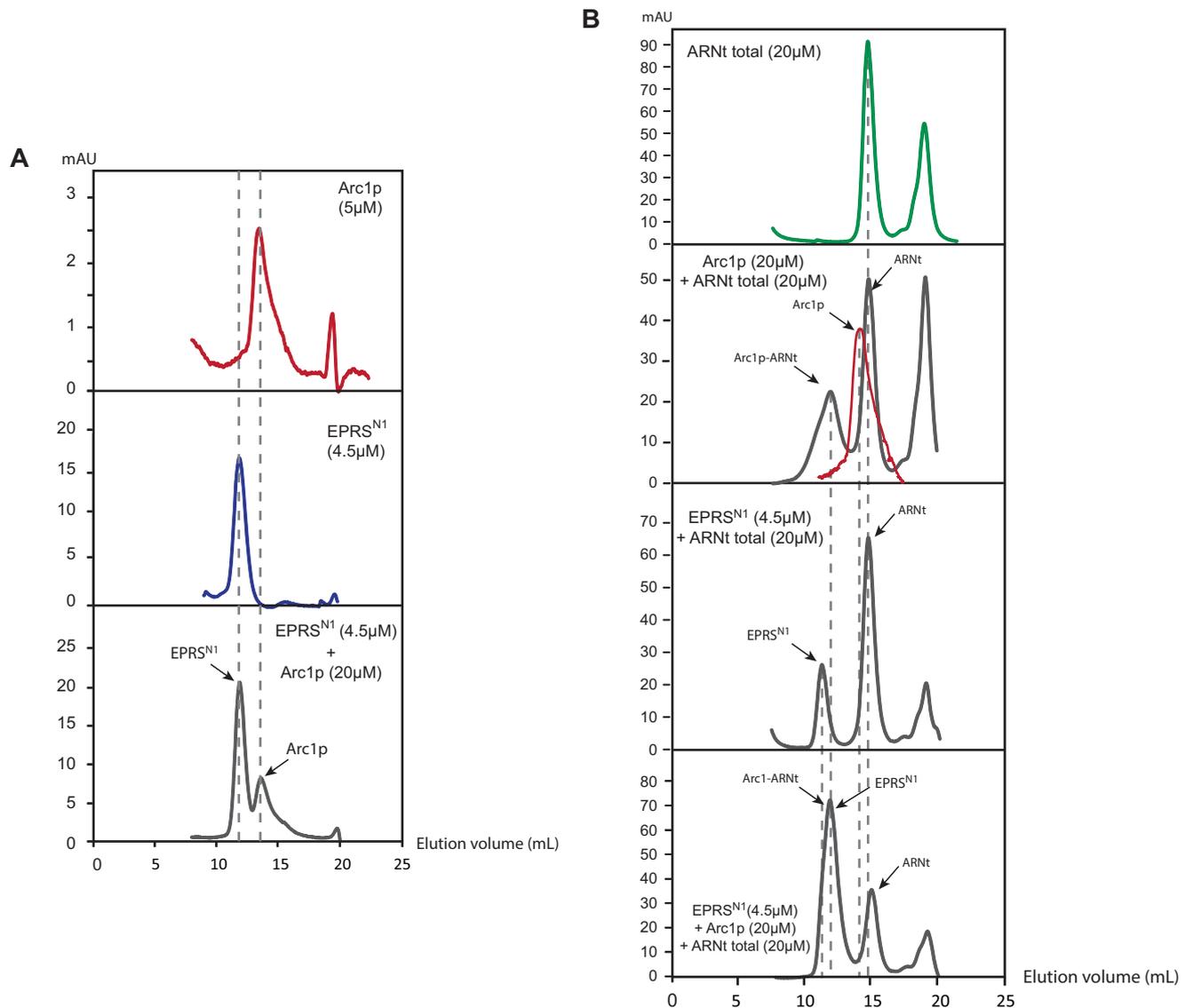


Figure 44. Tests d'interactions entre l'EPRS^{N1} et Arc1p par chromatographie d'exclusion de taille.

(A) Un premier test d'interaction entre l'EPRS^{N1} et Arc1p (en excès) nous montre qu'il n'y a pas d'interaction entre les deux protéines (panel de gauche par comparaison des volumes d'éluion des protéines seules). (B) Afin de vérifier si l'ARNt pourrait être un cofacteur d'assemblage, 20 μM d'ARNt total de levure est ajouté aux expériences d'interactions (panel de droite). Comme nous le voyons, Arc1p interagit avec l'ARNt total (deuxième panel en partant du haut), tandis que l'EPRS^{N1} ne se lie pas (troisième panel en partant du haut). L'ajout d'ARNt total en présence d'Arc1p et de l'EPRS^{N1} ne permet pas aux deux protéines d'interagir (panel du bas).

Je dois dire que les résultats de complémentation chez la levure m'ont quelque peu étonné puisque je ne m'attendais pas à avoir une complémentation par l'EPRS^{OWHEP} en respiration. En effet, comme le suggérait le Dr. Shiba, je pensais que les domaines WHEP (R1 et/ou R2) seraient importants pour l'import mitochondrial. Il semblerait donc que le MTS soit effectivement en N-ter de la protéine comme l'avaient montré les analyses de séquences de Mathieu (Frechin et al., 2009). La suite du travail passera impérativement par la délétion et/ou la mutation des résidus ¹¹⁵FVELPGA¹²¹ conservés entre l'homme et la levure et des tests d'import *in vivo* par microscopie et western-blot et/ou *in vitro* sur des mitochondries purifiées. Par la suite, si la séquence identifiée n'est pas le MTS, des mutants de délétions à différentes positions dans le domaine N-ter devront être réalisés pour vérifier par des tests d'import *in vivo*, par microscopie et western-blot si l'EPRS^{N1} est toujours importée.

Bien que les expériences de localisation subcellulaire par microscopie avec la split GFP soient tout à fait convaincantes, la détection par western-blot de l'EPRS^{N1} ou de l'EPRS^{OWHEP} dans les mitochondries purifiées de levures cultivées en fermentation et en respiration reste un contrôle important à réaliser. Les anticorps anti-GFP reconnaissent le polypeptide fusionné à l'EPRS^{N1}, ce qui me permettra d'identifier facilement les fractions cytosoliques non liées à β 1-10 et mitochondriales liées à β 1-10.

Chez la levure, l'ERS cytosolique est une ERS-ND qui aminoacyle le cARNt^E et le mARNt^Q mais pas le mARNt^E ni le cARNt^Q et s'apparente ainsi à l'ERS-2 d'*Helicobacter pylori* qui ne charge que l'ARNt^Q et plus l'ARNt^E (Chang and Hendrickson, 2009; Frechin et al., 2009). Chez la levure la différence majeure réside dans la compartimentalisation des ARNts substrats de l'ERS-ND. Dans le cytoplasme l'ERS ne charge que l'ARNt^E tandis que dans la mitochondrie elle ne charge que l'ARNt^Q. Cela est notamment dû à la présence de déterminants d'identité similaires dans ces ARNts (Figure 45), on retrouve ainsi la paire de base U₁-A₇₂ dans le bras accepteur des cARNt^E et mARNt^Q tandis qu'elle est remplacée par la paire de base G₁-C₇₂ dans les cARNt^Q et mARNt^E . Les déterminants U₁-A₇₂ des cARNt^E et mARNt^Q sont conservés chez tous les eucaryotes (<http://trna.bioinf.uni-leipzig.de>). L'établissement des déterminants d'identité de l'ARNt^{Asn} et de l'ARNt^Q pour les AdTs a montré que l'élément essentiel définissant si un ARNt peut être transamidé ou non par une AdT GatCAB, est la présence d'une paire de base U₁-A₇₂ (Bailly et al., 2006). Autrement dit, les cARNt^E et mARNt^Q peuvent être aminoacylés par une ERS-ND, et cela est réalisé grâce à l'import de l'ERS-ND dans les mitochondries (chez la levure du moins), puis transamidés par la GatFAB. Chez les apicomplexes, ces inversions de déterminants d'identités entre les ARNt^Q et ^E mitochondriaux et cytosoliques ne sont pas respectées, et de manière intéressante ils ne possèdent pas de Gat(C/F)AB. De plus tous les ARNts, y compris les ARNt mitochondriaux sont codés par le génome nucléaire. Cela renforce encore l'idée que les ERS cytosoliques sont des ERS-ND dans les mitochondries lorsque celles-ci possèdent une AdT, et que donc chez les eucaryotes le Q- mARNt^Q est toujours formé par voie indirecte.

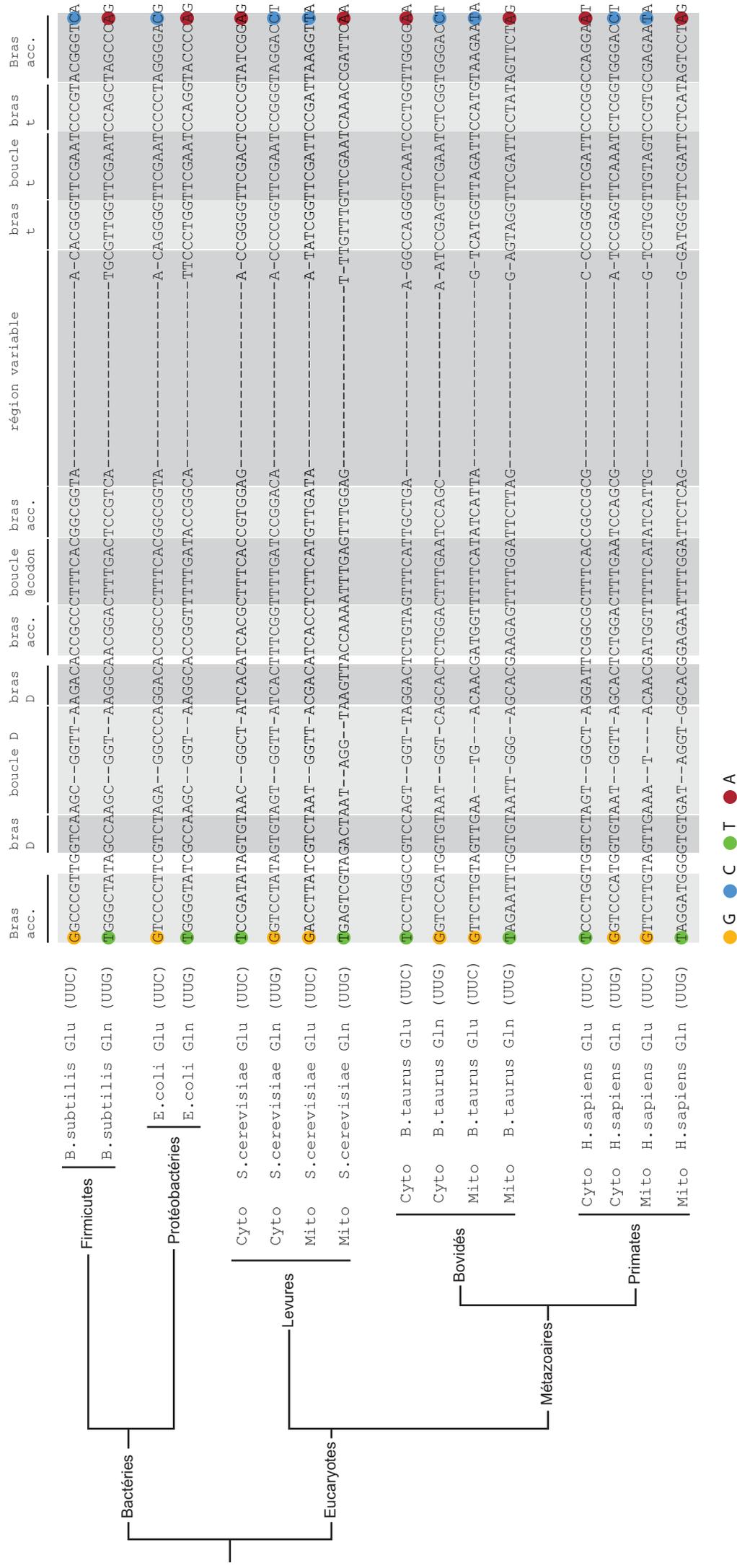


Figure 45. Alignement des ARNt^E et Q cytosoliques et mitochondriaux dans différents organismes.

Les ARNt^E et Q bactériens de *Bacillus subtilis* (B. subtilis) et d'*Escherichia coli* (E. coli) sont comparées aux ARNt^E et Q cytosoliques et mitochondriaux de différents eucaryotes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* (S. cerevisiae), l'humain *Homo sapiens* (H. sapiens) et le boeuf *Bos taurus* (B. taurus). Seuls les ARNts glutamate portant l'anticodon (UUC) et glutamine portant le codon (UUG) sont représentés. Un code couleur permet de différencier les bases 1 (G ou T) et les bases 72 (A ou C).

Si l'on compare les ARNt^{E et Q} bactériens à ceux de la levure, de l'humain ou du bœuf (Figure 45) on remarque que les ^cARNt^E partagent les mêmes déterminants d'identités que le ^mARNt^Q et que les déterminants des ^cARNt^Q sont partagés avec les ^mARNt^E. Il n'est donc pas impossible que dans certaines conditions, l'ERS-ND mitochondriale humaine ne soit plus en mesure de mésacyler le ^mARNt^Q et qu'à ce moment-là, l'EPRS^{NI} soit importée dans les mitochondries pour jouer le rôle d'ERS-ND et catalyser la formation de l'E-^mARNt^Q. Comme nos expériences de traduction mitochondriale *in vivo* n'ont pas montré une augmentation de la traduction dans les cellules exprimant constitutivement l'EPRS^{NI}, nous pourrions faire l'expérience inverse, c'est-à-dire empêcher l'expression de l'EPRS^{NI} par si- ou shRNA et mesurer le taux de traduction mitochondrial. Si nos hypothèses sont justes, il se pourrait que l'inhibition de l'expression de l'EPRS^{NI} soit létale ou impacte de manière importante la traduction mitochondriale dans la cellule.

Deux questions majeures restent en suspens dans cette étude : quand l'EPRS^{NI} est-elle exprimée et quand est-elle importée dans les mitochondries humaines ? Pour le moment la seule étude sur l'EPRS^{NI} a montré qu'elle n'est exprimée que 24h après un traitement des cellules myéloïdes aux IFN- γ , et bien qu'elle soit exprimée dans divers types cellulaires humains, rien n'est connu sur les autres stimuli qui induisent son expression. Un panel de conditions (hypoxie, traitement à différentes cytokines et facteurs de croissance...) pourrait être testé en combinaison avec la détection de l'ARNm de l'EPRS^{NI} par RT-PCR ainsi que la détection de la protéine dans les mitochondries par western-blot.

IV. 4 Matériels et méthodes

IV.4.1 Milieu de culture

IV.4.1.1 Pour levures

Les milieux synthétiques utilisés pour la croissance des levures sont composés de 0,67% (p/v) de yeast nitrogen base supplémenté en sulfate d'ammonium (YNB, MP Bio) sans acides aminés, 2% (p/v) de glucose (Glc), de galactose (Gal) ou de glycérol (Gly) et 0,08% (p/v) et d'une quantité appropriée d'une mixture d'acide aminé (MP Bio). Les milieux solides contiennent 2% (p/v) d'agar.

IV.4.1.2 Pour cellules humaines

Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) supplémenté en glucose (4,5 g/L), 10% de sérum fœtal de veau (Gibco), 1% (v/v) de Fongizone (Amphotéricine B 250 μ g/mL, Gibco) et 1% (v/v) de PenniStrepto (cocktail de pénicilline à 10 000 U/mL et de streptomycine à 10 000 μ g/mL, Gibco) dans une étuve à 37 °C et 5%

de CO₂. Les cellules sont lavées dans du PBS 1× (Gibco). Pour les expériences de traduction *in vivo*, les cellules sont cultivées dans du DMEM puis incubées dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) sans méthionine additionné de glutamine et supplémenté d'1 µL/mL d'émétine (dihydrochlorure d'émétine 100 mg/mL, Calbiochem).

IV.4.2 Vecteurs pour expression dans des levures et cellules humaines

Pour son expression chez la levure, les gènes de l'EPRS^{N1} et de l'EPRS^{OWHEP} ont été clonés dans un p415-ADH dans les sites de clonage SpeI/BamHI (EPRS^{N1}) ou SpeI/XhoI (EPRS^{OWHEP}). Pour les expériences de localisation subcellulaire l'EPRS^{N1} et l'EPRS^{OWHEP} ont été clonés dans un pRS315-GPD-GFP permettant d'exprimer une protéine de fusion avec la GFP en C-terminal. Les deux variants ont été clonés dans les sites XbaI/BamHI.

L'expression de l'EPRS^{N1} chez l'homme a été rendue possible par clonage dans le vecteur peGFP-N1 et -C1, permettant par la même occasion d'exprimer l'EPRS^{N1} fusionnée en N- (peGFP-C1) ou en C-terminal (peGFP-N1) à la GFP. L'EPRS^{N1} a été clonée dans les sites HindIII/SalI (peGFP-N1) ou BamHI/SalI (peGFP-C1).

IV.4.3 Transfection des cellules HeLa

Dix µg d'ADN plasmidique sont suspendus dans 250 µL de NaCl (150 mM), vortexé puis additionné de 20 µL (pour obtention d'extraits bruts) ou 10 µL (pour l'imagerie) de Jet-PEI (Polyplus Transfection) dilué dans 250 µL de NaCl (150 mM). La suspension est ensuite vortexée, incubée 15 à 30 min à température ambiante puis déposée sur les cellules.

IV.4.4 Traduction mitochondriale *in vivo*

Les cellules sont cultivées dans des plaques 6 puits à raison de 300 000 cellules/puits dans du DMEM, puis lavées dans 1 mL de PBS 1×. Les cellules sont ensuite incubées 15 min à 37 °C en présence de 500 µL de RPMI + émétine, puis 30 min à 37 °C en présence de 200 µCi de [³⁵S]Met /puits. A l'aide de 750 µL de DMEM (supplémenté de 1 g/L de glucose) les cellules sont lavées et incubées 10 min à 37 °C. Les cellules sont ensuite lavées avec 1 mL de PBS 1×, puis décollées à l'aide d'une solution de PBS 1× supplémentée en EDTA (1mM) après 15 min d'incubation à 37 °C. Resuspendre les cellules et les transférer dans un tube eppendorf 1,5 mL, culoter les cellules à 600 ×g pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant est retiré et les cellules sont resuspendues dans 60 µL de PBS 1×. A partir de ces extraits, la concentration en protéines est mesurée par Bradford, puis un volume de bleu de charge (2% (v/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 2.5% (v/v) β-mercaptoethanol, 0.06 M Tris-HCl pH 6.8 et 0.002% (p/v) bleu de bromophénol) est ajouté aux extraits. Les cellules sont

lysées par sonication (10 sec à 36% d'amplitude) puis chauffées 5 min à 40 °C. Avec ces extraits, 10-15 µg de protéines sont mis à migrer sur SDS-PAGE 12%, fixées dans un bain de 10% (v/v) d'acide acétique – 10% (v/v) d'éthanol, puis le gel est séché. La révélation de la radioactivité est faite après exposition sur film radiographique grâce à un Typhoon (Typhoon TRIO, GE Healthcare).

IV.4.5 Acquisition des images par microscopie

IV.4.5.1 Pour levures

Toutes les cellules ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance dans des milieux synthétiques appropriés tenant compte des marqueurs d'auxotrophie. Les mitochondries ont été marquées au MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen). Un µL de MitoTracker (200 nM stock) est ajouté à une aliquote de 1 mL de chaque culture puis les cellules sont incubées pendant 20 minutes à 30 °C sous agitation. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1600 ×g pendant 2 min puis suspendues dans du milieu frais et déposées entre lame et lamelle. Le signal de fluorescence a été acquis par un microscope à épifluorescence ZEISS (AXIO Observer d1) et les images ont ensuite été traitées par le programme Image J.

IV.4.5.2 Pour cellules humaines

Les cellules HeLa ont été cultivées dans des chambres de culture Lab-Tek (boîte 6 puits de 9,4 cm²/puits soit environ 300 000 cellules/puits) à fond en verre (pour minimiser l'autofluorescence) à 37 °C. 48h après transfection, les images ont été acquises par microscopie confocale (ZEISS LSM700), puis traitées par le programme ImageJ.

IV.4.6 Préparation des extraits protéiques totaux

IV.4.6.1 Extraits protéiques total de levure

A partir de 50 mL de cultures de levures effectuées en milieu synthétique, les cellules sont reprises dans 2 mL de tampon de broyage (100 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 150 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA) supplémenté d'inhibiteurs de protéases « cOmplete, Mini, EDTA-free » (chymotrypsine, thermolysine, papaïne, trypsine, extrait pancréatique, ROCHE). L'extrait est transféré dans des tubes 2 mL contenant un volume des billes de verre égal au volume sec de cellules. Les cellules sont lysées par agitation dans un FastPrep (6 cycles de 6 m/s pendant 30 secondes). L'extrait protéique total est obtenu par sédimentation des débris cellulaires 5 min à 430 ×g à température ambiante (TA) puis le surnageant est centrifugé 2 h à 105000 ×g à 4°C. La concentration relative en protéine est mesurée au réactif de Bradford (Roti-NanoQuant, ROTH) à A_{595nm}.

IV.4.6.2 Extraits protéiques total de cellules HeLa

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de pétrie de 58 cm² ce qui représente environ 500 000 cellules/boîtes, puis lavées avec 2 mL de PBS 1×. Afin de récupérer un maximum de cellules, ces dernières sont décrochées de la boîte à l'aide d'un râteau, puis centrifugées à 600 ×g à température ambiante pendant 10 min. Le surnageant est retiré et les cellules sont reprises dans du bleu de charge, soniquées (10 sec à 36% d'amplitude) puis chauffées 5 min à 40 °C.

IV.4.7 Purification des mitochondries à partir de cellules humaines

Pour ces expériences, 5 boîtes de 58 cm² de cellules HeLa transfectées (pEGFP-C1 ou N1 vide ou exprimant l'EPRS^{N1}) ont été utilisées. 48h après transfection les cellules sont lavées avec 5 mL de PBS 1×, reprises dans 1 mL de PBS 1× après grattage puis centrifugées 5 min à 250 ×g à température ambiante. Le culot est ensuite repris dans 1 mL de tampon BSA (0,6 M sorbitol, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes, 300 mM NaCl, inhibiteurs de protéases ROCHE et 0,3 % (v/v) de BSA (1 mg/mL) et les cellules sont cassées à l'aide d'une seringue de 1 mL (équipée d'une aiguille G23) par aspiration/refoulement environs 80 fois sur glace. Les mitochondries sont ensuite obtenues par une succession de centrifugations différentielles 2 fois à 1 200 ×g pendant 6 min à 4 °C en reprenant le surnageant à chaque étape, puis le surnageant ainsi obtenu est centrifugé à 16 000 ×g pendant 40 min à 4 °C. Le culot final correspondant aux mitochondries est repris dans 300 µL de tampon « mito » (0,6 M sorbitol, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes, 300 mM NaCl, inhibiteurs de protéases ROCHE), puis la concentration protéique est mesurée par Bradford. 50 µg de digitonine (1 mg/mL) préparé extemporanément est ajouté aux mitochondries (afin de dégrader la membrane externe de la mitochondrie) pendant 15 min à température ambiante. Ajouter 1 mL de tampon « mito » et centrifuger 20 min à 16 000 ×g à 4 °C, puis reprendre le culot de mitoplaste dans 50 µL de bleu de charge.

IV.4.8 Immunodétection

Les expériences d'immunodétection ont été réalisées en utilisant 10-15 µg d'extraits protéiques séparés sur gel SDS-PAGE 10 ou 12% puis transférés sur membrane PVDF (Trans-Blot BioRad). La présence de la Pgk (Phospho-glycérate kinase) est révélée par un anticorps monoclonal de souris anti-Pgk (1:5 000), la présence de la porine est révélée par un anticorps monoclonal de souris anti-Por1 (1:5 000, Molecular probes) et celle de la GFP par un anticorps monoclonal de souris anti-GFP (1 :10 000). La détection des anticorps primaires est réalisée en utilisant des anticorps secondaires anti-souris (1 : 10 000) couplés à la HRP puis révélés par l'ECL-plus (BioRad) selon les instructions du fournisseur.

IV.4.9 Gel filtration

Les interactions entre Arc1p et l'EPRS^{N1} ont été réalisées en suivant le même protocole que (Fischer et al., 2012). Brièvement, Arc1p (5 μ M) a été mis en contact de l'EPRS^{N1} (4,5 μ M) en présence ou en l'absence d'ARNt total de levure (20 μ M) dans un tampon « GF » (volume final 100 μ L ; 50 mM Hepes KOH pH 7,2, 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 0,1mM EDTA) pendant 15 min sur glace. Les extraits sont ensuite passés sur une colonne Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare). L'élution des différentes protéines et complexes est contrôlée par le programme UNICORN.

Arc1p-6His (pET20b) a été purifié sur colonne NiNTA dans un tampon de purification (50 mM Tris-HCl pH7.8 ; 300 mM NaCl ; 1mM B-ME ; 10% glycérol ; cocktail d'inhibiteur ROCHE ; 10 mM imidazole), puis lavé 2 fois dans un tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH7.8 ; 300 mM NaCl ; 30mM imidazole ; 1mM B-ME), puis élué dans un tampon d'élution 50 mM Tris-HCl pH7.8 ; 300 mM NaCl ; 30mM imidazole ; 1mM B-ME), puis purifié sur une colonne échangeuse d'ions Ressource Q (Tampon A : 25 mM Tris-HCl pH7.8 ; 10 mM KCl, Tampon B : 25 mM Tris-HCl pH7.8 ; 1M KCl) puis enfin par Superdex 200 avec le tampon GF.

L'EPRS^{N1}-6His (pET20b) sur colonne Ni-NTA comme Arc1p, chargée sur colonne d'héparine HiTrap HP (GE Healthcare) puis éluee par gradient linéaire de 200 à 1000 mM NaCl. L'éluat est ensuite purifié par chromatographie d'exclusion de taille (Superdex G200) dans le tampon GF.

Partie V

**Etude d'un facteur d'export de
l'aminoacyl-ARNt chez
Saccharomyces cerevisiae :
Cex1p**

V.1 Introduction au sujet

V.1.1 Les échanges de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme

Chez les eucaryotes, les machineries transcriptionnelle et traductionnelle sont séparées physiquement par la membrane nucléaire. Le transport de macromolécules comme les ARNs et les protéines, entre le cytosol et le noyau sont possibles grâce à la présence de pores dans la membrane nucléaire appelés « complexes de pores nucléaire » (NPC) et formés de nombreuses protéines appelées nucléoporines (Nups). Lorsque la taille d'une macromolécule est supérieure à 40 kDa, son passage à travers les NPC nécessite des transporteurs solubles appelés karyophérines. Dans la plupart des cas, les facteurs de transport nucléo-cytoplasmique sont des protéines de la famille des β -karyophérines (β -Kaps), et sont appelées importines lorsqu'elles sont impliquées dans l'import de molécules, ou exportines lorsqu'elles sont impliquées dans l'export de molécules. Chez la levure il existe 14 β -Kaps différentes identifiées sur la base de leur domaine N-terminal de liaison à la GTPase Gsp1p lié au GTP (homologue de RanGTP chez l'homme), et d'un domaine C-terminal (C-ter) formé de répétitions HEAT importantes pour la liaison aux cargos. Les cargos contenant une séquence d'import nucléaire (NLS) sont importés dans le noyau par interaction directe avec le domaine HEAT des β -Kaps, ou par interaction indirecte avec des adaptateurs qui vont interagir avec les β -Kaps. Par exemple, les NLS classiques sont liés par l'importine α qui se lie ensuite à l'importine β (pour approfondir ce sujet (Cook et al., 2007; Stewart, 2007)).

Au cours de l'import, les importines associées aux cargos interagissent avec les Nups afin de traverser le NPC pour libérer les cargos dans le noyau. La dissociation du complexe importine-cargo est catalysée par l'interaction des importines avec Gsp1p-GTP, le cargo est alors libéré dans le noyau et l'importine β recyclée vers le cytoplasme. Dans le cas où le cargo est également lié à une importine α , cette dernière est également dissociée du cargo par interaction avec Nup50p dans le noyau puis ré-exportée vers le cytoplasme par le facteur d'export nucléaire Cse1p (chez la levure) lié à une Gsp1p-GTP. Dans le cytoplasme, Rna1p (Ran GTPase-Activating Protein 1) stimule l'hydrolyse du GTP en GDP et provoque le relargage des importines pour qu'elles puissent initier un nouveau cycle d'import (Figure 46). Gsp1p-GDP est importée dans le noyau par le facteur de transport nucléaire Ntf2p (Nuclear transporting factor 2) où Prp20p (GEF : Guanosine exchange factor) catalyse l'échange de GDP par un GTP afin de régénérer Gsp1p-GTP. Des facteurs additionnels sont nécessaires au bon déroulement du cycle de la GTPase, comme par exemple Yrb1p (RanBP chez l'homme : Ran-binding protein) qui est un cofacteur de Rna1p et facilite la dissociation entre Gsp1p-GDP et les importines.

L'export nucléaire, assuré par Cse1p et Xpo1p chez la levure, est la réciproque du processus d'import. Dans le noyau, les cargos s'associent aux exportines liées à Gsp1-GTP, puis sont transloqués dans le cytoplasme à travers les NPC. Dans le cytoplasme, Rna1p stimule l'activité GTPase de Gsp1p-

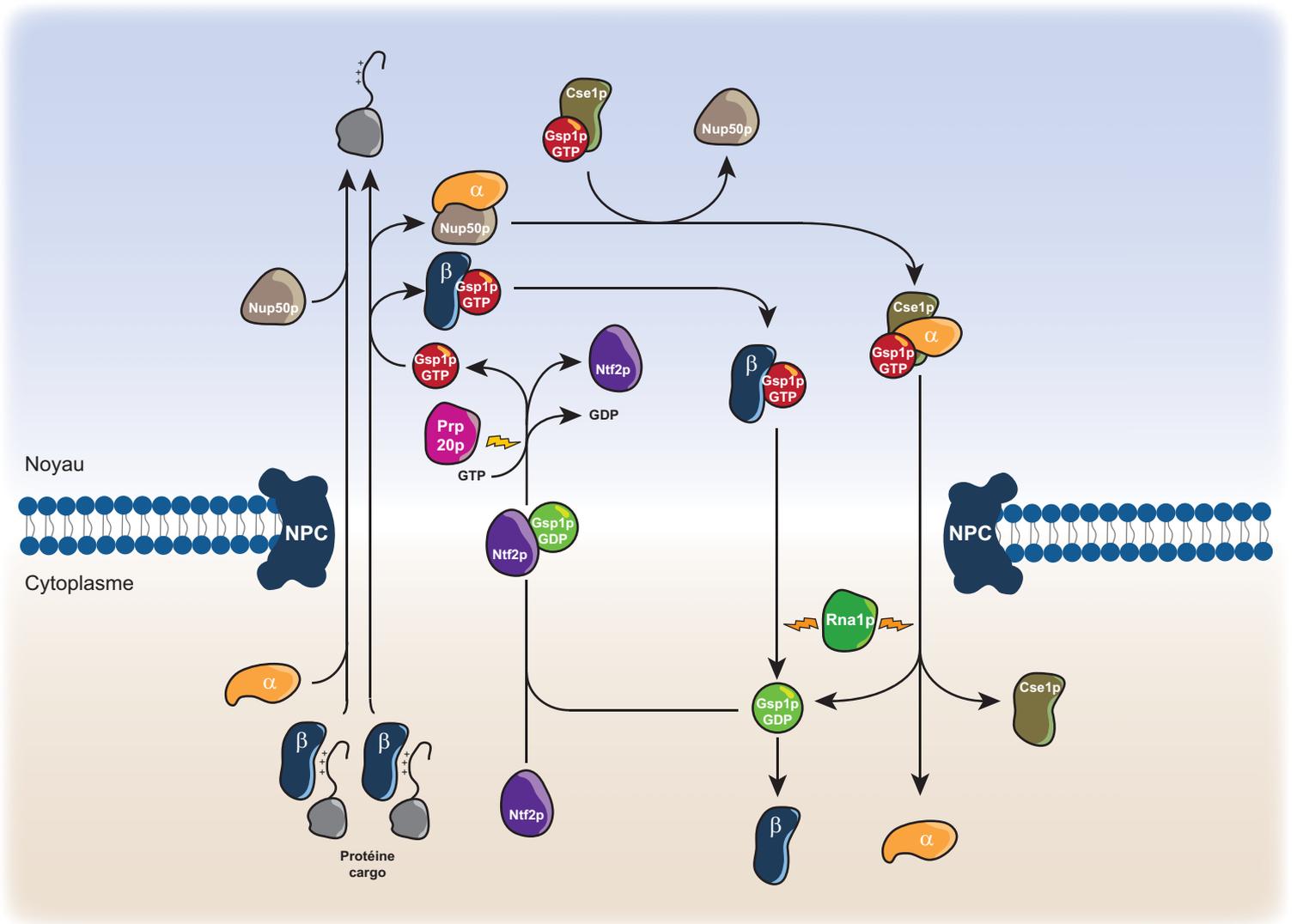


Figure 46. Représentation schématique de l'import nucléaire et du cycle des Ran chez la levure.

β : Importine β; α : Importine α; NPC : Complexe de Pore Nucléaire; Nup50p : Nucléoprine 50

GTP qui va hydrolyser le GTP provoquant la dissociation du complexe d'export. Exportines et Gsp1p-GDP sont ensuite recyclées vers le noyau.

Le cycle d'import/export nucléaire est donc basé sur les interactions entre les cargos et leurs transporteurs Gsp1p qui sont modulés par la forme GTP ou GDP de Gsp1p suivant que celle-ci se trouve dans le noyau (GTP) ou dans le cytoplasme (GDP).

V.1.2 Export des ARNts aminoacylés : implication de Cex1p

Comme nous l'avons déjà vu dans l'introduction générale, chez la levure les ARNts sont exportés du noyau à travers le NPC par les β -Kaps Los1p et Msn5p. Les ARNts non aminoacylés sont soit épissés à la surface de la mitochondrie avant de pouvoir être aminoacylés par les aaRSs soit aminoacylé directement après export du noyau. Une fraction des ARNts aminoacylés peut être ré-importée dans le noyau par voie rétrograde faisant intervenir Mtr10p. Bien que la raison de cet import ne soit pas totalement comprise, il semblerait que ce soit une étape de contrôle de qualité des ARNts. Ces ARNts aminoacylés sont ensuite ré-exportés par Los1p ou Msn5p pour pouvoir se lier au facteur d'élongation eEF-1A par un mécanisme de « channeling » dans le cytoplasme. Il existe donc deux voies d'export des ARNts : la voie d'export des ARNts aminoacylés et celle des ARNts non aminoacylés.

L'export des aa-ARNts implique plusieurs voies redondantes, mais ces voies ne sont pas très bien comprises et seules quelques protéines impliquées dans l'export de ces aa-ARNts sont connues. Parmi ces protéines, il a été montré que la protéine nucléolaire Utp8p délivre les aa-ARNts aux récepteurs Los1p et Msn5p qui les lient en présence de Gsp1p-GTP (Izaurralde et al., 1997; Richards et al., 1997; Steiner-Mosonyi et al., 2003). Ces aa-ARNts sont ensuite pris en charge par eEF-1A afin d'être utilisés au cours de la traduction. Des études chez les mammifères ont permis de montrer que l'exportine-5, orthologue de Msn5p chez la levure, exporte eEF-1A lié aux aa-ARNts dans le cytoplasme (Bohnsack et al., 2002; Calado et al., 2002) et que l'exportin-t, orthologue de Los1p, exporte les aa-ARNts matures issus de l'import rétrograde (Grosshans et al., 2000).

Des études réalisées par l'équipe du Pr. Dev Mangroo à Guelph (Canada) ont permis de mettre en évidence plusieurs protéines impliquées dans l'export des aa-ARNts. Sur la base d'une approche de triple hybride permettant d'identifier des interactions protéines-ARNt chez la levure, ainsi que d'expériences *in vivo* d'export nucléaire d'aa-ARNts, ils ont identifié la protéine nucléolaire Utp8p (Steiner-Mosonyi et al., 2003) et la protéine Cex1p (McGuire and Mangroo, 2007).

Selon le modèle décrit par McGuire *et coll.* (McGuire and Mangroo, 2007, 2012) et confirmé par Nozawa *et coll.* (Nozawa et al., 2013), Cex1p participe au channeling des aa-ARNts en

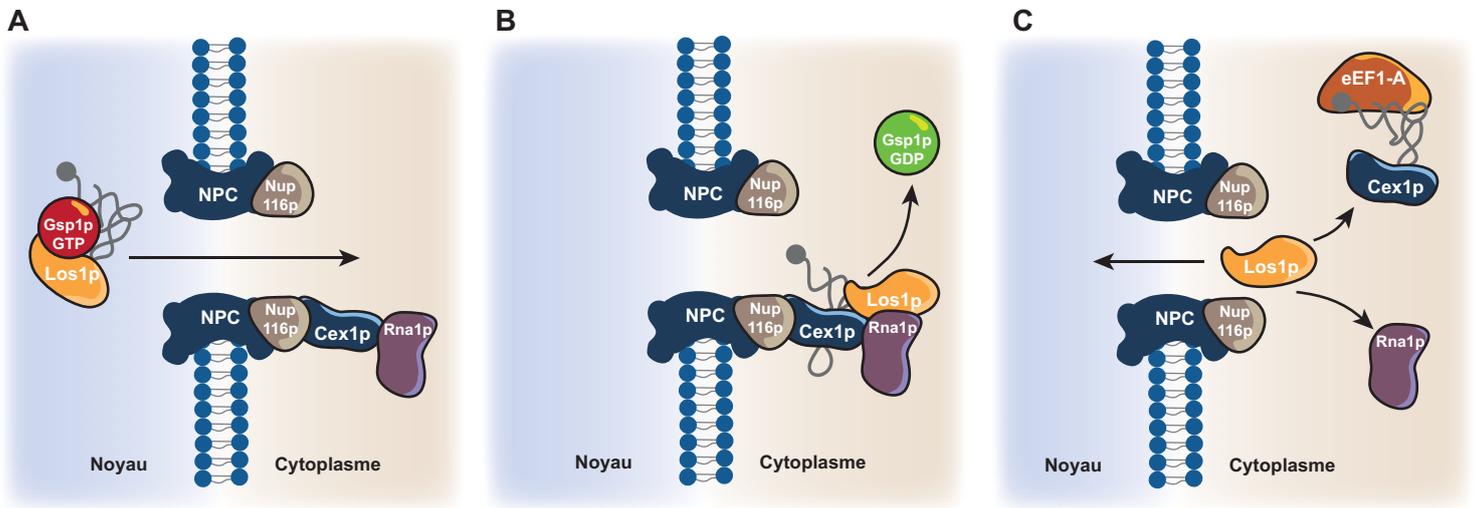


Figure 47. Modèle du channeling nucléo-cytoplasmique de l' aminoacyl-ARNt et rôle de Cex1p.

(A) Los1p, Gsp1p-GTP et l'ARNt aminoacylé sont exportés du noyau à travers le pore nucléaire (NPC). Du côté cytoplasmique du NPC, Cex1p interagit avec la nucléoporine Nup116p et Rna1p. (B) Une fois dans le cytoplasme, le complexe Los1p-Gsp1p-ARNt aminoacylé interagit avec Cex1p, Rna1p active l'hydrolyse du GTP par Gsp1p qui se détache du complexe sous la forme Gsp1p-GDP. (C) Une fois Gsp1p libéré, Rna1p et Los1p se détachent de Cex1p qui délivre l'ARNt aminoacylé au facteur d'élongation eEF1-A. L'ARNt est ensuite utilisé pour la traduction.

interagissant avec Nup116p du côté cytoplasmique des NPCs et en y recrutant Rna1p (Figure 47). Cex1p s'associe ensuite au complexe trimérique Los1p•aa-ARNt•Gsp1p-GTP après translocation à travers les NPC, Rna1p active l'hydrolyse du GTP de Gsp1p ce qui libère Gsp1p-GDP du complexe d'export. Cex1p interagit alors avec l'aa-ARNt et Los1p, Rna1p est libérée du complexe, Los1p est activement ré-importée dans le noyau et le complexe Cex1p•aa-ARNt est pris en charge par le facteur d'élongation eEF-1A pour être utilisé lors de la synthèse protéique. De cette manière, l'aa-ARNt est transféré de Los1p à Cex1p dans le cytoplasme, puis vraisemblablement transféré de Cex1p à eEF-1A.

V.1.3 Caractérisation de Cex1p

Cex1p (Cytoplasmic EXport protein 1) est une protéine cytoplasmique qui lie aussi bien les aa-ARNts que les ARNts. Cette protéine est également capable de lier des protéines soit grâce à un domaine médian composé de répétitions HEAT (hélices α antiparallèles), ou grâce à un domaine kinase-like inactif en N-ter (Figure 48A).

Le domaine N-ter de Cex1p (9-235) est plus ou moins similaire aux récepteurs à activité tyrosine kinase RET (**RE**arranged during **T**ransfection). Les kinases RET sont des récepteurs-enzyme à domaines transmembranaires essentielles chez l'Homme, et sont impliquées dans le développement et la régénération d'un grand nombre de cellules neuronales (Schuchardt et al., 1994). Le domaine kinase de ces protéines, c'est-à-dire la poche de liaison à l'ATP, est formé d'un lobe N-ter connecté à un lobe en C-ter par une boucle en hélice- α , et ce site actif est composé des motifs VA(I/V)K, HRD et DFG essentiels pour l'activité kinase, la liaison au magnésium et à l'ATP. En comparaison, Cex1p possède également les lobes N- et C-ter, mais ne présente ni la boucle A (importante pour l'auto-phosphorylation des kinases RET), ni la poche de liaison à l'ATP (Figure 48B). De plus, le domaine kinase-like ne possède pas les motifs conservés VA(I/V)K, HRD et DFG essentiels pour l'activité kinase, mais les motifs ₄₅TVFK_{48, 136}SKD₁₃₈ et ₁₅₀LFG₁₅₂ respectivement, ce qui suggère que Cex1p ne possède pas d'activité kinase (Nozawa et al., 2013).

Le domaine HEAT situé au milieu de Cex1p (291-544) est également retrouvé chez les protéines de la famille des exportines. Chez ces dernières, le domaine HEAT adopte une structure concave possédant un large « patch » d'aa chargés positivement importants pour des interactions protéines-protéines et protéines-nucléotides, et permet ainsi de lier les ARNts (Murthi et al., 2010; Okada et al., 2009). Il est intéressant de noter que le domaine HEAT de Cex1p adopte lui aussi une forme concave et présente également un patch chargé positivement, lui permettant d'interagir avec des ARNts et aa-ARNts (McGuire and Mangroo, 2007; Nozawa et al., 2013) (Figure 48C).

Cex1p est une protéine longue de 761 aa dont la structure 3D a été établie (Nozawa et al., 2013). Cette structure correspond à celle de la protéine tronquée des 220 derniers aa. En effet, la partie

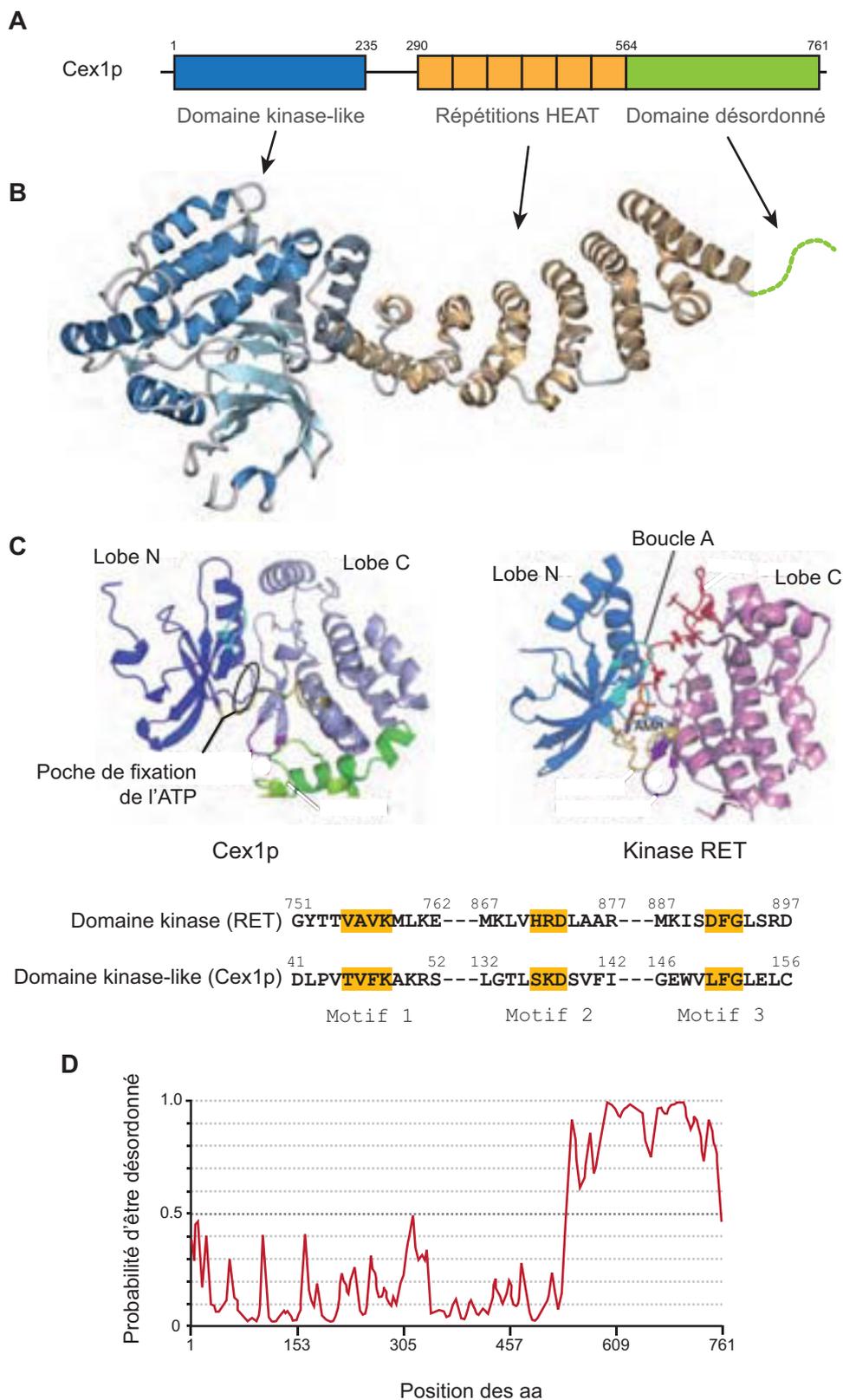


Figure 48 : Présentation de Cex1p : structure et domaines.

(A) Représentation schématique de Cex1p et ses trois domaines. (B) Chaque domaine est reporté sur la structure cristallographique obtenue par Nozawa et al., 2013 (Pdb: 3VWA). (C) Comparaison du domaine kinase de Cex1p (à gauche) et du récepteur à activité tyrosine kinase RET (à droite), selon Nozawa et al., 2013. Les séquences des trois motifs importants pour l'activité kinase de la kinase RET sont surlignés en jaune et sont comparés aux motifs présents dans le domaine kinase-like de Cex1p. (D) Prédiction des résidus désordonnés dans la partie C-terminale de Cex1p obtenu par le programme Poodle.

C-ter de la protéine (résidus 544-761) est totalement désordonnée rendant impossible la cristallisation de la protéine contenant ce domaine (Nozawa et al., 2013) (Figure 48D).

V.1.4 Pourquoi s'intéresser à Cex1p ?

...Et c'est bien la question que nous nous sommes posé au laboratoire, car même s'il est vrai que l'étude de l'export des aa-ARNts semble très intéressante, cela n'est pas dans la thématique du laboratoire. Néanmoins la première étude menée par l'équipe du Pr. Mangroo qui a permis de caractériser Cex1p, a également montré que, bien que la délétion du gène *CEXI* ne soit pas létale, une levure privée des gènes de *CEXI* et d'*ARCI* n'est pas viable. Cela signifie qu'il y a létalité synthétique et que les deux gènes sont liés génétiquement, en d'autres termes, ils interviennent dans la même voie de régulation, qui semble être dans notre cas l'export de l'ARNt puisqu'Arc1p a été identifié comme un facteur d'export de l'ARNt (Simos et al., 1996a). C'est cette interaction entre les deux gènes qui nous a poussé à travailler sur Cex1p et à mieux comprendre son rôle dans le channeling de l'ARNt.

A cette occasion, nous avons mis en place une collaboration avec le Pr. Osamu Nureki de l'université de Tokyo (Japon) au cours de l'année 2010. Le but de cette collaboration était pour l'équipe japonaise de déterminer la structure cristallographique de la protéine, et pour nous de caractériser les rôles de différents mutants de Cex1p (mutant privé du domaine kinase-like, du domaine HEAT ou possédant des mutations ponctuelles) dans des souches privées des gènes d'*ARCI* et de *CEXI* afin de mieux comprendre comment Cex1p interagit avec l'aa-ARNt. L'équipe du Pr. Nureki a pu cristalliser le variant de Cex1p privé du domaine C-ter non structuré assez rapidement et des tests biochimiques ont permis de montrer que le domaine kinase-like est impliqué dans l'interaction avec Gsp1p et Los1p, tandis que les répétitions HEAT sont importantes pour l'interaction avec les aa-ARNts et les ARNts (Nozawa et al., 2013), confirmant ainsi les résultats publiés par l'équipe du Pr. Mangroo (McGuire and Mangroo, 2012). De notre côté en revanche les choses ne se sont pas passées aussi bien que nous l'escomptions.

V.2 Résultats

V.2.1 Des débuts difficiles

On dit souvent que la science fonctionne bien sur le papier et qu'il « suffit » de faire l'expérience puisque de prime abord, c'est « simple » ! Mais nous savons qu'il faut attendre de se mettre à la paillasse et de « faire l'expérience » pour voir si effectivement, c'était « joué d'avance ». A l'aube de mes débuts en thèse (fin de l'année 2010), je travaillais en étroite collaboration avec le Dr. Guillaume Octobre qui était en charge du projet Cex1p, et qui devait me transmettre ce sujet après son

départ. Avant de tester les différents mutants de Cex1p et de déterminer lesquels étaient capables de compléter ou non la souche *arc1Δ cex1Δ* nous avons dû créer cette souche. La levure est en cela un outil fantastique puisque les disruptions de gènes et le remplacement génique par recombinaison homologue se font très simplement. Nous avons donc entrepris de créer notre propre souche *arc1Δ cex1Δ* par recombinaison homologue en remplaçant les gènes cibles par des marqueurs d'auxotrophies. Après plusieurs mois, aucune de nos tentatives ne s'est révélée fructueuse et nous n'arrivions pas à observer de létalité synthétique entre *CEX1* et *ARC1*. Nous avons donc demandé au Pr. Mangroo de nous envoyer la souche *arc1Δ cex1Δ* afin de tester nos mutants, ce qu'il n'a malheureusement jamais pu faire, puisqu'il avait perdu cette souche.

Nous avons donc décidé d'étudier les interactions entre Cex1p et l'ARNt. Pour cela nous avons surproduit et purifié Cex1p recombinant et réalisé des expériences de retard de migration sur gel (band-shift, interaction protéine-ARNt sur gel) à partir d'ARNt total de bœuf, de levure et de transcrits de l'ARNt^E de levure. Après mise au point nous n'arrivions pas à observer une interaction entre Cex1p et les ARNts, vraisemblablement parce que les conditions dans lesquelles nous tentions d'étudier ces interactions n'étaient pas optimales. Premièrement, la protéine recombinante, même après purification restait contaminée par d'autres protéines d'*E.coli* et ces contaminants pouvaient interférer dans notre étude ; et deuxièmement, la composition du tampon n'était peut-être pas non plus optimale. Je n'ai pas investi plus de temps dans l'optimisation des conditions de ces expériences puisque comme vous le verrez dans les parties qui suivent, l'étude de Cex1p nous a conduit dans un domaine de la biologie éloigné de ce rôle présumé dans la liaison et l'export de l'aa-ARNt du noyau.

V.2.2 Régulation transcriptionnelle de CEX1

Les études menées par l'équipe du Pr. Mangroo proposent que Cex1p et Arc1p ont un rôle commun. Comme les 2 protéines ont en commun de participer à l'export de l'aa-ARNt du noyau, nous en avons conclu que la létalité synthétique de la souche *arc1Δ cex1Δ* était due à une déficience importante dans l'export de l'aa-ARNt du noyau. Si tel est le cas, alors dans une souche WT Cex1p doit compenser la diminution d'Arc1p que nous avons mise en évidence lorsque la levure passe en respiration et que la transcription de son gène est réprimée ((Frechin et al., 2009); Article 1). Pour vérifier cette hypothèse, j'ai mis au point des expériences de qPCR pour mesurer le taux d'expression de *CEX1* au cours des différentes phases de croissance des levures. Comme nous l'avions fait pour suivre l'expression d'*ARC1* (Article 1), j'ai cultivé une souche sauvage et récupéré des aliquotes chaque heure pendant douze heures. J'ai extrait les ARN totaux, rétrotranscrit les ARNm et quantifié le taux d'ARNm de *CEX1* par qPCR. On peut voir dans la figure 49A que l'ARNm de *CEX1* est surexprimé au cours de la transition diauxique pour atteindre un taux maximal d'expression en respiration. Une comparaison du taux d'ARNm de *CEX1* entre des souches cultivées en fermentation

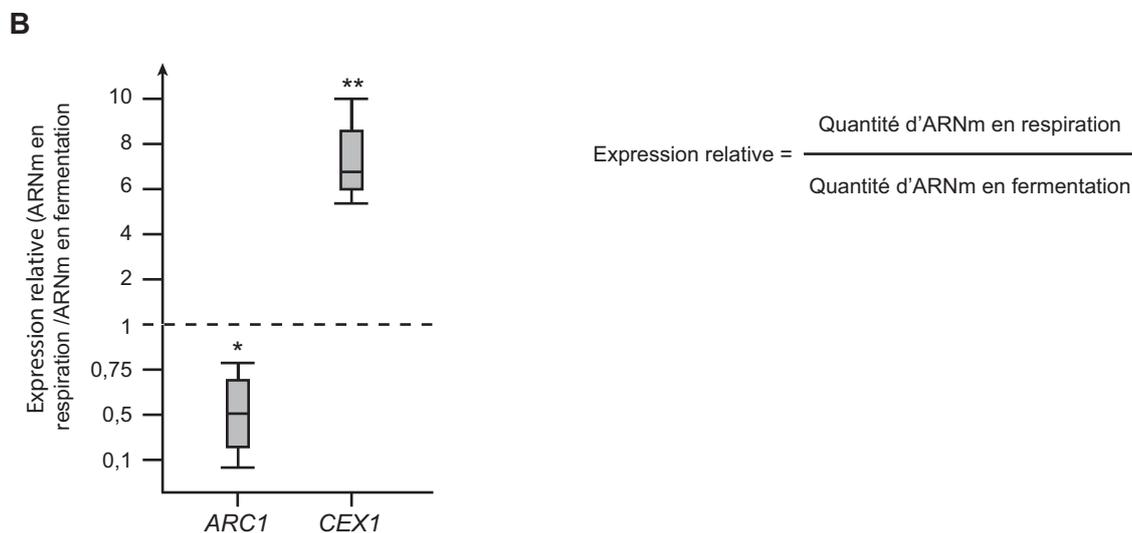
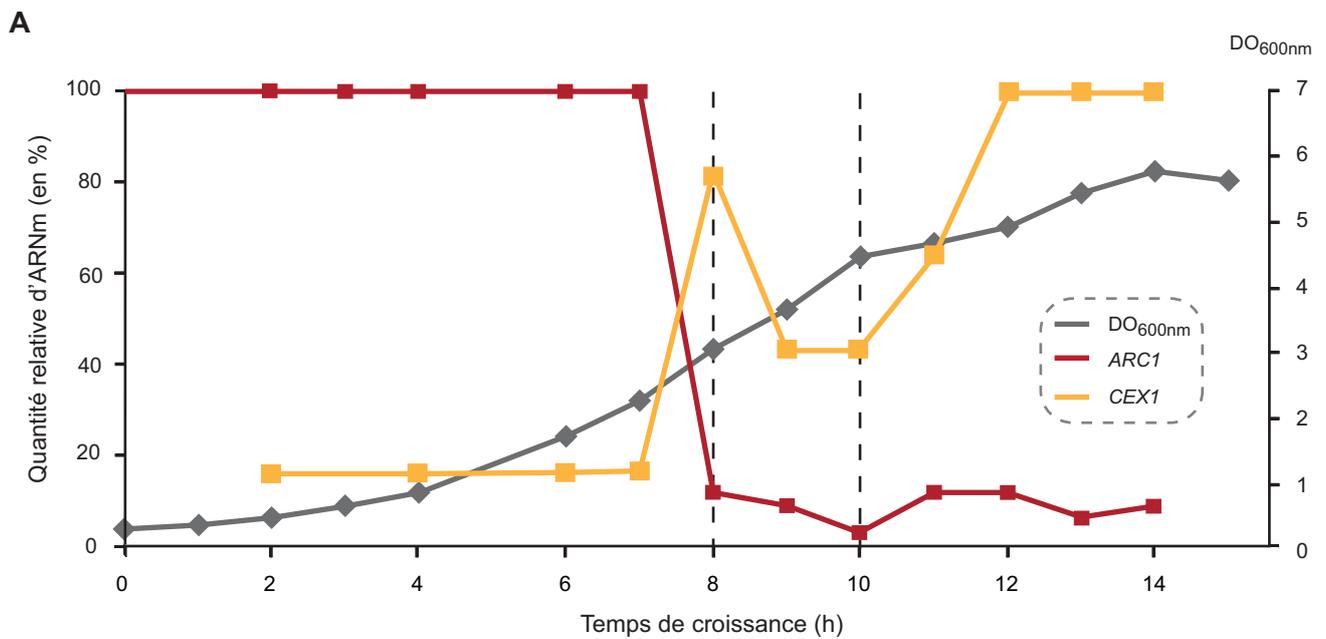
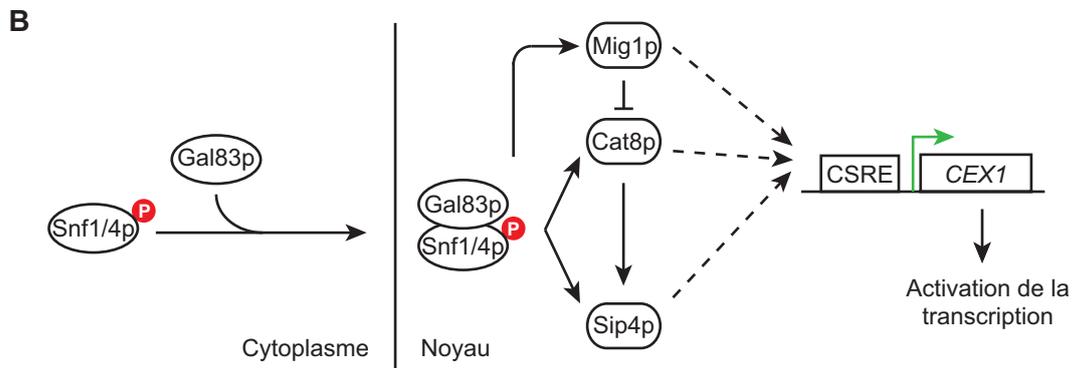
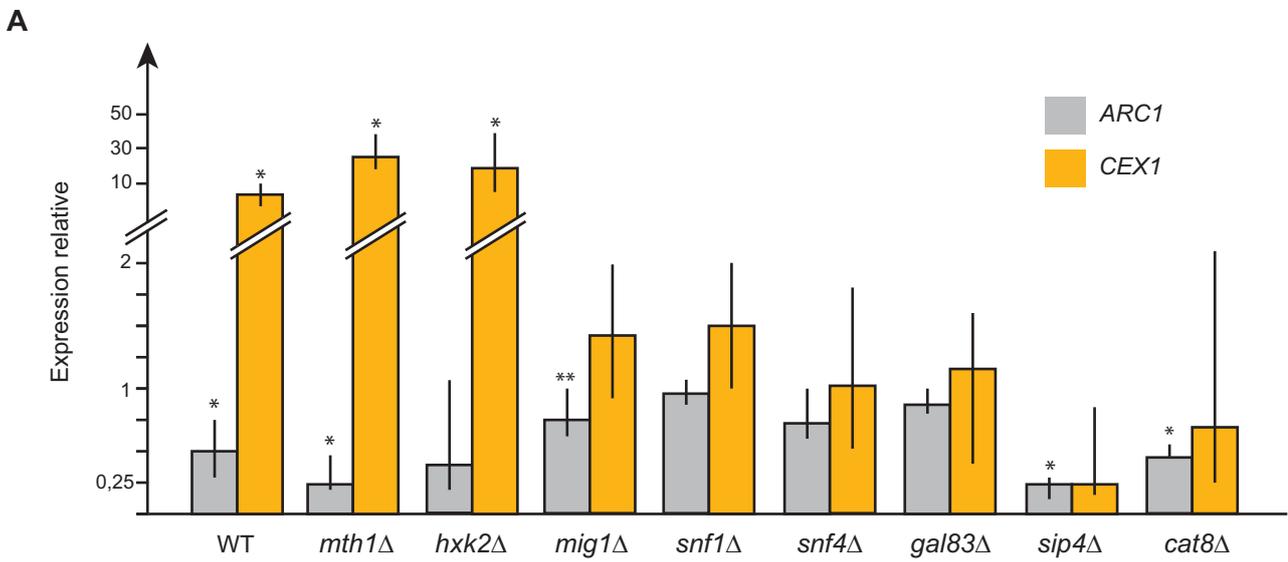


Figure 49 : La transcription de *CEX1* est augmentée en respiration chez *S.cerevisiae*.

(A) Quantification de la transcription de *CEX1* (en jaune) et *ARC1* (en rouge) au cours de la croissance de la levure en milieu SCGlc 2% pendant 14h (en gris). La mesure de la quantité d'ARNm a été réalisée par q-RT PCR à partir d'aliquots de 50 mL prélevés toutes les heures ou 2 heures et analysée par le programme REST. (B) Etude comparative des taux d'ARNm de *ARC1* et *CEX1* en phase exponentielle de croissance en fermentation et en respiration dans les mêmes conditions qu'en (A). *: p valeur=0,005; **: p valeur<10⁻³.

(SCGlc 2%) et en respiration (SCGly 2%) nous indique que *CEXI* est surexprimé en respiration d'un facteur 6,5 (Figure 49B). Au regard de ces résultats, nous avons donc supposé que *CEXI* pouvait être régulé par le changement de substrat carboné, et confirmait l'hypothèse selon laquelle Cex1p est exprimée lorsque Arc1p diminue dans la cellule et probablement *vice versa*.

J'ai ensuite entrepris d'identifier les facteurs responsables de l'activation de la transcription de *CEXI* au cours de la transition diauxique. Pour cela j'ai utilisé des souches viables privées de gènes codant des facteurs de transcription connus pour être impliqués dans l'adaptation au changement de substrat carboné. Nous avons comparé les taux d'expression d'ARNm de *CEXI* obtenus par qPCR à partir de souches cultivées en fermentation et en respiration, pour identifier les facteurs de transcription responsables de l'expression de *CEXI*, et en déduire la cascade d'événements qui entraîne son activation transcriptionnelle en respiration. Les résultats préliminaires présentés dans la figure 50A semblent indiquer que la voie Snf1/4 régule la transcription de *CEXI* au cours de la respiration. Plus spécifiquement, le complexe Snf1-4p lié à Gal83p régule les facteurs de transcription Cat8p et/ou Sip4p ainsi que Mig1p qui activent la transcription de *CEXI*. Bien que ces voies semblent être redondantes, on ne peut dire si ces facteurs se lient directement au promoteur de *CEXI* ou s'ils ne régulent pas un autre effecteur que nous n'avons pas identifié au cours de cette étude. En revanche, nous savons que les facteurs de transcription Sip4p et Cat8p lient des séquences spécifiques appelées CSRE (Carbon Source-Responsive Element) dans les promoteurs des gènes qu'ils régulent (Figure 50B). Ces séquences plus ou moins bien conservées, sont retrouvées dans différents gènes régulés au cours d'une baisse de glucose dans le milieu (pendant le shift diauxique) et sont reconnues par différents de facteurs de transcription. J'ai effectué une analyse des motifs présents dans les 1000 paires de bases (pb) en amont de la phase codante de 20 enzymes du métabolisme qui sont exprimées au cours de la transition diauxique (Figure 50C). Cette étude m'a permis d'identifier les différentes séquences CSRE contrôlant la transcription de ces gènes et d'en extrapoler la séquence consensus en utilisant l'algorithme MEME (Figure 50D). Curieusement, cinq séquences similaires à celles identifiées dans les promoteurs des 20 enzymes présentées figure 50D ont pu être identifiées dans les 1000 pb du promoteur de *CEXI* (Figure 50E), et deux d'entre elles (TGGTACCATTCCGAG et TTCTACCGATCCGAT) semblent être les CSRE les plus probables. De plus, la séquence TTCTACCGATCCGAT possède les bases G2 et T8 qui sont des éléments critiques pour la reconnaissance par Sip4p (Roth et al., 2004). Ces premiers éléments nous ont permis de proposer qu'au cours de l'adaptation à la respiration, la levure semble activer la transcription de *CEXI* via les facteurs de transcription Sip4p et/ou Cat8p et semble également impliquer Mig1p, bien que nous ne sachions pas encore s'ils activent directement la transcription du gène ou s'ils régulent d'autres facteurs responsables de l'expression de *CEXI*. Quoiqu'il en soit, ces résultats sont préliminaires et



C

Gènes	Brin W/C	Positions	Confiances	Séquences
YKR097W	+	518	1.90e-08	AAAACCCGAGC TTCCATTCATCCGGC GCGGCTGTGT
YER065C	+	601	1.10e-07	TGCCCCAGGT TTCCATTCATCCGAG CGATCACTTA
YML042W	-	718	1.72e-07	GCAGTCATT CCGCTTTCGCCGGC CATAGATCAA
YBL015W	-	667	2.10e-07	GCCCATTTGCC CCGCTTTCGCCGGC GGGGGGGGG
YKR097W	-	437	6.31e-07	AAATCCAGAT CTCCATTCATCCGGC AGGTCGCCGA
YCR005C	-	132	6.31e-07	TAAGTAAAG GTCCATTCATCCGAA GCGCTTCCTC
YJR095W	+	381	8.58e-07	AAAAATAATG CTCCATTCATCCGAG ATGATTCTCT
YLR377C	-	495	1.30e-06	AAAGCGCGA TTCCATTCATCCGAA AAAGAGAGCA
YBL015W	-	131	3.00e-06	GGAAATCTT CTCCACTTCCCGGC AGGGTACATG
YLR174W	+	696	3.71e-06	GGGATGTCT TTCCGGTTCATCCGAA AATCGGCAAA
YPL061W	+	384	4.54e-06	CTGATGAGGT CTCCTCTTCCCGGG CCGCAGAAAA
YOR100C	+	741	4.54e-06	ATTTATCTAC ACCCAGTCATCCGGC GTGACTGGAT
YJR095W	-	320	6.09e-06	CGCCCTCTT TTCCATTCATCCGAG GGTGCTGTCA
YKR097W	-	637	6.09e-06	ATCCTGTTT GGCCCTTTATCCGGC TATCCATAAT
YKL217W	+	353	7.36e-06	CCGCAATTA CTCCACTAGACCGGC GTGTTCTCT
YNL117W	+	549	8.06e-06	TTGTCCCTT TTCCGGTTCATCCGAG AGTCCGGCGG
YNL117W	+	499	8.06e-06	ATATCATAGC TTCCATTCATCCGGC GAAGTTAGTC
YNL117W	-	468	8.83e-06	ATATGGGGAT TTCCATTCATCCGGC AGCAATGTAG
YJR095W	-	419	9.68e-06	ATTCGCCAAC GTCCATTCATCCGGC CCGGGCGTAC
YMR303C	-	693	1.16e-05	AGTTGGAGAT GGCCGGTTCATCCGGC AGAGGAGATC
YLR081W	+	317	1.16e-05	ATCTGGAAAG TTCCCTTCATCCGTA AACCTCTCTG
YHR094C	-	193	1.37e-05	GAACCAATA CTCCATTCATCCGGC TTGAATTTAG
YKR097W	+	58	1.63e-05	AACAGAGAG TTCCAGTAAACCGG TCTTTCCCTT
YMR303C	-	29	2.09e-05	GAGAGATGGT CCCAATTCATCCGAA CTGGTATTTG
YER065C	+	643	2.26e-05	TTGTCACCTT TTCAATTCATCCGAA ACAATCAAAA
YMR108W	-	493	2.45e-05	AGCCGTTTGT CACCTTTCATCCGGC CCGACTGACA
YOR100C	-	787	3.09e-05	ACTCTTAAAT CTCCATTCATCCGGC GACTTATTTG
YER065C	+	584	3.33e-05	GAAAAATGT TCCCTTTCATCCGAG GTTTCCATTC
YJR095W	+	508	3.59e-05	ACCAGCTTAG TCCCGTAAACCGCA AACGGACCTT
YBL015W	-	559	4.46e-05	AGCCGGCGAG GGCCGGTTCATCCGGC ATCACGGAGT
YPL061W	-	744	5.13e-05	TTGTCTTGA TCCCGTTCATCCGAA ATTTATTTAG
YBL015W	+	744	5.50e-05	CAACAGCCAA TCCCATTCATCCGGC AAACATACCA
YHR094C	+	764	5.50e-05	CGACATTTGA TCCCTTTCATCCGAC AAGCCAGGAA

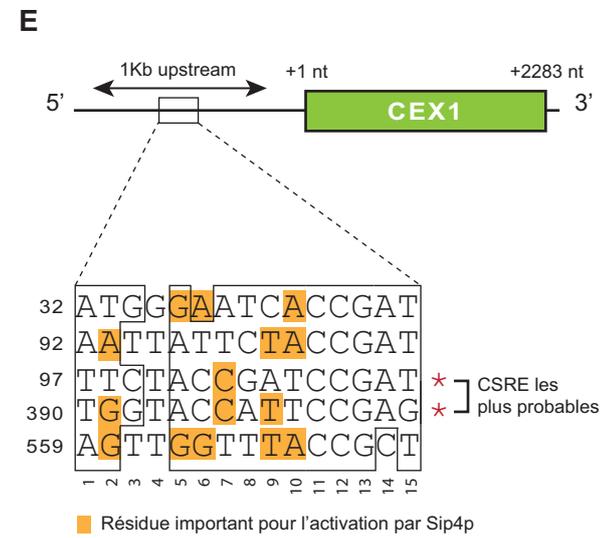
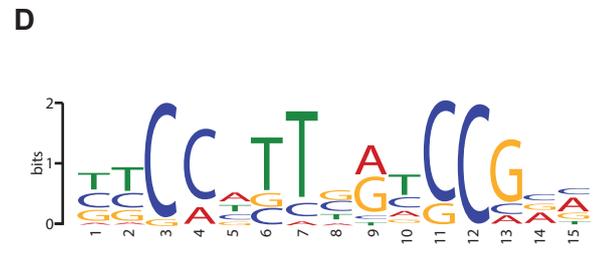


Figure 50 : La voie Snf1/4 active la transcription de *CEX1* en respiration.

(A) Quantification du taux d'ARNm d'*ARC1* (en gris) et *CEX1* (en jaune) en fermentation et respiration dans différentes souches délétées pour des gènes de la voie Snf1/4 impliquée dans la régulation au cours d'un changement de substrat carboné autre que le glucose. La mesure de la quantité d'ARNm a été réalisée par q-RT PCR à partir d'aliquot de 50 mL de cultures cultivées en phase exponentielle de croissance en fermentation et en respiration et analysés par le programme REST. (B) Intégration de nos résultats dans la voie Snf1/4, adapté de Zaman et al., 2008. (C) Analyse par MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>) des motifs présent dans les 1000 pb (promoteurs) en amont de 20 gènes régulés au cours de la transition diauxique et dépendant des facteurs de transcription Sip4p et/ou Cat8p. (D) Séquence consensus retrouvée dans les 20 gènes en (C) et correspondant à une CSRE (Carbone Source-Responsive Element). (E) Identification de 5 séquences similaires à une CSRE dans le promoteur de *CEX1*. Sur ces 5 séquences, la troisième et la quatrième sont les séquences les plus probables en regard de la séquence identifiée en (D). *: pvalue=0,001; **: pvalue=0,05.

devront être confirmés par qPCR, ainsi que par des expériences de mutagenèse au niveau du promoteur afin de démontrer l'implication des CSRE dans l'expression de *CEX1*.

Afin de vérifier que la surexpression de *CEX1* est également accompagnée d'une augmentation de taux de Cex1p dans la cellule j'ai utilisé une souche de levure possédant le gène de fusion *CEX1-GFP* au locus de *CEX1*. Cette souche m'a permis de quantifier, à partir d'extrait totaux de cellules cultivées en fermentation et en respiration, la protéine Cex1p-GFP par western-blot. La figure 51A nous montre qu'en respiration, le taux de Cex1p est augmenté d'environ 2,5 fois par rapport à la fermentation. Une analyse par microscopie de la même souche cultivée en fermentation et en respiration (Figure 51B) nous indique que *i*) le taux d'expression global de *CEX1* est très faible dans la cellule aussi bien en fermentation qu'en respiration, et que *ii*) le taux de Cex1p est plus important en respiration. Le faible taux de Cex1p dans la cellule, environ 1 360 molécules par cellules (contre 85 000 pour la MRS ou 48 700 pour l'ERS) (Ghaemmaghami et al., 2003) en phase exponentielle de croissance en milieu SCGlc 2%, rend sa détection par microscopie très délicate.

V.2.3 Etude génétique de CEX1

Une étude plus approfondie du rôle de Cex1p dans la cellule nécessite d'avoir une souche privée de *CEX1*. Cette souche nous permettra ensuite de rechercher une condition pour laquelle l'absence de Cex1p impacte la croissance de la cellule. Cette souche nous permettrait également de tester différents mutants de Cex1p générés par le Dr. Kayo Nozawa de l'équipe du Pr. Nureki, ainsi que différentes constructions fusionnées à la GFP ou à l'épitope HA dont nous disposons au laboratoire.

Je me suis donc procuré une souche commerciale (Euroscarf) dans laquelle l'ORF de *CEX1* a été remplacée par la cassette KanMX4 codant un gène de résistance à la généticine (G418). J'ai ensuite fait pousser cette souche sur milieu synthétique SC-Glc et -Gly 2% ainsi que sur milieu riche fermentaire (YPGlc) et respiratoire (YPGly) à température physiologique (30°C) ainsi qu'à 25 et 37°C pour voir si la souche *cex1Δ* était thermosensible. Comme nous pouvons le voir dans la figure 52, la souche *cex1Δ* pousse dans toutes les conditions testées ce qui signifie que l'absence de Cex1p dans ces conditions n'impacte pas leur croissance. En revanche nous voyons que la délétion de *CEX1* semble donner un avantage à la cellule en respiration (SCGly et YPGly) puisque les clones *cex1Δ* poussent plus rapidement que les WT et cela à toutes les températures testées. Il semblerait donc que Cex1p régule négativement le temps de génération de la cellule, en respiration, par un mécanisme encore inconnu, un résultat qui paraît plutôt surprenant en regard du rôle que nous suspicions pour Cex1p.

La souche *cex1Δ* m'a ensuite permis de créer la souche *arc1Δ cex1Δ* que nous avons déjà tenté de créer auparavant. Cette fois-ci, j'ai d'abord cloné *CEX1* dans un plasmide pRS316 qui est un

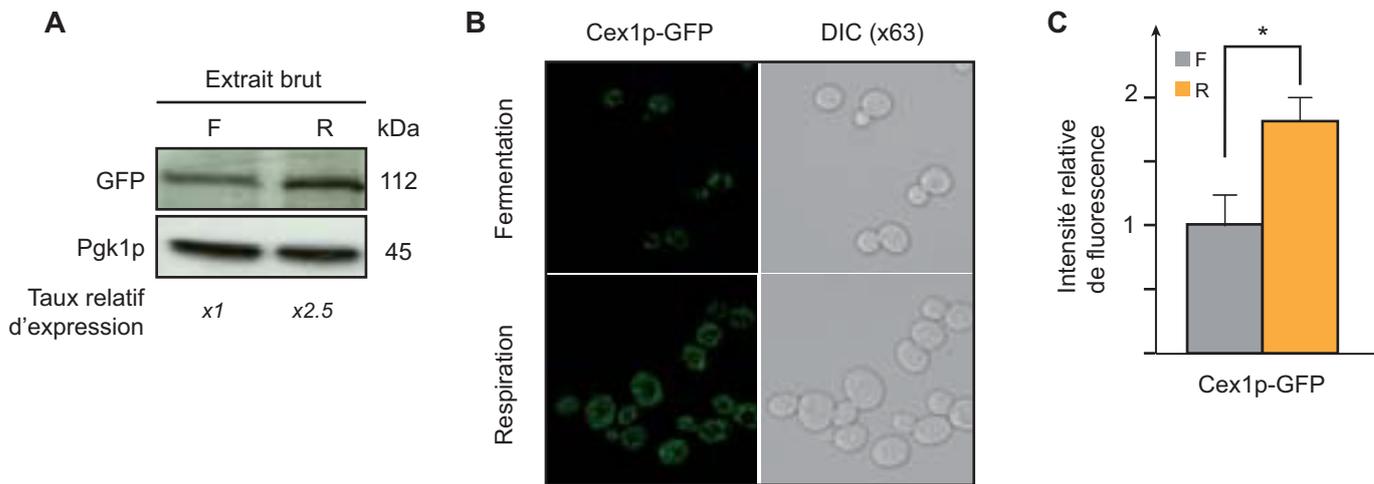


Figure 51 : L'expression Cex1p est augmentée en respiration chez *S.cerevisiae*.

(A) Western blot réalisés à partir d'extraits brut de levure cultivées en phase exponentielle de croissance en fermentation et en respiration. La souche exprime au génome la protéine de fusion Cex1p-GFP. La Pgk1p a été utilisée en tant que contrôle de charge. La quantité de Cex1p dans chaque ligne a été mesuré par ImageJ. (B) Etude par microscopie à épifluorescence de la souche exprimant Cex1p-GFP en fermentation et en respiration. On distingue deux localisation dans la cellule, une cytoplasmique et une au niveau de loci. (C) La fluorescence relative des cellules cultivées en fermentation et en respiration a été mesurée par ImageJ. Le taux de protéine est augmenté de 1,8 x en respiration. F: fermentation, R: respiration, *: p valeur 10^{-3}.

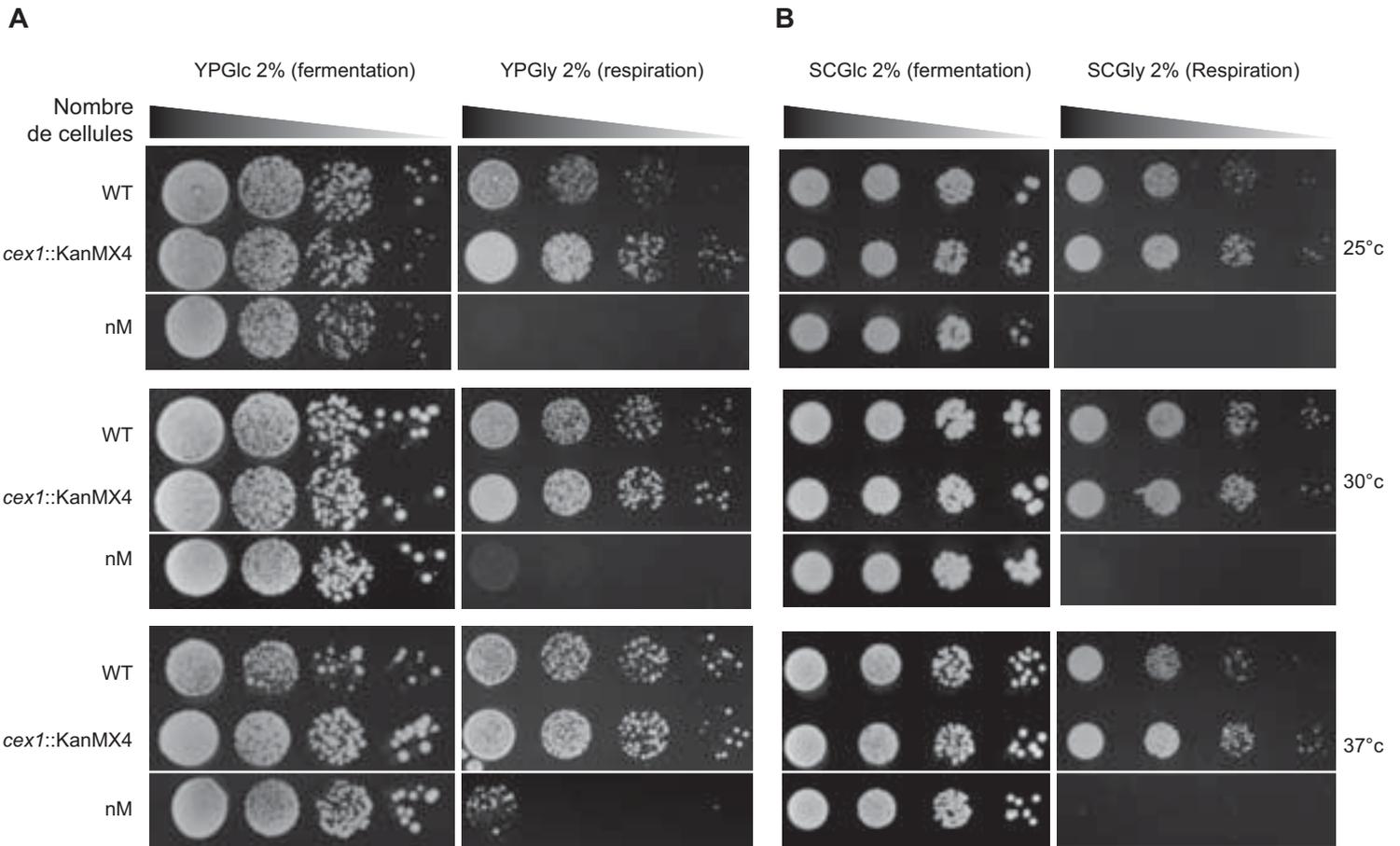


Figure 52 : La délétion de *CEX1* confère un avantage de croissance sur milieu respiratoire à différentes température.

(A) Tests en gouttes sur milieu riche fermentaire (YPGlc 2%) ou respiratoire (YPGly 2%) à 25, 30 et 37 °C d'une souche sauvage (**WT**), d'une souche privée de *CEX1* (*cex1::KanMX4*) et d'une souche incapable de respirer (**nM**). (B) Tests en gouttes des mêmes souches sur milieu synthétique fermentaire (SCGlc 2%) ou respiratoire (SCGly 2%) à 25, 30 et 37 °C. La souche **nM** a été cultivée sur les même boîtes mais plus en retrait d'où la séparation par une ligne blanche.

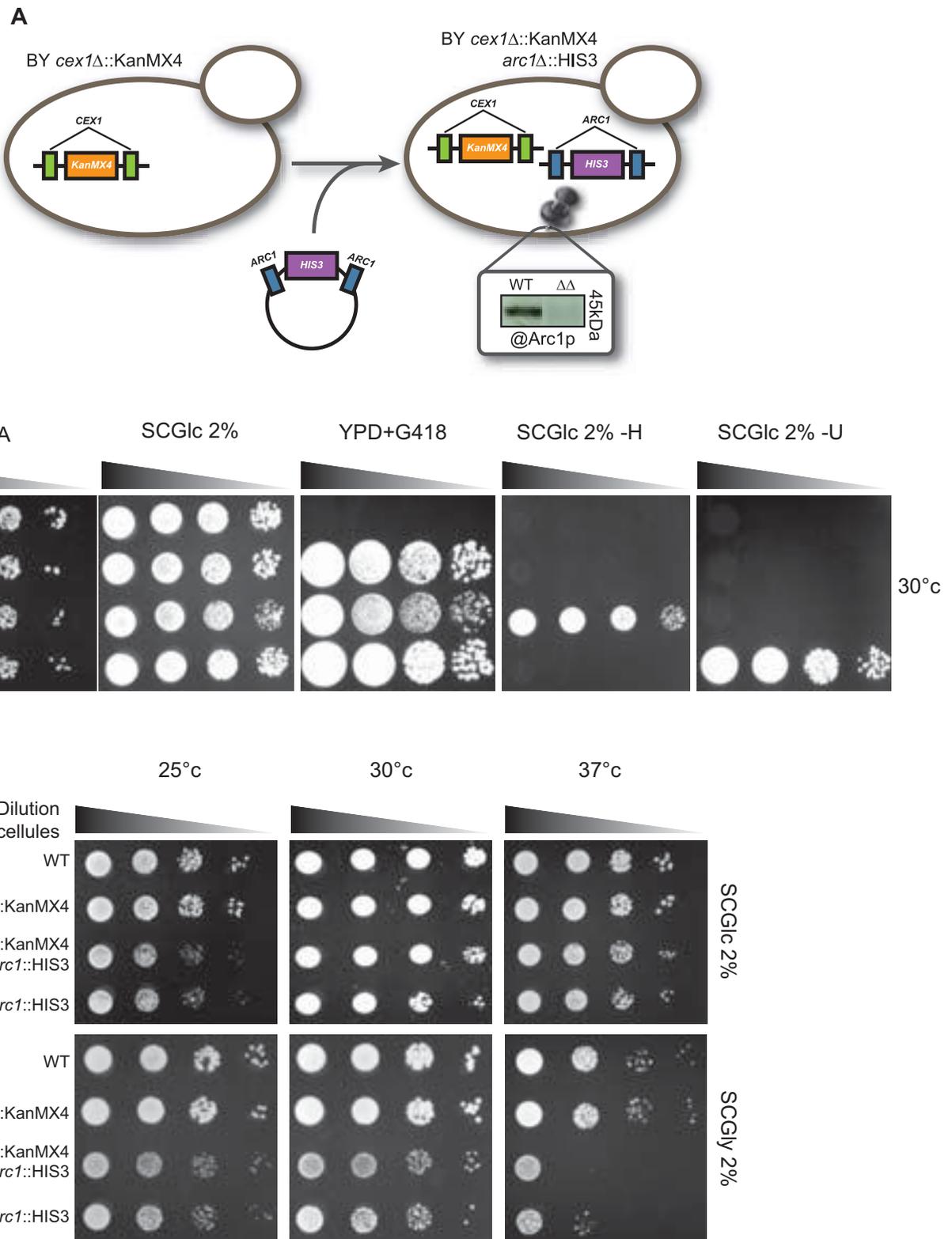


Figure 53 : La délétion simultanée de *CEX1* et d'*ARC1* n'est pas létale pour la levure.

(A) Schéma de la délétion d'*ARC1* dans la souche *cex1Δ*. L'absence d'Arc1p a été confirmée par western blot à partir de cellules cultivées en phase exponentielle de croissance en fermentation. (B) Tests en gouttes des souches WT, *cex1Δ*, *cex1Δarc1Δ* et *cex1Δ + CEX1* sur milieu 5FOA, synthétique fermentaire (SCGlc 2%) ainsi que sur différents milieux de contrôle. (C) Les mêmes souches ont été déposées sur milieux synthétiques fermentaire (SCGlc 2%) et respiratoire (SCGly 2%) à 25, 30 et 37 °C. G418: Généticine

vecteur centromérique portant le marqueur d'auxotrophie *URA3* créant ainsi une souche « shuffle », qui sera toujours viable même après la délétion d'*ARC1*, si *ARC1* et *CEX1* sont effectivement synthétiques létaux. La délétion d'*ARC1* dans la souche *cex1Δ* shuffle a été effectuée par recombinaison homologue au locus d'*ARC1* après transformation d'un produit de PCR composé du gène d'auxotrophie *HIS3* encadré par 50 pb correspondant aux séquences 5' et 3' de l'ORF d'*ARC1* (Figure 53A). Le remplacement génique, dans cette souche, a ensuite été vérifié par PCR et confirmé par l'absence d'expression d'Arc1p mesurée par western-blot à l'aide d'anticorps dirigés contre Arc1p. La chasse du pRS316-*CEX1* dans la souche *arc1Δ cex1Δ* shuffle a été faite par croissance sur milieu 5-FOA. La figure 53B nous montre qu'à *contrario* des résultats obtenus par l'équipe du Pr. Mangroo, il n'y a pas de lien génétique entre *CEX1* et *ARC1*, du moins pas dans le fond génétique des souches que j'ai utilisé pour cette étude (BY4741/4742). Les contrôles adéquats ont été réalisés pour s'assurer que les souches déposées sur boîtes étaient bien celles attendues. Après chasse sur 5-FOA, j'ai voulu savoir si la souche *arc1Δ cex1Δ* présentait un phénotype de thermosensibilité. J'ai donc fait croître ce double délétant sur SCGlc- et SCGly 2% à 25 °C, 30 °C et 37 °C (Figure 53C). Encore une fois, je n'ai observé aucun phénotype notoire pour la souche *arc1Δ cex1Δ*, et le retard de croissance à 37 °C en respiration n'est pas dû à la délétion simultanée des gènes *ARC1* et *CEX1* mais provient de la délétion d'*ARC1* (dernière ligne dans le panel en bas à droite du test en gouttes à 37 °C sur SCGly 2%).

Ces expériences nous ont permis de montrer que dans les souches de levure de fond génétique BY, la délétion simultanée du gène *ARC1* et *CEX1* n'est pas létale dans les conditions testées, contredisant les résultats précédemment publiés (McGuire and Mangroo, 2007). Ces souches ne présentent aucun défaut de croissance en fermentation ou en respiration à 25 °C, 30 °C et 37 °C, à l'exception de d'un léger phénotype de retard de croissance à 37 °C pour les souches *arc1Δ* et *arc1Δ cex1Δ*. De plus, l'augmentation de la vitesse de croissance en respiration observée après délétion de *CEX1* est en désaccord avec l'hypothèse selon laquelle Cex1p est un cofacteur de l'export de l'aa-ARNt. En effet, il est admis que la vitesse de croissance d'une cellule de levure dépend de la vitesse de la traduction des ARNm, et si Cex1p était bien un cofacteur d'export de l'aa-ARNt, sa délétion aurait un effet négatif sur la croissance de la souche et non le contraire.

V.2.4 Localisation intracellulaire de Cex1p

Le rôle de Cex1p dans l'export nucléaire de l'aa-ARNt étant remis en cause, une question cruciale se pose: quel est le rôle de Cex1p et où se localise-t'il ? Le faible taux d'expression de la protéine Cex1p ne permet pas d'observer de manière précise la localisation de Cex1p. J'ai donc cloné l'ORF de *CEX1* dans un vecteur multicopie possédant un promoteur fort GPD (Glyceraldéhyde 3 Phosphate Déshydrogénase) en phase avec le gène de la *GFP* (pRS315-GPD-GFP), me permettant

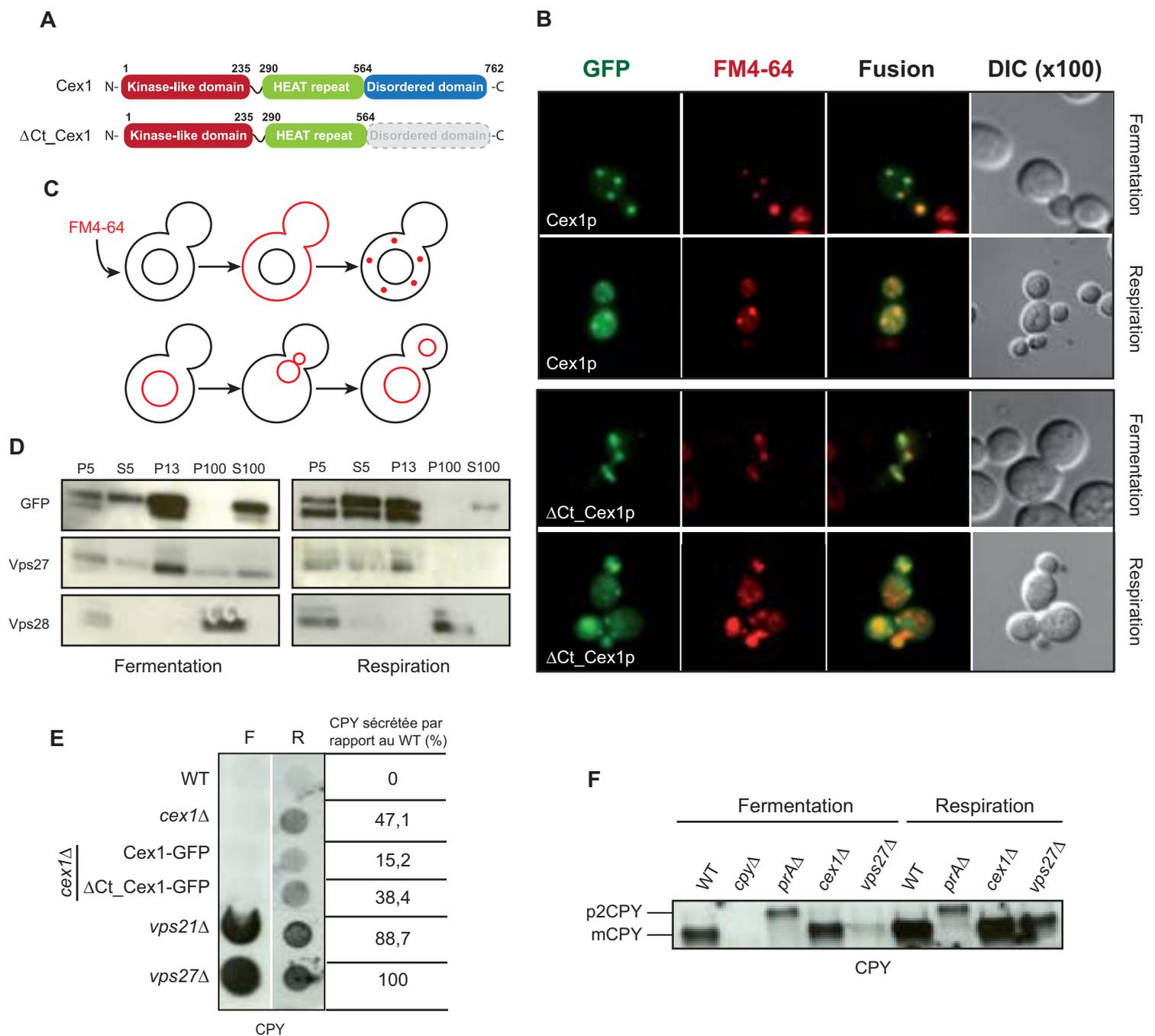


Figure 54 : Cex1p est localisée au niveau des endosomes tardifs et est impliquée dans le trafficking intracellulaire.

(A) Schéma des constructions utilisées pour étudier la localisation de Cex1p. La protéine entière (Cex1p) ou privée de son domaine C-ter (ΔCt_Cex1p) a été couplée à la GFP en C-ter. (B) Localisation des constructions Cex1p et ΔCt_Cex1p par microscopie à épifluorescence à partir de souches cultivées en phase exponentielle de croissance en fermentation et respiration. Les endosomes tardifs ont été marqués au FM4-64 après 10 min de traitement. (C) Schéma descriptif de l'internalisation du FM4-64 dans les cellules. (D) Localisation de Cex1p full couplée à la GFP par fractionnement subcellulaire à partir d'extraits bruts. (E) Test de sécrétion réalisé à partir de cellules cultivées en fermentation (F) et en respiration (R). La présence ou l'absence de protéines sécrétées a été suivie par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la carboxypeptidase Y (CPY). (F) Vérification de la maturation de la CPY en fermentation et respiration dans différentes souches par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre CPY. La forme non mature pré-CPY (p2CPY) est présente dans la souche privée de la protéinase A (PrA), maturase vacuolaire responsable de la dernière étape permettant d'obtenir la CPY mature (mCPY). F: Fermentation; R: Respiration; PrA: Protéinase A

d'obtenir une protéine de fusion exprimant la GFP en C-ter de Cex1p. Par curiosité, j'ai également cloné *CEX1* privé de son domaine C-ter (544-761 ; Δ Ct_Cex1p) dans le plasmide pRS315-GPD-GFP (Figure 54A). J'ai ensuite transformé les vecteurs recombinants pRS315-Cex1p-GFP et pRS315- Δ Ct_Cex1p-GFP dans la souche *cex1 Δ* , cultivé ces souches en fermentation et en respiration puis observé par microscopie à épifluorescence le signal GFP correspondant à Cex1p-GFP et Δ Ct_Cex1p-GFP dans les deux souches.

En fermentation et en respiration, Cex1p-GFP est localisé dans le cytoplasme ainsi que dans différentes structures ponctuelles dans la cellule (Figure 54B, panel 1 et 2 GFP). De manière assez surprenante, ces structures colocalisent avec le FM4-64 qui est un marqueur dynamique des membranes. Des cellules traitées un court moment (5-10 min) au FM4-64 seront marquées au niveau des endosomes tardifs et des cellules traitées pendant 15 à 20min seront marquées aux vacuoles (Figure 54C). Ici un marquage de 10 min nous permet de voir que Cex1p est localisée dans les endosomes tardifs, des vésicules de transport faisant le pont entre le Golgi et la vacuole (Panel 1et 2 FM4-64 et Merge). Lorsque l'on surexprime Δ Ct_Cex1p-GFP dans les cellules, la répartition aléatoire des points correspondant aux endosomes tardifs disparaît au profit d'un amas concentré au niveau du bourgeon de la cellule mère ainsi que dans la cellule fille (Figure 54B, panel 3 et 4 GFP et FM4-64). Cela est vrai aussi bien en fermentation qu'en respiration et suggère que le domaine C-ter de Cex1p est important pour sa distribution entre les endosomes tardifs qui régulent le trafic entre le Golgi-vacuole, et les vacuoles qui sont transmises à la cellule fille. Ces observations ont ensuite été confirmées à partir de la souche *cex1 Δ* transformée avec le plasmide pRS315-Cex1p-GFP (*cex1 Δ* +pRS315-Cex1p-GFP grâce à des expériences de fractionnement subcellulaire (Figure 54D) suivie d'expériences d'immunodétection dans chacune des fractions purifiées. Ces expériences d'immunodétections ont confirmé que Cex1p-GFP est retrouvée dans la fraction S100 correspondant aux protéines solubles dans le cytoplasme mais également dans la fraction P13 qui correspond aux protéines localisées dans le noyau, la vacuole, le RE, la membrane plasmique ou encore la mitochondrie. Ces résultats de localisation subcellulaire semblent indiquer que Cex1p est impliquée dans le trafficking intracellulaire.

V.2.5 Implication de Cex1p dans le trafficking intracellulaire

Les endosomes tardifs sont des vésicules de transport issues de vésicules d'endocytose ou du Golgi qui font transiter les protéines, aa et métabolites vers la vacuole ou le milieu extracellulaire. La voie CPY, nommée ainsi d'après la voie qu'elle empreinte la CPY (Carboxy Peptidase Y), est la voie principalement utilisée pour le transfert des protéines néo-synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) vers la vacuole *via* les endosomes tardifs. La CPY est une hydrolase soluble qui agit au niveau de la vacuole tout comme la protéinase A (PrA) qui est elle aussi importée dans la vacuole par la voie CPY. Au cours de sa maturation, la préproCPY (prépro-enzyme inactive) transite

du RE au Golgi, maturée en proCPY puis transférée du Golgi vers la vacuole où une dernière étape de maturation par clivage protéolytique la rend active (mCPY). L'étude de la distribution intracellulaire et de la maturation des protéases vacuolaires a permis de mettre en évidence de multiples protéines impliquées dans le trafficking vacuolaire et nommées VPS pour **V**acuolar **P**rotein **S**orting (Robinson et al., 1988). Des mutants *vps* sont caractérisés par la sécrétion dans le milieu extracellulaire d'un grand nombre de protéases vacuolaire comme la CPY par exemple, que l'on peut mettre en évidence par western-blot.

Dans le but de voir si l'absence ou la surexpression de Cex1p provoque un dysfonctionnement dans le trafficking intracellulaire, j'ai cultivé une souche sauvage BY4741 (WT), les souches *cex1Δ*, *cex1Δ*+pRS315-Cex1p-GFP et *cex1Δ*+ΔCt_Cex1p-GFP sur milieu solide SCGlc et Gly 2%. J'ai également utilisé deux souches privées des gènes *VPS21* (*vps21Δ*) et *VPS27* (*vps27Δ*), deux gènes impliqués dans la voie de biogénèse des vacuoles (respectivement la voie endosome tardif-vacuole et Golgi-vacuole), et qui sont caractérisés par une sécrétion abondante de CPY (Horazdovsky et al., 1994; Piper et al., 1995; Robinson et al., 1988). Comme nous le voyons dans la figure 54E, les souches WT, *cex1Δ*, *cex1Δ*+pRS315-Cex1p-GFP et *cex1Δ*+ΔCt_Cex1p-GFP ne sécrètent pas de CPY sur milieu fermentaire à l'inverse des souches contrôles *vps21Δ* et *vps27Δ*. Sur milieu respiratoire, la souche WT ne sécrète pas de CPY tandis que les souches *vps21Δ* et *vps27Δ* sécrètent à nouveau une quantité importante de CPY. Afin d'évaluer un pourcentage de sécrétion pour mes souches mutantes, j'ai fixé le niveau de sécrétion à 0% pour la WT et 100% pour la souche *vps27Δ* (taux sensiblement similaire à la souche *vps21Δ*). En comparaison, nous pouvons voir que la souche *cex1Δ* sécrète une quantité importante de CPY et la surexpression de Cex1-GFP dans cette souche *cex1Δ* permet de réduire le taux de sécrétion de près de 70% (baisse de 47,1% à 15,2%), tandis que la surexpression de la ΔCt_Cex1p-GFP ne permet de réduire que de 20% le taux de CPY sécrétée dans le milieu extracellulaire. Ces données nous indiquent que Cex1p est bien impliquée dans le trafficking intracellulaire entre le golgi et la vacuole, confirmant par la même occasion les résultats observés en microscopie.

Comme nous l'avons vu précédemment, la maturation de la CPY est une succession d'étapes qui prennent place dans le lumen du RE, le Golgi et la vacuole (Johnson et al., 1987; Stevens et al., 1982), et un défaut dans la biogénèse des vacuoles entraîne également l'apparition de formes non maturées de CPY dans la cellule. J'ai donc vérifié l'état de maturation de la CPY à partir d'extraits bruts de cellules et comme nous pouvons le voir dans la Figure 54F, en fermentation comme en respiration la CPY est uniquement retrouvée sous sa forme mature (mCPY) dans la souche *cex1Δ* comme dans la souche WT tandis que dans la souche *PrAΔ*, qui est privée du gène codant la protéinase A (PrA) responsable de la dernière étape de maturation de la CPY dans la vacuole, la forme

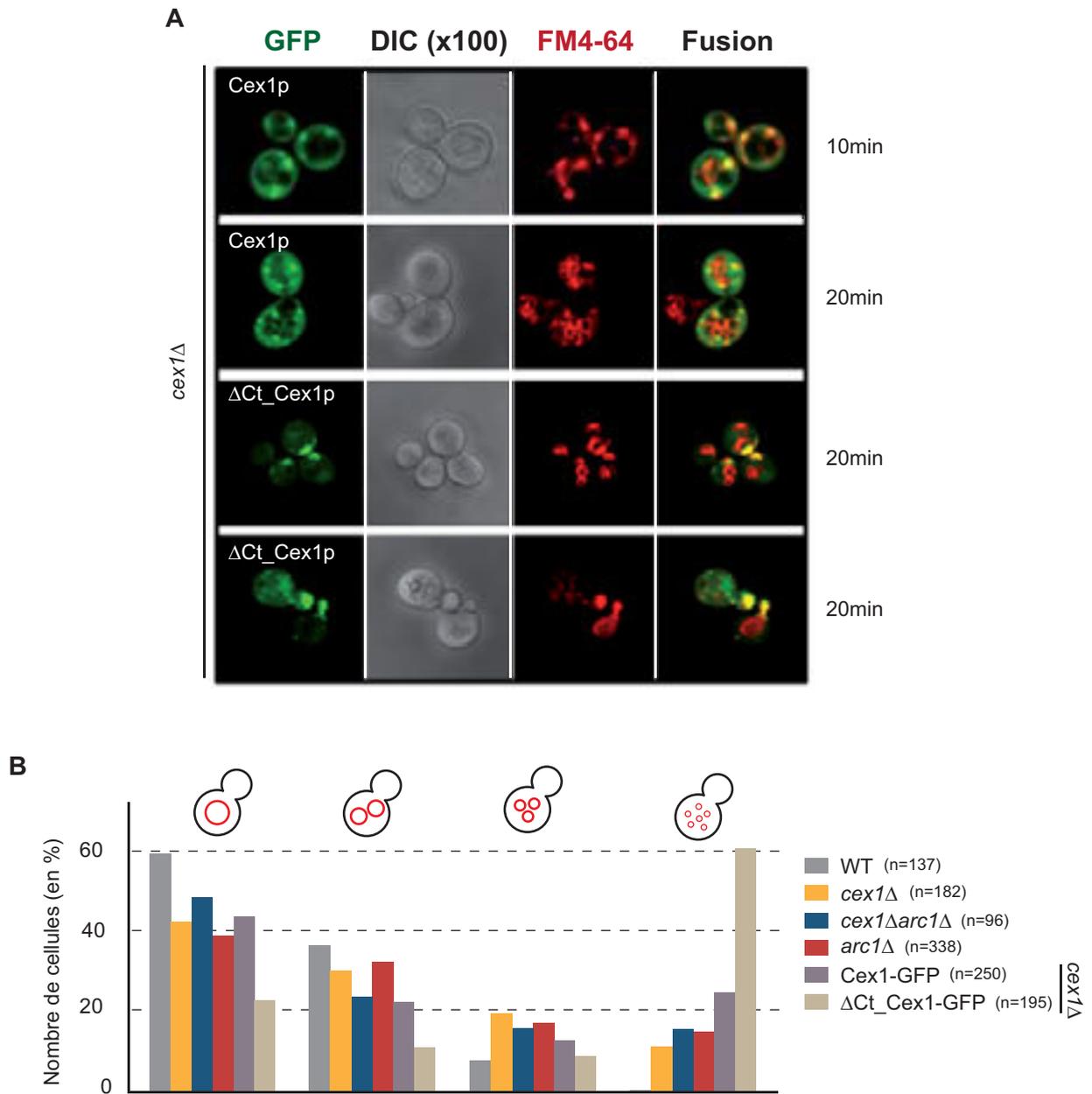


Figure 55 : La surexpression ou l'absence de Cex1p provoque une fragmentation vacuolaire.

(A) Localisation des constructions Cex1p et ΔCt_Cex1p par microscopie à épifluorescence à partir de souches cultivées en phase exponentielle de croissance en fermentation et respiration. Les endosomes tardifs ont été marqués 10 min au FM4-64 et les vacuoles 20 min. (B) Comptage vacuolaire dans les souches WT, *cex1Δ*, *cex1Δarc1Δ*, *arc1Δ* et *cex1Δ* + Cex1p ou ΔCt_Cex1p couplées à la GFP après croissance en phase exponentielle de croissance en fermentation. n= nombre de cellules comptées pour chaque échantillon.

proCPY (p2CPY) et s'accumule dans la cellule. Cela nous indique que, bien que participant au trafficking intracellulaire, Cex1p n'est pas impliquée dans la biogénèse des vacuoles.

V.2.6 Etude de la fragmentation vacuolaire

Au cours de l'analyse de mes images prises en microscopie, une chose m'a frappé : phénotypiquement les cellules privées ou surexprimant *CEX1* n'ont pas tout à fait le même aspect au niveau des vacuoles. Généralement les vacuoles sont visibles à l'œil nu et correspondent à une ou deux zones circulaires au centre des cellules moins denses en nomarski, tandis que dans mes mutants je n'observais que très rarement ces structures. J'ai donc décidé de cultiver les souches WT, *cex1Δ*, *arc1Δ*, *cex1Δ arc1Δ*, *cex1Δ+pRS315-Cex1p-GFP* et *cex1Δ+ΔCt_Cex1p-GFP* en fermentation jusqu'en phase exponentielle de croissance puis de les traiter au FM4-64 pendant 20 min, ce qui m'a permis de marquer les vacuoles présentes dans l'ensemble ces souches.

En guise d'exemple, on peut voir que dans la souche *cex1Δ+pRS315-Cex1p-GFP* après 10 min de marquage au FM4-64, Cex1p est localisée au niveau des endosomes tardifs (Figure 55A, premier panel) alors qu'après 20 minutes de marquage, la quasi-totalité du FM4-64 a diffusé dans les membranes vacuolaires ce qui nous permet de compter le nombre de vacuoles dans les souches *cex1Δ+pRS315-Cex1p-GFP* et *cex1Δ+ΔCt_Cex1p-GFP* (Figure 55A, second troisième et quatrième panel). Alors que Cex1p se localise majoritairement dans les endosomes tardifs, le mutant de Cex1p privé de son domaine C-ter se concentre à nouveau au niveau du cou entre la cellule mère et la cellule fille ainsi que dans le bourgeon confirmant ainsi les observations faites précédemment (Figure 54).

Le résultat des comptages vacuolaires effectué à partir d'images prises en microscopie à épifluorescence des souches WT, *cex1Δ*, *arc1Δ*, *cex1Δ arc1Δ*, *cex1Δ+pRS315-Cex1p-GFP* et *cex1Δ+ΔCt_Cex1p-GFP* après 20 minutes de traitement au FM4-64 sont présentés Figure 55B. Le niveau basal du nombre de vacuoles est donné par les comptages effectués dans la souche WT et nous permet de noter que les cellules possèdent généralement une ou deux vacuoles. Dans la souche *cex1Δ*, environ 10% des cellules possèdent plus de trois vacuoles ce qui n'est pas physiologiquement normal et traduit un défaut dans le processus de fusion ou de fission des vacuoles. Il en va de même dans la souche *cex1Δ arc1Δ* qui présente un taux important de cellules ayant trois vacuoles ou plus, ce qui m'a poussé à regarder comment se comportait la souche *arc1Δ*. De manière assez surprenante, cette souche semble également avoir un défaut au niveau de la fusion/fission des vacuoles puisqu'elle présente le même phénotype vacuolaire que les souches *cex1Δ* et *cex1Δ arc1Δ*. Cela nous permet d'ores et déjà de dire que *i)* Arc1p semble être impliquée dans le trafficking vacuolaire et que *ii)* il n'y a pas de synergie entre Cex1p et Arc1p dans les phénotypes de vacuolisation que nous observons. La surexpression de Cex1p dans la souche *cex1Δ* favorise encore plus la fragmentation des vacuoles et

porte à près de 25% le nombre de cellules possédant plus de trois vacuoles, cette fragmentation est drastiquement augmentée (un peu plus de 60%) lorsque l'on surexprime Cex1p privée de son domaine C-ter. Cela nous montre qu'au-delà de la présence de Cex1p et de l'importance du domaine C-ter pour la régulation de la fusion/fission vacuolaire, il semblerait que le taux de Cex1p soit important (*cex1Δ* vs *cex1Δ+Cex1p/ΔCt_Cex1p*) dans les endosomes.

De nombreuses mutations et/ou délétions de gènes codant des VPS ainsi que d'autres protéines impliquées dans le trafficking intracellulaire se caractérisent soit par la présence d'une grosse vacuole dans la cellule et traduisent un défaut de fission des vacuoles, soit par la présence de nombreuses vacuoles, on parle alors de fragmentation vacuolaire et traduisent un défaut de fusion des vacuoles (Armstrong, 2010; Bryant and Stevens, 1998; Fagarasanu et al., 2010; Weisman, 2006). D'après nos observations faites par microscopie et nos résultats de comptage vacuolaire, il semble évident que Cex1p soit impliquée dans le trafficking intracellulaire. Nous pouvons noter que bien que la délétion de *CEX1* augmente le nombre de vacuoles dans les cellules par rapport à une souche sauvage, la surexpression de Cex1p ou de sa version mutée ne permettent pas de retrouver un niveau normal du nombre de vacuoles. Il semblerait ainsi que la présence d'un taux trop important de Cex1p aux vacuoles joue le rôle de dominant négatif et inhiberait le rôle d'une (d') autre(s) protéine(s).

Quoiqu'il en soit, le rôle précis de Cex1p dans le trafficking vésiculaire n'est pas encore établi et cette étude nécessiterait d'être plus approfondie. L'utilisation de souches privées de gènes impliqués dans les voies de fusion et de fission vacuolaire ainsi que dans la transmission des vacuoles à la cellule fille devraient nous permettre de comprendre à quel moment intervient Cex1p et peut être de comprendre son rôle au niveau des endosomes tardifs.

V.2.7 Test phénotypique et étude de la fonction vacuolaire

Le rôle précis de Cex1p au niveau des vacuoles n'a encore pu être établi, c'est pourquoi j'ai mis en place une étude phénotypique pour étudier le comportement des souches WT, *cex1Δ*, *arc1Δ*, *cex1Δ arc1Δ*, *cex1Δ+pRS315-Cex1p-GFP* et *cex1Δ+ΔCt_Cex1p-GFP* en conditions de chocs hyper-osmotiques en présence de 1 M de sorbitol ou de chlorure de sodium (NaCl), en présence d'un métal divalent toxique comme le Cadmium (Cd^{2+}) ou encore en condition saturante de certains aa (5 mM).

J'ai tout d'abord transformé les souches WT, *cex1Δ*, *arc1Δ* et *cex1Δ arc1Δ* avec le plasmide pRS315-GFP pour pouvoir faire mes tests phénotypiques sur les mêmes boîtes, puis vérifié que cela n'affectait pas la croissance des souches sur milieu synthétique fermentaire (Glc 2%, Sucrose 2%) et respiratoire (Gly 2%) (Figure 56A). Les mêmes souches ont également été cultivées en présence d'1 M de sorbitol ou de NaCl afin de provoquer un choc hyper-osmotique, événement qui fait intervenir la vacuole et sa capacité à accumuler ou à provoquer un reflux d'eau par exemple (Hohmann, 2002).

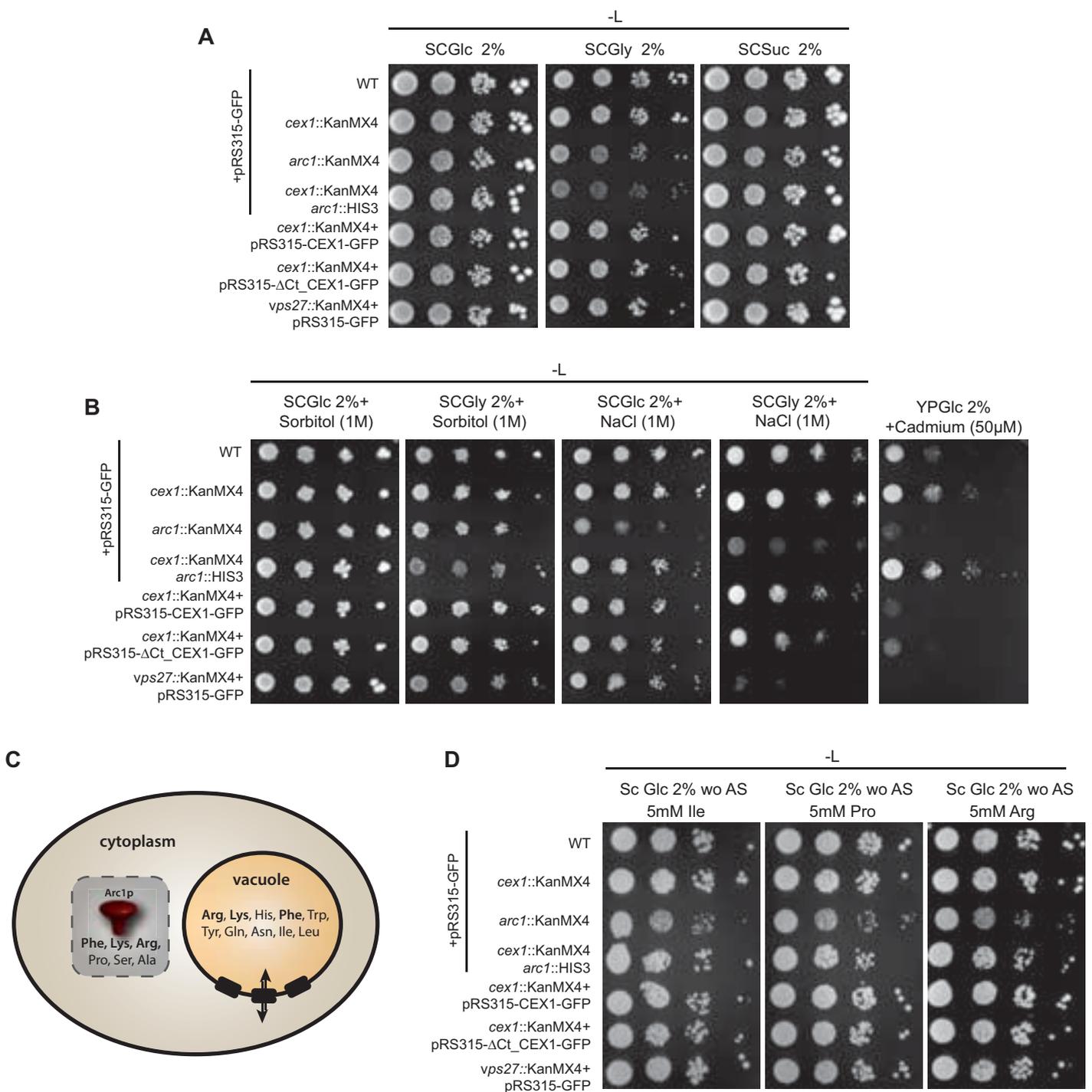


Figure 56 : Tests de fonctions vacuolaires.

(A, B, D) Tests en goutte des souches WT, *cex1Δ*, *cex1Δarc1Δ*, *arc1Δ* et *cex1Δ* + Cex1p ou ΔCt_Cex1p couplée à la GFP ainsi que *vps27Δ* sur milieu synthétique fermentaire (SCGlc 2%, SCSuc 2%) ou respiratoire (SCGly 2%), ainsi que sur milieu hyperosmotique (Sorbitol / NaCl) ou contenant 5 mM de différentes aa. Le test sur Cd²⁺ a été réalisé sur milieu riche (YPGlc). (C) Schéma du contenu en aa dans la vacuole et des ARNts liant Arc1p lorsqu'il n'est pas interaction avec l'ERS et la MRS.

Comme nous pouvons le voir (Figure 56B) aucune de ces conditions n'affectent la croissance des cellules. Cela implique que la vacuole est toujours capable de répondre aux stress extérieurs grâce à ces canaux et transporteurs membranaires qui permettent à la cellule de s'adapter. 50 μM de Cd^{2+} impacte la croissance de la souche WT sans pour autant être totalement délétère pour la cellule (Figure 56B, panel de droite), mais de manière assez surprenante la délétion de *CEX1* permet à la cellule de mieux s'adapter à la présence de 50 μM de Cd^{2+} , résultat parfaitement inattendu et que nous avons du mal à comprendre pour le moment. La létalité de la souche *arc1 Δ* est toute aussi surprenante, mais permet pour la seconde fois de faire le lien entre Arc1p et les PI3Ps car comme nous avons vu dans la Partie I §I.4.2.3, Arc1p interagit avec les PI3Ps (Fernandez-Murray and McMaster, 2006), phosphoinositides présents dans les membranes et impliqués dans le trafficking intracellulaire au niveau des vésicules de transport du Golgi vers les endosomes et des endosomes vers la vacuole (Munn and Riezman, 1994; Stack et al., 1995). Je ne rentrerai pas plus dans les détails de l'analyse de cette souche puisque ces résultats ont été à l'origine d'un nouveau projet de recherche en cours d'études par le Dr. Jonathan Huot, post-doctorant au laboratoire. La souche *cex1 Δ arc1 Δ* présente le même phénotype de croissance que la souche *cex1 Δ* ce qui semble indiquer qu'Arc1p et Cex1p aient des rôles antagonistes dans la métabolisation du Cd^{2+} . La surexpression de Cex1p ou de sa version délétée du domaine C-ter provoque la mort des cellules sur Cd^{2+} , ce qui pointe à nouveau vers un rôle régulateur de Cex1p au niveau du trafficking intracellulaire et nous indique que le taux de Cex1p dans la cellule semble être très important. Il faudrait également réaliser cette expérience sur milieu respiratoire afin de voir si la surproduction de Cex1p est toujours létale pour la cellule.

La réponse au stress osmotique n'est pas impactée dans les différentes souches étudiées, c'est pourquoi j'ai décidé d'analyser si les vacuoles étaient toujours fonctionnelles. Pour cela, j'ai cultivé mes différentes souches sur milieu SCGlc 2% sans sulfate d'ammonium, principale source d'azote à partir de laquelle la cellule peut synthétiser un grand nombre d'aa, et en présence de 5 mM de différents acides aminés. La vacuole est une des réserves de certains aa dans la cellule et la présence de différents transporteurs localisés dans la membrane vacuolaire permettent l'échange de ces aa avec le cytoplasme. Au cours de mon étude, les aa ont donc été choisis en fonction de leur présence ou absence dans les vacuoles (Kitamoto et al., 1988; Sekito et al., 2008) et en fonction des espèces d'ARNts que lie Arc1p lorsqu'il n'interagit pas avec l'ERS et la MRS (Deinert et al., 2001). J'ai choisi l'isoleucine car elle est présente dans la vacuole, la proline car l'ARNt^P interagit avec Arc1p, et l'arginine car on le retrouve dans la vacuole et que l'ARNt^R interagit avec Arc1p (Figure 56C). Après quatre jours à 30 °C toutes les souches présentent un phénotype de croissance similaire à la souche WT, ce qui signifie que la présence ou l'absence de Cex1p n'altère pas la fonction vacuolaire (Figure 56D) et que les défauts de croissances sur Cd^{2+} ne sont pas dus à un défaut de fonction vacuolaire. Ces analyses m'ont poussé à chercher au niveau moléculaire quel était le rôle de Cex1p dans le trafficking intracellulaire.

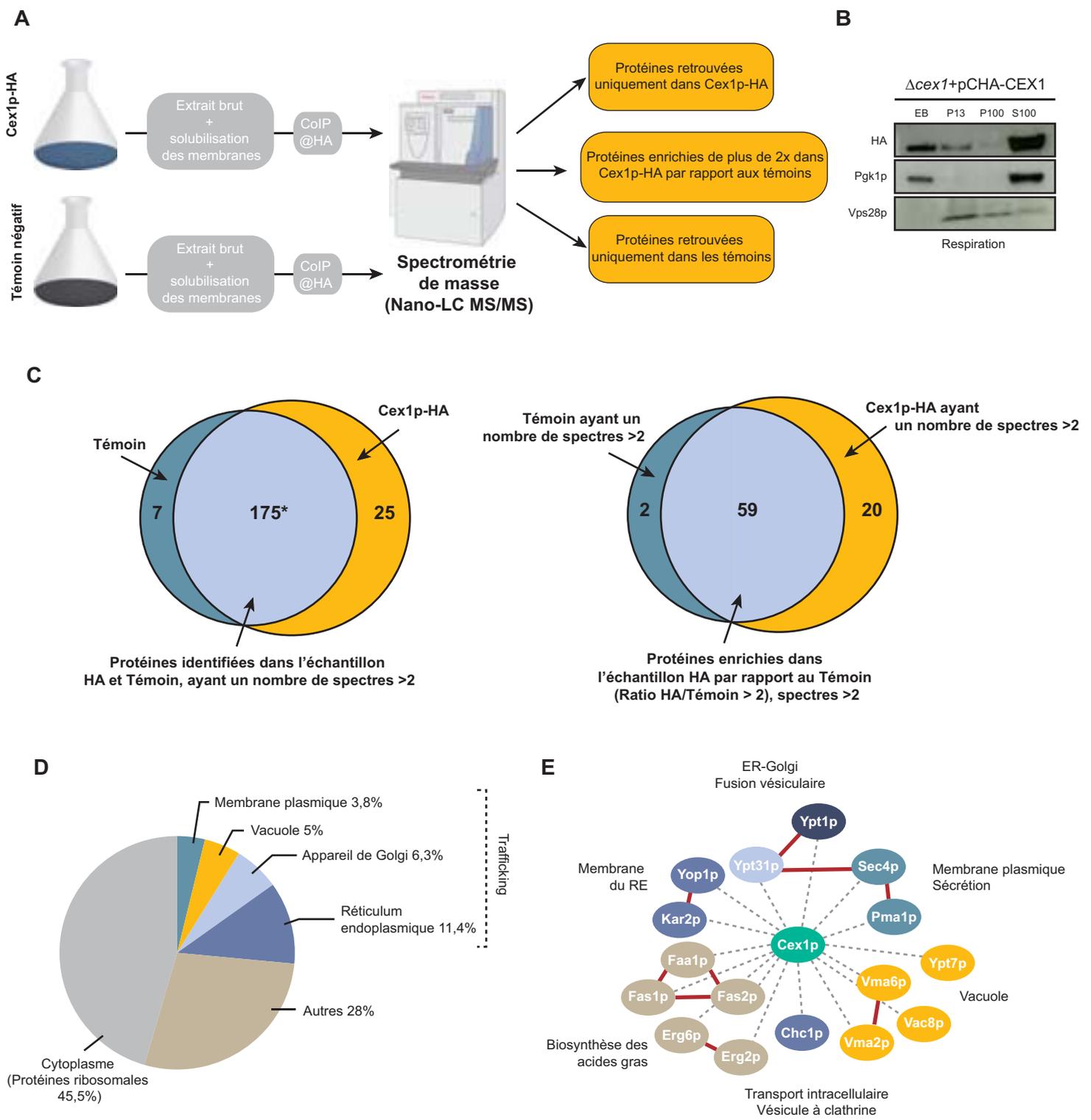


Figure 57 : Etablissement de l'interactome de Cex1p en respiration.

(A) Schéma des expériences de co-immunoprécipitation (CoIP) réalisées à partir de cellules exprimant ou non la protéine de fusion Cex1p-HA. (B) Vérification de la localisation subcellulaire de Cex1p-HA en respiration. (C) Ensembles des protéines identifiées par CoIP avant (à gauche) et après avoir filtré les résultats (à droite) selon le nombre de peptides identifié/protéine et le ratio HA/témoin. (D) Diagramme de la localisation des protéines interagissant avec Cex1p mise en évidence par CoIP. (E) Interactants de Cex1p les plus intéressants impliqués dans le trafficking intracellulaire.

V.2.8 Etablissement de l'interactome de Cex1p en respiration

Afin de mieux comprendre le rôle de Cex1p en respiration, nous avons décidé d'établir l'interactome de Cex1p par co-immunoprécipitation (CoIP), la recherche de partenaires pouvant nous aider à mieux cerner les processus biologiques dans lesquels Cex1p est impliquée. Pour cela, nous avons créé un vecteur permettant d'exprimer Cex1p sous la dépendance de son propre promoteur en fusion avec une étiquette Hémagglutinine (3-HA) puis nous avons exprimé ce clone dans une souche *cex1Δ*. A partir de cultures réalisées en respiration en phase exponentielle de croissance, les cellules ont été lysées par action mécanique avec un appareil FastPrep (voir section Matériels et Methodes), puis traitées avec 1% de NP40 pour solubiliser les membranes. Après sédimentation des résidus membranaires, l'extrait protéique brut a servi aux expériences de co-immunoprécipitation. L'éluat final, c'est-à-dire Cex1p-HA et ses interactants, a été analysé par nano-chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (Nano-LC MS/MS). L'ensemble des protéines identifiées a été comparé à des témoins n'exprimant aucune protéine de fusion étiquetée à l'épitope HA, puis séparées en trois catégories : *i*) les protéines mises en évidence uniquement en interaction avec Cex1p-HA, *ii*) les protéines dans les tests (Cex1p-HA) et les témoins, et *iii*) celles uniquement retrouvées dans les échantillons témoins (Figure 57A). En parallèle de ces expériences, j'ai également vérifié par fractionnement subcellulaire et immuno-détection dirigée contre l'épitope HA, que l'ajout de l'étiquette HA n'influçait en rien la localisation de Cex1p au niveau des vacuoles. Comme nous pouvons le voir dans la figure 57B, Cex1p-HA est retrouvée au niveau des vacuoles (P13) ainsi que sous forme soluble dans le cytoplasme (S100).

Par co-immunoprécipitation, nous avons pu identifier 207 protéines au total, parmi lesquelles 25 sont uniquement retrouvées en interaction avec Cex1p (par rapport aux témoins), 175 ont été identifiées aussi bien dans les témoins que dans les tests Cex1p-HA, et 7 protéines ont été identifiées uniquement dans les témoins (Figure 57C, graphique de gauche). Si l'on ne retient que les protéines ayant plus de deux spectres identifiés en spectrométrie de masse, nous pouvons voir que les interactants de Cex1p-HA sont aux nombres de 20, et ceux retrouvés uniquement dans les témoins de au nombre de 2. Un filtre supplémentaire a été appliqué pour les protéines identifiées dans les échantillons Cex1p-HA et dans les témoins, afin de ne conserver que les protéines enrichies de plus de deux fois dans les échantillons Cex1p-HA, ce qui représente encore 59 protéines (Figure 57C, graphique de droite). La classification des 79 protéines identifiées ici (20 protéines des échantillons Cex1p-HA + 59 protéines des échantillons/témoins) en fonction de leurs rôles cellulaire et qui représentent autant d'interactants potentiels, fait ressortir trois grandes tendances : 27% des protéines sont impliquées dans le trafficking intracellulaire, 45% sont cytosoliques et sont des protéines ribosomales, et 28% sont des protéines de la biosynthèse des acides gras, des protéines mitochondriale ou encore des chaperonnes.

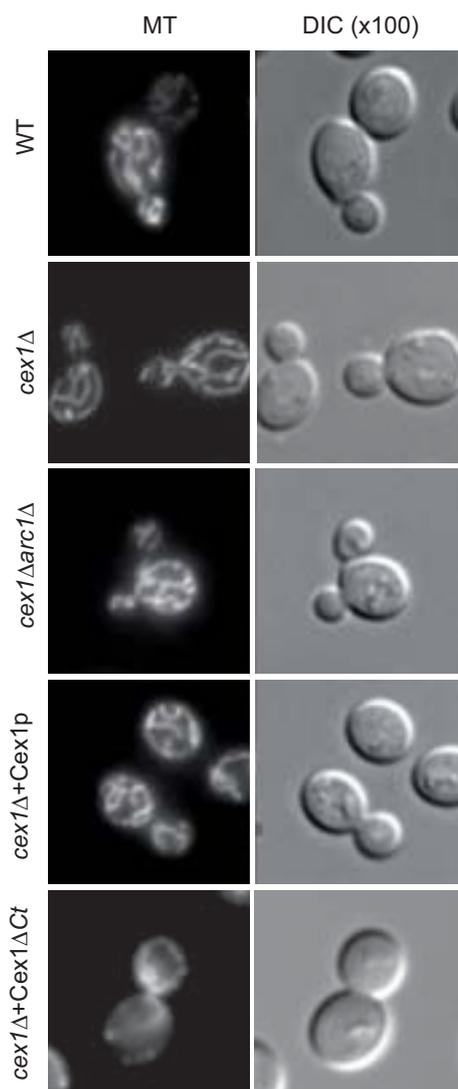
De nombreux interactants de Cex1p, identifiés dans nos expériences de CoIP, sont impliqués dans le trafficking vésiculaire, et sont listés dans la figure 57E. Bien que rien ne nous permette de différencier les interactants primaires (directement liés à Cex1p) des interactants secondaires (des interactants d'interactants), nous pouvons dresser une carte des interactions entre Cex1p et ces protéines pour voir si certaines tendances se dessinent. De cette manière, nous pouvons voir que Cex1p interagit avec Fas1p-Fas2p et Faa1p, ainsi qu'avec Erg1p et Erg2p qui sont des protéines de la synthèse des acides gras et de l'ergostérol. Ces composés sont essentiels pour le trafficking intracellulaire puisque la composition des membranes en acide gras détermine l'ancrage de protéines membranaires qui vont influencer sur l'activité de certaines enzymes et la distribution de vésicules dans la cellule. Cex1p interagit également avec Ypt1p, Ypt31p et Sec4p, des Rab-GTPase de la famille des protéines G similaire aux Ran impliquées dans l'import/export nucléaire. Au niveau du Golgi ces trois Rab-GTPases sont recrutées de manière séquentielle, Ypt1p-GTP recrute Ypt31p-GDP, puis Ypt31p-GTP en association avec la GEF Sec2p recrutent une autre GEF Sec4p et les trois Rabs sont ensuite réparties dans leurs compartiments respectifs à partir du Golgi (Munro, 2004). Ypt1p (Yeast Protein Transport) est nécessaire au transport antérograde ER-Golgi par les vésicules COPII ainsi que pour l'envoi à la vacuole, des vésicules d'endocytose (Buvelot Frei et al., 2006; Kamena et al., 2008; Segev, 2001) et a récemment été identifié dans le transport des vésicules des endosomes vers le Golgi (Sclafani et al., 2010). Ypt31p agit au niveau du *trans*-Golgi dans le transport de vésicules du Golgi à la membrane plasmique ainsi que des endosomes vers le Golgi (Chen et al., 2005a; Jedd et al., 1997) et Sec4p est impliquée dans la voie de transport des vésicules du Golgi vers la membrane plasmique en fonction du cycle cellulaire et se localise également au niveau du cou et du bourgeon de la cellule fille au cours de la division cellulaire (Goud et al., 1988; Novick and Brennwald, 1993). Sec4p interagit également avec une sous-unité de l'ATPase de la membrane plasmique Pma1p. Curieusement, Ypt31p est également localisée dans la cellule fille au cours du bourgeonnement et est impliquée dans la transmission des vacuoles en association avec Sec4p au niveau des exocystes (Jin et al., 2011; Lipatova et al., 2008).

Cex1p interagit également avec Yop1p, une protéine essentielle à la réticulation des tubules du RE (Voeltz et al., 2006) et Kar2p qui est une ATPase de la famille des chaperonnes HSP70 intervenant dans la translocation des protéines dans le RE, la fusion des membranes au cours de la karyogamie et de la dégradation des protéines associées au RE (Matlack et al., 1999; Nishikawa et al., 2001; Normington et al., 1989).

Les expériences de CoIP nous ont également permis d'identifier quatre protéines vacuolaires Vma2p et Vma6p, Ypt7p et Vac8p en interaction avec Cex1p. Vma2p et Vma6p sont les sous-unités B du domaine Vo et D du domaine V1 de l'ATPase vacuolaire (Bauerle et al., 1993; Pan et al., 1993; Stevens and Forgac, 1997) qui est responsable de l'acidification de la vacuole par pompage des

protons dans la vacuole couplée à l'hydrolyse de l'ATP. Il est important de noter que Vma6p a déjà été montré comme interagissant avec Cex1p au cours d'une étude globale visant à identifier tous les complexes protéiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Krogan et al., 2006). De plus, une étude génétique a permis de relier *CEX1* aux gènes *VMA21* et *VOA1*, deux facteurs situés dans le RE participant à l'assemblage de l'ATPase vacuolaire (Finnigan et al., 2011). Ypt7p, est une Rab-GTPase présente dans les endosomes tardifs et les vacuoles et participe au recrutement du complexe HOPS (**H**omotypic fusion and vacuole **P**rotein **S**orting) composé de Vps11p, -16p, -18p, -33p, -39p et -41p et responsable de la fusion des endosomes tardifs dans les vacuoles (Balderhaar and Ungermann, 2013; Liu et al., 2012; Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009). En plus de ces interactants dans le complexe HOPS, Ypt7p interagit également avec Ypt1p, Ypt31p, Sec4p et Chc1p dans divers complexes protéiques (Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002; Qiu and Noble, 2008). Vac8p est également une protéine vacuolaire (Fleckenstein et al., 1998) nécessaire au transfert des vacuoles à la cellule fille (Tang et al., 2006; Wang, 1998), et participe à la fusion homotypique des vésicules et au transport CVT (**C**ytosol-to-**V**acuole **T**ransport) (Wang et al., 2001b) qui est un mécanisme proche de l'autophagie et qui permet à la cellule de dégrader certains composants cellulaires dans la vacuole au cours de la croissance végétative (Teter and Klionsky, 2000). Vac8p, en association avec Nvj1p (Pan et al., 2000), participe à la formation des jonctions noyau-vacuole, site d'un processus autophagique appelé PMN (**P**iecemeal **M**icrophagy of the **N**ucleus) qui permet de dégrader une portion du noyau dans la vacuole (Roberts et al., 2003).

L'ensemble de ces résultats est cohérent avec nos expériences de localisation subcellulaire par microscopie et par western-blot et confirment que Cex1p est très certainement impliquée dans le trafficking intracellulaire. Il est tentant, aux vues des différents résultats obtenus, de postuler que Cex1p pourrait jouer un rôle dans la fusion vésiculaire des endosomes à la vacuole ou dans la fusion/fission vacuolaire, et la présence d'Ypt7p, Vac8p, Ypt31p et Sec4p dans nos expériences de CoIP pourraient alors signifier qu'ils sont des interactants directs de Cex1p, mais à ce stade nous manquons d'autres évidences pour relier Cex1p à ces processus. Pour affiner nos observations et mieux cerner le rôle de Cex1p, nous allons surexprimer Cex1p-GFP et Δ Ct_Cex1p-GFP dans différentes souches privées de gènes impliqués dans le trafficking vésiculaire. L'accumulation de Cex1p en amas dans le cytoplasme des levures semble correspondre à des endosomes tardifs, notamment parce que ces points colocalisent avec le marqueur lipidique FM4-64, mais pour écarter l'hypothèse de la formation d'autophagosomes, nous allons observer la localisation de Cex1p dans une souche *atg5 Δ* incapable de former des autophagosomes. Le phénotype d'hyper-vacuolisation observé dans les souches surexprimant Cex1p ou sa version Δ Ct_Cex1p laisse supposer que Cex1p intervient dans la fusion ou la fission vacuolaire et l'expression de ces deux variants dans une souche *vps15 Δ* , un mutant incapable de diviser sa vacuole et qui présente une seule vacuole « géante », pourrait nous apporter quelques informations quant à son mécanisme d'action à la vacuole.



Respiration

Figure 58 : Analyse de la transmission mitochondriale entre cellule mère et cellule fille en présence ou en l'absence de Cex1p.

Les souches WT, *cex1Δ*, *cex1Δarc1Δ* et *cex1Δ + Cex1p* ou Δ Ct_Cex1p couplée à la GFP ont été cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu respiratoire puis marquées 15 min au MitoTracker Red (MT). Les images ont été acquises par microscopie à épifluorescence .

V.2.9 Trafficking vésiculaire et mitochondries

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la plupart des organelles liées à des membranes ne peuvent pas être synthétisées *de novo* mais sont soumises à des processus de multiplications et de divisions à partir d'organelles pré-existantes avant d'être transmises aux cellules filles au cours de la division cellulaire (Warren and Wickner, 1996). C'est notamment le cas de la mitochondrie, des vacuoles et du RE qui se déplace le long des filaments d'actine grâce aux myosines 2 (mitochondries et vacuoles) et 4 (RE) au cours de la transmission aux cellules filles (Fagarasanu et al., 2010; Westermann, 2014).

La transmission de la mitochondrie vers le site de bourgeonnement est réalisée par la myosine 2 en interaction avec la Rab-GTPase, Ypt11p et la protéine mitochondriale Mmr1p (Westermann, 2014). Une fois dans le bourgeon, la mitochondrie s'ancre au RE grâce à Mmr1p et à la phosphatase Ptc1p, l'empêchant ainsi de retourner dans la cellule mère par mouvement rétrograde (Swayne et al., 2011). Une partie de la mitochondrie est maintenue dans la cellule mère par l'ancrage de la mitochondrie à la membrane plasmique par Num1p et la protéine Mdm36p (Klecker et al., 2013; Lackner et al., 2013) et il semblerait que le complexe Num1p-Mdm36p contacte également le RE, suggérant ainsi que la mitochondrie et le RE sont retenus dans la cellule fille à la membrane plasmique.

Le transport de la mitochondrie étant relié à la transmission des autres organelles comme la vacuole et le RE, nous avons décidé d'étudier le réseau mitochondrial dans des cellules WT, *cex1Δ*, *cex1Δ arc1Δ*, *cex1Δ+pRS315-Cex1p-GFP* et *cex1Δ+ΔCt_Cex1p-GFP* en phase exponentielle de croissance en SCGly 2% après 20 min de traitement au Mitotracker. Aucun phénotype particulier n'est observé dans les souches WT, *cex1Δ*, *cex1Δ arc1Δ*, ainsi que dans les souches *cex1Δ+pRS315-Cex1p-GFP* et *cex1Δ+ΔCt_Cex1p-GFP* et l'on peut voir que le réseau mitochondrial est bien polarisé au niveau des bourgeons et transmet aux cellules filles (Figure 58). Cela signifie que Cex1p n'est pas impliquée dans le transfert des mitochondries à la cellule fille au cours du bourgeonnement.

V.3 Discussion

V.3.1 Discussion sur Cex1p : le domaine kinase-like

Des études de génomique ont révélé que 2% des gènes chez les eucaryotes code des protéines kinases (Manning et al., 2002; Taylor and Kornev, 2011) soit environ 130 protéines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hunter and Plowman, 1997) et environ 500 chez l'Homme (Manning et al., 2002). Parmi l'ensemble de ces protéines, environ 10% correspondent à des pseudokinases, c'est-à-dire qu'elles possèdent un domaine kinase-like et sont considérées comme inactives

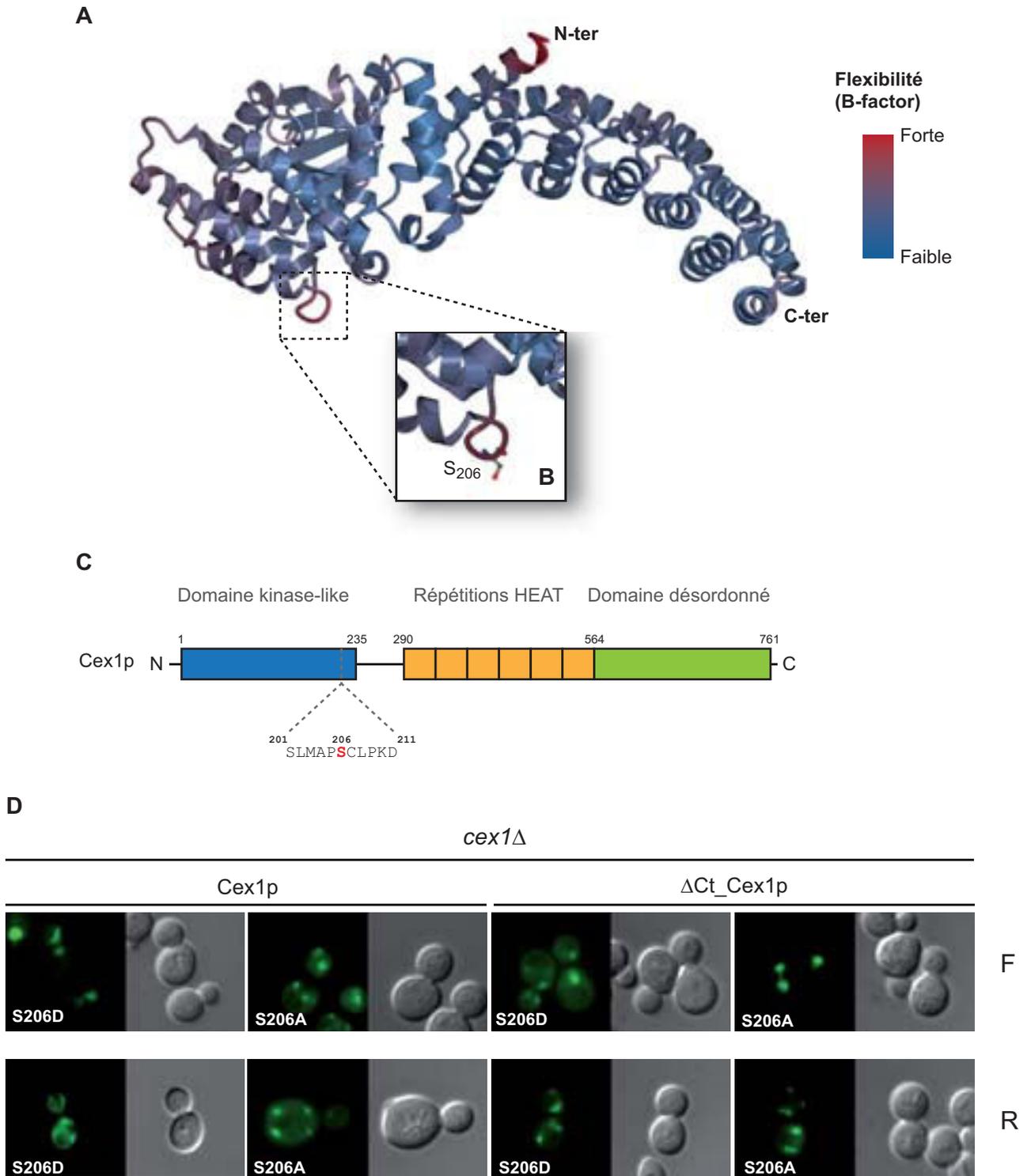


Figure 59 : Le domaine kinase-like de Cex1p joue un rôle dans sa localisation subcellulaire.

(A) Structure cristallographique de Cex1p colorisée en fonction de la flexibilité relative de chaque atome qui la compose (B-factor). Généralement, les atomes ayant un B-factor faible font partie d'une région très rigide dans la structure tandis que les atomes ayant un B-factor fort font partie d'une région très flexible. (B-C) Positionnement de la S₂₀₆ dans la boucle variable du domaine kinase-like. (D) Images présentées en microscopie à épifluorescence de souches *cex1Δ* exprimant un mutant Cex1p phosphomimétique (S206D) ou ne pouvant pas être phosphorylé (S206A). Les cellules ont été cultivées en fermentation (F) et en respiration (R).

(Boudeau et al., 2006; Zeqiraj and van Aalten, 2010). Ces protéines sont toutefois essentielles au bon fonctionnement d'un grand nombre de voies de régulation en tant que transmetteurs de signaux, non pas par leur capacité à phosphoryler des substrats, mais en réunissant différents composants de voies de signalisation ou en tant qu'activateurs allostériques de protéines kinases.

Chez l'Homme, les pseudokinases ont déjà été très largement étudiées et sont impliquées dans des mécanismes très divers comme les processus d'adhésion cellulaire en réponse à des signaux de récepteurs transmembranaire de type ILK (**I**ntegrin-**L**inked **K**inase) (Legate et al., 2006), ou la croissance et la prolifération cellulaire sous l'action de HER3/ErbB3, un récepteur membranaire à tyrosine kinase de la famille des facteurs de croissance HER (**H**uman **E**pidermal growth factor **R**eceptor) (Zhang et al., 2006). Les homologues humains de Cex1p, SCYL1 et -2 (**S**cy1-**L**ike protein 1 – 2) sont également composés d'un domaine kinase-like ne possédant pas les motifs DFG, HRD et VAIK (voir § V.1.3) (Boudeau et al., 2006), mais nous reparlerons de ces homologues plus tard.

Chez la levure en revanche, les pseudokinases sont très peu étudiées et les seuls exemples sont la protéine Gcn2p et son rôle dans l'inhibition de la traduction au cours d'une carence en nutriment (Lageix et al., 2014; Qiu et al., 1998), la régulation de la réponse au stress oxydatif par la pseudokinase Kdx1p (Jin et al., 2014) et le complexe Pan2p-Panp3 impliqué dans le raccourcissement des queues poly-A lors de la dégradation des ARNms (Schäfer et al., 2014). Il est intéressant de noter qu'à part Gcn2p qui est étudié depuis presque 20 ans, presque aucune autre pseudokinase n'a été examinée chez la levure et que la publication de nouvelles études les concernant ces deux dernières années laisse à penser que ce domaine de recherche est en cours d'expansion.

Après la résolution de la structure cristallographique de Cex1p, la cartographie de son domaine kinase-like et nos expériences sur le rôle de Cex1p dans le trafficking intracellulaire pourraient constituer une nouvelle étude dans le domaine des pseudokinases chez la levure. En effet, si l'on regarde la prédiction de la flexibilité de Cex1p (B-factor, Figure 59A) nous pouvons voir que la majeure partie de la protéine cristallisée est très peu flexible, à l'exception de quelques résidus dans le domaine kinase-like et notamment la sérine 206 (S₂₀₆, Figure 59B) qui se trouve quasiment à la jonction entre le domaine kinase-like et la région qui relie ce domaine aux répétitions HEAT (Figure 59C). Comme nous l'avons vu plus haut, les pseudokinases peuvent avoir un rôle dans le recrutement de partenaires catalytiquement actifs grâce à leur domaine kinase-like et ainsi participer à la régulation de certaines voies de signalisation. Un algorithme permettant de calculer la probabilité d'une sérine à être phosphorylée chez la levure (NetPhosYeast, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/>) prédit que la S₂₀₆ n'est pas phosphorylable avec un indice de confiance de 0.455/1, or vu la position de cette sérine et son orientation dans la région « linker » j'ai tout de même décidé de générer un mutant phosphomimétique en mutant la S₂₀₆ en aspartate (S₂₀₆D) et un mutant incapable d'être phosphorylé en

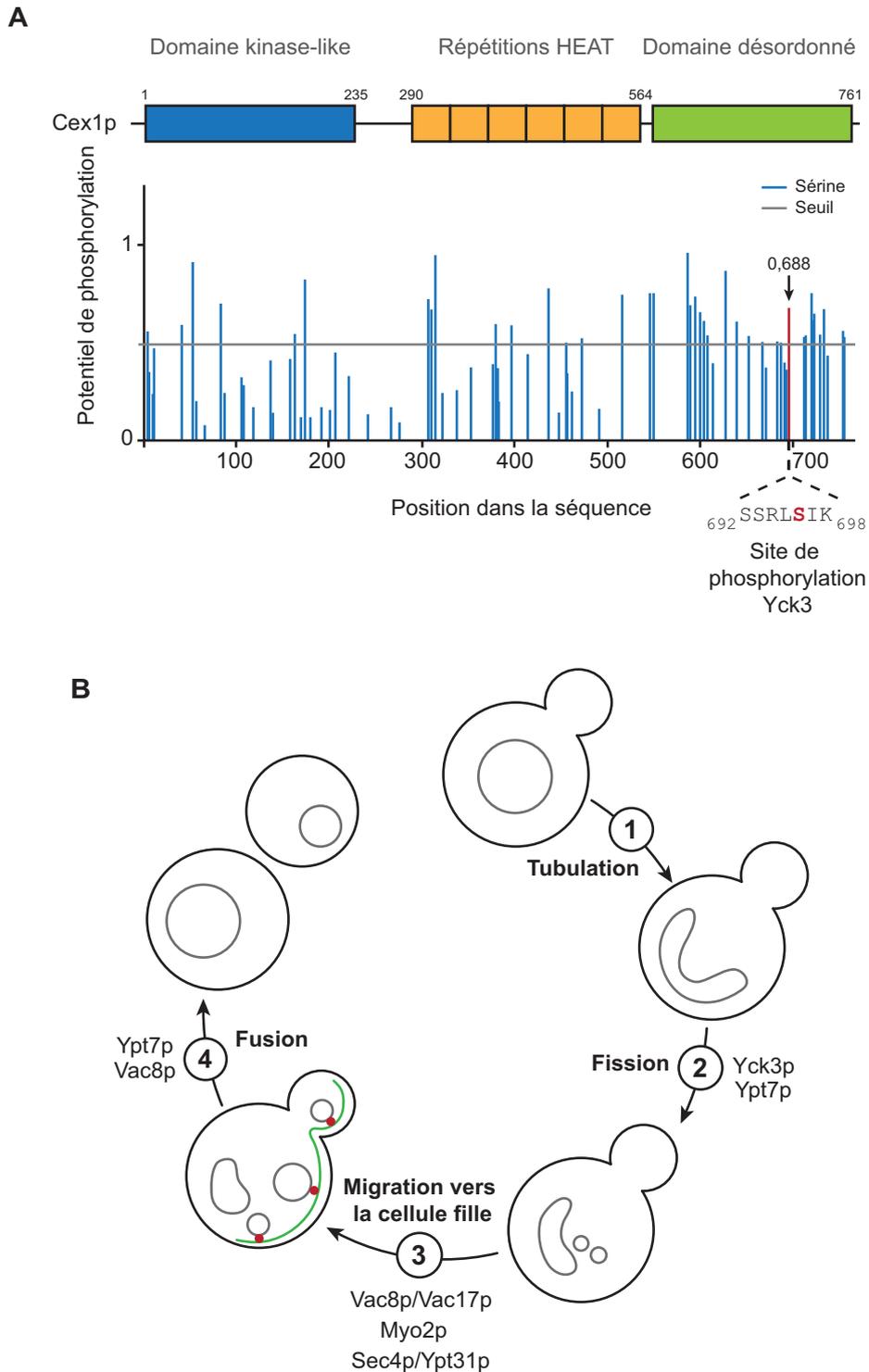


Figure 60 : Identification des sérines phosphorylées dans Cex1p et intégration de Cex1p dans le mécanisme de transport des vacuoles dans la cellule fille.

(A) Identification des sérines phosphorylables de Cex1p par le programme NetPhosYeast. Dans le domaine C-terminal, la S₆₉₆ est phosphorylée par la caséine kinase I (Yck3p). (B) Intégration de nos données de CoIP et de phosphorylation par Yck3p dans le mécanisme de fission et transport vacuolaire de la cellule mère vers le bourgeon (tiré de LaGrassa et al., 2005).

mutant la S₂₀₆ en alanine (S₂₀₆A) afin de vérifier si le domaine kinase-like de Cex1p joue un rôle dans la localisation de Cex1p.

Comme nous pouvons le voir dans la figure 59D, les mutants S₂₀₆A de Cex1p sont toujours localisés au niveau des endosomes tardifs en fermentation et en respiration comme nous l'avions déjà observé auparavant (Figure 54B et 55A), en revanche le mutant S₂₀₆D présente, en fermentation, la même localisation que le variant Δ Ct_Cex1p (Figure 54B et 55A). Il semblerait donc qu'en fermentation, la phosphorylation de la S₂₀₆ soit importante pour le recrutement de Cex1p au niveau du bourgeon, et que la localisation aux endosomes est médiée par le domaine C-ter.

En respiration, les mutants S₂₀₆D et S₂₀₆A de Δ Ct_Cex1p n'affectent pas la localisation de Cex1p observée plus tôt (Figure 54B), et cela est également vrai pour le mutant S₂₀₆A de Δ Ct_Cex1p en fermentation. En revanche, la mutation S₂₀₆D dans le variant Δ Ct_Cex1p ne provoque pas de modification de la localisation de Δ Ct_Cex1p en respiration. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation du domaine kinase-like est importante pour recruter Cex1p dans le cytoplasme en fermentation. Ces résultats semblent être en opposition avec ceux observés pour Cex1p, et pourrait s'expliquer par un mécanisme de compétition entre le domaine C-ter et le domaine kinase-like. Chacun serait nécessaire à la localisation de Cex1p dans un compartiment différent en fonction de son état de phosphorylation et du métabolisme de la cellule.

Le rôle de la phosphorylation de la S₂₀₆ du domaine kinase-like dans la localisation de Cex1p est très préliminaire et nécessitera d'être approfondie *i*) par l'identification des protéines se liant au domaine kinase-like de Cex1p (TAP-tag ou CoIP en ne surexprimant que le domaine kinase-like couplé à une étiquette HA ou TAP) puis *ii*) par des expériences de localisation par fluorescence à l'aide de différentes souches mutées dans les gènes codant les protéines identifiées précédemment (en TAP-tag ou CoIP) et codant des facteurs clés impliqués dans le trafficking intracellulaire.

V.3.2 Discussion sur Cex1p : le domaine C-ter

Le domaine C-ter de Cex1p est très intéressant pour plusieurs raisons. Tout d'abord parce qu'il n'a pas pu être cristallisé et qu'il concentre plus de 50% de toutes les sérines phosphorylables de Cex1p sur 197 aa soit environ 11% des aa présents (Figure 60A, NetPhos Yeast). Parmi ces sérines, trois ont déjà été identifiées sous leur forme phosphorylée par spectrométrie de masse : la S₆₈₈ (Smolka et al., 2007), la S₆₉₆ (Li et al., 2007) et la S₇₅₄ (Holt et al., 2009) (PhosphoGrid, <http://www.phosphogrid.org>), et curieusement la S₆₉₆ est phosphorylée par la caséine kinase I Yck3p.

La protéine kinase vacuolaire Yck3p régule la fusion vacuolaire en phosphorylant la protéine Vps41p du complexe HOPS (Cabrera et al., 2009; LaGrassa and Ungermann, 2005), ce qui favorise

l'interaction du complexe HOPS avec Ypt7p à la surface des vacuoles et inhibe ainsi la fusion des endosomes tardifs à la vacuole et la fusion homotypique des vacuoles (Cabrera et al., 2009; Hickey et al., 2009; Zick and Wickner, 2012). Cette succession d'événements prend place au cours du bourgeonnement de la cellule pour maintenir un pool de vésicules et de vacuoles libres afin de pouvoir les transporter vers la cellule fille (LaGrassa and Ungermann, 2005). En plus du complexe HOPS et d'Ypt7p, nous avons vu que ce mécanisme dépend de la protéine motrice Myo2p, de Vac8p et Vac17p ainsi que des protéines de l'exocyste Sec4p et Ypt31p (Figure 60B). Toutes ces évidences ainsi que les interactants de Cex1p identifiés par CoIP sont cohérents avec notre postulat et soutiennent l'idée que Cex1p est impliquée dans la fusion/fission vacuolaire au cours du transfert des vacuoles vers la cellule fille.

V.3.3 Les homologues humains SCYL1, SCYL2 et SCYL3

Les protéines de la famille SCYL sont des protéines à domaine N-ter sérine/thréonine kinase inactif et à répétitions HEAT, présentes chez tous les eucaryotes étudiés à ce jour à l'exception des kinétoplastides. Leur nom provient de l'homologie de leur domaine kinase-like avec celui de la protéine de levure Scy1p d'où le nom Scy1-Like protein (SCYL). Il existe trois sous-familles de protéines SCYL nommées SCYL1, 2 et 3, toutes trois ayant des homologies de séquence avec Cex1p.

Chez l'Homme, SCYL1 est une protéine impliquée dans le transport rétrograde médié par COPI, des vésicules du Golgi vers le RE grâce à son domaine C-ter et plus particulièrement un domaine en « superhélice » (Burman et al., 2008). Ce dernier appartient à la famille de domaines KOG3088 retrouvés dans des protéines membranaires associées à des transporteurs de la machinerie de sécrétion. SCYL1 interagit avec la Golgin 58K à l'interface entre le *cis*-Golgi et les vésicules COPI et régule le volume des citernes du Golgi (Burman et al., 2010). Plus récemment, une étude a démontré que la liaison de SCYL1 aux COPI se faisait *via* la GTPase Arf4 (Hamlin et al., 2014). SCYL1, comme son homologue Cex1p, semble être impliquée dans l'export de l'ARNt aminoacylé chez les mammifères en interagissant les nucléoporines Nup98 et Nup107 ainsi qu'avec les exportines Xpo-t et Xpo5 et la protéine RanGTP (Chafe and Mangroo, 2010). Une mutation induisant l'apparition prématurée d'un codon stop par frame-shift dans le gène codant SCYL1 est associée à l'apparition d'une forme récessive d'ataxie spinocérébelleuse (ASC) (Blot et al., 1995; Schmidt et al., 2007). De plus, les souris *scy11*^{-/-} présentent un phénotype de dégénérescence des motoneurones similaire à celui observé au cours d'une ASC ainsi qu'une inclusion cytoplasmique de la protéine nucléaire TDP-43 (TAR DNA-binding Protein 43kDa), caractéristique principale des scléroses latérales amyotrophiques (Pelletier et al., 2012). Toutes ces informations relient SCYL1 et le trafficking intracellulaire aux maladies neurodégénératives, nous pouvons donc tirer parti de nos découvertes sur Cex1p chez la levure afin de modéliser certaines maladies neurodégénératives et ainsi tenter de mieux comprendre

certains processus chez les mammifères (Khurana and Lindquist, 2010; Miller-Fleming et al., 2008; Pereira et al., 2012).

SCYL2, aussi appelée CVAK104 (Coated Vesicle-Associated Kinase of 104kDa) est impliquée dans la formation de vésicules d'endocytose à clathrine au niveau de la membrane plasmique en interagissant avec le complexe AP2 (Conner and Schmid, 2005; Schmid et al., 2006) ainsi qu'avec la clathrine grâce au domaine C-ter de SCYL2 (Duwel and Ungewickell, 2006). L'interaction de SCYL2 avec AP2 a été remise en cause et il semblerait que SCYL2 ne soit pas impliquée dans l'endocytose médié par AP2 mais plutôt dans le transport de vésicules à clathrine du *trans*-Golgi et vers les lysosomes (compartiment assimilé aux vacuoles chez la levure) chez l'Homme (Duwel and Ungewickell, 2006) et chez le xénope, où elle interagit également avec deux SNAREs, la Syntaxin 8 et Vit1b (Borner et al., 2007). Récemment, une étude a montré que SCYL2 interagit avec la protéine Dvl de la voie de signalisation WNT et favorise la dégradation du récepteur membranaire Fzd5 en activant la voie d'endocytose médiée par les vésicules à clathrine et le transport de ces vésicules vers le lysosome pour dégrader Fzd5 (Terabayashi et al., 2009). Très peu d'études font état du rôle de SCYL2 chez les mammifères et certaines sont contradictoires quant à son implication dans la voie d'endocytose. En revanche toutes les études s'entendent pour dire que SCYL2 est localisée au niveau des endosomes précoces et/ou tardifs ainsi qu'au Golgi et très certainement au lysosome dans le cas du recyclage de Fzd5, ce qui coïncide à nouveau avec nos résultats concernant Cex1p chez la levure. De plus nous avons montré que Cex1p interagit avec la chaîne lourde de la clathrine (Chc1p), résultats corroborés par une autre étude qui a mis en évidence un lien entre Cex1p et la clathrine (Boettner et al., 2011).

La protéine SCYL3, plus connue sous le nom de PACE-1 est très peu étudiée. Dans la cellule SCYL3 se situe au niveau du Golgi lorsque son domaine N-ter kinase-like est myristoylé, et se localise également dans les lamellipodes où elle interagit *via* son domaine C-ter avec l'Ezrin, une protéine du cytosquelette qui permet de relier l'actine à différentes protéines membranaires dans la cellule (Sullivan et al., 2003). De cette manière, SCYL3 est directement impliquée dans la motilité des cellules et dans le transport des organelles le long du cytosquelette d'actine, mécanisme qui n'est pas sans rappeler le rôle supposé de Cex1p dans le transport des vacuoles le long de l'actine au cours du bourgeonnement. Plusieurs études récentes ont mises en évidence un lien entre SCYL3 et la maladie de Parkinson (Navarro et al., 2009; van der Vegt et al., 2009; Xu et al., 2010). Ces études génomiques ont permis d'identifier des mutations dans le gène codant SCYL3 chez différents patients d'une même famille atteints de la maladie de Parkinson (Navarro et al., 2009; van der Vegt et al., 2009). Une des manifestations de la maladie de Parkinson au niveau moléculaire se traduit par une baisse de la vitesse de transport rétrograde de vésicules des axones vers les corps cellulaires des neurones due à la mutation de l' α -synuclein (Saha et al., 2004). SCYL3 pourrait être impliquée dans ce processus de transport

rétrograde *via* son interaction avec l'Ezrin ou une autre protéine impliquée dans le transport rétrograde le long des microtubules.

De manière générale les homologues humains de Cex1p sont toutes des protéines du trafficking intracellulaire, en agissant certes à des endroits différents mais toujours à l'interface entre les vésicules (endosomes précoces ou tardifs, vacuoles, vésicules COPI) et le Golgi ou le RE. Ils présentent également des similitudes en termes de séquence puisqu'ils sont tous composés d'un domaine Kinase-like inactif, d'une succession de répétition HEAT et d'un domaine C-ter impliqué dans l'interaction avec des protéines membranaires ou associées aux membranes. Cex1p présente les mêmes domaines que SCYL1 et SCYL2 et dans une moindre mesure SCYL3, et sa localisation chez la levure correspond à celles qui ont été décrites pour les protéines SCYL chez les mammifères. L'ensemble de ces observations semble confirmer, une fois de plus, les résultats que nous avons obtenus pour Cex1p chez la levure et laisse penser que nous pourrions par la suite utiliser nos souches de levure afin d'étudier plus en détails certaines maladies neurodégénératives.

V.3.4 Discussion générale et perspectives

Au cours de cette étude nous avons montré que l'expression de Cex1p est augmentée en respiration et que cette surexpression est due au contrôle transcriptionnel du gène *CEX1* médié par la voie Snf1/4 *via* les facteurs de transcription Sip4p et dans une moindre mesure Cat8p et Mig1p. En respiration Cex1p semble être impliquée dans le trafficking intracellulaire mais son rôle précis n'est pas encore déterminé. Nous pouvons néanmoins avancer qu'il est probable que Cex1p joue un rôle dans la fusion ou fission vacuolaire et/ou dans la transmission des vacuoles à la cellule fille.

La transmission des vacuoles de la cellule mère à la cellule fille est un processus synchronisé avec le cycle cellulaire chez la levure (Weisman, 2006). On peut donc se demander pourquoi faire intervenir une protéine régulée par le métabolisme carboné tel que Cex1p. Nous avons vu que les vacuoles sont transportées vers le bourgeon par l'action de Myo2p sur les filaments d'actine, voie également empruntée par les mitochondries au cours de la division cellulaire (Weisman, 2006; Westermann, 2014). Nous pourrions donc imaginer que les mitochondries contactent directement les vacuoles *via* des complexes protéiques comparable à ceux qui existent entre les mitochondries et le RE (van der Laan et al., 2012; Wideman et al., 2013). Ces complexes seraient d'autant plus importants en respiration et nécessiteraient certainement de nombreux facteurs afin de maintenir le contact entre ces deux organelles et ensuite permettre leur transport simultané dans la cellule fille. Il n'est pas impossible que Cex1p puisse être l'un de ces facteurs.

Pour la finalisation de cette étude, il me paraît essentiel de générer une souche exprimant Cex1p sans son domaine C-ter couplée à une étiquette HA (Δ Ct_Cex1p-HA). Cela nous permettra

d'identifier, par comparaison avec nos résultats déjà obtenu, les interactants spécifiques du domaine C-ter et donc les partenaires de Cex1p vraisemblablement impliqués dans le transport des vacuoles.

J'aimerais revenir sur les résultats des tests phénotypiques de la souche *arc1Δ* sur Cd^{2+} car cette découverte a soulevé un certain nombre de questions que nous nous posons au laboratoire quant au lien entre Arc1p et les PI3Ps. Plusieurs hypothèses ont été émises (Frechin et al., 2010) mais aucune pour le moment ne permet de replacer de manière logique Arc1p dans le trafficking intracellulaire ou dans le fonctionnement de la vacuole en présence de métaux toxique. Nous avons longtemps imaginé que la biotinylation d'Arc1p pouvait avoir un rôle sur la disruption du complexe AME au cours de la transition diauxique, mais des expériences menées par le Dr. Jonathan Huot au laboratoire semblent indiquer que ce n'est pas le cas. Le rôle de la biotine a naturellement été proposé pour expliquer une interaction entre Arc1p et les PI3Ps, mais une analyse détaillée des résultats obtenus par Fernandez-Murray et col. (Fernández-Murray and McMaster, 2006) suffit pour réfuter cette théorie. En effet, dans leur article, les auteurs surproduisent Arc1p dans une bactérie afin de le purifier, puis cet Arc1p recombinant est utilisé au cours des expériences de liaisons à différents phosphatidylinositides. Or nous savons qu'Arc1p ne peut être biotinylée que par l'enzyme de levure Bpl1p et n'est pas biotinylée par son homologue bactérien BirA (Kim et al., 2004). La question du rôle de la biotinylation d'Arc1p reste donc entière, mais les résultats de croissance sur Cd^{2+} ont motivé le Dr. Jonathan Huot à continuer les recherches dans cette direction. Les résultats qu'il a d'ores et déjà obtenus sont très prometteurs quant à l'existence d'un lien entre Arc1p, le RE et la vacuole.

Pour terminer cette partie j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont rendu ce projet possible, tout particulièrement mon directeur de thèse le Pr. Hubert Becker. Sa curiosité, son ouverture d'esprit et son esprit critique ont été un moteur constant dans cette étude, et sans cela le projet aurait été stoppé net le jour où nous avons montré qu'il n'y avait pas de létalité synthétique entre *CEX1* et *ARCI* ! Mais au lieu de cela, nous avons « justement » voulu savoir ce qu'il se passait...et je ne suis pas sûr que j'aurais eu le loisir de faire cela dans n'importe quelle autre équipe. Bien entendu le projet n'aurait pas pu prendre cette dimension si je n'avais pas eu la chance de pouvoir discuter (harceler ?) l'équipe du Dr. Sylvie Friant. Je tiens donc à remercier Sylvie et Johann pour les nombreuses discussions, réunions de laboratoire et souches mises à disposition, ainsi que Bruno Rinaldi qui reprend les dernières expériences nécessaires à la publication de ce projet... Je voudrais également remercier mon co-directeur de thèse le Dr. Bruno Senger qui m'a beaucoup épaulé dans les expériences de génétique de la levure ainsi que dans les expériences de CoIP.

V.4 Matériels et méthodes

V.4.1 Milieux de culture

Les milieux synthétiques utilisés pour la croissance des levures sont composés de 0,67% (p/v) de yeast nitrogen base supplémentés en sulfate d'ammonium (YNB, MP Bio) sans aa, 2% (p/v) de glucose (Glc), de galactose (Gal), de glycérol (Gly) ou de sucrose (Suc) et 0,08% (p/v) et d'une quantité appropriée d'une mixture d'acide aminé (MP Bio). Les milieux riches YPD sont composés de 20 g de peptone, 10 g de yeast extract, et de 20 g de glucose. Tous les milieux solides contiennent 2% (p/v) d'agar.

V.4.2 Acquisition des images par microscopie et marquage au FM4-64

Toutes les cellules ont été cultivées dans des milieux synthétiques appropriés tenant compte des marqueurs d'auxotrophie jusqu'en phase exponentielle de croissance. Une aliquote de 1 mL de cellules entre 0,5-1 DO_{600nm} sont centrifugées à 1500 ×g pendant 1 min à température ambiante puis reprises dans 50 µL d'YPD frais additionné de 4 µL de FM4-64 (200 µM stock, Life Technologies). Les cellules sont incubées pendant 5 ou 15 min à 30 °C sous agitation puis lavées par ajout de 500 µL d'YPD, centrifugées 1 min à 1500 ×g à température ambiante. Le culot est repris dans 50-100 µL de milieu synthétique approprié et les cellules sont à nouveau incubées 15 min à 30 °C. Les cellules ont ensuite été observées au microscope à épifluorescence AXIO Observer d1 (ZEISS) et les images ont été traitées par le programme Image J.

Les mitochondries ont été marquées au MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen). Un µL de MitoTracker (200nM stock) est ajouté à une aliquote de 1 mL de chaque culture puis les cellules sont incubées pendant 20 min à 30 °C sous agitation. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1600×g pendant 2 min puis resuspendues dans du milieu frais, déposées entre lame et lamelle et observées au microscope à épifluorescence AXIO Observer d1 (ZEISS) et les images ont été traitées par le programme Image J.

V.4.3 Extraits protéiques total de levure et fractionnement subcellulaire

A partir de 50 mL de cultures de levures effectuées en milieu synthétique, les cellules sont reprises dans 2 mL de tampon de broyage (100 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 150 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA) supplémenté d'inhibiteurs de protéases « cOmplete, Mini, EDTA-free » (chymotrypsine, thermolysine, papaïne, trypsine, extrait pancréatique, ROCHE). L'extrait est transféré dans des tubes 2 mL contenant un volume des billes de verre égal au volume sec de cellules. Les cellules sont lysées par agitation dans un FastPrep (6 cycles de 6 m/s pendant 30 secondes). L'extrait protéique total est

obtenu par sédimentation des débris cellulaires 5 min à 430 ×g à température ambiante (TA) puis le surnageant est centrifugé 2 h à 105000 ×g à 4 °C. La concentration relative en protéine est mesurée au réactif de Bradford (Roti-NanoQuant, ROTH) à A_{595nm}.

Pour les fractionnements subcellulaires, 100 mL de cellules ont été cultivées dans du milieu SC approprié, centrifugées 4 min à 1600 ×g à température ambiante puis resuspendues dans 10 mL de tampon de lyse froid (20 mM Hepes KOH pH 6,8, 150 mM KoAc, 10 mM MgCl₂, 250 mM sorbitol, inhibiteur de protéases). L'opération est renouvelée puis les cellules sont resuspendues dans 1 mL de tampon de lyse froid, transférées dans un tube comprenant 1/3 du volume en billes de verre puis lysées à la FastPrep (MP Bio ; 6,5 m/s, 5 × 30 s, 4 min dans la glace entre chaque cycle). Les cellules sont transférées dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 mL puis centrifugées à 300 ×g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube puis centrifugé à 500 ×g pendant 5 min à 4 °C, le culot est repris dans 200 µL de tampon de lyse (P5) pour des expériences d'immunolocalisations et une aliquote de 100 µL du surnageant (S5) est également conservée, le reste à nouveau centrifugée à 13000 ×g pendant 10 min à 4 °C. Le culot (P13) est repris dans 100 µL de tampon de lyse pour les expériences d'immunolocalisations tandis que le surnageant (S13) est transféré dans un nouveau tube et centrifugé 1 h à 100000 ×g à 4 °C. Le surnageant (S100) est conservé et le culot (P100) est repris dans 50 µL de tampon de lyse.

V.4.4 Tests de croissance en gouttes

Des cultures de 10 mL de chaque souche sont réalisées et les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} entre 0,8-1), culotées et diluées dans 1 mL d'eau à DO_{600nm} = 0,5 puis 5 dilutions en séries de 10 en 10 sont réalisées. Pour chaque souche, 7 µL de chaque dilution est déposée sur milieux synthétiques et incubée 2 à 4 jours à 30 °C.

V.4.5 Tests de sécrétion CPY

Les souches sont déposées sur milieux synthétiques comme lors des tests en gouttes, recouvertes d'une membrane de PVDF et incubées 2 à 4 jours à 30 °C. La membrane est ensuite passée dans un bain d'eau (afin de retirer les cellules encore adsorbées), puis traitée comme au cours de western blot (blocage-anticorps primaire-anticorps secondaire-lavages). La présence de CPY sécrétée est révélée par western blot dirigé contre la CPY sur la membrane, car seules les protéines sécrétées y sont adsorbées.

V.4.6 Immunodétection

Les expériences d'immunodétection ont été réalisées en utilisant 10-15 µg d'extraits protéiques séparés sur gel SDS-PAGE 10 ou 12% puis transférés sur membrane PVDF (Trans-Blot BioRad). La présence de la Pgkp est révélée par un anticorps monoclonal de souris anti-Pgkp (1:5 000), celle de Vps28p par un anticorps polyclonal de chèvre anti-Vps28p (1:1000, Molecular probes), Vps27p par un anticorps polyclonal de lapin anti-Vps27p (1:2000, Molecular probes) et celle de la GFP par anticorps monoclonal de souris anti-GFP (1 :10000). La CPY est révélée grâce à l'utilisation d'un anticorps polyclonal de souris anti-CPY (1 : 5000). La détection des anticorps primaires est réalisée en utilisant des anticorps secondaires anti-souris (1 : 5000 ou 1 : 10000), anti-lapin (1 : 10000) ou anti-chèvre (1 : 5000) couplés à la HRP puis révélés par l'ECL-plus (BioRad) selon les instructions du fournisseur.

V.4.7 Co-immunoprécipitation

Deux litres de culture de cellules exprimant Cex1p-HA ont été cultivés en SCGlc 2% jusqu'en respiration, culottés pendant 5 min à 4 100 ×g à température ambiante. Le culot est ensuite resuspendu dans 1 volume de tampon de lyse (100 mM Tris-HCl pH 7,2 ; 100 mM NaCl ; 0,5 mM β-mercaptoéthanol) pour un volume de cellule, et les cellules sont cassées par FastPrep (MP Bio ; 6,5 m/s, 5 × 30 s , 4min dans la glace entre chaque cycle), puis additionnées de 0,5 % (v/v) de NP40 et incubées 30 min dans de la glace (afin de dissoudre les membranes). Les débris cellulaires et résidus de membranes sont ensuite culottés à 500 ×g pendant 5 min à 4 °C et le surnageant est récupéré puis additionné de 2,5 µL d'anticorps polyclonal de lapin anti-HA (0,56 µg/µL ; Sigma-Aldrich). Après 2 h d'incubation à 4 °C sous rotation, l'extrait protéique est mis en présence de 100 µL de billes magnétiques couplées à la protéine A (Protéin A mag sepharose XTRA ; GE Healthcare) préalablement équilibrées dans le tampon de lyse, puis incubée sur la nuit à 4 °C sous rotation. Les billes sont récupérées grâce à l'utilisation d'un portoir aimanté et le surnageant est retiré, les billes sont ensuite lavées 2 fois avec du tampon de lavage (100 mM Tris-HCl pH 7,2 ; 100 mM NaCl) puis les billes sont resuspendues dans 50 µL de bleu de charge et bouillies 3 min à 95 °C. Le surnageant comprenant les protéines purifiées est séparé des billes par magnétisme et le surnageant ainsi récupéré est directement utilisé pour la spectrométrie de masse. Une aliquote de 10 µL est conservée pour réaliser un gel SDS-PAGE coloré à l'argent (ProteoSilver, Sigma-Aldrich) afin de vérifier que la purification c'est bien déroulée. Pour les témoins, les mêmes procédures ont été appliquées à des cellules cultivées dans les mêmes conditions n'exprimant aucune protéine fusionnée à l'étiquette HA.

V.4.8 Spectrométrie de masse

Les analyses par nano-LC-MS/MS ont été faites comme décrites dans la section Matériels et méthodes de l'Article 1.

V.4.9 Extraction des ARNm et qPCR

Toutes les purifications, transcription reverse et qPCR ont été réalisées comme décrites dans la section Matériels et méthodes de l'Article 1.

Partie VI

Discussion générale

Comme je l'ai exposé dans ce manuscrit, mon travail de thèse a porté sur l'étude des fonctions non canoniques de protéines appartenant à la machinerie traductionnelle de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Mon projet principal a permis de mettre en évidence le caractère dynamique du complexe AME au cours de l'adaptation de la levure au métabolisme respiratoire (transition diauxique), et d'identifier une localisation et une fonction non canonique et insoupçonnée de la MRS. En effet, en plus de son activité cytoplasmique d'aminacylation de l'ARNt^M, la MRS est importée dans le noyau pour réguler la transcription d'un certain nombre de gènes des complexes III et V de la CR mitochondriale. Plus globalement cette étude montre que la dynamique du complexe AME est directement liée au métabolisme de la levure, et que le relarguage synchronisé des deux aaRSs au cours de la transition diauxique permet de coordonner l'expression et l'assemblage de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire, essentielle à l'adaptation au métabolisme respiratoire. Mon travail montre que le complexe AME participe au dialogue inter-génomique nécessaire entre le génome nucléaire et mitochondrial pour obtenir l'expression des sous-unités de ces complexes de la CR avec la stoechiométrie requise. Comme c'est le désassemblage synchrone d'un complexe cytoplasmique (AME) qui permet de coordonner l'expression synchrone des 2 génomes, on peut considérer qu'il s'agit là d'un nouveau type de dialogue nucléo-mitochondrial indépendant de tout signal provenant des organites et contrastant donc avec les voies antéro- et rétrograde habituellement citées pour décrire ce type de dialogue. Ce que montre également mon travail de thèse c'est que ce dialogue repose non seulement sur un désassemblage synchrone du complexe AME mais également sur les fonctions additionnelles qu'exercent la MRS dans le noyau et l'ERS dans la mitochondrie.

Je me suis également intéressé au(x) possible(s) rôle(s) du variant transcriptionnel de l'EPRS chez les mammifères appelé EPRS^{N1}. Ce variant est exprimé dans des cellules myéloïdes au cours de la réponse inflammatoire après traitement aux interférons- γ et se lie de manière spécifique aux éléments GAIT présents dans la région 3'UTR de certains ARNm pour contrecarrer l'action du complexe GAIT et permettre à une faible proportion d'ARNm codant des protéines impliquées dans la réponse anti-inflammatoire d'être traduite. Comme l'EPRS^{N1} est également exprimée dans d'autres tissus sans être stimulé par l'interférons- γ , nous nous sommes demandé si elle ne pouvait pas avoir une fonction additionnelle dans la cellule. Sa ressemblance avec l'ERS de levure a orienté notre recherche sur la présence potentielle de l'EPRS^{N1} dans les mitochondries humaine. A l'aide de différentes méthodes, nous avons pu démontrer que l'EPRS^{N1} se localise dans les mitochondries de cellules HeLa, mais nous n'avons pas encore identifié le rôle qu'elle pouvait y jouer. C'est pourquoi nous avons transposé notre étude chez la levure et remplacé le gène de l'ERS de levure par expression ectopique du gène de l'EPRS^{N1}. De cette manière nous avons pu montrer que l'EPRS^{N1} complète l'absence de l'ERS de levure en fermentation et en respiration. Cela nous indique, certes indirectement, qu'en plus de glutamyliser le ϵ ARNt^E dans le cytoplasme, l'EPRS^{N1} mésacycle le m ARNt^Q. Cela prouve que l'EPRS^{N1} participe chez la levure à la voie indirecte de transamidation impliquant une AdT

mitochondriale de type GatFAB. Nous pouvons imaginer que chez l'humain, l'EPRS^{NI} participe également à la formation du Q_{-mt}-ARNt^Q par voie de transamidation. Cela constitue en soi une nouvelle fonction non canonique pour l'EPRS^{NI} qu'il reste néanmoins à prouver dans les cellules humaines.

Les aaRSs ne sont pas les seules protéines à exercer des fonctions additionnelles dans la cellule, même s'il est vrai qu'en la matière elles sont probablement les plus étudiées. Chez la levure, la protéine Snf7p a été identifiée comme un membre de la voie ESCRT (**E**ndosomal **S**orting **C**omplex **R**equired for **T**ransport) impliquée dans la formation d'endosomes multi-vésiculaires (Babst et al., 2002). Snf7p joue également le rôle de facteur de transcription pour activer l'expression de Rim101p, un facteur de transcription de la voie Rim mise en place au cours de l'adaptation à un pH alcalin (Weiss et al., 2008, 2009). Une fraction de Snf7p participant à la voie ESCRT est recrutée pour participer à la voie Rim, et cette dichotomie semble être possible grâce aux différentes interactions faites par Snf7p (Obara and Kihara, 2014). Aucune étude n'a pour le moment mis en évidence de modification(s) post-traductionnelle(s) susceptible(s) d'orienter Snf7p vers un partenaire particulier de la voie RIM (**R**egulator of **I**ME2) ou ESCRT. L'héxokinase 2 est un autre exemple de protéine possédant une fonction non canonique. Cette enzyme est la première kinase du cycle de la glycolyse et permet de phosphoryler le glucose générant ainsi du glucose-6-phosphate (Herrero et al., 1995). Mais lorsque la quantité de glucose devient limitante dans la cellule, Hxk2p est importée dans le noyau en complexe avec le facteur de transcription Mig1p et joue le rôle d'un facteur de transcription pour réguler l'expression de gènes du métabolisme du glucose (Ahuatzi et al., 2004; Rodriguez et al., 2001). Le transport nucléo-cytoplasmique d'Hxk2p est régulé par la phosphorylation de la Ser₁₄, reconnue par l'importine Kap60p et l'exportine Xpo1p pour son transport nucléo-cytoplasmique (Fernandez-Garcia et al., 2012).

Au cours de ma thèse je me suis également intéressé à une protéine identifiée comme un facteur d'export des aa-ARNts chez la levure, nommée Cex1p. Nous avons pu montrer, grâce à une panoplie de méthodes de biologie moléculaire et cellulaire, que Cex1p participe également au trafficking intracellulaire et semble être impliquée dans les événements de fusion/fission vacuolaire ainsi que dans le transport des vacuoles vers la cellule fille au cours du bourgeonnement. Ce rôle additionnel a été identifié en respiration et n'exclut pas que Cex1p puisse effectuer sa fonction d'export de l'aa-ARNt simultanément dans la cellule.

Plus globalement, l'étude des rôles additionnels des protéines est d'une grande importance puisqu'elle nous permet, dans certains cas, d'intégrer différentes voies de régulation qui ne semble pas toujours connectées entre elles, et donc de comprendre comment la cellule s'adapte en réponse à différents stimuli. Ces études mèneront peut être à une meilleure compréhension du rôle de certaines modifications post-traductionnelles dans le recrutement de ces protéines et la formation de complexes multi-protéiques. Un des exemples qu'il me faut vous mentionner à ce propos est celui des

domaines kinase-like chez la levure, qui commencent à être étudié qui nous révèle de nouveau types d'interaction et de coopération entre différents domaines (domaines déadénylase et pseudokinase dans le complexe Pan2-Pan3).

Comme nous l'avons vu, les protéines n'exercent pas forcément leurs deux fonctions simultanément dans la cellule, et la fonction additionnelle peut être « activée » en réponse à un stimulus externe à la cellule (cytokine, source nutritionnelle...) ou interne (dommage à l'ADN, carence en aa...). La (les) condition(s) dans laquelle l'étude est réalisée est donc un des paramètres primordial pour pouvoir identifier et analyser ces fonctions additionnelles.

Ce type d'études (la recherche/identification de fonctions additionnelles) reflète l'importance de mener des expériences selon une stratégie sans *a priori*, c'est-à-dire sans chercher à prouver une hypothèse préconçue. Elles nous sensibilisent aussi sur la grande diversité de destinations subcellulaires et de fonctions alternatives encore insoupçonnées et non moins essentielles que peuvent avoir un certain nombre de protéines considérées comme protéines de ménage.

Annexes

Articles

Article 2

**Idiosyncrasies in decoding
mitochondrial genomes**



Review

Idiosyncrasies in decoding mitochondrial genomes



Jonathan L. Huot^{a,1}, Ludovic Enkler^{a,1}, Cyrille Megel^c, Loukmane Karim^b,
Daphné Laporte^a, Hubert D. Becker^{a,*}, Anne-Marie Duchêne^c, Marie Sissler^{b,*},
Laurence Maréchal-Drouard^{c,*}

^a Unité Mixte de Recherche 7156, Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, CNRS, Université de Strasbourg, 21, rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

^b Architecture et Réactivité de l'ARN, IBMC, CNRS, conventionné avec l'Université de Strasbourg, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

^c Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, IBMP, CNRS, conventionné avec l'Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2013

Accepted 6 January 2014

Available online 16 January 2014

Keywords:

Mitochondria

Codon usage

Transfer RNA

Aminoacyl-tRNA synthetase

ABSTRACT

Mitochondria originate from the α -proteobacterial domain of life. Since this unique event occurred, mitochondrial genomes of protozoans, fungi, plants and metazoans have highly derived and diverged away from the common ancestral DNA. These resulting genomes highly differ from one another, but all present-day mitochondrial DNAs have a very reduced coding capacity. Strikingly however, ATP production coupled to electron transport and translation of mitochondrial proteins are the two common functions retained in all mitochondrial DNAs. Paradoxically, most components essential for these two functions are now expressed from nuclear genes. Understanding how mitochondrial translation evolved in various eukaryotic models is essential to acquire new knowledge of mitochondrial genome expression. In this review, we provide a thorough analysis of the idiosyncrasies of mitochondrial translation as they occur between organisms. We address this by looking at mitochondrial codon usage and tRNA content. Then, we look at the aminoacyl-tRNA-forming enzymes in terms of peculiarities, dual origin, and alternate function(s). Finally we give examples of the atypical structural properties of mitochondrial tRNAs found in some organisms and the resulting adaptive tRNA-protein partnership.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

In most eukaryotes, mitochondrial (mt) translation is of bacterial type but a certain degree of variation and adaptation has occurred during evolution. While the endosymbiotic genome likely encoded all components of the translational apparatus, genome wide analysis shows that mt DNA has kept only a minimal set of elements (mainly genes encoding a few respiratory chain proteins and rRNAs), but differences can be observed between species [1]. Nevertheless, mitochondria have retained a functional translational apparatus, meaning that almost all genes encoding mt ribosomal proteins, aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs), tRNAs and other translation-related factors were transferred to the nuclear genome. Once translated in the cytosol, these missing mt-encoded products must be imported into the organelle.

Evolutionarily, most components of the mt translation machinery have a bacterial origin and can often be experimentally

replaced by bacterial homologs. However, rapid evolution of the mt genomes, numerous post-endosymbiotic lateral gene transfer events (e.g. Ref. [2]) as well as an increased flexibility of mt enzymes and tRNAs can make these replacements difficult. For instance, in the case of mt tRNAs from metazoans, significant changes in tertiary structure likely require adaptation of the mt translation machinery (e.g. [3]). In addition, nucleus-encoded proteins and RNAs of eukaryotic origin, including many tRNAs, are imported into mitochondria where they also cause divergence from the bacterial "norm" of translation [4]. This presents major drawbacks when trying to establish eukaryotic models for the study of mt functions. The experimental advantages of using eukaryotic models such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the land plant *Arabidopsis thaliana* or human cells to study mt dysfunction (in particular respiratory dysfunction) are evident, but require a thorough understanding of the idiosyncrasies of mt translation as they occur between organisms.

To this end, we sought to highlight here unconventional properties of mt translation from different kingdoms of the eukaryotic tree of life (protozoans, fungi, plants and metazoans). We address

* Corresponding authors.

E-mail address: laurence.drouard@ibmp-cnrs.unistra.fr (L. Maréchal-Drouard).

¹ These authors are considered as co-first authors.

this by looking at mt codon usage, and mitochondrion-encoded tRNAs and their peculiarities. We also describe strategies used by species to express mt aaRSs or other aa-tRNA-forming enzymes, as well as the alternative roles of these enzymes.

2. Alternate codon usage

Of the ways in which mt translation differs from the bacterial or cytosolic (cyto) processes, the use of unique genetic codes may be the most familiar. The aaRSs, which determine what tRNAs (and anticodons) are paired with which amino acid (aa), are the molecular embodiment of the genetic code. Once formed, and if recruited by an elongation factor, the identity of the aa moiety of an aminoacyl-tRNA is no longer recognized. This may sometimes cause missense mutations, but it also allows suppression and codon reassignment, which occur at a higher rate in metazoan mitochondria for example. Codon usage is tied to tRNA availability: either the tRNA pool drives codon usage, or codon usage is determined by other factors and changes in the tRNA pool follow suit. Studying codon usage gives considerable insight into which tRNAs are used in mitochondria, and sometimes into their origin.

The number of tRNA genes encoded in the mt genome among related species follows broad trends, with many exceptions (see below for more details, [5–7]). In protozoan species that have been extensively studied, it is typical for the mt genome to have lost several tRNA-coding genes. The loss of mt tRNA genes must therefore be compensated by the import of nucleus-encoded tRNA species [4,8]. In Metazoa, the situation is more complex, but in higher Metazoa the trend is toward the conservation of a single mitochondrion-encoded tRNA for every aa, except leucine and serine, which have two tRNAs. In both these groups, codon usage seems likely to be biased toward those synonymous codons, which can be decoded by a single tRNA for every codon box (a codon box is defined as the set of four triplets sharing the first two nucleotides), which explains the presence of two isoacceptors for Leu and for Ser. While Arg normally also occupies two codon boxes, it has been recently demonstrated that the rare Arg AGA/AGG codons are not used. Instead, a very elegant work from Temperley et al. [9] demonstrated that, in the presence of these codons (and in the absence of any possible tRNA^{Arg}), with human mt ribosomes a frameshift occurs resulting in the positioning of a universal UAG stop codon. In plant mitochondria, broadly speaking, between 30 and 50% of the mitochondrion-encoded tRNA genes are well conserved, and sometimes present in more than one copy per codon. This is coupled with the import of several nucleus-encoded tRNA species [8]. How this may influence their codon usage in relation to Protozoa and Metazoa is a complex question.

Pressures defining synonymous codon usage can be pre-translational, such as mRNA secondary structure, abundance, and stability [10–12], and such as the GC-content of the genome [13,14]. These pressures can also be post-transcriptional, like repeating synonymous codon usage in order to maximize tRNA recycling [15], or a 5' stretch of codons enhancing ribosome “ramp up” shortly after initiation [16]. All of these factors as well as the number of tRNAs available for the decoding of mt genes may vary strongly between different species, but all have retained a translational apparatus tuned to the expression of a small number of genes. The most conserved of these are the respiratory chain proteins of which cytochrome *b* (Cytb) and cytochrome *c* oxidase subunit one (Cox1) are the only genes present in all known mt genomes. The proteins encoded by these genes are hydrophobic, at least transiently membrane-bound, and coordinate the binding of cofactors. These characteristics, in particular strong hydrophobicity, have been hypothesized as having selected these proteins for retention of the corresponding genes in the mt DNA. If these proteins are translated

from nucleus-encoded genes it will require import of the pre-proteins into mitochondria that can be impeded by their strong hydrophobicity, particularly in trans-membrane helices [17–19].

When comparing codon usage between diverse organisms, the value of each of those codons, whether it codes for an aa, a stop, or a start, does not need to be known in order to gain insights into mt translation. So long as coding DNA sequences are known, large scale surveys of codon usage can serve as a guide for further work, as shown here with a surface plot representation of three genes from ten species (Fig. 1). The coding DNA sequences for Cytb, Cox1 and for the nucleus-encoded cytochrome *c* subunit 1 (Cyt1) were obtained (GenBank, PlasmDB, PlantGDB), and their codon usage values calculated using available programs (www.GeneInfinity.org; www.kazusa.or.jp/codon/). Trends are sufficiently conserved among different species for those who diverge from this rough consensus to be readily apparent. The relevance of this type of data representation is demonstrable by how it visually flags idiosyncrasies previously described experimentally. For example, the fact that tRNA^{Leu}_{CAA} in *Chlamydomonas reinhardtii* is a nucleus-encoded tRNA mostly present in mitochondria [20], is likely related to the prevalence of TTG codons in Cox1 and Cytb when compared to Metazoa and Protozoa (Fig. 1, dark gray focus circle). In the mt (maxi-circle) genome of *Leishmania major*, some genes such as Cytb have TAG codons in frame, which do not result in a translational stop [21]. It is possible that this is related to the unusual frequency at which TAG codons occur in *L. major* Cytb when compared to the other organisms surveyed (Fig. 1, light gray focus circle). *Marchantia polymorpha*, *C. reinhardtii* and *A. thaliana* all import a significant number of nucleus-encoded tRNAs, which may explain their partial divergence from codon usage patterns seen in Protozoa and Metazoa. Another aspect that might have influenced codon usage in plant mt genomes is the presence of a second endosymbiotic organelle, the chloroplast. When comparing Protozoa and Metazoa, codon usage is surprisingly well conserved between organisms of these phylae, despite significant differences in the extent of mitochondrion-encoded tRNAs and in mt RNA editing patterns. This is apparent when comparing Cox1 and Cytb to the nucleus-encoded Cyt1, which is one of the components of the same respiratory chain complex in which Cytb participates (complex III). The surface plot of codon usage shows significantly more shifts in codon preference between species in Cyt1 (twists and breaks in the intensity ridges perpendicular to the X-axis) than in Cox1 and Cytb, despite well-conserved aa content for all three proteins. The survey presented also reveals other trends, which may guide future work.

3. Peculiarities of mitochondrial tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases

3.1. Mitochondrion-encoded versus nucleus-encoded mitochondrial tRNAs

Since genome sequencing has become commonplace, data on complete mt genomes have steadily increased for a wide range of evolutionarily divergent organisms. In theory, bioinformatics tools allow identification of the set of mitochondrion-encoded tRNA genes in each of these organisms. In practice, this is not always an easy task as several parameters may interfere with tRNA identification and with the characterization of the minimal set of tRNA genes required for mt translation to occur. Among them, we can cite: unknown codon/anticodon rules, deviation from the universal genetic code, post-transcriptional modification such as editing that changes the decoding properties of the tRNA molecule, “bizarre” tRNAs with unconventional cloverleaf secondary structure, which can escape detection [22,23]. Nevertheless, it has become clear that the number of mt tRNA genes varies between organisms, and that

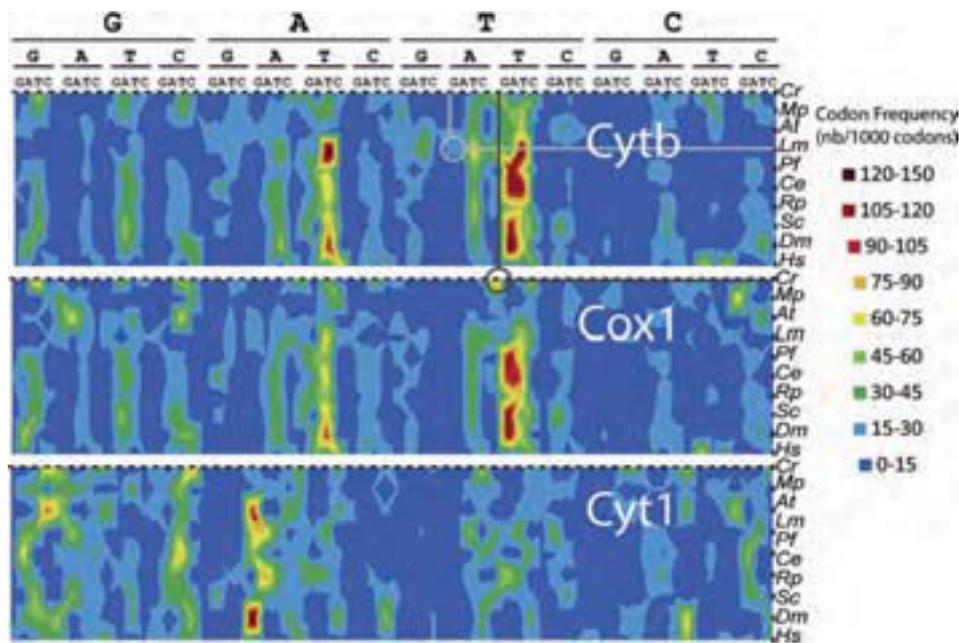


Fig. 1. A small survey of codon usage for three respiratory chain proteins across diverse genera. Organisms surveyed were *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Marchantia polymorpha* (Mp), *Arabidopsis thaliana* (At), *Rickettsia prowazekii* (Rp), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Homo sapiens* (Hs), *Plasmodium falciparum* (Pf), *Leishmania major* (Lm). Proteins surveyed were the mitochondrion-encoded cytochrome b (Cytb), and cytochrome c oxidase subunit 1 (Cox1), as well as the nuclear-encoded cytochrome c subunit 1 (Cyt1). The prevalence of each codon is shown as a frequency out of 1000 codons in order to account for the length of the polypeptide chain. Frequencies are plotted as points colored according to a nine-level scale of prevalence. The color between each frequency and its neighboring points corresponds to the value of the slope between each pair of points. Continuous intensity of coloration in a ridge perpendicular to the X-axis indicates conservation of codon usage across species: twists in this ridge are caused by bias shifting to codons with different third codon position identities, and breaks are caused by bias shifting toward codons with a different first or second codon position identity. Dark gray and light gray focus circles are examples discussed in Section 2.

those mt tRNA genes missing from the minimal set allowing mt translation must be imported via a correspondingly variable number of nucleus-encoded tRNAs [24]. Indeed, during the last two decades, experimental proof of tRNA mt import has been brought in some organisms and reviews on this topic have been recently written [4,8,25–27]. Major questions that are under debate are the origin of tRNA mt import and the mechanism(s) involved. Here, we only focused our analysis on the great variability of the mt tRNA gene content, and as a consequence, on the potential extent of mt tRNA import in eukaryotes representative of the different kingdoms.

The proto-mitochondrion at the origin of present-day mitochondria likely expressed the full set of mt tRNA genes of the ancestral endosymbiotic α proteobacterium. In contrast to this ancient situation, most mt genomes have now lost at least a few tRNA genes (Fig. 2) [24,27]. From the examples presented in the figure, a few conclusions can be drawn.

- i) The presence of an apparently full set of mt tRNA genes (in some Metazoa, fungi and green algae) is rather an exception. Furthermore, having an apparent full set of mt tRNA genes does not mean mitochondria do not need to import nucleus-encoded tRNAs. An illustration is the import of one of the two cyto tRNA^{Lys} isoacceptors into *S. cerevisiae* mitochondria, which becomes essential under heat stress condition [28].
- ii) Within all taxa, species *a priori* requiring no or mostly no tRNA import are phylogenetically close to species where many mt tRNA genes are missing. For example, in metazoans, as compared to *Caenorhabditis elegans* or *Drosophila melanogaster*, which contain a full set of mt tRNA genes, only 2 tRNAs are expressed from the mt genome of *Metridium senile* and no tRNA genes were found in *Mnemiopsis leidyi* mt DNA.

The same holds true in other clades/taxa (e.g. *S. cerevisiae* versus *Spizellomyces punctatus*) as observed in Fig. 2. Intermediate situations also exist in each kingdom where only a subset of tRNAs are imported.

- iii) On a large evolutionary scale, the loss of mt tRNA genes does not seem to follow a pattern. However, once a specific tRNA gene is lost in a certain organism, it is not recovered afterward (see *Cycas* and related species). To ensure an active mt translation, the loss of a mt tRNA must be preceded by the import of its cyto counterpart. Importantly, once imported, this eukaryotic cyto tRNA needs to be functional in a prokaryotic translational environment. This may strongly limit the loss of some tRNA genes with prokaryotic features. Mt genes encoding tRNA^{Thr} are the ones disappearing the most easily while genes encoding tRNA^{Met} and tRNA^{Trp} seem to be more efficiently retained. Whether these observations reflect biological constraints remains to be elucidated.
- iv) The lack of mt tRNA genes is well described in the literature, but the loss of tRNA genes in chloroplasts, the second endosymbiotic organelle present in plants and *apicomplexans*, is less described. In photosynthetic plants, a full set of plastidial tRNA genes is found. By contrast, as briefly mentioned in Fig. 2, the number of plastidial tRNA genes is highly reduced in nonphotosynthetic parasitic plants such as *Epifagus virginiana* or *Rhizanthella gardneri*.

While import of mt proteins is believed to have a monophyletic origin, the origin of tRNA mt import is still under debate. On one hand, looking at the above observations on evolutionary divergent organisms suggests that the process of tRNA import has been created independently many times over the course of eukaryotic evolution, a hypothesis already raised a few years ago [4]. On the other hand, an attractive proposal is that a cryptic RNA import

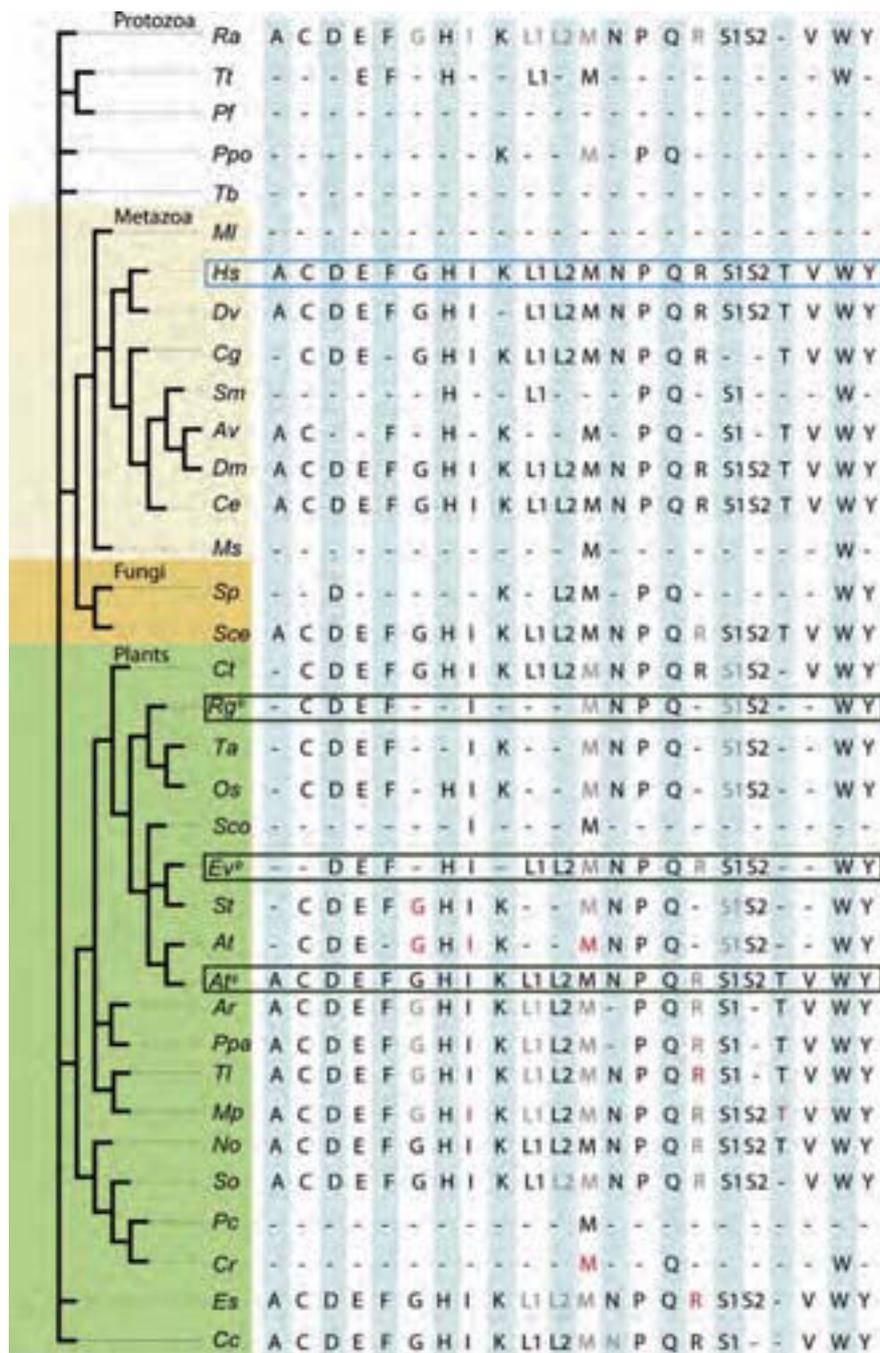


Fig. 2. Transfer RNA genes encoded by mitochondrial genomes of evolutionary divergent organisms. Only a few examples representative of the situation are given. The set of 22 mt tRNA genes of *Homo sapiens* was taken as arbitrary reference (blue frame). Amino acids in gray or green indicate that 2 or 3 isoacceptor tRNA genes respectively are mitochondrion-encoded and necessary to decode all codons of the family and ensure mt translation. Amino acids in red indicate that one isoacceptor tRNA is missing to carry out mt translation. *Hs*, *Homo sapiens* (J01415); *Dv*, *Didelphis virginiana* (Z29573); *Dm*, *Drosophila melanogaster* (U37541); *Ce*, *Caenorhabditis elegans* (U37541); *Srn*, *Steganacarus magnus* (EU935607); *Av*, *Armadillidium vulgare* (EU935607); *Cg*, *Crassostrea gigas* (AF177226); *Ms*, *Metridium senile* (AF000023); *MI*, *Mnemiopsis leidyi* (JF760210); *Scs*, *Saccharomyces cerevisiae* (AJ011856); *Sp*, *Spizellomyces punctatus* (AF404303; AF404304; AF404305); *Ppo*, *Physarum polycephalum* (AB027295); *Tt*, *Tetrahymena thermophila* (AB027295); *Ra*, *Reclinomonas americana* (AF007261); *Tb*, *Trypanosoma brucei* [126]; *Pf*, *Plasmodium falciparum* (AJ276845); *Cr*, *Chlamydomonas reinhartii* (AJ276845); *Pc*, *Polytomella capuana* (EF645804); *Nephroselmis olivacea* (AF110138); *So*, *Scenedesmus obliquus* (AF204057); *Es*, *Ectocarpus siliculosus* (FP885846); *Cc*, *Chondrus crispus* (Z47547); *Ppa*, *Physcomitrella patens* (AB251495); *Mp*, *Marchantia polymorpha* (M68929); *Ar*, *Anomodon rugelii* (JF973314); *Tl*, *Treubia lacunosa* (JF973315); *Ct*, *Cycas taitungensis* (AP009381); *At*, *Arabidopsis thaliana* (Y08501); *St*, *Solanum tuberosum* (L. Maréchal-Drouard, personal communication); *Sco*, *Silene conica* [127]; *Ta*, *Triticum aestivum* (AP008982); *Os*, *Oryza sativa* (BA000029). The tRNA genes encoded by *Rg^p* (*Rhizanthella gardneri*, NC_014874), *Ev^p* (*Epifagus virginiana*, NC_014874) and *At^p* (NC_000932) plastidial genomes are framed in green.

machinery was created very early during the evolution of the proto-mitochondria (as a matter of fact, the protist *Reclinomonas americana* has already lost mt tRNA^{Thr} genes) or even was pre-existing in the ancestral endosymbiotic bacteria, meaning in that case that mt tRNA import is monophyletic. Under evolutionary

pressure, this cryptic machinery could be activated, and could also evolve. If this happens independently in different eukaryotic organisms, from a monophyletic cryptic machinery, the acquisition of various additional import factors can be envisaged. A similar hypothesis is also applicable to the case of plastidial tRNA import. Our

present knowledge does not allow discrimination between the poly- or monophyletic evolutionary status of tRNA mt import. Deciphering import machineries from phylogenetically distant organisms is essential to answer this question. Experimental evidence from *S. cerevisiae*, plant and *Trypanosoma brucei* shows that tRNA import requires factors of the protein import machinery. Although this may suggest that some of these factors are the common bricks of the cryptic machinery, information is still too fragmentary and controversial today to draw a conclusion.

3.2. Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases

3.2.1. In photosynthetic organisms and apicomplexans

Over the course of eukaryotic evolution, a first endosymbiotic event led to mitochondria. In plants, subsequent endosymbioses led to chloroplasts and derivatives. Most plastids originate from the endosymbiotic acquisition of a cyanobacterium by a primitive eukaryote. Other plastids originate from the endosymbiosis of a green or red alga into an eukaryote. This is for example the case of apicoplasts in *Apicomplexa* [29]. In plants, algae and apicomplexans, translation occurs in all three compartments: the cytosol, the mitochondrion and the plastid (or relic of plastid). So, all of the components needed for translation should be found in these three compartments. In particular three complete sets of aminoacylated tRNAs have to be generated, implying the need for three complete sets of tRNAs and aaRSs (sixty aaRS activities are thus expected per organism).

The first observation is that all aaRS genes originating from the primitive organellar genomes have been lost or transferred into the nucleus, and all aaRS genes are now localized in the nucleus [2]. The second observation is that the number of putative aaRSs never reaches 60 (Table 1), suggesting that some enzymes are shared

between two or three compartments. Among the analysed organisms, the highest number of aaRS genes is found in *Oryza sativa* (53 aaRS genes [30]), and the lowest in *C. reinhardtii* with 33 aaRS genes [6].

The 30 to 50 aaRS genes are distributed so that the most frequent situation is the existence of two aaRSs per aa (70% of aa-aaRS couples, Table 1). In a few cases (15%) only one aaRS has been identified per aa, and in other cases (15%) 3 or 4 aaRS were found per aa. No particular bias was observed at the level of aa, with the notable exception of Gln. In most of the mentioned organisms, only one GlnRS gene is found, probably because Gln-tRNA^{Gln} can be formed by two pathways. In *A. thaliana* cyto tRNAs^{Gln} are charged by cyto GlnRS (direct pathway), but organellar Gln-tRNAs^{Gln} are formed by an indirect transamidation pathway. In mitochondria and chloroplasts, tRNAs^{Gln} are first charged with glutamate by a non-discriminating GluRS, then are converted into Gln-tRNA^{Gln} by a tRNA-dependent amidotransferase (AdT). Both the non-discriminating GluRS and the three AdT subunits are dual imported into mitochondria and chloroplasts [31,32]. AdT subunits have been identified in all the analysed organisms (Table 1), suggesting that the transamidation pathway is functional in one or the other cellular compartment.

The number of aaRSs is particularly high in land plants (*O. sativa*, *A. thaliana*, *Physcomitrella patens*). In these plants, 3 or 4 aaRS genes per aa are often found (Table 1). AaRS localization has been extensively studied in *A. thaliana*. In this plant, synthesis from the same gene of two isoforms that only differ by the presence of a mt targeting sequence (MTS) prior to import, appears to be a general rule (also referred herein as “dual targeting”). Among the 24 identified organellar aaRSs, 17 are shared between mitochondria and plastids, 4 are shared between cytosol and mitochondria, and probably 2 are shared between the 3 compartments (Fig. 3A)

Table 1

Number of aaRS subunits per aa in a few organisms with 3 translating compartments. Amino acids are indicated with the one-letter code. The blue background refers to 3 or 4 aaRS genes, the light brown to 2 genes, and the green background to one unique gene. For PheRSs, one type is composed of one subunit, the other is tetrameric(α2β2) yes: at least one out of the 3 AdT subunits has been identified. Os *Oryza sativa japonica*, At *Arabidopsis thaliana*, Pp *Physcomitrella patens*, Es *Ectocarpus siliculosus*, Cr *Chlamydomonas reinhardtii*, Ot *Ostreococcus tauri*, Pt *Phaeodactylum tricorutum*, Pf *Plasmodium falciparum*, Tg *Toxoplasma gondii*.

One letter code	Higher plant		Moss	Brown algae	Green algae		Apicomplexa		
	monocot	dicot	Pp	Es	Cr	Ot	Plastid (2ary)	Pf	Tg
	Os	At							
A	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D	2	2	2	2	2	2	2	2	2
E	2	2	2	2	2	2	2	2	2
F	3 (trans)	3 (trans)	3 (trans)	3 (trans)	2 (trans)	3 (trans)	3 (trans)	3 (trans)	3 (trans)
G	2	2	2	2	2	2	2	2	2
H	2	2	2	2	2	2	2	2	2
I	2	2	2	2	2	2	2	2	2
K	2	2	2	2	2	2	2	2	2
L	2	2	2	2	2	2	2	2	2
M	2	2	2	2	2	2	2	2	2
N	2	2	2	2	2	2	2	2	2
P	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Q	2	2	2	2	2	2	2	2	2
R	2	2	2	2	2	2	2	2	2
S	2	2	2	2	2	2	2	2	2
T	2	2	2	2	2	2	2	2	2
V	2	2	2	2	2	2	2	2	2
W	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Y	2	2	2	2	2	2	2	2	2
# aaRS genes	53	45	40	43	33	39	41	36	35
AdT subunits*	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

*The diatom Pt and the apicomplexans Pf and Tg have secondary plastids.

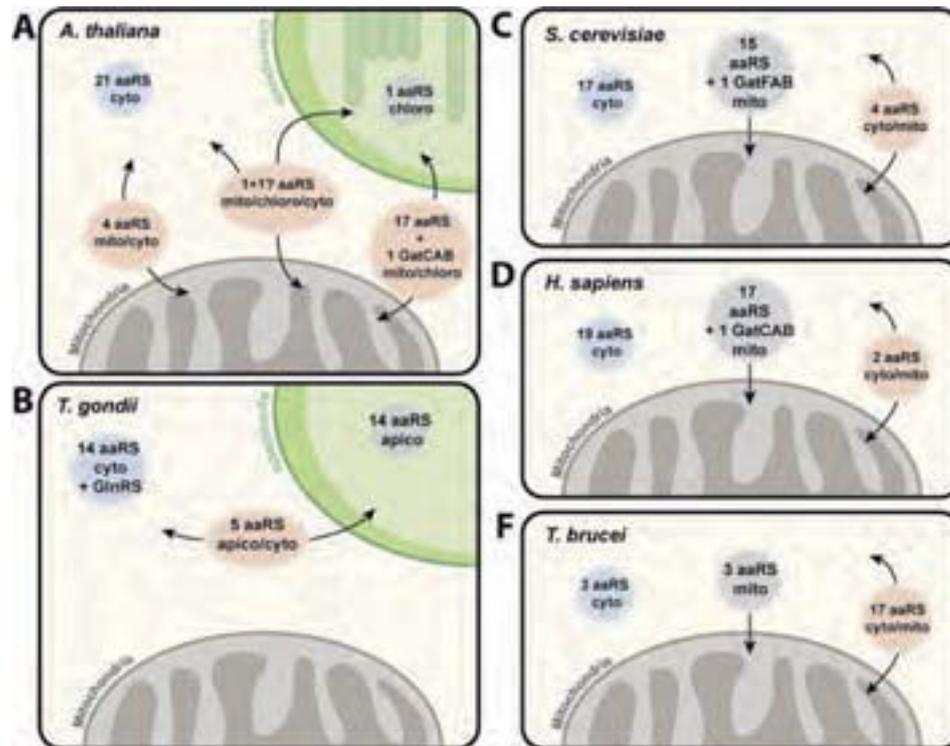


Fig. 3. Aminoacyl-tRNA synthetases (and amidotransferases) localization in *A. thaliana*, *T. gondii*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens* and *T. brucei*. In all these organisms, all the aaRS-encoding genes are localized in the nucleus. A) In *A. thaliana*, most organellar aaRSs are shared between the 2 organelles or between mitochondria and the cytosol. One AlaRS and probably one ArgRS are targeted to the 3 compartments. B) In *T. gondii*, no aaRS have been identified in mitochondria. A few aaRSs are expected to be shared between the cytosol and the apicoplast. But for most of aa, 2 cognate aaRSs have been determined, one potentially targeted to the apicoplast and the other cytosolic. C, D, and E) In *S. cerevisiae*, *H. sapiens* and *T. brucei*, most of the mt aaRSs are encoded by nuclear genes and imported in mitochondria. Some aaRSs are shared between the cytosol and the mitochondria. In *A. thaliana*, *S. cerevisiae* and *H. sapiens*, mt-tRNA^{Gln} is aminoacylated by a non-discriminating GluRS. The misacylated Glu-tRNA^{Gln} is further converted into Gln-tRNA^{Gln} by a tRNA-dependent amidotransferase (AdT) constituted by three subunits (A, B, and either C or F). Thus, these enzymes are named GatCAB or GatFAB.

[27,33–35]. Only 1 was shown to be uniquely chloroplastic, and none to be uniquely mitochondrial. Surprisingly 2 aaRSs with the same aa specificity can also be found in the same compartment, although some of these aaRSs show no aminoacylation activity in the organelle [27,36]. Altogether these results show the complexity of aaRSs localization in *A. thaliana* [37].

In algae, the general situation is also 2 aaRS per aa, suggesting that at least one of these is dual targeted. *C. reinhardtii* appears as an exception because for 8 aa species, a single corresponding aaRS gene was found. *C. reinhardtii* is also the green algae with the lowest tRNA gene content in the mt genome (only 3 tRNA genes, see above). The full set of mt tRNAs is provided by extensive tRNA import from the cytosol [20]. A few aaRSs have been detected in the mitochondrial proteome [38]. These results suggest an extensive sharing of tRNAs and aaRSs between *C. reinhardtii* compartments.

In apicomplexans, even though 2 aaRSs can also be found per aa, the situation is clearly different from that in plants. Translation occurs in the cytosol, mitochondria and the apicoplast but neither tRNAs, nor aaRSs are found in mitochondria [39–42]. Hence it is thought that mt tRNAs are imported from the cytosol in an aminoacylated state. This also implies that aaRSs are shared between the apicoplast and the cytosol (Fig. 3B). For most aa, one cognate aaRS is predicted to be targeted to the apicoplast and the other to the cytosol. A few other aaRSs were shown or are predicted to be dual localized in the cytosol and the apicoplast.

A last example is the unicellular marine algae chlorarachniophytes. This algae has 4 genome-containing compartments due to the presence of a secondary plastid and a relic nucleus derived from the green algal endosymbiont. The relic nucleus, called nucleomorph, is located in a residual cytoplasm named the

periplastidial compartment (PPC). The localization of 3 HisRSs and 2 GlyRSs has been studied in *Bigelowiella natans* [43]. One HisRS was located in the cytosol, the second in the PPC and the third one is dual targeted to mitochondria and plastids. One GlyRS is mt and plastidial, the other one is cyto. None are found in PPC. Moreover the nucleomorph in PPC does not contain tRNA^{Gly} sequences, and import of charged tRNA^{Gly} is suggested [43].

These few examples illustrate the complexity of aaRS localization and sharing in organisms with 3 (or more) translating compartments.

3.2.2. In protozoans, fungi and metazoans

The endosymbiotic origin of mitochondria is still under debate. While phylogeny with the α -proteobacteria can be easily retraced for nucleus-encoded genes of the mt respiratory chain, the ancestral “proto-mitochondrial” aaRS genes *a priori* re-targeted to the nuclear genome do not cluster with the α -proteobacteria clade due to horizontal gene transfer, gene deletion or extensive duplication [2]. When looking at genomes of different metazoans, one can see that the general trend seems to be having 2 genes encoding one cyto and one mt aaRS rather than having one gene encoding both the cyto and mt aaRS. When comparing the fungi *S. cerevisiae*, the mammalian *Homo sapiens* and the trypanosomatid *T. brucei*, cyto and mt aaRS encoded by a single gene are different from species to species. One exception is the Cnidaria *Nematostella vectensis*, which shares features between mammals and trypanosomatids. It only contains 2 putative mt aaRS (mt PheRS and mt TrpRS) genes in the nuclear genome [44]. Consequently, MTSs were identified in every other cyto aaRS, due to their necessity to be dual localized in absence of additional gene encoding the mt aaRSs. This report

demonstrates that some in-between cases exist in which the loss of almost all mt-aARSs is followed by the subsequent acquisition of MTSs in their cyto homologs.

Interestingly, one pathway that remains evolutionarily similar from yeast to higher eukaryotes is the absence of a mt GlnRS and a specific pathway for Gln-tRNA^{Gln} biogenesis. As seen in *A. thaliana*, mt-tRNA^{Gln} is aminoacylated by a non-discriminating GluRS (the mt one in mammals [45], the cyto GluRS in yeast [32]). The misacylated Glu-tRNA^{Gln} is further converted into Gln-tRNA^{Gln} by a tRNA-dependent amido-transferase (AdT) named GatCAB (GatFAB in yeast), even though import of cyto tRNA glutamine has been proposed for yeast and human [46,47]. There is a particularly interesting feature of one of the components of the yeast transamidation pathway with respect to dual cyto and mt localization of aa-tRNA-forming enzymes. The pool of cyto GluRS participating in mt tRNA^{Gln} charging is imported inside the organelle without any additional targeting signal nor processing; meaning that both cyto and mt pools of GluRS originate from the same cyto translational product and have therefore the same exact aa sequence [32].

In the model organism *S. cerevisiae*, aARSs are also encoded by the nuclear genome (Fig. 3C). Commonly, this genome contains one gene coding for the cyto aARS, and another coding for the mt version. This is the case for Trp- [48], Thr- [49], Phe- [50], Leu- [51], Met- [52], Lys- [53], Ile-, Glu-, Arg- [54], Tyr- [55] and AspRS [56]. As for SerRS, ProRS, AsnRS and CysRS they are only shown as putative mt proteins since no work highlighting their real localization was done. But they can also display some differences. For example, cyto PheRS consists of two subunits whereas the mt version has only one subunit and lacks the editing domain [57]. Other exceptions exist: *HTS1* and *VAS1* encode both the cyto and mt HisRS and ValRS respectively [58,59]. These aARSs are encoded by transcripts harboring different 5' ends with two alternative in-frame AUG initiation codons: the shorter variant coding for the cyto enzyme and the longer (harboring the MTS sequence) coding for the mt enzyme, a situation often found in plants. Cyto and mt GlyRS and AlaRS are also encoded both by a single gene, but mt GlyRS and mt AlaRS are subjected to alternative translational start [60,61]. Two genes, *GRS1* and *GRS2*, encode GlyRS, but only *GRS1* encodes the mt and cyto isoforms. *GRS2* has been shown to encode a heat stress inducible GlyRS which is more stable and has a lower K_M value for tRNA^{Gly} than the GlyRS1 at 37 °C [62].

In *H. sapiens*, 17 nuclear genes encode mt aARSs with predicted *bona fide* MTS [63]. These are Met, Leu, Ile, Val, Ser, Pro, Thr, Ala, Tyr, His, Asn, Asp, Glu, Cys, Trp, Phe and Arg (Fig. 3D). It is to be noted that in 2008, Rorbach et al. [64] confirmed *in vivo* that *VARS2* was encoding a mt protein. There are 2 examples of cyto and mt aARSs isoforms encoded by a single nuclear-gene, namely the human mt GlyRS and the human mt LysRS: i) human mt GlyRS is synthesized from an alternative translational initiation [65]; ii) human mt LysRS transcript is subjected to alternative splicing. Upon splicing, the longer variant gives the mt protein whereas the shorter gives the cyto one [66]. This enzyme is further cleaved upon mt import to give the mature human mt LysRS form [67].

Trypanosomatids are an extreme example of gene transfer from mitochondria to the nucleus. As stated above, unlike in eukaryotes, all tRNA genes were transferred to the nuclear genome and this was accompanied, in *T. brucei*, with the transfer of all aARS genes to the nuclear genome. Nevertheless, the nuclear genome of *T. brucei* only encodes for 23 aARSs [68] (Fig. 3E), meaning that almost all aARSs require a strategy to be dual localized. This was well studied in the case of *T. brucei* IleRS, GluRS and GlnRS, where cyto and mt proteins are produced through alternative *trans*-splicing of the messenger RNA. In these cases, the major long variant allows production of the mt form displaying an MTS, the second produces a shorter variant corresponding to the cyto form [46,69]. *T. brucei* mt TrpRS, AspRS

and LysRS are encoded by a specific single gene and are not subjected to any *trans*-splicing or alternative translation-start. Further *in silico* analyses [46], adapted from *in vivo* studies, showed that Asn-, Pro-, Phe(α)-, Ser-, Ala-, Thr-, Met- and CysRS are translated from alternatively spliced mRNAs transcribed from single genes to express both mt and cyto forms. The remaining aARSs (Arg-, Gly-, Val-, Phe(β)-, Leu-, Tyr- and HisRS) display no alternative splicing sites and might rather be subjected to alternative translation start [70,71].

Altogether these data point to the fact that from Trypanosomatids to Metazoans, all aARS genes were transferred from the mt to the nuclear genome. Species then developed their own strategy to express and target each aARS to the mitochondria. This was followed by many re-arrangements leading to the complex situation that we can observe nowadays.

3.2.3. Alternate functions

3.2.3.1. In photosynthetic organisms. Although gene characterization and subcellular localization have been extensively studied in plants, no work has focused on potential alternative functions for plants aARSs inside their respective compartments. The vast diversity of additional functions acquired by aARSs in Metazoa, discussed below, might reflect a similar pattern for plant aARSs. As an example, the GlyRS1 of *A. thaliana* and *Phaseolus vulgaris* is both cyto and mt but is only active for cyto Gly-tRNA^{Gly} formation [36]. The role of this inactive GlyRS1 remains in question, since GlyRS2 aminoacylates the mt tRNA^{Gly}. This evidence remains insufficient, but careful analysis of each aARS should unravel their potential alternative roles in plants. This could open a new field of research and lead to a better integration of biological pathways within the plant cell.

3.2.3.2. In yeast and metazoan. Group I introns are self-splicing non-coding nuclear and organellar RNAs. Even though they have an autocatalytic activity, they require the involvement of proteins partners *in vivo*. In *Neurospora crassa* and *Podospira anserina*, one of these cofactors is the mt TyrRS [72]. Genomic analysis and biochemical assays comparing mt TyrRS of different fungal species showed that the bifunctionality of this aARS is a characteristic of the subphylum *Peizizomycotina* including *Aspergillus nidulans*, and suggests acquisition of this additional role after divergence with the *Saccharomycotina* subphylum [73].

Saccharomycotina subphylum displays another bifunctional mt aARS. In *S. cerevisiae* and *Saccharomyces douglasii* mt LeuRS is involved in mRNA splicing [51]. This “moonlighting” activity involves the CP1 (connective polypeptide 1) domain, the C-terminus of mt LeuRS and requires participation of the b14 maturase [74]. Although the human mt genome lacks group I introns, mt LeuRS from *H. sapiens* is able to complement the intron-splicing activity in a yeast strain disrupted for the endogenous mt LeuRS [75].

In human, the HIV-1 virus hijacks the host translational machinery for the production of viral particles. It was first thought that packaging of polyproteins into newly assembled virions relied on the uptake of cyto LysRS and its cognate tRNA^{Lys} [33,76]. However, it was recently shown that human mt LysRS, through its amino-terminal extension, provides a strong scaffold for tRNA^{Lys} prior to its interaction with the unprocessed polyprotein GagPol. More especially the catalytic domain of human mt LysRS interacts with the P6- and integrase domains of GagPol. The authors of this discovery also propose that tRNA^{Lys} is contacted by the Reverse Transcriptase domain to further stabilize the complex [77].

Gowher et al. [78] showed that, like in yeast, cytosolic tRNA^{Lys}-_{s(cuu)} (tRK1) can be imported into human mitochondria. This import is facilitated by the mammalian enolase and mediated by the precursor of human mt LysRS (preKARS2), which has affinity for tRK1.

Some pathogenic mutations reported for human mt aaRSs have a mild effect (if any at all) on their aminoacylation activity, suggesting that they are not related to their aminoacylation activities. Intriguing examples can be found in the literature such as the involvement of mt LysRS and in amyotrophic lateral sclerosis [79]. Other examples include the autosomal recessive disease leukoencephalopathy and the identification of missense mutations in mt AspRS (reviewed in Ref. [80]). One appealing possibility would be that these mutations affect yet unknown non-canonical function(s); therefore the deep characterization and analysis of these mutants would be of great therapeutic interest. The hypothesis of non-canonical function for mt aaRSs would be in line with observations made for their cytosolic homologs. Indeed, numerous studies over the past decade have demonstrated that aside from their canonical/ancestral aminoacylation activities, human cyto aaRSs can fulfill equally important additional tasks upon challenging of the cells by diverse stimuli. They range from translational regulation during immune response [81] to leucine sensing *via* the mTORC1 pathway [82] and many others that are well documented [83–86]. These signaling activities are not only carried by full-length and catalytically active aaRSs but also by splice-variants that are catalytic-null isoforms. These truncated aaRSs or aaRS fragments, also called physiocrines (<http://www.atyrpharma.com/physiocrines/>), are often used as intracellular regulatory factors but can sometimes be secreted (for a review see Ref. [83]). A recent work lead to the identification of a pool of aaRS gene-derived mRNAs packaged into exosomes, yet the exact role of this set of aaRSs remains to be identified [87].

Finally, it is to be noted that a few studies are highlighting the role of some aaRSs in Insecta mitochondria. One example is the SLIMP (Seryl-tRNA synthetase-like insect mitochondrial protein) identified by Guitart et al. [88], which appears to be a mt protein with essential functions beyond translation.

4. Atypical structural properties of mitochondrial tRNAs and adaptive partnership

Numerous studies on tRNAs have identified common features defining the tRNA canonical structure at different levels: invariant and semi-invariant nucleotides in the primary sequence; D-arm, anticodon arm, variable region, T-arm and acceptor stem allowing the tRNA to adopt a cloverleaf secondary structure and an L-shape tertiary structure stabilized by nine well-defined long-distance interactions (Fig. 4A). Noteworthy are six of these long-distance interactions which build the core of the tRNA molecule. One is inside the T-loop and two bring the D- and the T-loops close to each other. Interestingly, all tRNAs of the different kingdoms adopt this canonical structure except mt ones that display a wide range of unconventional structures and even very unusual tertiary folds (reviewed in *e.g.* Refs. [89,90]). This observation led to the proposal that mt tRNAs are, in some species, 'bizarre' or degenerated when compared to their cyto homologs [91]. Also and as mentioned before, mt translation machinery might either be of dual origin (from nucleus and mitochondria), or of exclusive nuclear origin. Indeed, the set of mt tRNAs is either entirely encoded by the mt DNA (in *e.g.* human), partially encoded by mt DNA and the remaining ones imported from the cytosol (in *e.g.* *A. thaliana*) or totally imported (*e.g.* *T. brucei*) [4]. In every situation however, partner proteins are encoded in the nucleus and imported from the cytosol, raising issues about adaptive partnership.

The present part aims to address two questions: how degenerated (or not) are the mt tRNAs? And, how mt tRNAs partner proteins have adapted to this degeneracy? For the sake of simplicity, our analysis is mainly focusing on mt tRNA^{Ser} which

nicely exemplifies the large structural variability of mt tRNAs throughout the Tree of Life.

4.1. How degenerated are mitochondrial tRNAs?

All mt tRNAs from plants, fungi and protozoans display canonical secondary structures, despite the existence of few differences in common signature motifs [92,93] (Fig. 4B). The only exception described so far is mt tRNA^{Met} from *Tetrahymena pyriformis* and *Paramecium primaurelia*, characterized by the absence of canonical nucleotides in D-arm and an atypical structure [94,95].

In metazoans, mt tRNAs are mainly non-canonical and lack some or most of the common features. Metazoans usually have two mt tRNA^{Ser} isoacceptors, one of them commonly lacks its D-arm (Fig. 4C and D) (except mt tRNAs^{Ser} from some arthropods *e.g.* *Diaphania pyloalis* [96]). In vertebrates, the second mt tRNA^{Ser} isoacceptor has a cloverleaf-like secondary structure (4 arms with, however, strong deviations from the canonical definition) (Fig. 4C), as it is the case for all mt tRNAs of other specificities [89,97]. The most noticeable exception concerns mt tRNA^{Cys} from Lepidosaurs, which lacks the D-arm as well [98]. In invertebrates, the second mt tRNA^{Ser} isoacceptor is either D-armless (in most species), T-armless (in *e.g.* the nematode *Ascaris suum* [99] Fig. 4D; or the arthropod *Heptathela hangzhouensis* [100]), or cloverleaf-like (in some arthropods as *e.g.* *D. pyloalis* [96]). This diversity of structures is collectively found in mt tRNAs from other specificities, with most of them lacking the T-arm (in arthropods, nematodes, mollusks, plathelminthes, brachiopods, bryozoans and acanthocephalans [101]). The situation in Enoplea (Nematode) is presently the most puzzling, with most unusual mt tRNAs. For some species, both mt tRNA^{Ser} are D-armless, more than half of the other mt tRNAs are T-armless, and the rest is D- and T-armless. The extreme situation concerns mt tRNA^{Ala}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Phe}, tRNA^{His}, tRNA^{Ile}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Val}, and tRNA^{Tyr}, which are the smallest functional mt tRNAs, containing only 45 nucleotides (Fig. 4E) ([23,102], this special issue).

Access to native mt tRNAs is difficult because the amount of mt tRNAs is extremely low as compared to the amount of cyto tRNAs in eukaryotic cells. Also, the absence of post-transcriptional modifications within *in vitro* transcribed mt tRNAs was shown to have a drastic incidence on the proper folding of the tRNA [103]. As a consequence, only a few investigations have so far been performed to establish in solution the 2D structures of mt tRNAs and to build models of their 3D structures (*e.g.* Refs. [103–108]). It has also been shown that truncated mt tRNAs of metazoans display more flexibility than their conventional homologs, due to *e.g.* the absence of some long distance interactions between D- and T-loops [108], or the decrease of Mg²⁺ ions binding [90,109]. Thus, 2D representations of mt tRNAs are today mostly established using bioinformatics prediction. The reactivity of these mt atypical structures remains, however, to be proven for several instances. This was the case for the marsupial mitochondrion-encoded tRNA^{Lys} that was first predicted to be D-armless, but experimentally proven to be non functional and compensated by a mt tRNA^{Lys} imported from cytosol and with a typical cloverleaf structure [110,111].

4.2. How have partner proteins been adapted to the degeneracy of mitochondrial tRNAs?

The crystal structure of mt SerRS from *Bos taurus* has been resolved [112] and allowed us to understand the exact mechanism by which both mt tRNA^{Ser} isoacceptors are recognized and aminoacylated [113,114], although these isoacceptors share neither the same structure nor the same anticodon-acceptor inter-stem angle [115]. In fact, mt SerRS possesses an additional N-terminal helix and

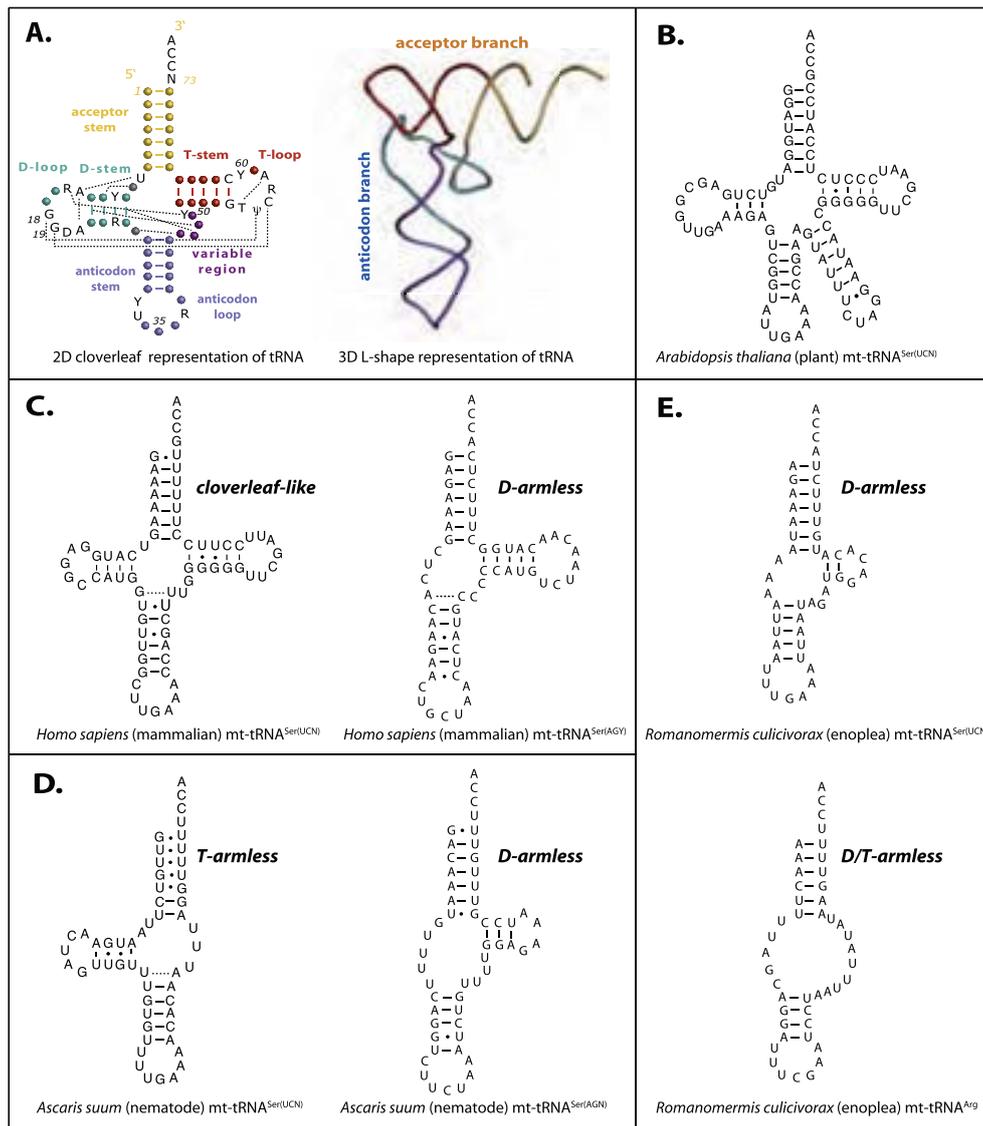


Fig. 4. Atypical structural properties of mitochondrial tRNAs. A) 2D and 3D representations of canonical tRNA [89,90]. tRNA's domains are colored and named. Conserved and semi-conserved nucleotides are indicated. Long distance interactions are displayed using dashed lines. B) Mt tRNA^{Ser(UCN)} from *Arabidopsis thaliana* (taken from <http://plantma.ibmp.cnrs.fr/> [127]), as a representative of the three tRNAs accepting serine in plant mitochondria. Of note, this mt-tRNA displays all canonical features and a long variable region, which is typical for canonical tRNA^{Ser}. C and D) Mt tRNA^{Ser(UCN)} and tRNA^{Ser(AGY)} in *Homo sapiens* (as a representative of mammals) and *Ascaris suum* (as a representative of Nematodes), respectively. E) The extreme case of Enoplea (group of Nematodes) is illustrated by the T-armless tRNA^{Ser(UCN)} (from Ref. [7]) and the D/T-armless tRNA^{Arg} (from Ref. [23], this special issue).

a C-terminal extension when compared to its bacterial homolog, and these elements are responsible for the recognition of the two isoacceptors. It has also been shown that the human mt AspRS displays a reduced catalytic efficiency [63], a reduced thermal stability [116], an increased cross-aminoacylation activity (i.e. can aminoacylate tRNAs of different origins [117,118]), a more electro-positive surface potential, and an increased plasticity [116] compared to its *Escherichia coli* homolog, despite the fact that the two enzymes have common evolutionary ancestry and highly similar tertiary structures [116]. Those functional and physico-chemical differences have been suggested to be evolutionary adaptations necessary to accommodate the more flexible and structurally degenerated/relaxed mt tRNAs.

After aminoacylation, mt tRNAs are delivered to the ribosome in order to decode their corresponding codons. The unique mammalian mt EF-Tu recognizes all cloverleaf-like mt tRNAs including the D-armless mt tRNA^{Ser} [119]. In contrast, two mt EF-Tu have been

identified in *C. elegans* and *Trichinella spiralis* (Enoplea) [101]. While mt EF-Tu2 recognizes specifically the D-armless mt tRNA^{Ser} in the two organisms, mt EF-Tu1 is specific to the T-armless tRNAs in *C. elegans*, but recognizes mt tRNAs of different structures (cloverleaf-like, lacking D- or T-arm) in *T. spiralis*. Notably, both mt EF-Tu1 and mt EF-Tu2 possess a C-terminal extension (of 57 and 16 aa respectively) absent from canonical EF-Tu. These C-terminal extensions compensate the absence of the tRNA T- or D- arms and keep recognition specificity [120,121]. However, whether the duplication of the mt EF-Tu gene is an adaptation to D- or T-armless tRNAs, or the truncation of tRNAs is an adaptation to mt EF-Tu duplication remains ambiguous. It also remains puzzling why mammals do not have a mt EF-Tu2-like factor specific to the D-armless mt tRNA^{Ser}. It has to be mentioned that an EF-Tu pseudogene was discovered in different mammals and could be a remnant of EF-Tu gene duplication [122]. Finally, the persistent existence of two mt EF-Tu in all arthropods [101] may not exclusively account

for the appearance of T-armless tRNAs. Indeed, large combinations of mt tRNAs exist in these organisms (including or excluding T-armless tRNAs): only cloverleaf-like tRNAs (in e.g. *D. pyloalis* [96]), D-armless and cloverleaf-like tRNAs (in e.g. *D. melanogaster* [123]), D- and T-armless tRNAs (in e.g. *Paratemnoides elongatus* [124]), or a mixture of all structures (in e.g. *H. hangzhouensis* [100]).

Truncation of mt RNAs is a hallmark of mt evolution, which tends to be compensated by accretive addition of new domains or extensions to the proteins binding these truncated RNAs (e.g. compensation of truncated mt rRNAs by ribosomal proteins [125]). This compensatory interplay is illustrated here by mt SerRS and mt EF-Tu but might plausibly be extended to ribosomal proteins or other unknown RNA-binding proteins.

5. Conclusion

Access to a growing number of sequenced genomes over the past decades has allowed us to explore and analyze content in tRNA genes, aaRS genes, and in mt-related proteins on a large scale. Despite this vast amount of data, the question of how organellar translation is regulated remains poorly understood, because genetic content only gives an incomplete picture of the molecular basis of codon usage, organellar import and protein-tRNA recognition. Large-scale data has made clear that the genomic content of each species has evolved closely to suit its specific environment, but that it nonetheless shares similar patterns between species, such as the dual localization of mt-aaRSs, and the specificity of tRNAs most often retained in the mt genome. These patterns help us to understand the most basic evolutionary adaptations that are necessary to interconnect the mt bacteria-like and eukaryotic translation systems. The challenge of the post-genomic era will be to understand the various layers of crosstalks connecting the mitochondria and the nucleus genomes.

Acknowledgments

The work was supported by the French National Program “Investissement d’Avenir” administered by the “Agence National de la Recherche” (ANR) (“MitoCross” Laboratory of Excellence (Labex), funded as ANR-10-IDEX-0002-02), the University of Strasbourg and the CNRS. L.E. is recipient of a fellowship from the Ministère de l’Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. C.M., L.K. and D.L. are recipients of doctoral fellowship and J.L.H. is recipient of a postdoctoral fellowship, all four supported by the ANR-10-IDEX-0002-02 “Investissements d’Avenir” program.

References

- [1] M.W. Gray, G. Burger, B.F. Lang, The origin and early evolution of mitochondria, *Genome Biol.* 2 (2001) 1–5.
- [2] B. Brindefalk, J. Viklund, D. Larsson, M. Tholleson, S.G. Andersson, Origin and evolution of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases, *Mol. Biol. Evol.* 24 (2007) 743–756.
- [3] H. Schwenzler, G.C. Scheper, N. Zorn, L. Moulinier, A. Gaudry, E. Leize, F. Martin, C. Florentz, O. Poch, M. Sissler, Released selective pressure on a structural domain gives new insights on the functional relaxation of mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase, *Biochimie* 100 (2014) 18–26.
- [4] A. Schneider, Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation, *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 1033–14053.
- [5] T. Abe, T. Ikemura, J. Sugahara, A. Kanai, Y. Ohara, H. Uehara, M. Kinouchi, S. Kanaya, Y. Yamada, A. Muto, H. Inokuchi, tRNADB-CE 2011: tRNA gene database curated manually by experts, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) D210–D213.
- [6] V. Cognat, G. Pawlak, A.M. Duchêne, M. Daujat, A. Gigant, T. Salinas, M. Michaud, B. Gutmann, P. Giege, A. Gobert, L. Maréchal-Drouard, PlantRNA, a database for tRNAs of photosynthetic eukaryotes, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) D273–D279.
- [7] F. Juhling, J. Putz, C. Florentz, P.F. Stadler, Armless mitochondrial tRNAs in enoplea (nematoda), *RNA Biol.* 9 (2012) 1161–1166.
- [8] F. Sieber, A.M. Duchêne, L. Maréchal-Drouard, Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 287 (2011) 145–190. Elsevier.
- [9] R. Temperley, R. Richter, S. Dennerlein, R.N. Lightowers, Z.M. Chrzanoska-Lightowers, Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes, *Science* 327 (2010) 301.
- [10] S.A. Shabalina, N.A. Spiridonov, A. Kashina, Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 2073–2094.
- [11] E. Trotta, Selection on codon bias in yeast: a transcriptional hypothesis, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 9382–9395.
- [12] H. Zur, T. Tuller, Strong association between mRNA folding strength and protein abundance in *S. cerevisiae*, *EMBO Rep.* 13 (2012) 272–277.
- [13] M.M. Fonseca, S. Rocha, D. Posada, Base-pairing versatility determines wobble sites in tRNA anticodons of vertebrate mitogenomes, *PLoS One* 7 (2012) e36605.
- [14] Z. Sun, L. Ma, R.W. Murphy, X. Zhang, D. Huang, Factors affecting mitochondrial codon usage interactions in the OXPHOS system of *Drosophila melanogaster*, *J. Genet. Genomics* 35 (2008) 729–735.
- [15] G. Cannarozzi, N.N. Schraudolph, M. Faty, P. von Rohr, M.T. Friberg, A.C. Roth, P. Gonnet, G. Gonnet, Y. Barral, A role for codon order in translation dynamics, *Cell* 141 (2010) 355–367.
- [16] K. Fredrick, M. Ibba, How the sequence of a gene can tune its translation, *Cell* 141 (2010) 227–229.
- [17] M. Bietenhader, A. Martos, E. Tetaud, R.S. Aiyar, C.H. Sellem, R. Kucharczyk, S. Clauder-Münster, M.F. Giraud, F. Godard, B. Salin, I. Sagot, J. Gagneur, M. Déquard-Chablat, V. Contamine, S. Hermann-Le Denmat, A. Sainsard-Chanet, L.M. Steinmetz, J.P. di Rago, Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution, *PLoS Genet.* 8 (2012) e1002876.
- [18] E. Perales-Clemente, P. Fernández-Silva, R. Acín-Pérez, A. Pérez-Martos, J.A. Enríquez, Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 225–234.
- [19] L. Supekova, F. Supek, J.E. Greer, P.G. Schultz, A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotopic expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2010) 5047–5052.
- [20] E. Vinogradova, T. Salinas, V. Cognat, C. Remacle, L. Maréchal-Drouard, Steady-state levels of imported tRNAs in *Chlamydomonas* mitochondria are correlated with both cytosolic and mitochondrial codon usages, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 1521–1528.
- [21] L. Yatawara, T.H. Le, S. Wickramasinghe, T. Agatsuma, Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*: gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*, *Gene* 424 (2008) 80–86.
- [22] M. Michaud, V. Cognat, A.M. Duchêne, L. Maréchal-Drouard, A global picture of tRNA genes in plant genomes, *Plant J.* 66 (2011) 80–93.
- [23] S. Wende, E.G. Platzer, F. Jühling, J. Putz, C. Florentz, P.F. Stadler, M. Mörl, Biological evidence for the world’s smallest tRNAs, *Biochimie* 100 (2014) 151–158.
- [24] T. Lithgow, A. Schneider, Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes, *Philos. Trans. R. Soc. B* 365 (2010) 799–817.
- [25] T. Salinas, A.M. Duchêne, L. Maréchal-Drouard, Recent advances in tRNA mitochondrial import, *Trends Biochem. Sci.* 33 (2008) 320–329.
- [26] J.D. Alfonzo, D. Söll, Mitochondrial tRNA import – the challenge to understand has just begun, *Biol. Chem.* 390 (2009) 717–722.
- [27] A.K. Berglund, C. Pujol, A.M. Duchêne, E. Glaser, Defining the determinants for dual targeting of aminoacyl-tRNA synthetases to mitochondria and chloroplasts, *J. Mol. Biol.* 393 (2009) 803–814.
- [28] P. Kamenski, O. Kolesnikova, V. Jubenot, N. Entelis, I.A. Krashennnikov, R.P. Martin, I. Tarassov, Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol, *Mol. Cell* 26 (2007) 625–637.
- [29] R.G. Dorrell, C.J. Howe, What makes a chloroplast? Reconstructing the establishment of photosynthetic symbioses, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 1865–1875.
- [30] C.V. Morgante, R.A. Rodrigues, P.A. Marbach, C.M. Borgonovi, D.S. Moura, M.C. Silva-Filho, Conservation of dual-targeted proteins in Arabidopsis and rice points to a similar pattern of gene-family evolution, *Mol. Genet. Genomics* 281 (2009) 525–538.
- [31] C. Pujol, M. Bailly, D. Kern, L. Maréchal-Drouard, H. Becker, A.M. Duchêne, Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNA^{Gln} synthesis in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 6481–6485.
- [32] M. Frechin, A.M. Duchêne, H.D. Becker, Translating organellar glutamine codons: a case by case scenario? *RNA Biol.* 6 (2009) 31–34.
- [33] U. Ahting, C. Thun, R. Hegerl, D. Typke, F.E. Nargang, W. Neupert, S. Nussberger, The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria, *J. Cell Biol.* 147 (1999) 959–968.
- [34] A.M. Duchêne, A. Giritich, B. Hoffmann, V. Cognat, D. Lanclen, N.M. Peeters, M. Zaepfel, L. Maréchal-Drouard, I.D. Small, Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 16484–16489.
- [35] M.M. Brandao, M.C. Silva-Filho, Evolutionary history of *Arabidopsis thaliana* aminoacyl-tRNA synthetase dual-targeted proteins, *Mol. Biol. Evol.* 28 (2011) 79–85.

- [36] A.M. Duchêne, N. Peeters, A. Dietrich, A. Cosset, I.D. Small, H. Wintz, Overlapping destinations for two dual targeted glycyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15275–15283.
- [37] K. Hammani, G. Bonnard, A. Bouchoucha, A. Gobert, F. Pinsker, T. Salinas, P. Giegé, Helical repeats modular proteins are major players for organelle gene expression, *Biochimie* 100 (2014) 141–150.
- [38] A. Atteia, A. Adrait, S. Brugiere, M. Tardif, R. van Lis, O. Deusch, T. Dagan, L. Kuhn, B. Gontero, W. Martin, J. Garin, J. Joyard, N. Rolland, A proteomic survey of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria sheds new light on the metabolic plasticity of the organelle and on the nature of the alpha-proteobacterial mitochondrial ancestor, *Mol. Biol. Evol.* 26 (2009) 1533–1548.
- [39] A. Gupta, A. Haider, S. Vaishya, S. Habib, Translation in mitochondria and apicoplasts of apicomplexan parasites, in: D. A. M. (Ed.), *Translation in Mitochondria and Other Organelles*, Springer, 2013, pp. 159–179.
- [40] P. Pino, E. Aeby, B.J. Foth, L. Sheiner, T. Soldati, A. Schneider, D. Soldati-Favre, Mitochondrial translation in absence of local tRNA aminoacylation and methionyl tRNA Met formylation in Apicomplexa, *Mol. Microbiol.* 76 (2010) 706–718.
- [41] K.E. Jackson, S. Habib, M. Frugier, R. Hoen, S. Khan, J.S. Pham, L. Ribas de Pouplana, M. Royo, M.A. Santos, A. Sharma, S.A. Ralph, Protein translation in *Plasmodium* parasites, *Trends Parasitol.* 27 (2011) 467–476.
- [42] K.E. Jackson, J.S. Pham, M. Kwek, N.S. De Silva, S.M. Allen, C.D. Goodman, G.I. McFadden, L.R. de Pouplana, S.A. Ralph, Dual targeting of aminoacyl-tRNA synthetases to the apicoplast and cytosol in *Plasmodium falciparum*, *Int. J. Parasitol.* 42 (2012) 177–186.
- [43] Y. Hirakawa, F. Burki, P.J. Keeling, Dual targeting of aminoacyl-tRNA synthetases to the mitochondrion and complex plastid in chlorarachniophytes, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 6176–6184.
- [44] K.M. Haen, W. Pett, D.V. Lavrov, Parallel loss of nuclear-encoded mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases and mt DNA-encoded tRNAs in Cnidaria, *Mol. Biol. Evol.* 27 (2010) 2216–2219.
- [45] A. Nagao, T. Suzuki, T. Katoh, Y. Sakaguchi, Biogenesis of glutamyl-mt tRNA^{Gln} in human mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 16209–16214.
- [46] J. Rinehart, E.K. Horn, D. Wei, D. Soll, A. Schneider, Non-canonical eukaryotic glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases form mitochondrial aminoacyl-tRNA in *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1161–1166.
- [47] M.A. Rubio, J.J. Rinehart, B. Krett, S. Duvezin-Caubet, A.S. Reichert, D. Soll, J.D. Alfonzo, Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 9186–9191.
- [48] A.M. Myers, A. Tzagoloff, MSW, a yeast gene coding for mitochondrial tryptophanyl-tRNA synthetase, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 15362–15370.
- [49] L.K. Pape, T.J. Koerner, A. Tzagoloff, Characterization of a yeast nuclear gene (MST1) coding for the mitochondrial threonyl-tRNA1 synthetase, *J. Biol. Chem.* 260 (28) (1985) 15362–15370.
- [50] T.J. Koerner, A.M. Myers, S. Lee, A. Tzagoloff, Isolation and characterization of the yeast gene coding for the a subunit of mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 3690–3696.
- [51] C.J. Herbert, M. Labouesse, G. Dujardin, P. Slonimski, The NAM2 proteins from *Saccharomyces cerevisiae* and *Spiraea douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases, and are involved in mRNA splicing, *EMBO J.* 7 (1988) 473–483.
- [52] A. Tzagoloff, A. Vambutas, A. Akai, Characterization of MSM1, the structural gene for yeast mitochondrial methionyl-tRNA synthetase, *Eur. J. Biochem.* 179 (1989) 365–371.
- [53] D.L. Gatti, A. Tzagoloff, Structure of a group of related aminoacyl-tRNA synthetases, *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 557–568.
- [54] A. Tzagoloff, A. Shtanko, Mitochondrial and cytoplasmic isoleucyl-, glutamyl and arginyl-tRNA synthetases of yeast are encoded by separated genes, *Eur. J. Biochem.* 230 (1995) 582–586.
- [55] C.M. Chow, U.L. RajBhandary, *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase gene. Isolation by complementation of a mutant *Escherichia coli* suppressor tRNA defective in aminoacylation and sequence analysis, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 12855–12863.
- [56] I. Landrieu, M. Vandebol, M. Hartlein, D. Portetelle, Mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase is encoded by the yeast nuclear gene YCR24c, *Eur. J. Biochem.* 243 (1997) 268–273.
- [57] A. Sanni, C. Houtondji, S. Blanquet, J.-P. Ebel, Y. Boulanger, F. Fasiolo, Interaction of the tRNA(Phe) acceptor end with the synthetase involves a sequence common to yeast and *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetases, *Biochemistry* 30 (1991) 2448–2453.
- [58] X. Jordana, B. Chatton, M. Paz-Weisshaar, J.M. Buhler, F. Cramer, J.P. Ebel, F. Fasiolo, Structure of the yeast valyl-tRNA synthetase gene (VAS1) and the homology of its translated amino acid sequence with *Escherichia coli* isoleucyl-tRNA synthetase, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 7189–7194.
- [59] G. Natsoulis, F. Hilger, G.R. Fink, The HTS1 gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidine tRNA synthetases of *S. cerevisiae*, *Cell* 46 (1986) 235–243.
- [60] H.L. Tang, L.S. Yeh, N.K. Chen, T. Ripmaster, P. Schimmel, C.C. Wang, Translation of a yeast mitochondrial tRNA synthetase initiated at redundant non-AUG codons, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 49656–49663.
- [61] R.J. Turner, M. Lovato, P. Schimmel, One of two genes encoding glycyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* provides mitochondrial and cytoplasmic functions, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27681–27688.
- [62] S.J. Chen, Y.H. Wu, H.Y. Huang, C.C. Wang, *Saccharomyces cerevisiae* possesses a stress-inducible glycyl-tRNA synthetase gene, *PLoS One* 7 (2012) e33363.
- [63] L. Bonnefond, A. Fender, J. Rudinger-Thirion, R. Giegé, C. Florentz, M. Sissler, Towards the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS, *Biochemistry* 44 (2005) 4805–4816.
- [64] J. Rorbach, A.A. Yusoff, H. Tuppen, D.P. Abg-Kamaludin, Z.M. Chrzanowska-Lightowler, R.W. Taylor, D.M. Turnbull, R. McFarland, R.N. Lightowler, Overexpression of human mitochondrial valyl tRNA synthetase can partially restore levels of cognate mt-tRNAVal carrying the pathogenic C25U mutation, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 3065–3074.
- [65] K. Shiba, P. Schimmel, H. Motegi, T. Noda, Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 30049–30055.
- [66] E. Tolkunova, H. Park, J. Xia, M.P. King, E. Davidson, The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual splicing of the primary transcript, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35063–35069.
- [67] J. Dias, G. Octobre, L. Kobbi, M. Comisso, S. Flisiak, M. Mirande, Activation of human mitochondrial lysyl-tRNA synthetase upon maturation of its pre-mitochondrial precursor, *Biochemistry* 51 (2012) 909–916.
- [68] M. Berriman, E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renauld, D.C. Bartholomeu, N.J. Lennard, E. Caler, N.E. Hamlin, B. Haas, U. Böhm, L. Hannick, M.A. Aslett, J. Shallom, L. Marcello, L. Hou, B. Wickstead, U.C. Alsmark, C. Arrowsmith, R.J. Atkin, A.J. Barron, F. Bringaud, K. Brooks, M. Carrington, I. Cherevach, T.J. Chillingworth, C. Churcher, L.N. Clark, C.H. Corton, A. Cronin, R.M. Davies, J. Doggett, A. Djikeng, T. Feldblyum, M.C. Field, A. Fraser, I. Goodhead, Z. Hance, D. Harper, B.R. Harris, H. Hauser, J. Hostetler, A. Ivens, K. Jagels, D. Johnson, J. Johnson, K. Jones, A.X. Kerhornou, H. Koo, N. Larke, S. Landfear, C. Larkin, V. Leech, A. Line, A. Lord, A. Macleod, P.J. Mooney, S. Moule, D.M. Martin, G.W. Morgan, K. Mungall, H. Norbertczak, D. Ormond, G. Pai, C.S. Peacock, J. Peterson, M.A. Quail, E. Rabinowitz, M.A. Rajandream, C. Reitter, S.L. Salzberg, M. Sanders, S. Schobel, S. Sharp, M. Simmonds, A.J. Simpson, L. Tallon, C.M. Turner, A. Tait, A.R. Tivey, S. Van Aken, D. Walker, D. Wanless, S. Wang, B. White, O. White, S. Whitehead, J. Woodward, J. Wortman, M.D. Adams, T.M. Embley, K. Gull, E. Ullu, J.D. Barry, A.H. Fairlamb, F. Opperdoes, B.G. Barrell, J.E. Donelson, N. Hall, C.M. Fraser, S.E. Melville, N.M. El-Sayed, The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*, *Science* 309 (2005) 416–422.
- [69] J. Rettig, Y. Wang, A. Schneider, T. Ochsenreiter, Dual targeting of isoleucyl-tRNA synthetase in *Trypanosoma brucei* is mediated through alternative trans-splicing, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 1299–1306.
- [70] N.G. Kolev, J.B. Franklin, S. Carmi, H. Shi, S. Michaeli, C. Tschudi, The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution, *PLoS Pathog.* 6 (2010) e1001090.
- [71] T.N. Siegel, D.R. Hekstra, X. Wang, S. Dewell, G.A. Cross, Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 4946–4957.
- [72] U. Kamper, U. Kuck, A.D. Cherniack, A.M. Lambowitz, The mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase of *Podospira aenerea* is a bifunctional enzyme active in protein synthesis and RNA splicing, *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 499–511.
- [73] P.J. Paukstelis, A.M. Lambowitz, Identification and evolution of fungal mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetases with group I intron splicing activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 6010–6015.
- [74] S.B. Rho, T.L. Lincecum Jr., S.A. Martinis, An inserted region of leucyl-tRNA synthetase plays a critical role in group I intron splicing, *EMBO J.* 21 (2002) 6874–6881.
- [75] F. Houman, S.B. Rho, J. Zhang, X. Shen, C.-C. Wang, P. Schimmel, S.A. Martinis, A prokaryote and human tRNA synthetase provide an essential RNA splicing function in yeast mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 13743–13748.
- [76] M. Kaminska, V. Shalak, M. Francin, M. Mirande, Viral hijacking of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase, *J. Virol.* 81 (2007) 68–73.
- [77] L. Kobbi, G. Octobre, J. Dias, M. Comisso, M. Mirande, Association of mitochondrial Lysyl-tRNA synthetase with HIV-1 GagPol involves catalytic domain of the synthetase and transframe and integrase domains of Pol, *J. Mol. Biol.* 410 (2011) 875–886.
- [78] A. Gowher, A. Smirnov, I. Tarassov, N. Entelis, Induced tRNA import into human mitochondria: implication of a host aminoacyl-tRNA-synthetase, *PLoS One* 8 (2013) e66228.
- [79] H. Kawamata, J. Magrané, C. Kunst, M.P. King, G. Manfredi, Lysyl-tRNA synthetase is a target for mutant SOD1 toxicity in mitochondria, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 28321–28328.
- [80] H. Schwenzer, J. Zoll, C. Florentz, M. Sissler, Pathogenic implications of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases, *Top. Curr. Chem.* (2013), (Epub ahead of print).
- [81] A. Arif, J. Jia, R. Mukhopadhyay, B. Willard, M. Kinter, P.L. Fox, Two-site phosphorylation of EPRS coordinates multimodal regulation of noncanonical translational control activity, *Mol. Cell* 35 (2009) 164–180.

- [82] J.M. Han, S.J. Jeong, M.C. Park, G. Kim, N.H. Kwon, H.K. Kim, S.H. Ha, S.H. Ryu, S. Kim, Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway, *Cell* 149 (2012) 410–424.
- [83] M. Guo, P. Schimmel, Essential nontranslational functions of tRNA synthetases, *Nat. Chem. Biol.* 9 (2013) 145–153.
- [84] M. Guo, X.L. Yang, P. Schimmel, New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11 (2010) 668–674.
- [85] C.D. Hausmann, M. Ibbá, Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed, *FEMS Microbiol. Rev.* 32 (2008) 705–721.
- [86] E.V. Smirnova, V.A. Lakunina, I. Tarassov, I.A. Krashennnikov, P.A. Kamenski, Noncanonical functions of aminoacyl-tRNA synthetases, *Biochemistry (Moscow)* 77 (2012) 15–25.
- [87] F. Wang, Z. Xu, J. Zhou, W.S. Lo, C.F. Lau, L.A. Nangle, X.L. Yang, M. Zhang, P. Schimmel, Regulated capture by exosomes of mRNAs for cytoplasmic tRNA synthetases, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 29223–29228.
- [88] T. Guitart, T. Leon Bernardo, J. Sagalés, T. Stratmann, J. Bernués, L. Ribas de Pouplana, New aminoacyl-tRNA synthetase-like protein in insects with an essential mitochondrial function, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 38157–38166.
- [89] G. Dirheimer, G. Keith, P. Dumas, E. Westhof, Primary, secondary, and tertiary structures of tRNAs, in: D. Söll, U.L. RajBhandary (Eds.), *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*, American Society for Microbiology, Washington DC, 1995, pp. 93–126.
- [90] R. Giegé, F. Juhling, J. Pütz, P. Stadler, C. Sauter, C. Florentz, Structure of transfer RNAs: similarity and variability, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3 (2012) 37–61.
- [91] M. Helm, H. Brulé, D. Friede, R. Giegé, J. Pütz, C. Florentz, Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs, *RNA* 6 (2000) 1356–1379.
- [92] D.O. Clary, J.M. Goddard, S.C. Martin, C.M. Fauron, D.R. Wolstenholme, *Drosophila* mitochondrial DNA: a novel gene order, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 6619–6637.
- [93] L. Maréchal-Drouard, J.H. Weil, A. Dietrich, Transfer-RNAs and transfer-RNA genes in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 44 (1993) 13–32.
- [94] J.J. Seilhamer, D.J. Cummings, Structure and sequence of the mitochondrial 20S tRNA and tRNA^{Tyr} gene of *Paramecium primaurelia*, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 6391–6406.
- [95] M.N. Schnare, S.J. Greenwood, M.W. Gray, Primary sequence and post-transcriptional modification pattern of an unusual mitochondrial tRNA^{Met} from *Tetrahymena pyriformis*, *FEBS Lett.* 362 (1995) 24–28.
- [96] B.J. Zhu, Q.N. Liu, L.S. Dai, L. Wang, Y. Sun, K.Z. Lin, G.Q. Wei, C.L. Liu, Characterization of the complete mitochondrial genome of *Diaphania pycloalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *Gene* 527 (2013) 283–291.
- [97] T. Ueda, T. Ohta, K. Watanabe, Large scale isolation and some properties of AGY-specific serine tRNA from bovine heart mitochondria, *J. Biochem.* 98 (1985) 1275–1284.
- [98] J.R. Macey, A. Larson, N.B. Ananjeva, T.J. Papenfuss, Evolutionary shifts in three major structural features of the mitochondrial genome among iguanian lizards, *J. Mol. Evol.* 44 (1997) 660–674.
- [99] D.R. Wolstenholme, J.L. Macfarlane, R. Okimoto, D.O. Clary, J.A. Wahleithner, Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 1324–1328.
- [100] Y. Qiu, D. Song, K. Zhou, H. Sun, The mitochondrial sequences of *Heptathela hangzhouensis* and *Ornithoctonus huwena* reveal unique gene arrangements and atypical tRNAs, *J. Mol. Evol.* 60 (2005) 57–71.
- [101] T. Ohtsuki, Y. Watanabe, T-armless tRNAs and elongated elongation factor Tu, *IUBMB Life* 59 (2007) 68–75.
- [102] M. Bernt, A. Donath, F. Juhling, F. Externbrink, C. Florentz, G. Fritzsche, J. Pütz, M. Middendorf, P.F. Stadler, MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation, *Mol. Phylogenet. Evol.* 69 (2013) 313–319.
- [103] M. Helm, H. Brulé, F. Degoul, C. Cepanec, J.-P. Leroux, R. Giegé, C. Florentz, The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 1636–1643.
- [104] M.H.L. de Bruijn, A. Klug, A model for the tertiary structure of mammalian mitochondrial transfer RNAs lacking the entire 'dihydrouridine' loop and stem, *EMBO J.* 2 (1983) 1309–1321.
- [105] M. Helm, R. Giegé, C. Florentz, A Watson–Crick base-pair disrupting methyl group (m¹A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA^{Leu}, *Biochemistry* 38 (1999) 13338–13346.
- [106] L.M. Wittenhagen, M.D. Roy, S.O. Kelley, The pathogenic U3271C human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation disrupts a fragile anticodon stem, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 596–601.
- [107] R. Hao, M.W. Zhao, Z.X. Hao, Y.N. Yao, E.D. Wang, A T-stem slip in human mitochondrial tRNA^{Leu(CUN)} governs its charging capacity, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 3606–3613.
- [108] M. Messmer, J. Pütz, T. Suzuki, T. Suzuki, C. Sauter, M. Sissler, C. Florentz, Tertiary network in mammalian mitochondrial tRNA^{Asp} revealed by solution probing and phylogeny, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 6881–6895.
- [109] A.A. Frazer-Abel, P.J. Hagerman, Variation of the acceptor-anticodon interstem angles among mitochondrial and non-mitochondrial tRNAs, *J. Mol. Biol.* 343 (2004) 313–325.
- [110] A. Janke, G. Feldmaier-Fuchs, W.K. Thomas, A. von Haeseler, S. Paabo, The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals, *Genetics* 137 (1994) 243–256.
- [111] M. Dörner, M. Altman, S. Paabo, M. Morl, Evidence for import of a lysyl-tRNA into marsupial mitochondria, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 2688–2698.
- [112] S. Chinnaronk, M. Gravers Jeppesen, T. Suzuki, J. Nyborg, K. Watanabe, Dual-mode recognition of noncanonical tRNAs^{Ser} by seryl-tRNA synthetase in mammalian mitochondria, *EMBO J.* 24 (2005) 3369–3379.
- [113] N. Shimada, T. Suzuki, K. Watanabe, Dual mode recognition of two iso-acceptor tRNAs by mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 46770–46778.
- [114] T. Hanada, T. Suzuki, T. Yokogawa, C. Takemoto-Hori, M. Sprinzl, K. Watanabe, Translation ability of mitochondrial tRNAs^{Ser} with unusual secondary structures in an *in vitro* translation system of bovine mitochondria, *Genes Cells* 6 (2001) 1019–1030.
- [115] A.A. Frazer-Abel, P.J. Hagerman, Determination of the angle between the acceptor and anticodon stems of a truncated mitochondrial tRNA, *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 581–593.
- [116] A. Neuenfeldt, B. Lorber, E. Ennifar, A. Gaudry, C. Sauter, M. Sissler, C. Florentz, Thermodynamic properties distinguish human mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase from bacterial homolog with same 3D architecture, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 2698–2708.
- [117] Y. Kumazawa, H. Himeno, K. Miura, K. Watanabe, Unilateral aminoacylation specificity between bovine mitochondria and eubacteria, *J. Biochem.* 109 (1991) 421–427.
- [118] A. Fender, A. Gaudry, F. Juhling, M. Sissler, C. Florentz, Adaptation of aminoacylation identity rules to mammalian mitochondria, *Biochimie* 94 (2012) 1090–1097.
- [119] T. Ohtsuki, A. Sato, Y. Watanabe, K. Watanabe, A unique serine-specific elongation factor Tu found in nematode mitochondria, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 669–673.
- [120] M. Sakurai, Y. Watanabe, K. Watanabe, T. Ohtsuki, A protein extension to shorten RNA: elongated elongation factor-Tu recognizes the D-arm of T-armless tRNAs in nematode mitochondria, *Biochem. J.* 399 (2006) 249–256.
- [121] D.K. Willkomm, R.K. Hartmann, Intricacies and surprises of nuclear-mitochondrial co-evolution, *Biochem. J.* 399 (2006) e7–e9.
- [122] M. Ling, F. Merante, H.S. Chen, C. Duff, A.M. Duncan, B.H. Robinson, The human mitochondrial elongation factor Tu (EF-Tu) gene: cDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene, *Gene* 197 (1997) 325–336.
- [123] D.L. Lewis, C.L. Farr, L.S. Kaguni, *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons, *Insect Mol. Biol.* 4 (1995) 263–278.
- [124] S. Ovchinnikov, S.E. Masta, Pseudoscorpion mitochondria show rearranged genes and genome-wide reductions of RNA gene sizes and inferred structures, yet typical nucleotide composition bias, *BMC Evol. Biol.* 12 (2012) 31.
- [125] O. Rackham, A. Filipovska, Supernumerary proteins of mitochondrial ribosomes, *Biochim. Biophys. Acta* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.010>.
- [126] K. Hancock, S.L. Hajduk, The mitochondrial tRNAs of *Trypanosoma brucei* are nuclear encoded, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 19208–19215.
- [127] D.B. Sloan, A.J. Alverson, J.P. Chuckalovcak, M. Wu, D.E. McCauley, J.D. Palmer, D.R. Taylor, Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates, *PLoS Biol.* 10 (2012) e1001241.

Article 3

**Crystal structure of
Saccharomyces cerevisiae
mitochondrial GatFAB
reveals a novel subunit
assembly in tRNA-
dependent
amidotransferases**

Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial GatFAB reveals a novel subunit assembly in tRNA-dependent amidotransferases

Yuhei Arais¹, Jonathan L. Huot¹, Takuya Sekiguchi², Mathieu Frechin³, Frédéric Fischer⁴, Ludovic Enkler¹, Bruno Senger¹, Ryuichiro Ishitani², Hubert D. Becker^{1,*} and Osamu Nureki^{2,*}

¹Unité Mixte de Recherche 7156 Génétique Moléculaire Génomique Microbiologie, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France, ²Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo, Japan, ³Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland and ⁴Unité Propre de Recherche Architecture et Réactivité de l'ARN, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France

Received December 20, 2013; Revised March 06, 2014; Accepted March 7, 2014

ABSTRACT

Yeast mitochondrial Gln_mtRNA^{Gln} is synthesized by the transamidation of mischarged Glu_mtRNA^{Gln} by a non-canonical heterotrimeric tRNA-dependent amidotransferase (AdT). The GatA and GatB subunits of the yeast AdT (GatFAB) are well conserved among bacteria and eukaryota, but the GatF subunit is a fungi-specific ortholog of the GatC subunit found in all other known heterotrimeric AdTs (GatCAB). Here we report the crystal structure of yeast mitochondrial GatFAB at 2.0 Å resolution. The C-terminal region of GatF encircles the GatA–GatB interface in the same manner as GatC, but the N-terminal extension domain (NTD) of GatF forms several additional hydrophobic and hydrophilic interactions with GatA. NTD-deletion mutants displayed growth defects, but retained the ability to respire. Truncation of the NTD in purified mutants reduced glutaminase and transamidase activities when glutamine was used as the ammonia donor, but increased transamidase activity relative to the full-length enzyme when the donor was ammonium chloride. Our structure-based functional analyses suggest the NTD is a trans-acting scaffolding peptide for the GatA glutaminase active site. The positive surface charge and novel fold of the GatF–GatA interface, shown in this first crystal structure of an organellar AdT, stand in contrast with the more conventional, negatively charged bacterial AdTs described previously.

INTRODUCTION

The existing paradigm for mitochondrial aa-tRNA synthesis in eukaryotes cannot explain the translation of glutamine codons (1). All eukaryotic genomes analyzed so far only encode a single cytosolic glutamyl-tRNA synthetase (*c*GlnRS). The gene encoding an organellar GlnRS is always missing (2), but its absence is compensated by the so-called transamidation pathway, which also generates mitochondrial glutamyl-tRNA^{Gln} (Gln_mtRNA^{Gln}). As most bacteria and all known archaea use this pathway to generate Gln-tRNA^{Gln}, its presence in mitochondria probably reflects the endosymbiotic origin of these organelles (3–5). In this transamidation pathway, the mischarged glutamyl-tRNA^{Gln} (Glu-tRNA^{Gln}) is formed by a non-discriminating glutamyl-tRNA synthetase (ND-GluRS), and then is converted into Gln-tRNA^{Gln} by a tRNA-dependent amidotransferase (AdT).

The formation of Gln_mtRNA^{Gln} has only been examined in a few species: some may import *c*GlnRS (6,7), while others may use GatCAB and the transamidation pathway (8,9). Our recent study revealed that yeast Gln_mtRNA^{Gln} is synthesized by a transamidation pathway involving a novel heterotrimeric AdT named GatFAB (10). It transamidates Glu_mtRNA^{Gln} generated by an imported pool of cytoplasmic GluRS (*c*GluRS), which acts as a ND-GluRS in the mitochondrion (10).

The GatA and GatB subunits of GatFAB are homologous to those of bacterial and eukaryotic GatCABs. GatA hydrolyzes Gln into Glu and an ammonia molecule, which travels to GatB through an intramolecular ammonia tunnel (11,12). Upon reaching the GatB active site, it re-

*To whom correspondence should be addressed. Osamu Nureki. Tel: +81 (0)3 5841 4392; Fax: +81 (0)3 5841 8057; Email: nureki@biochem.s.u-tokyo.ac.jp
Correspondence may also be addressed to Hubert D. Becker. Tel: +33 03 68 85 14 70; Fax: +33 03 68 85 13 65; Email: h.becker@unistra.fr

acts with γ -phosphoryl-glutamyl-mtRNA^{Gln} formed by the ATP-dependent activation of the Glu side-chain carboxyl group. These reactions are coupled, as shown by activation of the GatA glutaminase activity upon binding of Glu-tRNA^{Gln} and ATP by GatB (13).

The third subunit, GatF, is a new type of AdT subunit found only in fungal genomes. It is present in the place of the GatC found in bacterial, plant and mammalian AdTs, where it reinforces the interaction between the GatA and GatB subunits by encircling their interface (14–18). Given this pivotal role, it is surprising that GatC and GatF share poor sequence homology and that GatF is approximately twice the size of any GatC, although both subunits are comparatively smaller than the other catalytic subunits.

Our crystal structure of GatFAB from *Saccharomyces cerevisiae*, at 2.0 Å resolution, is the first AdT structure from a eukaryotic organelle. A structural comparison between GatF and GatC revealed that it has an N-terminal extension domain (NTD), which forms an extended interface with GatA. Our structure shows that GatF is a functional homolog of GatC based on its role in maintaining the GatFAB trimer assembly. However, this role is achieved using a different architecture from that of GatC, since the NTD of GatF extends to the glutaminase site of GatA. To understand the functional properties of the NTD of GatF, we generated structure-based NTD deletion mutants and analyzed their enzymatic activities and ability to complement a yeast Δ gatF strain. Our results show that deletions of the NTD impacted cell growth, especially in respiration, but were not lethal. The ability to hydrolyze glutamine and to use the resulting ammonia for Gln-mtRNA^{Gln} synthesis was reduced in GatFABs assembled with these GatF mutants. However, for one such mutant, transamidation with NH₄Cl as the ammonia donor was enhanced relative to the full-length enzyme. These results suggest that truncation of the NTD alters or destabilizes the GatA active site. Thus, we propose that the GatF NTD is present to modulate folding and stability of the GatA core, while the GatC-like portion of GatF serves to maintain the GatA–GatB assembly.

MATERIALS AND METHODS

Protein purification

The yeast *gatFAB* operon was designed as described previously (10). The putative mitochondrial target sequences in the N-termini of GatB (residues 1–15) and GatF (residues 1–23) were removed. The *gatFAB* operon was subcloned into a modified pCGFP-BC vector containing a C-terminal His-tag and a Tobacco Etch Virus (TEV) protease cleavage site for the tag removal (19). To facilitate the structural study, we truncated the C-terminal helical (residues 330–474) and YqeY (residues 475–541) domains (GatFAB Δ HY), which showed high flexibilities in the reported bacterial GatCAB structures (17,18). To overproduce GatFAB Δ HY, the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star2 CodonPlus (Stratagene). The cells were grown to an absorbance at 600 nm of 0.5 and gene expression was induced with 0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), followed by incubation at 18°C for 18 h. After centrifugation at 5000

×g for 5 min, the harvested cells were suspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 250 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 5% glycerol and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and then were disrupted by sonication. The supernatant after centrifugation was loaded on a Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose (QIAGEN) column and eluted with 500 mM imidazole. The eluted fraction was treated with TEV protease and reloaded onto the Ni-NTA column to remove the His-tag. The protein was loaded onto a HiTrap Heparin HP (GE healthcare) column and eluted with a linear gradient of 200–1000 mM NaCl. The recombinant GatFAB Δ HY was finally purified with a Hiload 16/600 Superdex200 gel filtration column (GE healthcare) with the buffer containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 100 mM NaCl and 1 mM dithiothreitol. The fractions were concentrated to 10 mg/ml.

For the biochemical assays, GatFAB Δ Y was overexpressed with the same procedure as GatFAB Δ HY. However, GatFAB_{F24–183} (pseudo-wild-type) and the series of GatF mutants (GatFAB_{F37–183}, GatFAB_{F47–183}, GatFAB_{F58–183} and GatFAB_{F67–183}) were expressed by autoinduction in 200 ml ZYP-5052 medium (20) or addition of 10% (w/v) glucose together with IPTG in LB medium. GatFAB pseudo-wild-type, GatFAB Δ Y and GatFAB Δ HY were purified with Ni-NTA agarose (QIAGEN) and Superdex200 10/300 column (GE Healthcare). The other GatF mutants were purified with MagneHis (Promega).

Western blots quantification of expression levels of GatF mutants

The GatF mutants were overexpressed by autoinduction in 200 ml ZYP-5052 medium with strong agitation (20). The cells were grown to 0.1 O.D._{600 nm} and then incubated at 20°C for 32 h (total 36 h). Each cell pellet (approximately 5 g on average) was resuspended in 10 ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 500 mM NaCl, Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche) and disrupted by sonication. The supernatant after centrifugation was recovered and aliquoted, and the aliquots were flash frozen in liquid nitrogen and then kept at –80°C. The purified pseudo-wild-type GatFAB_{F24–183} protein (2.4 μ g) and total protein (30 μ g) from each extract were loaded on 15% SDS-PAGE gel. Electrophoresis was stopped when the migration front almost reached the bottom of the gel. The gel was transferred onto a Transblot Turbo Pack membrane (PVDF). Mouse anti-His-tag primary antibodies (1:1000) were used to quantify the amount of GatB in each extract. Detection was carried out using Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse antibodies (1:2000).

Crystallization and data collection

Crystallization was performed at 20°C by the sitting drop vapor diffusion method. The crystals of GatFAB Δ HY free form were grown within 2 days by mixing equal volume of the 10 mg/ml GatFAB Δ HY protein solution and the reservoir solution containing 50 mM sodium malonate, 200 mM Mg(NO₃)₂ and 10–13% PEG3350. The Gln-bound form of GatFAB Δ HY was prepared by mixing the protein solution with glutamine to a final concentration of 10 mM

before crystallization. The SeMet-labeled protein was crystallized under the same conditions as those for the native protein. The crystals were cryoprotected in the reservoir solution supplemented with 20% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol and flash-cooled in a nitrogen stream at 100 K. Diffraction data were collected at beamlines NW12A and NE3A at KEK PF-AR (Tsukuba, Japan) and BL41XU at SPring-8 (Harima, Japan). Diffraction data were processed using the program HKL2000 (21).

Structure determination and refinement

Although *S. cerevisiae* GatA and GatB show high sequence similarity with their bacterial counterparts, our attempts to solve the structure by molecular replacement were unsuccessful. Therefore, the structure was determined by the multiwavelength anomalous dispersion method. The 10 selenium sites were initially identified by the program SHELEX and SHELEXD with the dataset collected at the peak wavelength (22). Subsequent refinements of the heavy atom parameters and phase calculations were performed with the program SHARP (23), followed by density modification and automated model building with the program RESOLVE (24). The resulting initial model was manually improved to fit into the electron density map using the program COOT (25). Eventually, the atomic models of the apo and Gln-bound form of GatFAB Δ HY were refined against the native datasets up to 2.0 Å resolutions, respectively, using the program PHENIX (26). Molecular graphics were illustrated with CueMol2.0 (<http://www.cuemol.org/>).

Construction of tRNA docking model

In order to build a model of the C-terminal domains of GatB, we superposed the GatB subunit of *Thermotoga maritima* GatCAB-tRNA^{Gln}-GluRS complex structure and placed the YqeY and helical domains of *T. maritima* GatB in the C-terminus of *S. cerevisiae* GatB (18). Since bacterial tRNA^{Asn} was shown to be an efficient substrate for GatFAB (10), we then superposed the GatB subunit and tRNA^{Asn} of *Thermus thermophilus* GatCAB-tRNA^{Asn}-AspRS complex structure and modeled the tRNA^{Asn} onto the *S. cerevisiae* GatFAB structure (17).

Complementation of yeast Δ gatB and Δ gatF strains

The *gatB* and *gatF* genes (*PET112* and *GTF1*) were subcloned into pRS316 vector under the control of their endogenous promoters. Yeast Δ gatB and Δ gatF strains (Euroscarf) were transformed with these plasmids to obtain *gatB* and *gatF* shuffle strains in which a plasmid-borne wild-type gene complements the chromosomal deletion. The genes encoding *gatB* and *gatF* mutants were subcloned into p415MDH vector (10). The GatB and GatF mutants were overexpressed under the control of the mitochondrial malate dehydrogenase (MDH) promoter. All mutants were fused with the N-terminal canonical mitochondrial target sequence of MDH (10). The *gatB* and *gatF* shuffle strains were transformed with these plasmids, respectively. As a negative control, the strain was transformed with an empty vector. Then, these strains were plated on 5-Fluoroorotic

acid plates to select for loss of the plasmid encoding wild-type genes.

Transamidation assay

To characterize the transamidation and glutaminase activities of the GatF mutants, we used Glu-tRNA^{Gln} from unfractionated yeast tRNA enriched to 20% tRNA^{Gln} and yeast ϵ GluRS. To measure the transamidation activity of the GatB mutants, *Helicobacter pylori* tRNA^{Gln} (over 70% purity) was used, this tRNA having the U1-A72 base pair and small D-loop identity determinants of trimeric AdTs found on yeast m tRNA^{Gln} (27).

H. pylori tRNA^{Gln}, yeast unfractionated tRNA, *H. pylori* GluRS2 (ND-GluRS) and yeast ϵ GluRS were overproduced and purified as described in previous studies (10,28). The aminoacylation mixture (100 μ l) containing 100 mM Na-HEPES (pH 7.2), 30 mM KCl, 10 mM ATP, 12 mM MgCl₂, 12 μ M [¹⁴C]L-glutamate ([¹⁴C]Glu) (330 cpm/pmol, Amersham), 0.1 mg/ml BSA, 10 μ M *H. pylori* tRNA^{Gln} or yeast unfractionated tRNA and 5 μ M *H. pylori* GluRS2 or yeast ϵ GluRS was incubated at 37°C for 30 min. The [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln} was extracted using acid-buffered phenol and chloroform and precipitated with ethanol (28). The standard transamidation mixture containing 100 mM Na-HEPES (pH 7.2), 30 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 1 mM L-Gln as amide group donor, approximately 6 μ M [¹⁴C]Glu-tRNA^{Gln} and 0.1–0.2 μ M *S. cerevisiae* GatFAB variants was incubated for 10–20 min at 37°C. For the transamidation tests performed without Gln, 20 mM NH₄Cl was used. Activities were then assayed as previously described (28).

Glutaminase assay

The glutaminase mixture containing 100 mM Na-HEPES (pH 7.2), 30 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 10 nM ATP, 50 μ M [¹⁴C]L-glutamine ([¹⁴C]Gln), 0.025 mg/ml BSA, approximately 6 μ M Glu-tRNA^{Gln} and 0.1 μ M *S. cerevisiae* GatFAB variants was incubated at 37°C for 10–20 min. The reaction was stopped and spotted on Thin-layer Chromatography (TLC) plates as above.

RESULTS

Structure determination

To facilitate crystallization, the putative N-terminal mitochondrial targeting sequences of GatB (residues 1–15) and GatF (residues 1–23) were eliminated. Furthermore, we truncated the C-terminal helical and YqeY domains (residues 330–474 and 475–541, respectively), which were reported to be highly flexible (17,18). The crystal structure of the heterotrimeric GatFAB AdT from *S. cerevisiae* was determined by the multiple wavelength anomalous diffraction method. The final models of the free and glutamine-bound forms were refined at 2.0 Å resolutions to free R-factors of 22.2 and 21.9%, respectively (Figure 1A, Tables 1 and 2).

Table 1 Data collection and phasing statistics

	SeMet	Free form	Gln-bound form
Data collection			
X-ray source	SPring-8 BL41XU	PF-AR NE3A	PF-AR NW12
Wavelength (Å)	0.97914 (peak)	0.97937 (inflection)	1.0
Space group	$P2_12_12_1$		
Cell dimensions			
a, b, c (Å)	61.78, 85.35, 189.58	61.80, 85.43, 189.57	61.95, 86.30, 191.23
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	50.0–2.10 (2.14–2.10)	50.0–2.10 (2.14–2.10)	50.0–1.95 (1.98–1.95)
R_{merge} (%)	10.1 (35.2)	9.6 (37.9)	11.8 (38.9)
$I/\sigma(I)$	82.19 (9.29)	54.34 (4.44)	21.38 (2.59)
Completeness (%)	99.9 (99.8)	99.6 (95.9)	98.7 (98.8)
Redundancy	23.4 (16.2)	11.2 (5.7)	5.3 (4.1)

*Highest resolution shell is shown in parentheses.

Table 2 Structure refinement statistics

	Free form	Gln-bound form
Refinement		
Resolution (Å)	50–1.95 (1.98–1.95)	50–2.0 (2.02–2.0)
No. of reflections	74 447	68 955
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.1881/0.2218 (0.2715/0.2860)	0.1890/0.2192 (0.2735/0.3030)
No. of atoms		
Protein	6597	6596
Ions/Ligand	4	13
Water	274	327
Average B -factors (Å ²)		
Protein	40.1	51.4
Ions/Ligand	45.5	41.1
Water	36.9	41.8
Coordinates error (Å)	0.52	0.50
r.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.004	0.006
Bond angles (°)	0.892	1.060

*Highest resolution shell is shown in parentheses.

Overall structure

The present structure revealed that the organization of the yeast GatA and GatB subunits is quite similar to those of their bacterial homologs from *T. thermophilus*, *T. maritima*, *Staphylococcus aureus* and *Aquifex aeolicus* (14–18) (Figure 1B). The root mean square deviations between the GatA and GatB subunits of *S. cerevisiae* and those of *A. aeolicus* are 1.6 and 1.1 Å, respectively.

Like the bacterial GatCs, the GatF subunit is an unstructured protein (Figure 1C). Based on the superposition of our structure with that of the bacterial GatCAB, the yeast GatF can be divided into two halves, the C-terminal GatC-like portion and the N-terminal appended domain (NTD). Despite the low sequence similarity between GatF and GatC, the C-terminal part of GatF adopts a structure similar to that of the bacterial GatC, and surrounds the contact area between GatA and GatB (14). The NTD extends the interaction with GatA and encircles the amidase site. This structural property was not observed in any bacterial GatCAB structures (Figure 1B and C), and was not predicted in a recently proposed homology model for GatFAB (29).

Two catalytic sites connected by an ammonia tunnel

The GatFAB AdT has two distinct and spatially separated catalytic sites for the glutaminase and transamidase reactions (Figure 2A and B). The present Gln-bound form structure reveals that the glutamine molecule is bound to the glutaminase site of GatA in a manner conserved among the bacterial homologs (14,15) (Figure 2A). The amide group of Gln is recognized by D418 and the carboxyl group is stabilized by R334. The Gln side chain is in the vicinity of the conserved S154-*cis*-S130-K52 catalytic scissors, which are thought to form the acyl intermediate at nucleophilic S154 like in the bacterial GatA structures (14,15).

In contrast, we were not able to identify any substrate in the AdT site of GatB, whereas *S. aureus* and *A. aeolicus* GatB structures co-crystallized with ATP or its analogues (14,15) (Figure 2B). In order to analyze the transamidation mechanism, a structural comparison with *S. aureus* GatCAB allowed us to construct a model in which ADP and the catalytically essential Mg²⁺ ion are docked into the yeast GatB active site (Figure 2B). The Mg²⁺ ion plays a catalytic role in the nucleophilic reaction to form γ -phosphoryl-glutamyl-tRNA^{Gln} (14,15). Our model suggested that the ATP molecule can be bound through electrostatic interac-

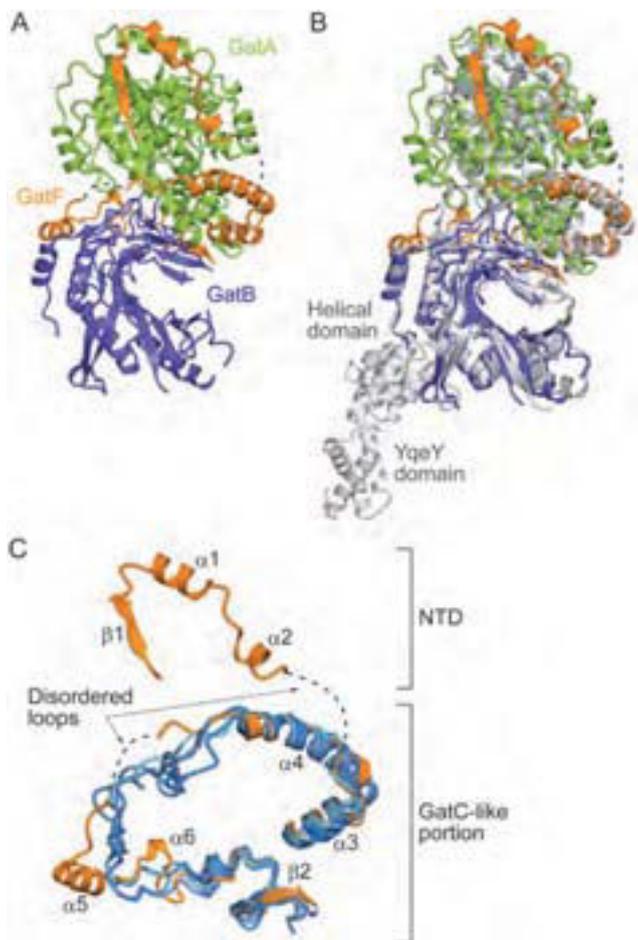


Figure 1. Structural comparison of GatFAB with GatCAB. (A) Ribbon representation of the crystal structure of *S. cerevisiae* GatFAB, consisting of the GatA (green), GatB (navy blue) and GatF (orange) subunits. Dashed lines indicate the disordered loops of GatF (residues 59–66 and 114–128). (B) The superposition of the crystal structure of *S. cerevisiae* GatFAB onto that of *S. aureus* GatCAB. GatFAB is shown in the same color code as in (A). *S. aureus* GatCAB is colored gray (PDB ID: 3IP4). GatF is colored orange. The *T. thermophilus*, *T. maritima*, *S. aureus* and *A. aeolicus* GatCAB structures (PDB IDs: 3KFU, 3AL0, 3IP4 and 3H0R) are colored blue and superposed onto that of *S. cerevisiae* GatFAB.

tions by the conserved E34, T189, N230 and S232 on the $\beta 1$ and $\beta 11$ strands in the bottom of the cradle domain, as in bacterial GatB. The model also indicated that the conserved H36, E156 and E186 recognize the Mg^{2+} ion.

Adjacent to the modeled Mg^{2+} ion is a molecular tunnel that penetrates the GatA and GatB subunits and connects the GatA glutaminase and GatB transamidase sites like in bacterial GatCABs (14) (Figure 2C). The tunnel is composed of hydrophilic residues that are highly conserved from bacteria to eukaryotes. Inside this tunnel are several electron densities corresponding to water molecules, or possibly ammonia. These structural features indicate that the GatFAB AdT harbors the same ammonia channeling system as bacterial AdT.

The C-terminal domains of GatB play a key role in tRNA anchoring

To elucidate the tRNA binding mode of GatFAB, we performed a molecular superposition using the tRNA-bound structures of the bacterial GatCABs to dock the tRNA^{Asn} and the missing C-terminal helical and YqeY domains onto the present GatFAB structure (17,18). It has been shown that GatFAB efficiently transamidates a heterologous bacterial aspartyl-tRNA^{Asn} (Asp-tRNA^{Asn}), and that tRNA^{Asn} and tRNA^{Gln} share the identity elements (10,27). The good fit between the modeled tRNA^{Asn} and GatB allowed the CCA terminus to contact the transamidation site (Figure 3A). Our docking model suggested that the cradle domain can recognize the U1-A72 base pair in the acceptor stem, which is the major determinant for transamidation by AdTs (17,18,27), and that the helical and YqeY domains bind the D-loop of tRNA (Figure 3A). To ascertain the importance of the interaction between the C-terminal domains of GatB and *m*tRNA^{Gln}, we constructed C-terminal deletion mutants of GatB lacking the YqeY domain (GatB Δ Y, residues 16–474) and both the helical and YqeY domains (GatB Δ HY, residues 16–329). As a positive control, we also constructed the GatB variant containing both C-terminal domains (GatB_{16–541}, residues 16–541). Since all of the GatB mutants lack the endogenous N-terminal putative Mitochondrial Targeting Signal (MTS), we fused the MTS of the yeast MDH to the N-terminus of each GatB mutant to allow the *in vivo* mitochondrial import of these GatB variants. Indeed, GatB_{16–541} did not exhibit any growth defects in either fermentation or respiration, showing that the MTS of MDH suffices for import of GatB (Supplementary Figure S1A). *In vivo* complementation tests revealed that the strains expressing either GatB Δ Y or GatB Δ HY displayed severe growth defects under respiratory conditions as compared to pseudo-wild-type GatB_{16–541}, but had almost no impact on growth in fermentable medium (Figure 3B).

To characterize the enzymatic activities of these GatB mutants, we subsequently performed transamidation tests with the purified full-length and C-terminal deletion mutants of GatFAB (GatFAB Δ Y and GatFAB Δ HY) using a heterologous bacterial Glu-tRNA^{Gln} possessing all the necessary identity determinants to be fully competent for transamidation assays (18). In the activity tests, the full-length GatFAB protein efficiently transamidated the bacterial Glu-tRNA^{Gln} into Gln-tRNA^{Gln}, while the GatFAB Δ Y and GatFAB Δ HY mutants displayed no measurable activities (Figure 3C).

These results demonstrate that GatB is mandatory for mitochondrial activity and that removal of the small YqeY domain consisting of only four helices inactivates GatB. Therefore, we propose that, like in the bacterial GatCAB (14,16), the helical and YqeY domains are critical for adequate anchoring of the Glu-*m*tRNA^{Gln} core and synthesis of Gln-*m*tRNA^{Gln}.

The GatC-like portion encircles the GatA–GatB interface

In the GatC-like portion of GatF, the $\alpha 3$ and $\alpha 4$ helices bind to GatB and GatA through hydrophobic and electrostatic

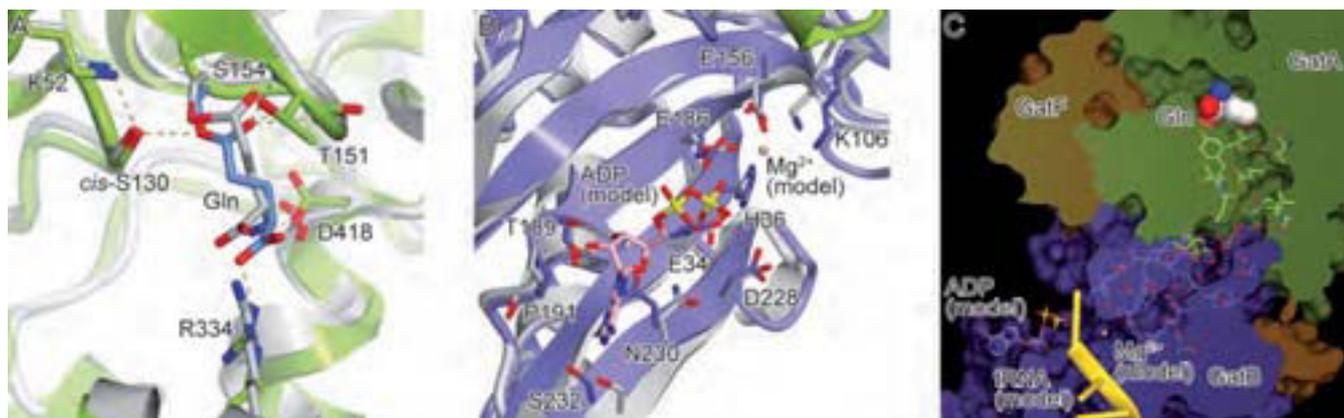


Figure 2. Active sites of GatFAB. GatFAB is colored as in Figure 1. (A) The glutaminase site of GatA in the Gln-bound form. The bound Gln molecule is shown as blue sticks. The crystal structure of *A. aeolius* GatA is colored gray and superposed onto that of *S. cerevisiae* GatA. (B) The amidotransferase site of GatB in the apo form. The crystal structure of *S. aureus* GatB is colored gray and superposed onto that of *S. cerevisiae* GatB. The modeled ADP molecule and Mg^{2+} ion are shown as pink sticks and as a sphere, respectively. (C) Surface model representation of a hydrophilic NH_3 tunnel. The tunnel is filled with water molecules (red spheres), which interact with conserved residues of GatA and GatB. The modeled ADP and Mg^{2+} ion are shown as in (B). The modeled *T. thermophilus* tRNA^{Asp} is colored yellow.

interactions. These helices are also observed in the bacterial GatC structures (Figure 1B and C), $\alpha 3$ and $\alpha 4$ having $\sim 40\%$ sequence similarity and $\sim 20\%$ sequence identity with the corresponding *S. aureus* helices (10,30). The contact region of GatF is mainly composed of residues that are highly conserved in the fungal GatF proteins. Among these conserved residues, L77, L80 and L83 of helix $\alpha 3$, and L97, L101 and F103 of helix $\alpha 4$ are also conserved in the bacterial and mammalian GatC proteins. These residues mediate the hydrophobic interactions with GatA to form a helical bundle that stabilizes the heterotrimer (Supplementary Figure S2A). This domain is extended by an unstructured internal loop that crosses over the GatA–GatB contact area. The C-terminus of the $\beta 2$ strand forms an antiparallel β -sheet with a β hairpin of GatB (Supplementary Figure S2D). These binding modes resemble those of the corresponding regions of the bacterial GatC. However, the internal loop of GatF structurally differs from that of GatC in several ways (Figure 1C, Supplementary Figure S2B and C). After the helical bundle, GatF possesses a flexible disordered loop (114–128), while GatC tightly contacts GatA (Supplementary Figure S2B). Moreover, GatF has two insertion helices, $\alpha 5$ and $\alpha 6$. The first insertion helix, $\alpha 5$, is anchored to GatB through hydrophobic interactions (Supplementary Figure S2C). Meanwhile, the bacterial GatC harbors the invariant Arg and Asp residues (R64 and D66 in *S. aureus* GatCAB) that interact with the conserved Ser and Asn residues of GatB (S19 and N52 in *S. aureus* GatCAB) (14), which are not conserved in yeast GatFAB (Supplementary Figure S2C).

The NTD of GatF is bound to the GatA core domain

The NTD is tightly bound to the GatA core domain and is composed of one β -strand, two α -helices and unstructured loop regions (Figures 1C and 4A). The linker loop connecting the NTD and the C-terminal GatC-like structure is completely disordered, reflecting the flexibility of the NTD (Figure 1A and C).

The first β strand of GatF folds into a twelve-stranded β -sheet central domain, together with eleven β -strands of GatA. In the $\beta 1$ strand and $\alpha 1$ helix of GatF, F36, I42, Y45 and L46 form a hydrophobic core with I239, Y256, L260 and L270 of the GatA subunit (Figure 4B). These hydrophobic residues from GatF are highly conserved among the fungal AdTs (Supplementary Figure S3). On the other hand, the following loop and $\alpha 2$ helix form electrostatic interactions with GatA (Figure 4C). The main chain carbonyl group of R48 of GatF forms a salt bridge with H245 of GatA (Figure 4C). In the $\alpha 2$ helix, H54 of GatF forms a salt bridge with E246 of GatA, while Y56 of GatF hydrogen bonds with N280 of GatA (Figure 4C). However, as compared to the hydrophobic core in the $\beta 1$ strand and the $\alpha 1$ helix, these hydrophilic residues are not well conserved among the fungal AdTs (Supplementary Figure S3). Intriguingly, the side chain of H54 is disordered in the apo form structure, while all of the other hydrophilic and hydrophobic interactions between GatF and GatA are preserved in both the Gln-bound and free forms. Notably, H54 is located in the vicinity of the glutaminase pocket in the Gln-bound form, implying that its stability depends on Gln-binding. Given that the interface is adjacent to the glutaminase site (Figure 4A), the interaction between the GatF NTD and GatA seems to play a key role in stabilizing the glutaminase site for effective glutamine hydrolysis.

Functional analyses for N-terminal deletion mutants

To verify *in vivo* the functional properties of the NTD, we tested a series of N-terminal mutants (GatF_{24–183}, GatF_{37–183}, GatF_{47–183}, GatF_{58–183} and GatF_{67–183}) for their ability to complement the deletion of the WT *gatF* gene (Figure 5A). GatF_{24–183} lacks the N-terminal MTS but retains the entire NTD, whereas GatF_{67–183} completely lacks the NTD and consists of only the GatC-like portion of GatF. The other variants, GatF_{37–183}, GatF_{47–183} and GatF_{58–183}, partially lack the NTD. Since all of the GatF mutants lack the endogenous N-terminal putative MTS, we

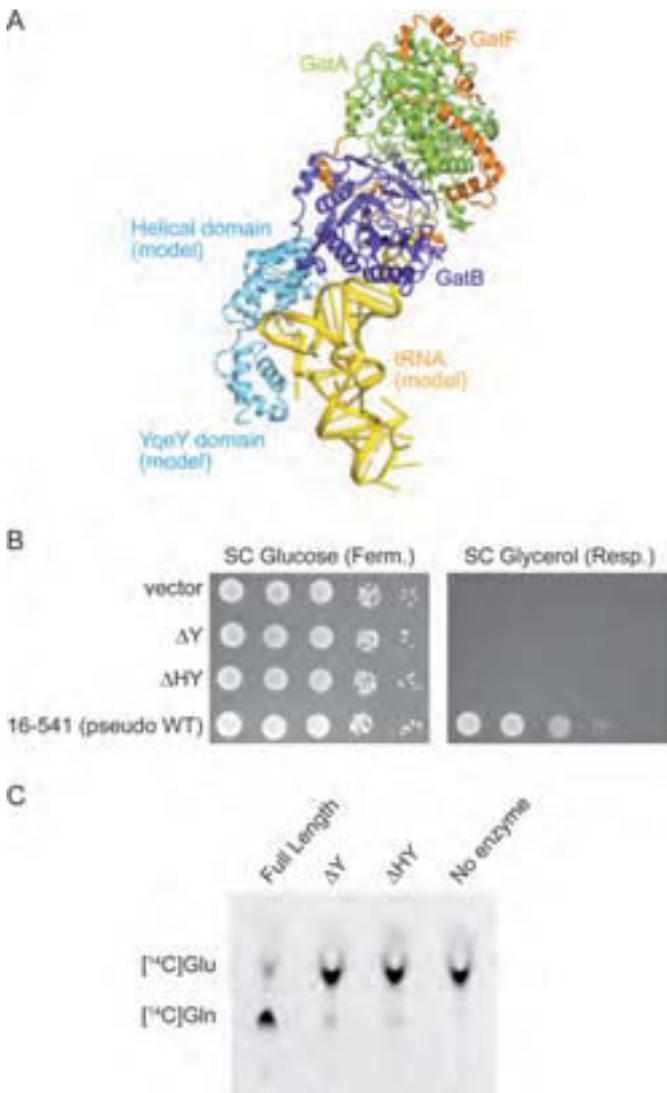


Figure 3. Functional analyses of YqeY and the helical domain of GatB. (A) Model of the GatFAB-tRNA complex. tRNA^{Asn} from *T. thermophilus* (PDB ID: 3KFU) and the helical and YqeY domains of GatB from *T. maritima* (PDB ID: 3AL0) are docked onto the GatFAB Δ HY structure. The modeled tRNA^{Asn} and the C-terminal domains of GatB are colored yellow and cyan, respectively. GatFAB is colored as in Figure 1. (B) Growth phenotypes of GatB mutants on fermentative (SC Glucose) or respiratory (SC Glycerol) media. (C) Bioimager scan of the TLC plate for a transamidase assay, which shows the absence of conversion of *H. pylori* tRNA^{Gln}-bound [¹⁴C]Glu into [¹⁴C]Gln, catalyzed by the GatFAB mutants with the C-terminal deletions of GatB (ΔY and ΔHY).

fused the MTS of MDH to the N-terminus of each GatF mutant as *in vivo* analyses of GatB mutants.

The GatF₂₄₋₁₈₃ mutant did not exhibit any growth defects in either fermentation or respiration, revealing that the MTS of MDH allows mitochondrial import of GatF (Supplementary Figure S1B). As compared to the pseudo-wild-type GatF₂₄₋₁₈₃ variant, the progressive NTD deletions in the GatF₃₇₋₁₈₃, GatF₄₇₋₁₈₃ and GatF₅₈₋₁₈₃ mutants impacted growth on respiratory medium, but did not completely prevent the use of the respiratory metabolism (Figure 5A). Strangely, the mutant that lacked the entire NTD

(GatF₆₇₋₁₈₃) grew slightly better than that bearing the loop connecting the $\alpha 2$ and $\alpha 3$ helices (GatF₅₈₋₁₈₃). These results indicated that the NTD is highly important for the enzymatic activity of GatFAB, but the GatC-like domain can still assemble a functional GatFAB AdT that forms sufficient amounts of Gln-mtRNA^{Gln} *in vivo* (Figure 5A). Unexpectedly, the Δ gatF strains and the GatF mutants displayed mild growth defects in fermentation, suggesting the participation of GatF in other pathways during fermentative growth.

To explore the functional role of the NTD in tRNA-dependent Gln synthesis, we generated *E. coli* strains expressing the GatFAB mutants with sequential N-terminal deletions of GatF. Immunoblot analysis revealed that all of the truncated mutants showed marked defects in their heterologous expression levels as compared to the pseudo-wild-type GatFAB_{F24-183} variant (Supplementary Figure S4A). When purified, all three subunits were equimolar and robustly detected in GatFAB_{F37-183} and GatFAB_{F47-183} variants on coomassie blue-stained protein gel (Supplementary Figure S4B). The minor bands between GatF and GatA were contaminants from the host cell. Thus, both GatF₃₇₋₁₈₃ and GatF₄₇₋₁₈₃ are still capable of assembling a GatFAB heterotrimer. However, in the fractions of GatFAB_{F58-183} and GatFAB_{F67-183} variants, all three subunits were difficult to detect (Supplementary Figure S4B). These results showed that the expression was drastically decreased with the shortening of the NTD, implying that the NTD contributes to stability of the GatA subunit to prevent its degradation in the cell extract.

Due to the especially low expression levels, we were unable to purify the GatFAB_{F58-183} and GatFAB_{F67-183} mutants. However, we obtained sufficient quantities of the GatFAB_{F37-183} and GatFAB_{F47-183} mutants, which retain the $\alpha 2$ helix but partially or completely lack the hydrophobic core, for enzymatic activity measurements.

In agreement with its participation in GatA folding, the GatFAB_{F37-183} and GatFAB_{F47-183} mutants showed reduced activities in both GatA-mediated glutamine-hydrolysis and GatB-mediated transamidation when compared to that of the full-length (Figure 5B and Supplementary Figure S5). When the glutaminase reaction was bypassed by using ammonium chloride as the ammonia donor, a shorter NTD seemed to favor transamidation (Figure 5B and Supplementary Figure S5). Notably, the difference in transamidation activity with free ammonia as the donor between the GatFAB_{F37-183} mutant and the GatFAB_{F47-183}, which has lost the hydrophobic cluster, highlights the importance of this cluster in modulating the folding of the glutaminase site. In agreement with our observations of the GatFAB structure, the biochemical data therefore further suggest that the NTD is strongly linked to the glutaminase activity, likely by playing a key role in stabilizing the GatA core structure, but possibly also by affecting the use of free ammonia. Meanwhile, the effect on transamidation could be caused by unstable folding of the deletion mutants affecting the trimeric assembly, and/or be a consequence of the reduction in glutaminase activity.

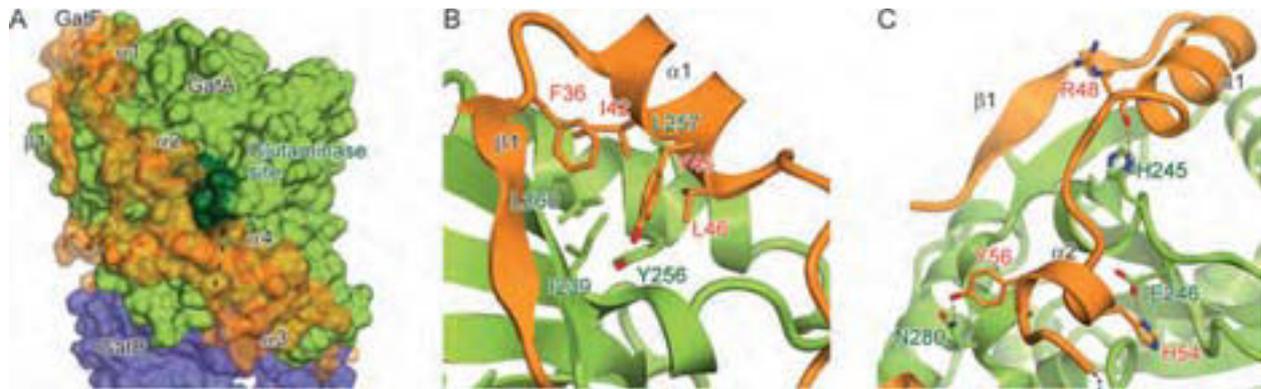


Figure 4. Interface between GatA and the NTD of GatF. GatFAB is colored as in Figure 1. (A) Surface representation of GatFAB. GatF is also shown in a ribbon representation. The glutaminase site is colored dark green. (B and C) Close-up views of the GatF-GatA interface.

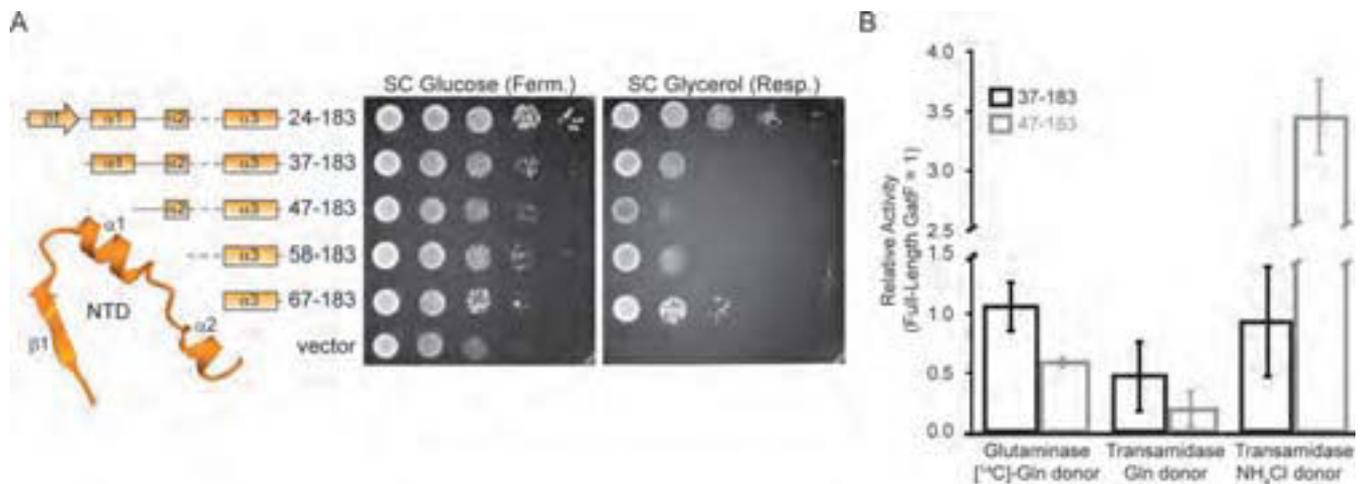


Figure 5. Functional analyses of the GatF NTD. (A) Secondary structures of GatF mutants are shown (left). Growth phenotypes of GatF mutants on fermentative (SC Glucose) or respiratory (SC Glycerol) media (right). (B) Quantification of the activities of the GatFAB_{F37-183} and GatFAB_{F47-183} mutants relative to the full-length GatFAB. Glutaminase activity as well as transamidase activities with glutamine or NH₄Cl as the amide donor are shown for GatF mutants relative to the activity of the full-length GatFAB. Results are the average of three experiments, with error bars representing standard deviation (See Supplementary Figure S5).

DISCUSSION

In many eukaryotes, Gln-mtRNA^{Gln} is generated by the transamidation pathway employing a ND-GluRS and an AdT. Although the orthologs encoding catalytic subunits such as GatA and GatB can be easily identified in the majority of the eukaryotic genomes, the third auxiliary subunit shows more sequence variation (10).

While the GatC subunit is used in most eukaryotes analyzed so far, fungi utilize the GatF subunit. The reason why fungi evolved this subunit, with its NTD extension domain, remains unknown. Our structural analyses revealed that GatF adopts an extended structure similar to that of GatC by surrounding the main catalytic body. The portions of the GatAB interface that are conventionally stabilized by GatC are also stabilized by the GatC-like portion of GatF, albeit by different mechanisms on the local scale (Supplementary Figure S2). On the larger scale, the main difference is the additional interface between GatA and the NTD of GatF. GatF therefore assures the structural role of GatC in addition to its own, despite the lack of sequence homology.

Such a role in GatA stabilization is observed in the bacterial GatC. Previous work proposed that the bacterial GatC subunit is required for folding of the GatA subunit (31). Our current study can provide insights into the role of the small, non-catalytic subunit of the trimeric AdTs. GatA is unstable, and therefore needs to be coexpressed with non-catalytic subunits, GatC or GatF. In bacteria, the ring structure of GatC is sufficient to retain the GatA structure. However, in yeast mitochondria, the GatA subunit may be more unstable and need extensive interactions provided by the NTD of GatF. Our functional analyses revealed that the NTD contributes to the GatA glutaminase activity, suggesting that the yeast organellar GatF subunit is both a glutaminase scaffolding peptide and an assembly factor. The increased rate of transamidation for GatFAB_{F47-183} when NH₄Cl was the ammonia donor hints at a role in controlling the use of free ammonia.

Given that the NTD-deprived GatF strains can still respire, despite their impaired ability to efficiently generate NH₃ by Gln deamination, we considered that a Δ *gatF* mutant should be rescued by the overexpression of a bona fide

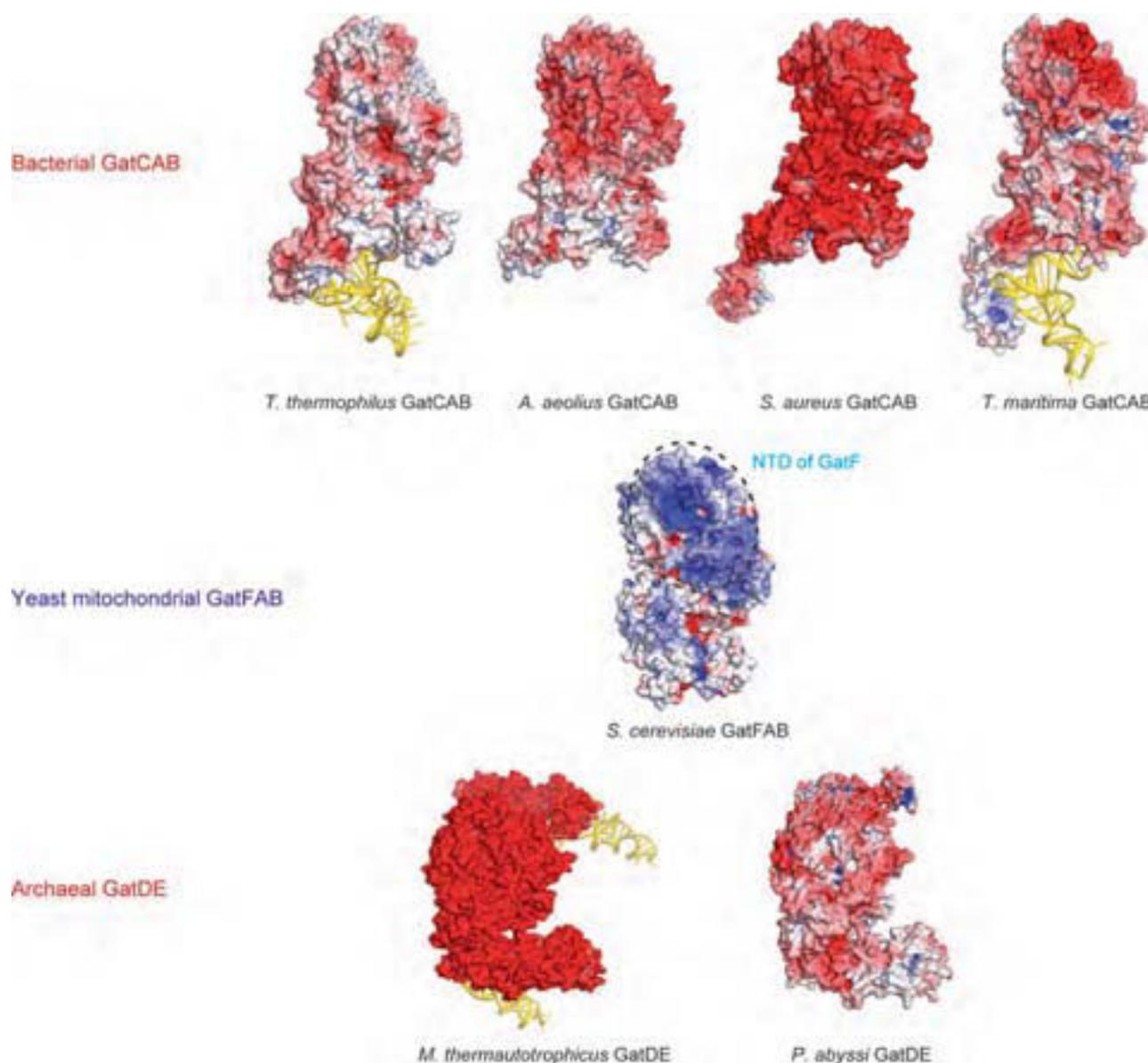


Figure 6. Electrostatic surface potential models of tRNA-dependent amidotransferases. Bacterial GatCABs (PDB IDs: 3KFU for *T. thermophilus* GatCAB-tRNA^{Asn} complex, 3H0R for *A. aeolius* GatCAB, 3IP4 for *S. aureus* GatCAB and 3AL0 for *T. maritima* GatCAB-tRNA^{Gln} complex) are shown on the upper lane. *S. cerevisiae* GatFAB (this study) is shown on the center of the figure. The NTD of GatF is indicated by the dashed circle. Archaeal GatDEs (PDB IDs: 2D6F for *M. thermautotrophicus* GatDE-tRNA^{Gln} complex and 1ZQ1 for *P. abyssi* GatDE) are shown on the lower lane. Electrostatic surface potential is calculated by the program APBS (36).

mitochondrial *gatC* gene. A previous study reported that a respiration-defective mutant of the *GatB* gene was complemented by the expression of *Bacillus subtilis* *GatB* fused with an MTS, suggesting that a chimeric *GatCAB* has sufficient activity *in vivo* (32). However, the overexpression of the human *GatC* fused to the MDH MTS did not rescue the growth of the $\Delta gatF$ KO strain (Supplementary Figure S6). This result suggested that yeast *GatA* and *GatB* are not able to form an active chimeric AdT even with another organellar *GatC*, perhaps due to the structural differences in the internal loops (Supplementary Figure S2). Another possibility would be that *GatF* may play additional roles in mitochondria that are not supported by *GatC*, such as signal

transduction or adaptation to the mitochondrial environment, in addition to its primary function as a *GatA*–*GatB* assembly factor.

Intriguingly, the electrostatic potentials of the solvent-accessible surface models are quite different between the bacterial and yeast mitochondrial AdTs (Figure 6). While all reported bacterial *GatCAB* structures, *S. aureus*, *A. aeolicus*, *T. thermophilus* and *T. maritima* *GatCAB*s, are negatively charged (14–18), the yeast *GatFAB* has positively charged patches spread over the *GatF* and *GatA* subunits. Notably, all reported archaeal *GatDE* AdT structures, *Pyrococcus abyssi* and *Methanothermobacter thermautotrophicus* *GatDE*s, are also negatively charged (33,34). These dif-

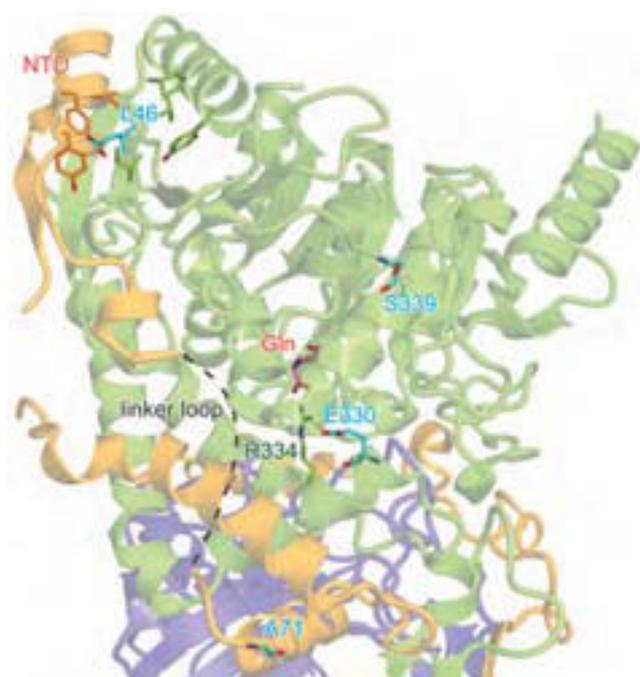


Figure 7. Structural mapping of respiration-defective mutations. GatFAB is shown as in Figure 1. The residues associated with the respiration-defective phenotypes are shown as cyan sticks. The bound Gln molecule is shown as pink sticks.

ferences may be an adaptation to the physiological environment, or relevant to the localization in organelles. Previous reports indicated that the GatF subunit can be isolated from the inner membrane, and that it likely faces the matrix (30), although GatF does not have any specific domain for anchoring to the phospholipid membrane (35). The presence of the positively charged patch provides a possible explanation for the anchoring of GatFAB to the inner membrane through electrostatic interactions with negatively charged phospholipids. However, it remains unclear whether GatF is directly anchored to the inner membrane or if it requires other adapter molecules for anchoring. The considerable difference in electrostatic surface potential between fungal AdT and those previously described could also be exploitable with respect to the development of inhibitory compounds specific to fungi. It may also be related to the impaired use of free ammonia as an amide donor in the full-length enzyme compared to an NTD truncated mutant.

A recent study reported that the L46S and A71G double mutations in the yeast GatF subunit cause a temperature-sensitive (*ts*) respiratory phenotype (30). This *ts* mutant strain accumulated defective forms of the *atp8* and *cox2* gene products due to significantly decreased Gln_mtRNA^{Gln} formation (30). The present structure revealed that these residues are located on the NTD (Figure 7). L46 participates in the conserved GatF hydrophobic core contacts between GatF and GatA. A71 is located in between the NTD and the GatC-like portion of GatF. Based on the present structure, the L46S and A71G double mutations may weaken the hydrophobic interaction in the GatF–

GatA interface, by increasing the flexibility of the disordered linker loop and/or destabilizing the GatA structure, thereby impairing the glutaminase activity. Thus, the structural mapping of these mutations agrees well with our present work, showing that the enhanced stabilizing interactions of the NTD are critical for the enzymatic activity of GatA, and thus the efficiency of mitochondrial translation.

Moreover, the GatA E330K and S399F double mutations also lead to respiration-defective phenotypes, which could be suppressed by the overexpression of GatF (30). Notably, these mutations are located in the vicinity of the glutaminase active site (Figure 7). E330 is highly conserved and interacts with R334, which recognizes the γ -carbonyl group of the Gln substrate molecule, indicating that the E330K mutation can disrupt this interaction and reduce the affinity for Gln. On the other hand, S399 is not well conserved, but the S399F mutation may reduce the glutaminase activity by increased steric hindrance due to the aromatic side chain. Therefore, our structural mapping revealed that the mutations of both the glutaminase site of GatA and the NTD of GatF display similar functional phenotypes, confirming the existence of a tight functional and structural relationship between the glutaminase activity and the presence of the NTD.

To conclude, our work describes the structure of the yeast mitochondrial GatFAB AdT displaying a new type of subunit, GatF. We proved that the yeast GatFAB AdT employs the conserved glutaminase and AdT active sites connected by a molecular tunnel. GatF is composed of the GatC-like portion and the NTD. While the GatC-like portion encircles the GatA–GatB contact area, the NTD forms extended interactions with the GatA core domain. Moreover, the structure-based functional analyses suggest the NTD is a trans-acting scaffolding peptide for GatA. Our findings shed a new light on the architecture and function of the mitochondrial tRNA-dependent AdT, as well as on glutamine decoding in mitochondria.

ACCESSION NUMBERS

The atomic coordinates are deposited in the Protein Data Bank (PDB ID codes: 4N0H and 4N0I).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to the beamline staff at BL41XU of SPring-8 (Harima, Japan) and NW12A and NE3A of PF-AR (Tsukuba, Japan) for assistance in data collection, to G. Bader, A. Huber and A. Kurabayashi for technical assistance, and R. P. Martin for fruitful discussions.

FUNDING

JST-CNRS Japanese-French Cooperative Program on ‘Structure and Function of Biomolecules’ [O.N. and H.B.]; Université de Strasbourg; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Agence Nationale de

la Recherche [ANR-09-BLAN-0091-02]; National Program 'Investissement d'Avenir' LABEX vague 2 ANR-11-LABX-0057_MITOCROSS; Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Postdoctoral Fellowship for Research Abroad [Y.A.]; Naito Foundation [Y.A.]; National Research Agency (ANR) for the 'MitoCross' Laboratory of Excellence (Labex) [ANR-10-IDEX-0002-02 'Investissements d'Avenir' to J.L.H.]; Ministère de l'Éducation Nationale [M.F., F.F. and L.E.]; de la Recherche et de la Technologie [M.F., F.F. and L.E.]; AFM-Téléthon [M.F.]; Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) ['Funding Program for World-Leading Innovative R&D on Science and Technology (FIRST program)' to O.N.]; Japan Science and Technology Agency (JST) [Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) Program 'The Creation of Basic Medical Technologies to Clarify and Control the Mechanisms Underlying Chronic Inflammation' to O.N.]. Source of open access funding: Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) Program 'The Creation of Basic Medical Technologies to Clarify and Control the Mechanisms Underlying Chronic Inflammation' of Japan Science and Technology Agency (JST) to O.N.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Bonnefond, L., Fender, A., Rudinger-Thirion, J., Giegé, R., Florentz, C. and Sissler, M. (2005) Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry*, **44**, 4805–4816.
- Frechin, M., Duchêne, A.M. and Becker, H.D. (2009) Translating organellar glutamine codons: a case by case scenario? *RNA Biol.*, **6**, 31–34.
- Sagan, L. (1967) On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.*, **14**, 255–274.
- Curnow, A.W., Tumbula, D.L., Pelaschier, J.T., Min, B. and Söll, D. (1998) Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12838–12843.
- Tumbula, D.L., Becker, H.D., Chang, W.Z. and Söll, D. (2000) Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature*, **407**, 106–110.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonso, J.D. and Söll, D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev.*, **19**, 583–92.
- Rinehart, J., Horn, E.K., Wei, D., Söll, D. and Schneider, A. (2004) Non-canonical eukaryotic glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases form mitochondrial aminoacyl-tRNA in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 1161–1166.
- Pujol, C., Bailly, M., Kern, D., Maréchal-Drouard, L., Becker, H. and Duchêne, A.M. (2008) Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNAGln synthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 6481–6485.
- Nagao, A., Suzuki, T., Katoh, T., Sakaguchi, Y. and Suzuki, T. (2009) Biogenesis of glutamyl-mt tRNAGln in human mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 16209–16214.
- Frechin, M., Senger, B., Brayé, M., Kern, D., Martin, R.P. and Becker, H.D. (2009) Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev.*, **23**, 1119–1130.
- Wilcox, M. (1969) Gamma-glutamyl phosphate attached to glutamine-specific tRNA. A precursor of glutamyl-tRNA in *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.*, **11**, 405–412.
- Zhao, L., Dewage, S.W., Bell, M.J., Chang, K.M., Fatma, S., Joshi, N., Silva, G., Cisneros, G.A. and Hendrickson, T.L. (2012) The kinase activity of the *Helicobacter pylori* Asp-tRNA(Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferase is sensitive to distal mutations in its putative ammonia tunnel. *Biochemistry*, **51**, 273–285.
- Horiuchi, K.Y., Harpel, M.R., Shen, L., Luo, Y., Rogers, K.C. and Copeland, R.A. (2001) Mechanistic studies of reaction coupling in Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase. *Biochemistry*, **40**, 6450–6457.
- Nakamura, A., Yao, M., Chinnarong, S., Sakai, N. and Tanaka, I. (2006) Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB. *Science*, **312**, 1954–1958.
- Wu, J., Bu, W., Sheppard, K., Kitabatake, M., Kwon, S.T., Söll, D. and Smith, J.L. (2009) Insights into tRNA-dependent amidotransferase evolution and catalysis from the structure of the *Aquifex aeolicus* enzyme. *J. Mol. Biol.*, **391**, 703–716.
- Nakamura, A., Sheppard, K., Yamane, J., Yao, M., Söll, D. and Tanaka, I. (2010) Two distinct regions in *Staphylococcus aureus* GatCAB guarantee accurate tRNA recognition. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 672–682.
- Blaise, M., Bailly, M., Frechin, M., Behrens, M.A., Fischer, F., Oliveira, C.L., Becker, H.D., Pedersen, J.S., Thirup, S. and Kern, D. (2010) Crystal structure of a transfer-ribonucleoprotein particle that promotes asparagine formation. *EMBO J.*, **29**, 3118–3129.
- Ito, T. and Yokoyama, S. (2010) Two enzymes bound to one transfer RNA assume alternative conformations for consecutive reactions. *Nature*, **467**, 612–616.
- Kawate, T. and Gouaux, E. (2006) Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure*, **14**, 673–681.
- Studier, F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, **41**, 207–234.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.*, **276**, 307–326.
- Schneider, T.R. and Sheldrick, G.M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 1772–1779.
- de La Fortelle, E. and Bricogne, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.*, **276**, 472–494.
- Terwilliger, T.C. (2003) SOLVE and RESOLVE: automated structure solution and density modification. *Macromol. Crystallogr.*, **374**, 22–37.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486–501.
- Adams, P.D., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.-W., Ioerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Read, R.J., Sachetti, J.C., Sauter, N.K. and Terwilliger, T.C. (2002) PHENIX: Building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 1948–1954.
- Bailly, M., Giannouli, S., Blaise, M., Stathopoulos, C., Kern, D. and Becker, H.D. (2006) A single tRNA base pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagine. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6083–6094.
- Huot, J.L., Fischer, F., Corbeil, J., Madore, E., Lorber, B., Diss, G., Hendrickson, T.L., Kern, D. and Lapointe, J. (2011) Gln-tRNA^{Gln} synthesis in a dynamic transamidosome from *Helicobacter pylori*, where GluRS2 hydrolyzes excess Glu-tRNA^{Gln}. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9306–9315.
- Ferreira-Júnior, J.R., Bleicher, L. and Barros, M.H. (2013) Her2p molecular modeling, mutant analysis and intramitochondrial localization. *Fungal Genet. Biol.*, **60**, 133–139.
- Barros, M.H., Rak, M., Paulela, J.A. and Tzagoloff, A. (2011) Characterization of Gtf1p, the connector subunit of yeast mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase. *J. Biol. Chem.*, **286**, 32937–32947.
- Curnow, A.W., Hong, K.W., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T.M. and Söll, D. (1997) Glu-tRNAGln amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 11819–11826.
- Kim, S.I., Stange-Thomann, N., Martins, O., Hong, K.W., Söll, D. and Fox, T.D. (1997) A nuclear genetic lesion affecting *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation is complemented by a homologous *Bacillus* gene. *J. Bacteriol.*, **179**, 5625–5627.

33. Schmitt,E., Panvert,M., Blanquet,S. and Mechulam,Y. (2005) Structural basis for tRNA-dependent amidotransferase function. *Structure*, **13**, 1421–1433.
34. Oshikane,H., Sheppard,K., Fukai,S., Nakamura,Y., Ishitani,R., Numata,T., Sherrer,R.L., Feng,L., Schmitt,E., Panvert,M. *et al.* (2006) Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science*, **312**, 1950–1954.
35. Lemmon,M.A. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 99–111.
36. Baker,N.A., Sept,D., Joseph,S., Holst,M.J. and McCammon,J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 10037–10041.

Supplementary data

Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial GatFAB reveals a novel subunit assembly in tRNA-dependent amidotransferases

Yuhei Arais¹, Jonathan L. Huot¹, Takuya Sekiguchi², Mathieu Frechin³, Frédéric Fischer⁴, Ludovic Enkler¹, Bruno Senger¹, Ryuichiro Ishitani², Hubert D. Becker^{1,*} and Osamu Nureki^{2,*}

¹ Unité Mixte de Recherche 7156 Génétique Moléculaire Génomique Microbiologie, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France

² Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo, Japan

³ Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland

⁴ Unité Propre de Recherche Architecture et Réactivité de l'ARN, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 (0)3 5841 4392; Fax: +81 (0)3 5841 8057; Email: nureki@biochem.s.u-tokyo.ac.jp

Correspondence may also be addressed to Hubert D. Becker. Tel: +33 (0)3 68 85 14 70; Fax: +33 (0)3 68 85 13 65; Email: h.becker@unistra.fr

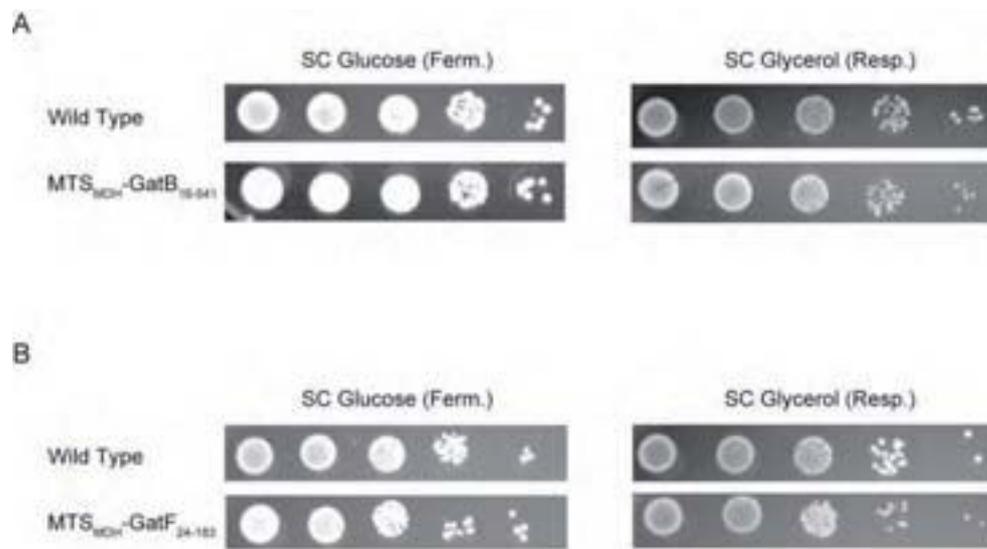


Figure S1. Yeast complementation of the RS453 wild type strain and the GatB₁₆₋₅₄₁ (A) and GatF₂₄₋₁₈₃ (B) mutants fused to MTS of MDH.

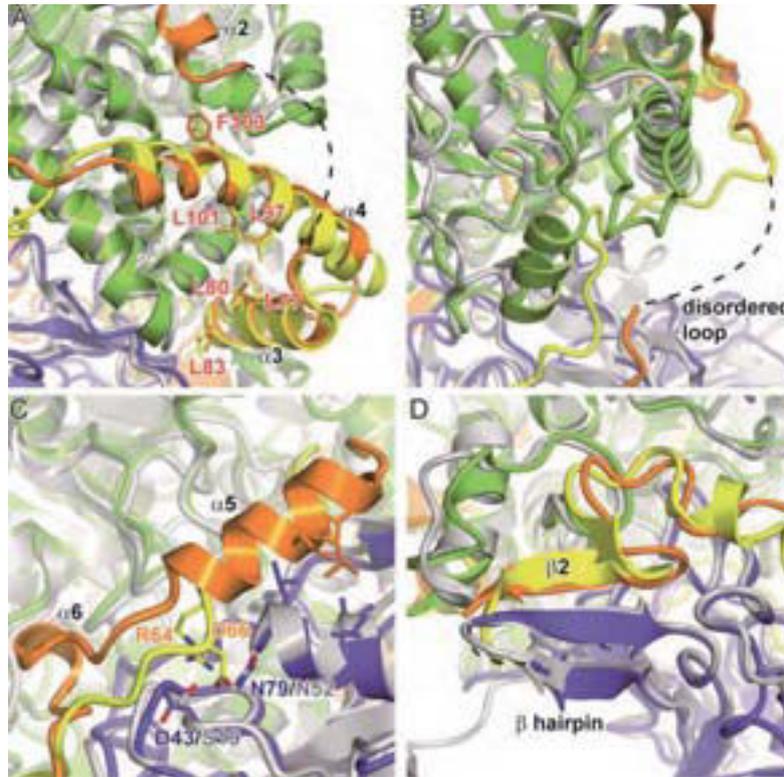


Figure S2. Interactions between GatAB and the GatC-like portion of GatF.

The crystal structure of *S. aureus* GatCAB is superposed onto that of GatFAB. GatFAB is colored as in Figure 1. *S. aureus* GatAB and GatC are colored gray and purple, respectively. (A) The conserved helical bundle. The conserved hydrophobic residues between GatF and GatC are shown as yellow and purple sticks, respectively. (B) The disordered loop followed by the helical bundle. (C) The insertion helices $\alpha 5$ and $\alpha 6$. The residues involving hydrophobic interactions for anchoring $\alpha 5$ helix are shown as yellow and green sticks. The conserved residues forming a hydrogen bond network in bacterial GatC are shown as purple, green and gray sticks. (D) The C-terminal $\beta 2$ strand forming an antiparallel β -sheet with a β hairpin of GatB.

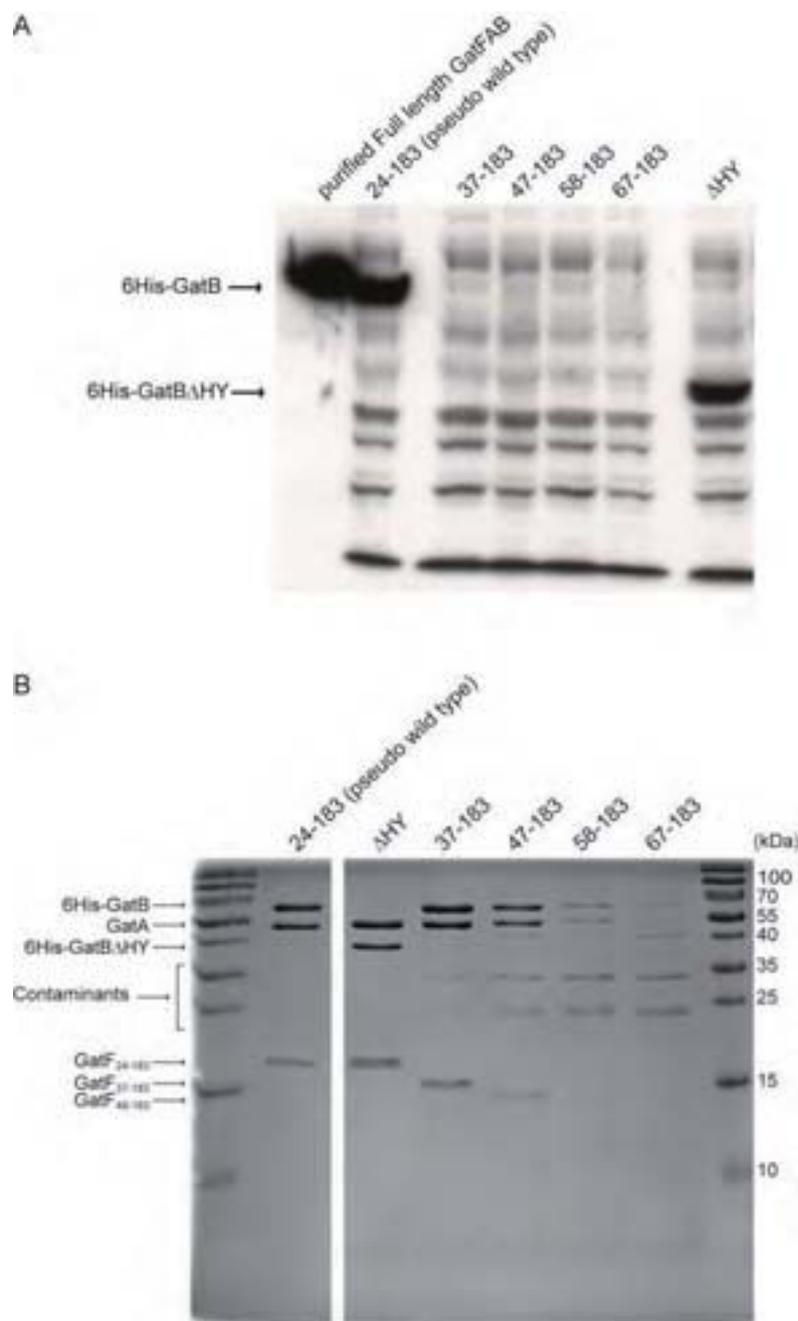


Figure S4. Expression and purification of the GatFAB mutants.

(A) Western blot quantification of the expression levels of GatFAB mutants in *E. coli* total protein extract by anti-His tag antibody. 6His tag is fused to the C-terminus of GatB in each construction. (B) Coomassie blue-stained protein gel of the GatFAB mutants, purified by MagneHis (Promega).

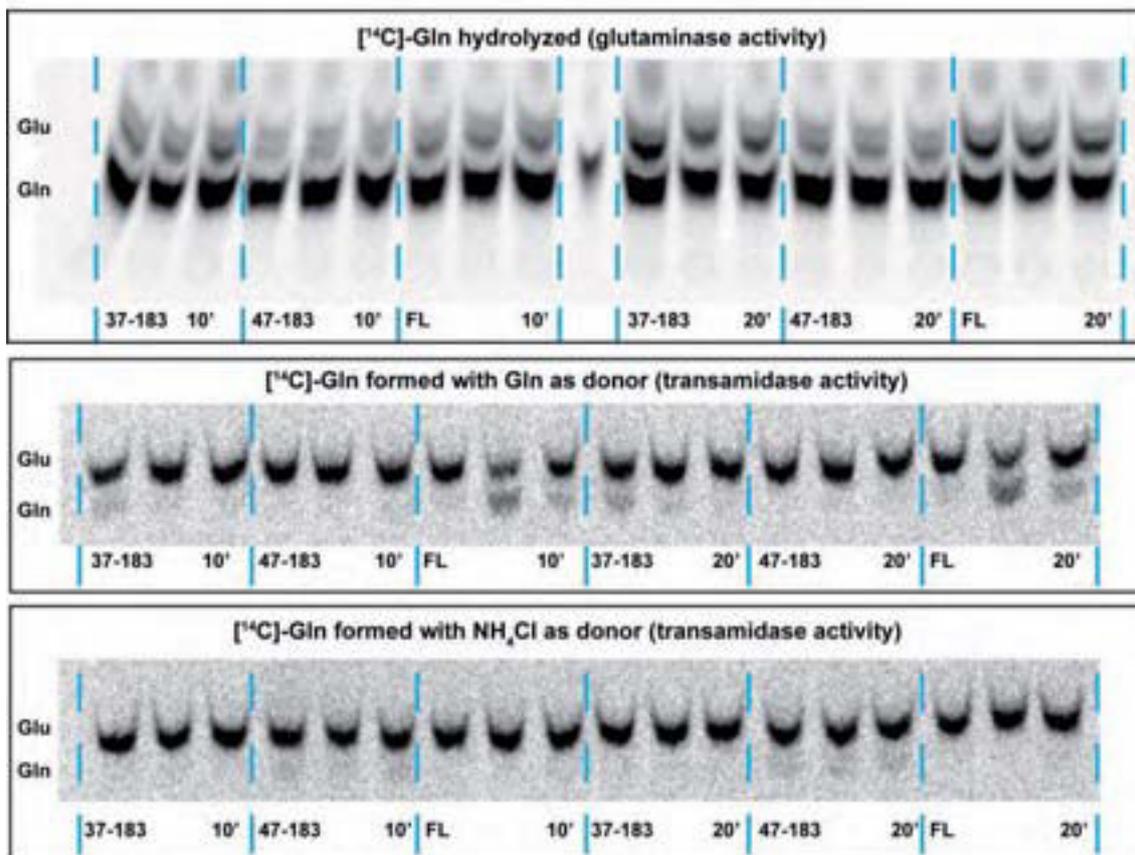


Figure S5. Thin-layer chromatography activity assays for GatF NTD deletion mutants.

Three reactions were performed for each of the three activities tested: Glutamine hydrolysis, transamidation with Gln donor and transamidation with NH₄Cl donor. Time points were taken at 10 and 20 minutes. Relative activities were obtained by dividing the value of each of three points for a mutant at a given time for a given reaction (*e.g.*, glutaminase, 37-183, 10') by the average value of the three corresponding full length enzyme measurements (*e.g.*, glutaminase, FL, 10'). Relative activities at 10' and 20' were combined and the averages of those six relative activities for each of the two mutants in the three conditions tested are presented in Figure 5B. The standard deviation of each group of six time points was used for the error bars.

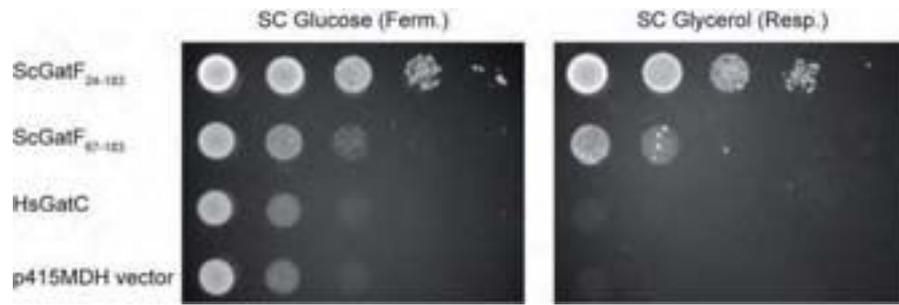


Figure S6. Yeast complementation of the NTD-deprived GatF mutant (GatF₆₇₋₁₂₂) and human GatC.

Annexes

Bibliographie

- Aebi, M., Kirchner, G., Chen, J.-Y., Vijayraghavan, U., Jacobson, A., Martin, N. C., and Abelson, J. (1990). Isolation of a thermo-sensitive mutant with an altered tRNA nucleotidyltransferase and cloning of the gene encoding tRNA nucleotidyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* *265*, 16216-16220.
- Agafonov, D.E., Kolb, V.A., Nazimov, I.V., and Spirin, A.S. (1999). A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 12345-12349.
- Agafonov, D.E., Kolb, V.A., and Spirin, A.S. (2001). Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage, Vol 2.
- Ahel, I., Korencic, D., Ibba, M., and Söll, D. (2003). Trans-editing of mischarged tRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 15422-15427.
- Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T., and Moreno, F. (2004). The Glucose-regulated Nuclear Localization of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mig1-dependent. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 14440-14446.
- Ahuatzi, D., Riera, A., Peláez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2007). Hxk2 Regulates the Phosphorylation State of Mig1 and Therefore Its Nucleocytoplasmic Distribution. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 4485-4493.
- Aiso, T., Yoshida, H., Wada, A., and Ohki, R. (2005). Modulation of mRNA stability participates in stationary-phase-specific expression of ribosome modulation factor. *Journal of bacteriology* *187*, 1951-1958.
- Ajioka, R.S., Phillips, J.D., and Kushner, J.P. (2006). Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1763*, 723-736.
- Alexandrov, A., Chernyakov, I., Gu, W., Hiley, S.L., Hughes, T.R., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. (2006). Rapid tRNA Decay Can Result from Lack of Nonessential Modifications. *Molecular cell* *21*, 87-96.
- Alkalaeva, E.Z., Pisarev, A.V., Frolova, L.Y., Kisselev, L.L., and Pestova, T.V. (2006). In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* *125*, 1125-1136.
- An, S., and Musier-Forsyth, K. (2004). Trans-editing of Cys-tRNA^{Pro} by *Haemophilus influenzae* YbaK protein. *The Journal of biological chemistry* *279*, 42359-42362.
- Andersen, C.B., Becker, T., Blau, M., Anand, M., Halic, M., Balar, B., Mielke, T., Boesen, T., Pedersen, J.S., Spahn, C.M., *et al.* (2006). Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* *443*, 663-668.
- Anderson, J., Phan, L., Cuesta, R., Carlson, B.A., Pak, M., Asano, K., Björk, G.R., Tamame, M., and Hinnebusch, A.G. (1998). The essential Gcd10p–Gcd14p nuclear complex is required for 1-

- methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA. *Genes & development* *12*, 3650-3662.
- Anderson, J., Phan, L., and Hinnebusch, A.G. (2000). The Gcd10p/Gcd14p complex is the essential two-subunit tRNA(1-methyladenosine) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 5173-5178.
- Andersson, S.G., and Kurland, C.G. (1995). Genomic evolution drives the evolution of the translation system. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* *73*, 775-787.
- Andersson, S.G., and Kurland, C.G. (1998). Reductive evolution of resident genomes. *Trends in microbiology* *6*, 263-268.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* *396*, 133-140.
- Antonellis, A., and Green, E.D. (2008). The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annual review of genomics and human genetics* *9*, 87-107.
- Araiso, Y., Huot, J.L., Sekiguchi, T., Frechin, M., Fischer, F., Enkler, L., Senger, B., Ishitani, R., Becker, H.D., and Nureki, O. (2014). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial GatFAB reveals a novel subunit assembly in tRNA-dependent amidotransferases. *Nucleic acids research* *42*, 6052-6063.
- Arif, A., Jia, J., Moodt, R.A., DiCorleto, P.E., and Fox, P.L. (2011). Phosphorylation of glutamyl-prolyl tRNA synthetase by cyclin-dependent kinase 5 dictates transcript-selective translational control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 1415-1420.
- Arif, A., Jia, J., Mukhopadhyay, R., Willard, B., Kinter, M., and Fox, P.L. (2009). Two-site phosphorylation of EPRS coordinates multimodal regulation of noncanonical translational control activity. *Molecular cell* *35*, 164-180.
- Armstrong, J. (2010). Yeast vacuoles: more than a model lysosome. *Trends in cell biology* *20*, 580-585.
- Åström, S.U., and Byström, A.S. (1994). Rit1, a tRNA backbone-modifying enzyme that mediates initiator and elongator tRNA discrimination. *Cell* *79*, 535-546.
- Åström, S.U., Von Pawel-Rammingen, U., and Byström, A.S. (1993). The yeast initiator tRNA^{Met} can act as an elongator tRNA^{Met} in vivo. *Journal of molecular biology* *233*, 43-58.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., and Emr, S.D. (2002). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* *3*, 271-282.

- Bacher, J.M., Waas, W.F., Metzgar, D., de Crecy-Lagard, V., and Schimmel, P. (2007). Genetic code ambiguity confers a selective advantage on *Acinetobacter baylyi*. *Journal of bacteriology* *189*, 6494-6496.
- Bailly, M., Giannouli, S., Blaise, M., Stathopoulos, C., Kern, D., and Becker, H.D. (2006). A single tRNA base pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagine. *Nucleic acids research* *34*, 6083-6094.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* *120*, 483-495.
- Balderhaar, H.J.k., and Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes – coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci* *126*, 1307-1316.
- Bandyopadhyay, A.K., and Deutscher, M.P. (1971). Complex of aminoacyl-transfer RNA synthetases. *Journal of molecular biology* *60*, 113-122.
- Barthelme, D., Dinkelaker, S., Albers, S.V., Londei, P., Ermler, U., and Tampe, R. (2011). Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 3228-3233.
- Bauerle, C., Ho, M.N., Lindorfer, M.A., and Stevens, T.H. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H(+)-ATPase membrane sector. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 12749-12757.
- Becker, H.D., and Kern, D. (1998). *Thermus thermophilus*: A link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 12832-12837.
- Becker, H.D., Min, B., Jacobi, C., Raczniak, G., Pelaschier, J., Roy, H., Klein, S., Kern, D., and Söll, D. (2000). The heterotrimeric *Thermus thermophilus* Asp-tRNA^{Asn} amidotransferase can also generate Gln-tRNA^{Gln}. *FEBS Letters* *476*, 140-144.
- Becker, T., Böttinger, L., and Pfanner, N. (2012a). Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends in biochemical sciences* *37*, 85-91.
- Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C.J., Anger, A.M., Armache, J.P., Sieber, H., Ungewickell, C., Berninghausen, O., Daberkow, I., *et al.* (2012b). Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* *482*, 501-506.
- Bell, E.L., Klimova, T.A., Eisenbart, J., Moraes, C.T., Murphy, M.P., Budinger, G.R., and Chandel, N.S. (2007). The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *The Journal of cell biology* *177*, 1029-1036.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* *334*, 1524-1529.

- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., *et al.* (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* *277*, 1453-1462.
- Blokhina, O., and Fagerstedt, K.V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia plantarum* *138*, 447-462.
- Blot, S., Poirier, C., and Dreyfus, P.A. (1995). The Mouse Mutation Muscle Deficient (Mdf) Is Characterized by a Progressive Motoneuron Disease. *J Neuropath Exp Neur* *54*, 812-825.
- Boettner, D.R., Friesen, H., Andrews, B., and Lemmon, S.K. (2011). Clathrin light chain directs endocytosis by influencing the binding of the yeast Hip1R homologue, Sla2, to F-actin. *Molecular biology of the cell* *22*, 3699-3714.
- Bohnsack, M.T., Regener, K., Schwappach, B., Saffrich, R., Paraskeva, E., Hartmann, E., and Görlich, D. (2002). Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *The EMBO Journal* *21*, 6205-6215.
- Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., and De Virgilio, C. (2012). Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Molecular cell* *46*, 105-110.
- Borner, G.H., Rana, A.A., Forster, R., Harbour, M., Smith, J.C., and Robinson, M.S. (2007). CVAK104 is a novel regulator of clathrin-mediated SNARE sorting. *Traffic* *8*, 893-903.
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., and Alessi, D.R. (2006). Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology* *16*, 443-452.
- Briza, P., Winkler, G., Kalchauer, H., and Breitenbach, M. (1986). Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. A proof of its structure. *Journal of Biological Chemistry* *261*, 4288-4294.
- Brown, M.V., Reader, J.S., and Tzima, E. (2010). Mammalian aminoacyl-tRNA synthetases: cell signaling functions of the protein translation machinery. *Vascular pharmacology* *52*, 21-26.
- Bryant, N.J., and Stevens, T.H. (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* *62*, 230-247.
- Buddha, M.R., Keery, K.M., and Crane, B.R. (2004a). An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 15881-15886.
- Buddha, M.R., Tao, T., Parry, R.J., and Crane, B.R. (2004b). Regioselective Nitration of Tryptophan by a Complex between Bacterial Nitric-oxide Synthase and Tryptophanyl-tRNA Synthetase. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 49567-49570.

- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., *et al.* (1996). Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* *273*, 1058-1073.
- Burman, J.L., Bourbonniere, L., Philie, J., Stroh, T., Dejgaard, S.Y., Presley, J.F., and McPherson, P.S. (2008). Scyl1, mutated in a recessive form of spinocerebellar neurodegeneration, regulates COPI-mediated retrograde traffic. *The Journal of biological chemistry* *283*, 22774-22786.
- Burman, J.L., Hamlin, J.N., and McPherson, P.S. (2010). Scyl1 regulates Golgi morphology. *PLoS one* *5*, e9537.
- Buschlen, S., Amillet, J.M., Guiard, B., Fournier, A., Marcireau, C., and Bolotin-Fukuhara, M. (2003). The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comparative and functional genomics* *4*, 37-46.
- Buvelot Frei, S., Rahl, P.B., Nussbaum, M., Briggs, B.J., Calero, M., Janeczko, S., Regan, A.D., Chen, C.Z., Barral, Y., Whittaker, G.R., *et al.* (2006). Bioinformatic and Comparative Localization of Rab Proteins Reveals Functional Insights into the Uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Molecular and cellular biology* *26*, 7299-7317.
- Cabrera, M., Ostrowicz, C.W., Mari, M., LaGrassa, T.J., Reggiori, F., and Ungermann, C. (2009). Vps41 phosphorylation and the Rab Ypt7 control the targeting of the HOPS complex to endosome-vacuole fusion sites. *Molecular biology of the cell* *20*, 1937-1948.
- Cahuzac, B., Berthonneau, E., Birlirakis, N., Guittet, E., and Mirande, M. (2000). A recurrent RNA-binding domain is appended to eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *The EMBO Journal* *19*, 445-452.
- Calado, A., Treichel, N., Müller, E.-C., Otto, A., and Kutay, U. (2002). Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *The EMBO Journal* *21*, 6216-6224.
- Cannino, G., Di Liegro, C.M., and Rinaldi, A.M. (2007). Nuclear-mitochondrial interaction. *Mitochondrion* *7*, 359-366.
- Cassandrini, D., Cilio, M.R., Bianchi, M., Doimo, M., Balestri, M., Tessa, A., Rizza, T., Sartori, G., Meschini, M.C., Nesti, C., *et al.* (2013). Pontocerebellar hypoplasia type 6 caused by mutations in RARS2: definition of the clinical spectrum and molecular findings in five patients. *Journal of inherited metabolic disease* *36*, 43-53.
- Cerini, C., Kerjan, P., Martine Astier, Gratecos, D., Mirande, M., and Semeriva, M. (1991). A component of the multisynthetase complex is a multifunctional aminoacyl-tRNA synthetase. *Embo J.*
- Cestari, I., Kalidas, S., Monnerat, S., Anupama, A., Phillips, M.A., and Stuart, K. (2013). A multiple aminoacyl-tRNA synthetase complex that enhances tRNA-aminoacylation in African trypanosomes. *Molecular and cellular biology* *33*, 4872-4888.

- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628-644.
- Chafe, S.C., and Mangroo, D. (2010). Scyl1 facilitates nuclear tRNA export in mammalian cells by acting at the nuclear pore complex. *Molecular biology of the cell* 21, 2483-2499.
- Chafe, S.C., Pierce, J.B., Eswara, M.B., McGuire, A.T., and Mangroo, D. (2011). Nutrient stress does not cause retrograde transport of cytoplasmic tRNA to the nucleus in evolutionarily diverse organisms. *Molecular biology of the cell* 22, 1091-1103.
- Chang, K.-M., and Hendrickson, T.L. (2009). Recognition of tRNAGln by *Helicobacter pylori* GluRS2—a tRNAGln-specific glutamyl-tRNA synthetase. *Nucleic acids research* 37, 6942-6949.
- Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N., and Breaker, R.R. (2007). Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* 447, 497-500.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry* 278, 36027-36031.
- Chen, S.H., Chen, S., Tokarev, A.A., Liu, F., Jedd, G., and Segev, N. (2005a). Ypt31/32 GTPases and Their Novel F-Box Effector Protein Rcy1 Regulate Protein Recycling. *Molecular biology of the cell* 16, 178-192.
- Chen, Y., Beck, A., Davenport, C., Chen, Y., Shattuck, D., and Tavtigian, S. (2005b). Characterization of TRZ1, a yeast homolog of the human candidate prostate cancer susceptibility gene ELAC2 encoding tRNase Z. *BMC Molecular Biology* 6, 12.
- Cheng, G., Zhang, H., Yang, X., Tzima, E., Ewalt, K.L., Schimmel, P., and Faber, J.E. (2008). Effect of mini-tyrosyl-tRNA synthetase on ischemic angiogenesis, leukocyte recruitment, and vascular permeability, Vol 295.
- Choi, J.W., Kim, D.G., Lee, A.-E., Kim, H.R., Lee, J.Y., Kwon, N.H., Shin, Y.K., Hwang, S.-K., Chang, S.-H., Cho, M.-H., *et al.* (2011). Cancer-Associated Splicing Variant of Tumor Suppressor AIMP2/p38: Pathological Implication in Tumorigenesis. *PLoS genetics* 7, e1001351.
- Choi, J.W., Lee, J.W., Kim, J.K., Jeon, H.K., Choi, J.J., Kim, D.G., Kim, B.G., Nam, D.H., Kim, H.J., Yun, S.H., *et al.* (2012). Splicing variant of AIMP2 as an effective target against chemoresistant ovarian cancer. *Journal of molecular cell biology* 4, 164-173.
- Choi, J.W., Um, J.Y., Kundu, J.K., Surh, Y.J., and Kim, S. (2009). Multidirectional tumor-suppressive activity of AIMP2/p38 and the enhanced susceptibility of AIMP2 heterozygous mice to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 30, 1638-1644.
- Chuang, S.M., Chen, L., Lambertson, D., Anand, M., Kinzy, T.G., and Madura, K. (2005). Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A. *Molecular and cellular biology* 25, 403-413.

- Ciesla, M., and Boguta, M. (2008). Regulation of RNA polymerase III transcription by Maf1 protein. *Acta biochimica Polonica* 55, 215-225.
- Coenen, M.J.H., van den Heuvel, L.P., and Smeitink, J.A.M. (2001). Mitochondrial oxidative phosphorylation system assembly in man: recent achievements. *Current Opinion in Neurology* 14, 777-781.
- Coluccio, A., Bogengruber, E., Conrad, M.N., Dresser, M.E., Briza, P., and Neiman, A.M. (2004). Morphogenetic Pathway of Spore Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* 3, 1464-1475.
- Commans, S., and Bock, A. (1999). Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS microbiology reviews* 23, 335-351.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2005). CVAK104 is a novel poly-L-lysine-stimulated kinase that targets the beta2-subunit of AP2. *The Journal of biological chemistry* 280, 21539-21544.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M., and Conti, E. (2007). Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annual review of biochemistry* 76, 647-671.
- Copela, L.A., Fernandez, C.F., Sherrer, R.L., and Wolin, S.L. (2008). Competition between the Rex1 exonuclease and the La protein affects both Trf4p-mediated RNA quality control and pre-tRNA maturation. *Rna* 14, 1214-1227.
- Couplan, E., Aiyar, R.S., Kucharczyk, R., Kabala, A., Ezkurdia, N., Gagneur, J., St Onge, R.P., Salin, B., Soubigou, F., Le Cann, M., *et al.* (2011). A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11989-11994.
- Cui, T.Z., Conte, A., Fox, J.L., Zara, V., and Winge, D.R. (2014). Modulation of the respiratory supercomplexes in yeast: Enhanced formation of cytochrome oxidase increases the stability and abundance of respiratory supercomplexes. *The Journal of biological chemistry*.
- Curnow, A.W., Ibba, M., and Soll, D. (1996). tRNA-dependent asparagine formation. *Nature* 382, 589-590.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Leverich, E.P., Hwang, D.K., Beverly, K.N., and Koehler, C.M. (2004). The role of Hot13p and redox chemistry in the mitochondrial TIM22 import pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 43744-43751.
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Hartlein, M., Nassar, N., and Leberman, R. (1990). A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* 347, 249-255.
- Dagkessamanskaia, A., Martin-Yken, H., Basmaji, F., Briza, P., and Francois, J. (2001). Interaction of Knr4 protein, a protein involved in cell wall synthesis, with tyrosine tRNA synthetase encoded by TYS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 200, 53-58.

- Dai, D.-F., Chiao, Y., Marcinek, D., Szeto, H., and Rabinovitch, P. (2014). Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longevity & Healthspan* 3, 6.
- Dalton, T.P., Shertzer, H.G., and Puga, A. (1999). REGULATION OF GENE EXPRESSION BY REACTIVE OXYGEN. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39, 67-101.
- De Virgilio, C., and Loewith, R. (2006). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25, 6392-6415.
- Deinert, K., Fasiolo, F., Hurt, E.C., and Simos, G. (2001). Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *The Journal of biological chemistry* 276, 6000-6008.
- Deutscher, M.P. (1984). The eucaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex: suggestions for its structure and function. *The Journal of cell biology* 99, 373-377.
- Devaux, F., Lelandais, G., Garcia, M., Goussard, S., and Jacq, C. (2010). Posttranscriptional control of mitochondrial biogenesis: spatio-temporal regulation of the protein import process. *FEBS Lett* 584, 4273-4279.
- Dever, T.E., and Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a013706.
- Dias, J., Renault, L., Perez, J., and Mirande, M. (2013). Small-angle X-ray solution scattering study of the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals an elongated and multi-armed particle. *The Journal of biological chemistry* 288, 23979-23989.
- Drose, S., and Brandt, U. (2008). The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *The Journal of biological chemistry* 283, 21649-21654.
- Durdevic, Z., Mobin, Mehrpouya B., Hanna, K., Lyko, F., and Schaefer, M. (2013). The RNA Methyltransferase Dnmt2 Is Required for Efficient Dicer-2-Dependent siRNA Pathway Activity in *Drosophila*. *Cell Reports* 4, 931-937.
- Duwel, M., and Ungewickell, E.J. (2006). Clathrin-dependent association of CVAK104 with endosomes and the trans-Golgi network. *Molecular biology of the cell* 17, 4513-4525.
- Edwards, T.A., Pyle, S.E., Wharton, R.P., and Aggarwal, A.K. (2001). Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* 105, 281-289.
- Egner, A., Jakobs, S., and Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 3370-3375.
- El Yacoubi, B., Bailly, M., and de Crecy-Lagard, V. (2012). Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annual review of genetics* 46, 69-95.

- Emara, M.M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., Hu, G.-F., and Anderson, P. (2010). Angiogenin-induced tRNA-derived Stress-induced RNAs Promote Stress-induced Stress Granule Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 285, 10959-10968.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347, 203-206.
- Eswarappa, S.M., and Fox, P.L. (2013). Citric acid cycle and the origin of MARS. *Trends in biochemical sciences* 38, 222-228.
- Ewalt, K.L., Yang, X.-L., Otero, F.J., Liu, J., Slike, B., and Schimmel, P. (2005). Variant of Human Enzyme Sequesters Reactive Intermediate†. *Biochemistry* 44, 4216-4221.
- Eyler, D.E., and Green, R. (2011). Distinct response of yeast ribosomes to a miscoding event during translation. *Rna* 17, 925-932.
- Fagarasanu, A., Mast, F.D., Knoblach, B., and Rachubinski, R.A. (2010). Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 644-654.
- Fernandez-Garcia, P., Pelaez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2012). Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling. *The Journal of biological chemistry* 287, 42151-42164.
- Fernandez-Murray, J.P., and McMaster, C.R. (2006). Identification of novel phospholipid binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 580, 82-86.
- Fernández-Murray, J.P., and McMaster, C.R. (2006). Identification of novel phospholipid binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 580, 82-86.
- Fernie, A.R., Carrari, F., and Sweetlove, L.J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 254-261.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F., and Käppeli, O. (1981). Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells. In *Advances in Microbial Physiology*, A.H. Rose, and J.G. Morris, eds. (Academic Press), pp. 123-183.
- Finnigan, G.C., Ryan, M., and Stevens, T.H. (2011). A Genome-Wide Enhancer Screen Implicates Sphingolipid Composition in Vacuolar ATPase Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 187, 771-783.
- Fischer, F., Huot, J.L., Lorber, B., Diss, G., Hendrickson, T.L., Becker, H.D., Lapointe, J., and Kern, D. (2012). The asparagine-transamidosome from *Helicobacter pylori*: a dual-kinetic mode in non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase safeguards the genetic code. *Nucleic acids research* 40, 4965-4976.

- Fleckenstein, D., Rohde, M., Klionsky, D.J., and Rudiger, M. (1998). Yel013p (Vac8p), an armadillo repeat protein related to plakoglobin and importin alpha, is associated with the yeast vacuole membrane. *J Cell Sci* *111*, 3109-3118.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., *et al.* (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* *269*, 496-512.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* *440*, 325-331.
- Fox, T.D. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics* *192*, 1203-1234.
- Frantz, J.D., and Gilbert, W. (1995). A Novel Yeast Gene Product, G4p1, with a Specific Affinity for Quadruplex Nucleic Acids. *Journal of Biological Chemistry* *270*, 20692-20697.
- Frechin, M., Kern, D., Martin, R.P., Becker, H.D., and Senger, B. (2010). Arc1p: Anchoring, routing, coordinating. *FEBS Letters* *584*, 427-433.
- Frechin, M., Senger, B., Braye, M., Kern, D., Martin, R.P., and Becker, H.D. (2009). Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes & development* *23*, 1119-1130.
- Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., and Zheng, X. (2009). Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Letters* *583*, 437-442.
- Gadir, N., Haim-Vilmovsky, L., Kraut-Cohen, J., and Gerst, J.E. (2011). Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* *17*, 1551-1565.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., and Kroemer, G. (2012). Mitochondrial Control of Cellular Life, Stress, and Death. *Circulation Research* *111*, 1198-1207.
- Garcia-Silva, M., Cura das Neves, R., Cabrera-Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L., Robello, C., Naya, H., Fernandez-Calero, T., Souto-Padron, T., Souza, W., *et al.* (2014a). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitol Res* *113*, 285-304.
- Garcia-Silva, M.R., Sanguinetti, J., Cabrera-Cabrera, F., Franzén, O., and Cayota, A. (2014b). A particular set of small non-coding RNAs is bound to the distinctive Argonaute protein of *Trypanosoma cruzi*: Insights from RNA-interference deficient organisms. *Gene* *538*, 379-384.
- Garcia Silva, M., Frugier, M., Tosar, J., Parodi, A., Rovira, C., Robello, C., Goldenberg, S., and Cayota, A. (2011). *Trypanosoma cruzi* produces a population of tRNA-derived small RNAs which are recruited to specific cytoplasmic granules and secreted to the extracellular medium. *BMC Proceedings* *5*, O7.

- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Gebetsberger, J., and Polacek, N. (2013). Slicing tRNAs to boost functional ncRNA diversity. *RNA biology* 10, 1798-1806.
- Gebetsberger, J., Zywicki, M., Kunzi, A., and Polacek, N. (2012). tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea* 2012, 260909.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- Giege, R., Sissler, M., and Florentz, C. (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic acids research* 26, 5017-5035.
- Godinic-Mikulcic, V., Jaric, J., Hausmann, C.D., Ibba, M., and Weygand-Durasevic, I. (2011). An archaeal tRNA-synthetase complex that enhances aminoacylation under extreme conditions. *The Journal of biological chemistry* 286, 3396-3404.
- Godinic, V., Mocibob, M., Rocak, S., Ibba, M., and Weygand-Durasevic, I. (2007). Peroxin Pex21p interacts with the C-terminal noncatalytic domain of yeast seryl-tRNA synthetase and forms a specific ternary complex with tRNA^{Ser}. *FEBS Journal* 274, 2788-2799.
- Goldgur, Y., and Safro, M. (1994). Aminoacyl-tRNA synthetases from *Haloarcula marismortui*: an evidence for a multienzyme complex in a procaryotic system. *Biochemistry and molecular biology international* 32, 1075-1083.
- Gonsalvez, G.B., Urbinati, C.R., and Long, R.M. (2005). RNA localization in yeast: moving towards a mechanism. *Biology of the Cell* 97, 75-86.
- Goud, B., Salminen, A., Walworth, N.C., and Novick, P.J. (1988). A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* 53, 753-768.
- Gowher, A., Smirnov, A., Tarassov, I., and Entelis, N. (2013). Induced tRNA import into human mitochondria: implication of a host aminoacyl-tRNA-synthetase. *PloS one* 8, e66228.
- Graindorge, J.S., Senger, B., Tritch, D., Simos, G., and Fasiolo, F. (2005). Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* 44, 1344-1352.
- Gray, M.W. (1998). Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. *Nature* 396, 109-110.
- Greenberg, Y., King, M., Kiosses, W.B., Ewalt, K., Yang, X., Schimmel, P., Reader, J.S., and Tzima, E. (2008). The novel fragment of tyrosyl tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 1597-1605.

- Gregg, C., Kyryakov, P., and Titorenko, V.I. (2009). Purification of mitochondria from yeast cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Grosjean, H. (2005). Modification and editing of RNA: historical overview and important facts to remember. In *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing*, H. Grosjean, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1-22.
- Grosshans, H., Hurt, E., and Simos, G. (2000). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes & development* *14*, 830-840.
- Guerrero, C., Milenković, T., Pržulj, N., Kaiser, P., and Huang, L. (2008). Characterization of the proteasome interaction network using a QTAX-based tag-team strategy and protein interaction network analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 13333-13338.
- Guo, M., and Schimmel, P. (2012). Homeostatic mechanisms by alternative forms of tRNA synthetases. *Trends in biochemical sciences* *37*, 401-403.
- Guo, M., and Schimmel, P. (2013). Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nature chemical biology* *9*, 145-153.
- Guo, M., Schimmel, P., and Yang, X.-L. (2010a). Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions. *FEBS Letters* *584*, 434-442.
- Guo, M., Yang, X.L., and Schimmel, P. (2010b). New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation. *Nature reviews Molecular cell biology* *11*, 668-674.
- Habersetzer, J., Ziani, W., Larriue, I., Stines-Chaumeil, C., Giraud, M.-F., Brèthes, D., Dautant, A., and Paumard, P. (2013). ATP synthase oligomerization: From the enzyme models to the mitochondrial morphology. *The international journal of biochemistry & cell biology* *45*, 99-105.
- Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences* *35*, 505-513.
- Hamlin, J.N.R., Schroeder, L.K., Fotouhi, M., Dokainish, H., Ioannou, M.S., Girard, M., Summerfeldt, N., Melançon, P., and McPherson, P.S. (2014). Scyl1 scaffolds class II Arfs to specific subcomplexes of coatomer through the γ -COP appendage domain. *J Cell Sci* *127*, 1454-1463.
- Han, J.M., Jeong, S.J., Park, M.C., Kim, G., Kwon, N.H., Kim, H.K., Ha, S.H., Ryu, S.H., and Kim, S. (2012). Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* *149*, 410-424.
- Han, J.M., Park, B.J., Park, S.G., Oh, Y.S., Choi, S.J., Lee, S.W., Hwang, S.K., Chang, S.H., Cho, M.H., and Kim, S. (2008). AIMP2/p38, the scaffold for the multi-tRNA synthetase complex, responds to genotoxic stresses via p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 11206-11211.

- Hanada, T., Weitzer, S., Mair, B., Bernreuther, C., Wainger, B.J., Ichida, J., Hanada, R., Orthofer, M., Cronin, S.J., Komnenovic, V., *et al.* (2013). CLP1 links tRNA metabolism to progressive motor-neuron loss. *Nature* *495*, 474-480.
- Haugen, P., Simon, D.M., and Bhattacharya, D. (2005). The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* *21*, 111-119.
- Hausmann, C.D., and Ibba, M. (2008a). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS microbiology reviews* *32*, 705-721.
- Hausmann, C.D., and Ibba, M. (2008b). Structural and functional mapping of the archaeal multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *FEBS Lett* *582*, 2178-2182.
- Hausmann, C.D., Prætorius-Ibba, M., and Ibba, M. (2007). An aminoacyl-tRNA synthetase:elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic acids research* *35*, 6094-6102.
- Hausner, G., Hafez, M., and Edgell, D. (2014). Bacterial group I introns: mobile RNA catalysts. *Mobile DNA* *5*, 8.
- Havrylenko, S., Legouis, R., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2010). Methionyl-tRNA synthetase from *Caenorhabditis elegans*: A specific multidomain organization for convergent functional evolution. *Protein Science* *19*, 2475-2484.
- Havrylenko, S., Legouis, R., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2011). *Caenorhabditis elegans* evolves a new architecture for the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *The Journal of biological chemistry* *286*, 28476-28487.
- Hekimi, S., Lapointe, J., and Wen, Y. (2011). Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in cell biology* *21*, 569-576.
- Helm, M., and Attardi, G. (2004). Nuclear Control of Cloverleaf Structure of Human Mitochondrial tRNALys. *Journal of molecular biology* *337*, 545-560.
- Herbert, C.J., Labouesse, M., Dujardin, G., and Slonimski, P.P. (1988). The NAM2 proteins from *S. cerevisiae* and *S. douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases, and are involved in mRNA splicing. *Embo J* *7*, 473-483.
- Herrero, P., Galindez, J., Ruiz, N., Martinez-Campa, C., and Moreno, F. (1995). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes. *Yeast* *11*, 137-144.
- Herrmann, J.M., and Riemer, J. (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxidants & redox signaling* *13*, 1341-1358.
- Hershberg, R., and Petrov, D.A. (2008). Selection on codon bias. *Annual review of genetics* *42*, 287-299.
- Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., and Mathews, M.B. (2012). Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *4*.

- Hickey, C.M., Stroupe, C., and Wickner, W. (2009). The major role of the Rab Ypt7p in vacuole fusion is supporting HOPS membrane association. *The Journal of biological chemistry* 284, 16118-16125.
- Hinnebusch, A.G. (1994a). Translational control of GCN4: An in vivo barometer of initiation-factor activity. *Trends in biochemical sciences* 19, 409-414.
- Hinnebusch, A.G. (1994b). Translational Control of GCN4: Gene-specific Regulation by Phosphorylation of eIF2. *Translational Control*, 199-244.
- Hinnebusch, A.G. (1997). Translational Regulation of Yeast GCN4 : A WINDOW ON FACTORS THAT CONTROL INITIATOR-tRNA BINDING TO THE RIBOSOME. *Journal of Biological Chemistry* 272, 21661-21664.
- Hinnebusch, A.G. (2005). TRANSLATIONAL REGULATION OF GCN4 AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEAST*. *Annual Review of Microbiology* 59, 407-450.
- Hinnebusch, A.G. (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75, 434-467, first page of table of contents.
- Hinnebusch, A.G., and Lorsch, J.R. (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 300-372.
- Holt, L.J., Tuch, B.B., Villen, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., and Morgan, D.O. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* 325, 1682-1686.
- Hopper, A.K. (2013). Transfer RNA Post-Transcriptional Processing, Turnover, and Subcellular Dynamics in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 194, 43-67.
- Hopper, A.K., Pai, D.A., and Engelke, D.R. (2010). Cellular dynamics of tRNAs and their genes. *FEBS Letters* 584, 310-317.
- Horazdovsky, B.F., Busch, G.R., and Emr, S.D. (1994). Vps21 Encodes a Rab5-Like Gtp-Binding Protein That Is Required for the Sorting of Yeast Vacuolar Proteins. *Embo J* 13, 1297-1309.
- Horie, N., Hara-Yokoyama, M., Yokoyama, S., Watanabe, K., Kuchino, Y., Nishimura, S., and Miyazawa, T. (1985). Two tRNA^{Ala1} species from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8: effect of 2-thiolation of ribothymidine on the thermostability of tRNA. *Biochemistry* 24, 5711-5715.

- Houten, S., and Wanders, R.A. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of inherited metabolic disease* 33, 469-477.
- Hsieh, L.C., Lin, S.I., Shih, A.C., Chen, J.W., Lin, W.Y., Tseng, C.Y., Li, W.H., and Chiou, T.J. (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant physiology* 151, 2120-2132.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Hunter, T., and Plowman, G.D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends in biochemical sciences* 22, 18-22.
- Huot, J.L., Enkler, L., Megel, C., Karim, L., Laporte, D., Becker, H.D., Duchene, A.M., Sissler, M., and Marechal-Drouard, L. (2014). Idiosyncrasies in decoding mitochondrial genomes. *Biochimie* 100C, 95-106.
- Ibba, M., Morgan, S., Curnow, A.W., Pridmore, D.R., Vothknecht, U.C., Gardner, W., Lin, W., Woese, C.R., and Söll, D. (1997). A Euryarchaeal Lysyl-tRNA Synthetase: Resemblance to Class I Synthetases. *Science* 278, 1119-1122.
- Ibba, M., and Soll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annual review of biochemistry* 69, 617-650.
- Ingolia, N.T., Lareau, L.F., and Weissman, J.S. (2011). Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 147, 789-802.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W., and Görlich, D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus, Vol 16.
- Jackson, R.J. (2013). The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 113-127.
- Jakubowski, H. (2012). Quality control in tRNA charging. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3, 295-310.
- Jedd, G., Mulholland, J., and Segev, N. (1997). Two New Ypt GTPases Are Required for Exit From the Yeast trans-Golgi Compartment. *The Journal of cell biology* 137, 563-580.
- Jeong, E.J., Hwang, G.S., Kim, K.H., Kim, M.J., Kim, S., and Kim, K.S. (2000). Structural analysis of multifunctional peptide motifs in human bifunctional tRNA synthetase: identification of RNA-binding residues and functional implications for tandem repeats. *Biochemistry* 39, 15775-15782.

- Jia, J., Arif, A., Ray, P.S., and Fox, P.L. (2008). WHEP Domains Direct Noncanonical Function of Glutamyl-Prolyl tRNA Synthetase in Translational Control of Gene Expression. *Molecular cell* 29, 679-690.
- Jiang, M., Mak, J., Ladha, A., Cohen, E., Klein, M., Rovinski, B., and Kleiman, L. (1993). Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 67, 3246-3253.
- Jin, C., Strich, R., and Cooper, K.F. (2014). Slt2p phosphorylation induces cyclin C nuclear-to-cytoplasmic translocation in response to oxidative stress. *Molecular biology of the cell* 25, 1396-1407.
- Jin, Y., Sultana, A., Gandhi, P., Franklin, E., Hamamoto, S., Khan, Amir R., Munson, M., Schekman, R., and Weisman, Lois S. (2011). Myosin V Transports Secretory Vesicles via a Rab GTPase Cascade and Interaction with the Exocyst Complex. *Developmental Cell* 21, 1156-1170.
- Johanson, K., Hoang, T., Sheth, M., and Hyman, L.E. (2003). GRS1, a Yeast tRNA Synthetase with a Role in mRNA 3' End Formation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 35923-35930.
- Johnson, L.M., Bankaitis, V.A., and Emr, S.D. (1987). Distinct sequence determinants direct intracellular sorting and modification of a yeast vacuolar protease. *Cell* 48, 875-885.
- Johnston, M., and Carlson, M. (1992). 5 Regulation of Carbon and Phosphate Utilization.
- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A., and Rodenburg, R.J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of inherited metabolic disease* 35, 211-225.
- Jones, T.E., Alexander, R.W., and Pan, T. (2011). Misacylation of specific nonmethionyl tRNAs by a bacterial methionyl-tRNA synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 6933-6938.
- Joshi, A.S., Zhou, J., Gohil, V.M., Chen, S., and Greenberg, M.L. (2009). Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793, 212-218.
- Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., and Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in *S. cerevisiae*. *Genes & development* 18, 1227-1240.
- Kamena, F., Diefenbacher, M., Kilchert, C., Schwarz, H., and Spang, A. (2008). Ypt1p is essential for retrograde Golgi-ER transport and for Golgi maintenance in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* 121, 1293-1302.
- Kamenski, P., Kolesnikova, O., Jubenot, V., Entelis, N., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2007). Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Molecular cell* 26, 625-637.
- Kamenski, P., Smirnova, E., Kolesnikova, O., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., Entelis, N., and Tarassov, I. (2010). tRNA mitochondrial import in yeast: Mapping of the import determinants

- in the carrier protein, the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *Mitochondrion* *10*, 284-293.
- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Le Marechal, P., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2009a). Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *The Journal of biological chemistry* *284*, 6053-6060.
- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Le Marechal, P., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2009b). Dynamic Organization of Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes in the Cytoplasm of Human Cells. *The Journal of biological chemistry* *284*, 13746-13754.
- Kaminska, M., Shalak, V., and Mirande, M. (2001). The appended C-domain of human methionyl-tRNA synthetase has a tRNA-sequestering function. *Biochemistry* *40*, 14309-14316.
- Kämper, U., Kück, U., Cherniack, A.D., and Lambowitz, A.M. (1992). The mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase of *Podospira anserina* is a bifunctional enzyme active in protein synthesis and RNA splicing. *Molecular and cellular biology* *12*, 499-511.
- Karanasios, E., and Simos, G. (2010). Building arks for tRNA: structure and function of the Arc1p family of non-catalytic tRNA-binding proteins. *FEBS Lett* *584*, 3842-3849.
- Kato, T., Yoshida, H., Miyata, T., Maki, Y., Wada, A., and Namba, K. (2010). Structure of the 100S Ribosome in the Hibernation Stage Revealed by Electron Cryomicroscopy. *Structure* *18*, 719-724.
- Kaufmann, G. (2000). Anticodon nucleases. *Trends in biochemical sciences* *25*, 70-74.
- Kausik, S., and Umadas, M. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* Homologue of Mammalian Translation Initiation Factor 6 Does Not Function as a Translation Initiation Factor. *Molecular biology of the cell* *19*, 1416-1426.
- Kellems, R.E., Allison, V.F., and Butow, R.A. (1974). Cytoplasmic Type 80 S Ribosomes Associated with Yeast Mitochondria: II. EVIDENCE FOR THE ASSOCIATION OF CYTOPLASMIC RIBOSOMES WITH THE OUTER MITOCHONDRIAL MEMBRANE IN SITU. *Journal of Biological Chemistry* *249*, 3297-3303.
- Kellems, R.E., Allison, V.F., and Butow, R.A. (1975). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *The Journal of cell biology* *65*, 1-14.
- Kerjan, P., Cerini, C., Sémériva, M., and Mirande, M. (1994). The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1199*, 293-297.
- Kerjan, P., Triconnet, M., and Waller, J.P. (1992). Mammalian prolyl-tRNA synthetase corresponds to the approximately 150 kDa subunit of the high-M(r) aminoacyl-tRNA synthetase complex. *Biochimie* *74*.

- Khoshnevis, S., Gross, T., Rotte, C., Baierlein, C., Ficner, R., and Krebber, H. (2010). The iron-sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination. *EMBO reports* *11*, 214-219.
- Khurana, V., and Lindquist, S. (2010). Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nature reviews Neuroscience* *11*, 436-449.
- Kim, E., Kim, S.H., Kim, S., Cho, D., and Kim, T.S. (2008). AIMP1/p43 protein induces the maturation of bone marrow-derived dendritic cells with T helper type 1-polarizing ability. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *180*, 2894-2902.
- Kim, H.S., Hoja, U., Stolz, J., Sauer, G., and Schweizer, E. (2004). Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of in vivo biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* *279*, 42445-42452.
- Kim, M.J., Park, B.J., Kang, Y.S., Kim, H.J., Park, J.H., Kang, J.W., Lee, S.W., Han, J.M., Lee, H.W., and Kim, S. (2003). Downregulation of FUSE-binding protein and c-myc by tRNA synthetase cofactor p38 is required for lung cell differentiation. *Nature genetics* *34*, 330-336.
- Kise, Y., Lee, S.W., Park, S.G., Fukai, S., Sengoku, T., Ishii, R., Yokoyama, S., Kim, S., and Nureki, O. (2004). A short peptide insertion crucial for angiostatic activity of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Nature structural & molecular biology* *11*, 149-156.
- Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janaky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Rotte, C., *et al.* (2005). Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *Embo J* *24*, 589-598.
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. (1988). Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* *170*, 2683-2686.
- Klecker, T., Scholz, D., Fortsch, J., and Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J Cell Sci* *126*, 2924-2930.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* *334*, 941-948.
- Knight, R.D., Freeland, S.J., and Landweber, L.F. (2001). Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. *Nature reviews Genetics* *2*, 49-58.
- 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., *et al.* (2005). Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *25*, 7968-7978.
- Ko, Y.G., Kang, Y.S., Kim, E.K., Park, S.G., and Kim, S. (2000). Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *The Journal of cell biology* *149*, 567-574.

- Kobbi, L., Octobre, G., Dias, J., Comisso, M., and Mirande, M. (2011). Association of mitochondrial Lysyl-tRNA synthetase with HIV-1 GagPol involves catalytic domain of the synthetase and transframe and integrase domains of Pol. *Journal of molecular biology* *410*, 875-886.
- Koehler, C., Round, A., Simader, H., Suck, D., and Svergun, D. (2013). Quaternary structure of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex in solution and its compaction upon binding of tRNAs. *Nucleic acids research* *41*, 667-676.
- Koehler, C.M. (2004). New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* *20*, 309-335.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* *325*, 477-481.
- Kozak, M. (1992). Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu Rev Cell Biol* *8*, 197-225.
- Kramer, E.B., and Hopper, A.K. (2013). Retrograde transfer RNA nuclear import provides a new level of tRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 21042-21047.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *440*, 637-643.
- Kurata, S., Nielsen, K.H., Mitchell, S.F., Lorsch, J.R., Kaji, A., and Kaji, H. (2010a). Ribosome recycling step in yeast cytoplasmic protein synthesis is catalyzed by eEF3 and ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 10854-10859.
- Kurata, S., Nielsen, K.H., Mitchell, S.F., Lorsch, J.R., Kaji, A., and Kaji, H. (2010b). Ribosome recycling step in yeast cytoplasmic protein synthesis is catalyzed by eEF3 and ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 10854-10859.
- Kurata, S., Shen, B., Liu, J.O., Takeuchi, N., Kaji, A., and Kaji, H. (2013a). Possible steps of complete disassembly of post-termination complex by yeast eEF3 deduced from inhibition by translocation inhibitors. *Nucleic acids research* *41*, 264-276.
- Kurata, S., Shen, B., Liu, J.O., Takeuchi, N., Kaji, A., and Kaji, H. (2013b). Possible steps of complete disassembly of post-termination complex by yeast eEF3 deduced from inhibition by translocation inhibitors. *Nucleic acids research* *41*, 264-276.
- Kurata, S., Weixlbaumer, A., Ohtsuki, T., Shimazaki, T., Wada, T., Kirino, Y., Takai, K., Watanabe, K., Ramakrishnan, V., and Suzuki, T. (2008). Modified uridines with c5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U center dot G wobble pairing during decoding. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 18801-18811.

- Kwon, N.H., Kang, T., Lee, J.Y., Kim, H.H., Kim, H.R., Hong, J., Oh, Y.S., Han, J.M., Ku, M.J., Lee, S.Y., *et al.* (2011). Dual role of methionyl-tRNA synthetase in the regulation of translation and tumor suppressor activity of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 19635-19640.
- Kyriacou, S.V., and Deutscher, M.P. (2008). An Important Role for the Multienzyme Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex in Mammalian Translation and Cell Growth. *Molecular cell* *29*, 419-427.
- Labauge, P., Dorboz, I., Eymard-Pierre, E., Dereeper, O., and Boespflug-Tanguy, O. (2011). Clinically asymptomatic adult patient with extensive LBSL MRI pattern and DARS2 mutations. *Journal of neurology* *258*, 335-337.
- Lackner, L.L., Ping, H., Graef, M., Murley, A., and Nunnari, J. (2013). Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, E458-467.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lageix, S., Rothenburg, S., Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (2014). Enhanced Interaction between Pseudokinase and Kinase Domains in Gcn2 stimulates eIF2 α Phosphorylation in Starved Cells. *PLoS genetics* *10*, e1004326.
- LaGrassa, T.J., and Ungermann, C. (2005). The vacuolar kinase Yck3 maintains organelle fragmentation by regulating the HOPS tethering complex. *The Journal of cell biology* *168*, 401-414.
- Lapointe, J., and Hekimi, S. (2010). When a theory of aging ages badly. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *67*, 1-8.
- Lapuate-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P.M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M.A., *et al.* (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* *340*, 1567-1570.
- Lee, S.R., and Collins, K. (2005). Starvation-induced Cleavage of the tRNA Anticodon Loop in *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 42744-42749.
- Lee, S.W., Cho, B.H., Park, S.G., and Kim, S. (2004). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J Cell Sci* *117*, 3725-3734.
- Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A., and Dutta, A. (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes & development* *23*, 2639-2649.

- Lefebvre-Legendre, L., Salin, B., Schaëffer, J., Brèthes, D., Dautant, A., Ackerman, S.H., and di Rago, J.-P. (2005). Failure to Assemble the $\alpha_3 \beta_3$ Subcomplex of the ATP Synthase Leads to Accumulation of the α and β Subunits within Inclusion Bodies and the Loss of Mitochondrial Cristae in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 18386-18392.
- Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H., Velours, J., Slonimski, P.P., and di Rago, J.-P. (2001). Identification of a Nuclear Gene (FMC1) Required for the Assembly/Stability of Yeast Mitochondrial F1-ATPase in Heat Stress Conditions. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6789-6796.
- Legate, K.R., Montanez, E., Kudlacek, O., and Fassler, R. (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 20-31.
- Lenaz, G., Baracca, A., Barbero, G., Bergamini, C., Dalmonte, M.E., Del Sole, M., Faccioli, M., Falasca, A., Fato, R., Genova, M.L., *et al.* (2010). Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochimica et biophysica acta* 1797, 633-640.
- Li, X., Gerber, S.A., Rudner, A.D., Beausoleil, S.A., Haas, W., Villen, J., Elias, J.E., and Gygi, S.P. (2007). Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of proteome research* 6, 1190-1197.
- Li, Z., Ender, C., Meister, G., Moore, P.S., Chang, Y., and John, B. (2012). Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs. *Nucleic acids research* 40, 6787-6799.
- Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences* 30, 133-141.
- Lipatova, Z., Tokarev, A.A., Jin, Y., Mulholland, J., Weisman, L.S., and Segev, N. (2008). Direct interaction between a myosin V motor and the Rab GTPases Ypt31/32 is required for polarized secretion. *Molecular biology of the cell* 19, 4177-4187.
- Lipman, R.S., Chen, J., Evilia, C., Vitseva, O., and Hou, Y.M. (2003). Association of an aminoacyl-tRNA synthetase with a putative metabolic protein in archaea. *Biochemistry* 42, 7487-7496.
- Liu, T.-T., Gomez, T.S., Sackey, B.K., Billadeau, D.D., and Burd, C.G. (2012). Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Molecular biology of the cell* 23, 2505-2515.
- Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annual review of genetics* 40, 159-185.
- Ljungdahl, P.O., and Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885-929.
- Lofffield, R.B., and Vanderjagt, D. (1972). The frequency of errors in the protein biosynthesis. *J Biochem* 128, 1353-1356.

- Loss-Morais, G., Waterhouse, P.M., and Margis, R. (2013). Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets. *Biol Direct* 8.
- Lu, J., Esberg, A., Huang, B., and Byström, A.S. (2008). *Kluyveromyces lactis* γ -toxin, a ribonuclease that recognizes the anticodon stem loop of tRNA. *Nucleic acids research* 36, 1072-1080.
- Luhtala, N., and Parker, R. (2012). Structure-Function Analysis of Rny1 in tRNA Cleavage and Growth Inhibition. *PLoS one* 7, e41111.
- Lund, E., and Dahlberg, J.E. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* 282, 2082-2085.
- Magrath, C., and Hyman, L.E. (1999). A Mutation in GRS1, a Glycyl-tRNA Synthetase, Affects 3'-End Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 129-141.
- Maki, Y., Yoshida, H., and Wada, A. (2000). Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. *Genes to Cells* 5, 965-974.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., and Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO reports* 3, 159-164.
- Margeot, A., Garcia, M., Wang, W., Tetaud, E., di Rago, J.P., and Jacq, C. (2005). Why are many mRNAs translated to the vicinity of mitochondria: a role in protein complex assembly? *Gene* 354, 64-71.
- Martinis, S.A., and Boniecki, M.T. (2010). The balance between pre- and post-transfer editing in tRNA synthetases. *FEBS Letters* 584, 455-459.
- Matlack, K.E.S., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999). BiP Acts as a Molecular Ratchet during Posttranslational Transport of Prepro- α Factor across the ER Membrane. *Cell* 97, 553-564.
- Mattiazzi, M., Vijayvergiya, C., Gajewski, C.D., DeVivo, D.C., Lenaz, G., Wiedmann, M., and Manfredi, G. (2004). The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Human Molecular Genetics* 13, 869-879.
- Maute, R.L., Schneider, C., Sumazin, P., Holmes, A., Califano, A., Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2013). tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 1404-1409.
- McCarthy, J.E.G. (1998). Posttranscriptional Control of Gene Expression in Yeast. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1492-1553.

- McGuire, A.T., and Mangroo, D. (2007). Cex1p is a novel cytoplasmic component of the *Saccharomyces cerevisiae* nuclear tRNA export machinery. *Embo J* 26, 288-300.
- McGuire, A.T., and Mangroo, D. (2012). Cex1p facilitates Rna1p-mediated dissociation of the Los1p-tRNA-Gsp1p-GTP export complex. *Traffic* 13, 234-256.
- Miller-Fleming, L., Giorgini, F., and Outeiro, T.F. (2008). Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnology Journal* 3, 325-338.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191.
- Moine, H., Romby, P., Springer, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J.-P., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1990). *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase and tRNA^{Thr} modulate the binding of the ribosome to the translational initiation site of the ThrS mRNA. *Journal of molecular biology* 216, 299-310.
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., *et al.* (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756-766.
- Moura, G.R., Carreto, L.C., and Santos, M.A. (2009). Genetic code ambiguity: an unexpected source of proteome innovation and phenotypic diversity. *Current opinion in microbiology* 12, 631-637.
- Mukhopadhyay, R., Jia, J., Arif, A., Ray, P.S., and Fox, P.L. (2009). The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends in biochemical sciences* 34, 324-331.
- Mukkada, A.J. (1977). Tricarboxylic acid and glyoxylate cycles in the "*Leishmaniae*". *Acta tropica* 34, 167-175.
- Munn, A.L., and Riezman, H. (1994). Endocytosis Is Required for the Growth of Vacuolar H⁺-Atpase-Defective Yeast - Identification of 6 New End Genes. *Journal of Cell Biology* 127, 373-386.
- Munro, S. (2004). Organelle identity and the organization of membrane traffic. *Nature cell biology* 6, 469-472.
- Murthi, A., Shaheen, H.H., Huang, H.Y., Preston, M.A., Lai, T.P., Phizicky, E.M., and Hopper, A.K. (2010). Regulation of tRNA bidirectional nuclear-cytoplasmic trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 21, 639-649.
- Nagao, A., Suzuki, T., Katoh, T., Sakaguchi, Y., and Suzuki, T. (2009). Biogenesis of glutamyl-mt tRNA^{Gln} in human mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16209-16214.
- Nangle, L.A., Motta, C.M., and Schimmel, P. (2006). Global effects of mistranslation from an editing defect in mammalian cells. *Chem Biol* 13, 1091-1100.

- Nathanson, L., and Deutscher, M.P. (2000). Active Aminoacyl-tRNA Synthetases Are Present in Nuclei as a High Molecular Weight Multienzyme Complex. *Journal of Biological Chemistry* 275, 31559-31562.
- Navarro, A., Boveris, A., Bandez, M.J., Sanchez-Pino, M.J., Gomez, C., Muntane, G., and Ferrer, I. (2009). Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free radical biology & medicine* 46, 1574-1580.
- Negrutskii, B.S., and Deutscher, M.P. (1991). Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4991-4995.
- Netzer, N., Goodenbour, J.M., David, A., Dittmar, K.A., Jones, R.B., Schneider, J.R., Boone, D., Eves, E.M., Rosner, M.R., Gibbs, J.S., *et al.* (2009). Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. *Nature* 462, 522-526.
- Nishikawa, S.-i., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L., and Endo, T. (2001). Molecular Chaperones in the Yeast Endoplasmic Reticulum Maintain the Solubility of Proteins for Retrotranslocation and Degradation. *The Journal of cell biology* 153, 1061-1070.
- Norcum, M.T., and Boisset, N. (2002). Three-dimensional architecture of the eukaryotic multisynthetase complex determined from negatively stained and cryoelectron micrographs. *FEBS Letters* 512, 298-302.
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.-J., and Sambrook, J. (1989). *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* 57, 1223-1236.
- Novick, P., and Brennwald, P. (1993). Friends and family: The role of the rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75, 597-601.
- Novoa, E.M., and Ribas de Pouplana, L. (2012). Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Trends in genetics : TIG* 28, 574-581.
- Nowacka, M., Strozycycki, P., Jackowiak, P., Hojka-Osinska, A., Szymanski, M., and Figlerowicz, M. (2013). Identification of stable, high copy number, medium-sized RNA degradation intermediates that accumulate in plants under non-stress conditions. *Plant Mol Biol* 83, 191-204.
- Nozawa, K., Ishitani, R., Yoshihisa, T., Sato, M., Arisaka, F., Kanamaru, S., Dohmae, N., Mangroo, D., Senger, B., Becker, H.D., *et al.* (2013). Crystal structure of Cex1p reveals the mechanism of tRNA trafficking between nucleus and cytoplasm. *Nucleic acids research* 41, 3901-3914.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., and Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion

- and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Molecular biology of the cell* **8**, 1233-1242.
- O'Connor, J.P., and Peebles, C.L. (1991). In vivo pre-tRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **11**, 425-439.
- O'Donoghue, P., Sethi, A., Woese, C.R., and Luthey-Schulten, Z.A. (2005). The evolutionary history of Cys-tRNACys formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 19003-19008.
- Obara, K., and Kihara, A. (2014). Signaling events of the Rim101 pathway occur at the plasma membrane in a ubiquitination-dependent manner. *Molecular and cellular biology*.
- Ohira, T., and Suzuki, T. (2011). Retrograde nuclear import of tRNA precursors is required for modified base biogenesis in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10502-10507.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* **326**, 1275-1279.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**, 552-565.
- Osawa, S., and Jukes, T.H. (1989). Codon reassignment (codon capture) in evolution. *Journal of molecular evolution* **28**, 271-278.
- Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K., and Muto, A. (1992). Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiological reviews* **56**, 229-264.
- Otani, A., Slike, B.M., Dorrell, M.I., Hood, J., Kinder, K., Ewalt, K.L., Cheresh, D., Schimmel, P., and Friedlander, M. (2002). A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 178-183.
- Ozanick, S.G., Wang, X., Costanzo, M., Brost, R.L., Boone, C., and Anderson, J.T. (2009). Rex1p deficiency leads to accumulation of precursor initiator tRNAMet and polyadenylation of substrate RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **37**, 298-308.
- Pan, X., Roberts, P., Chen, Y., Kvam, E., Shulga, N., Huang, K., Lemmon, S., and Goldfarb, D.S. (2000). Nucleus-Vacuole Junctions in *Saccharomyces cerevisiae* Are Formed Through the Direct Interaction of Vac8p with Nvj1p. *Molecular biology of the cell* **11**, 2445-2457.
- Pan, Y.X., Gu, H.H., Xu, J., and Dean, G.E. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* expression of exogenous vacuolar ATPase subunits B. *Biochimica et biophysica acta* **1151**, 175-185.
- Pang, Y.L.J., Poruri, K., and Martinis, S.A. (2014). tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, n/a-n/a.

- Park, B.J., Kang, J.W., Lee, S.W., Choi, S.J., Shin, Y.K., Ahn, Y.H., Choi, Y.H., Choi, D., Lee, K.S., and Kim, S. (2005a). The haploinsufficient tumor suppressor p18 upregulates p53 via interactions with ATM/ATR. *Cell* *120*, 209-221.
- Park, H., Park, S.G., Kim, J., Ko, Y.G., and Kim, S. (2002). Signaling pathways for TNF production induced by human aminoacyl-tRNA synthetase-associating factor, p43. *Cytokine* *20*, 148-153.
- Park, S.G., Choi, E.-C., and Kim, S. (2010). Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins (AIMPs): A triad for cellular homeostasis. *IUBMB life* *62*, 296-302.
- Park, S.G., Ewalt, K.L., and Kim, S. (2005b). Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends in biochemical sciences* *30*, 569-574.
- Park, S.G., Schimmel, P., and Kim, S. (2008). Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 11043-11049.
- Patten, D.A., Germain, M., Kelly, M.A., and Slack, R.S. (2010). Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* *20 Suppl 2*, S357-367.
- Pelletier, S., Gingras, S., Howell, S., Vogel, P., and Ihle, J.N. (2012). An early onset progressive motor neuron disorder in Scyl1-deficient mice is associated with mislocalization of TDP-43. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *32*, 16560-16573.
- Pereira, C., Bessa, C., Soares, J., Leao, M., and Saraiva, L. (2012). Contribution of yeast models to neurodegeneration research. *Journal of biomedicine & biotechnology* *2012*, 941232.
- Pereira, C., Silva, R.D., Saraiva, L., Johansson, B., Sousa, M.J., and Corte-Real, M. (2008). Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochimica et biophysica acta* *1783*, 1286-1302.
- Pezo, V., Metzgar, D., Hendrickson, T.L., Waas, W.F., Hazebrouck, S., Doring, V., Marliere, P., Schimmel, P., and De Crecy-Lagard, V. (2004). Artificially ambiguous genetic code confers growth yield advantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 8593-8597.
- Phizicky, E.M., and Hopper, A.K. (2010). tRNA biology charges to the front. *Genes & development* *24*, 1832-1860.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., and Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* *27*, 6407-6418.
- Piper, R.C., Cooper, A.A., Yang, H., and Stevens, T.H. (1995). Vps27 Controls Vacuolar and Endocytic Traffic through a Prevacuolar Compartment in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* *131*, 603-617.
- Pisarev, A.V., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* *131*, 286-299.

- Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Molecular cell* *37*, 196-210.
- Polycarpo, C., Ambrogelly, A., Bérubé, A., Winbush, S.M., McCloskey, J.A., Crain, P.F., Wood, J.L., and Söll, D. (2004). An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 12450-12454.
- Prætorius-Ibba, M., Hausmann, C.D., Paras, M., Rogers, T.E., and Ibba, M. (2007). Functional Association between Three Archaeal Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 3680-3687.
- Putney, S.D., and Schimmel, P. (1981). An aminoacyl tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. *Nature* *291*, 632-635.
- Qiu, H., Garcia-Barrio, M.T., and Hinnebusch, A.G. (1998). Dimerization by Translation Initiation Factor 2 Kinase GCN2 Is Mediated by Interactions in the C-Terminal Ribosome-Binding Region and the Protein Kinase Domain. *Molecular and cellular biology* *18*, 2697-2711.
- Qiu, J., and Noble, W.S. (2008). Predicting co-complexed protein pairs from heterogeneous data. *PLoS computational biology* *4*, e1000054.
- Quenault, T., Lithgow, T., and Traven, A. (2011). PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends in cell biology* *21*, 104-112.
- Quevillon, S., Robinson, J.-C., Berthonneau, E., Siatecka, M., and Mirande, M. (1999). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *Journal of molecular biology* *285*, 183-195.
- Raben, N., Nichols, R., Dohlman, J., McPhie, P., Sridhar, V., Hyde, C., Leff, R., and Plotz, P. (1994). A motif in human histidyl-tRNA synthetase which is shared among several aminoacyl-tRNA synthetases is a coiled-coil that is essential for enzymatic activity and contains the major autoantigenic epitope. *Journal of Biological Chemistry* *269*, 24277-24283.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* *331*, 730-736.
- Raina, M., Elgamal, S., Santangelo, T.J., and Ibba, M. (2012). Association of a multi-synthetase complex with translating ribosomes in the archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *FEBS Lett* *586*, 2232-2238.
- Rajkowitsch, L., Vilela, C., Berthelot, K., Ramirez, C.V., and McCarthy, J.E.G. (2004). Reinitiation and Recycling are Distinct Processes Occurring Downstream of Translation Termination in Yeast. *Journal of molecular biology* *335*, 71-85.

- Rak, M., Tetaud, E., Godard, F., Sagot, I., Salin, B., Duvezin-Caubet, S., Slonimski, P.P., Rytka, J., and di Rago, J.-P. (2007). Yeast Cells Lacking the Mitochondrial Gene Encoding the ATP Synthase Subunit 6 Exhibit a Selective Loss of Complex IV and Unusual Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry* 282, 10853-10864.
- Rak, M., Zeng, X., Brière, J.-J., and Tzagoloff, A. (2009). Assembly of F₀ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793, 108-116.
- Ray, P.S., Arif, A., and Fox, P.L. (2007). Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends in biochemical sciences* 32, 158-164.
- Reading, B.J., Williams, V.N., Chapman, R.W., Williams, T.I., and Sullivan, C.V. (2013). Dynamics of the Striped Bass (*Morone saxatilis*) Ovary Proteome Reveal a Complex Network of the Translasome. *Journal of proteome research* 12, 1691-1699.
- Reichert, A.S., and Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends in Genetics* 20, 555-562.
- Rho, S.B., Kim, M.J., Lee, J.S., Seol, W., Motegi, H., Kim, S., and Shiba, K. (1999). Genetic dissection of protein-protein interactions in multi-tRNA synthetase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4488-4493.
- Rho, S.B., Lee, J.S., Jeong, E.-J., Kim, K.-S., Kim, Y.G., and Kim, S. (1998). A Multifunctional Repeated Motif Is Present in Human Bifunctional tRNA Synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11267-11273.
- Rho, S.B., Lee, K.H., Kim, J.W., Shiba, K., Jo, Y.J., and Kim, S. (1996). Interaction between human tRNA synthetases involves repeated sequence elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10128-10133.
- Rho, S.B., Lincecum, T.L., and Martinis, S.A. (2002). An inserted region of leucyl-tRNA synthetase plays a critical role in group I intron splicing, Vol 21.
- Ribas de Pouplana, L., and Schimmel, P. (2001). Two Classes of tRNA Synthetases Suggested by Sterically Compatible Dockings on tRNA Acceptor Stem. *Cell* 104, 191-193.
- Richards, S.A., Carey, K.L., and Macara, I.G. (1997). Requirement of Guanosine Triphosphate-Bound Ran for Signal-Mediated Nuclear Protein Export. *Science* 276, 1842-1844.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D., and Soll, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes & development* 19, 583-592.
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M., and Goldfarb, D.S. (2003). Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 14, 129-141.

- Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M., and Emr, S.D. (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Molecular and cellular biology* *8*, 4936-4948.
- Rocak, S., Landeka, I., and Weygand-Durasevic, I. (2002). Identifying Pex21p as a protein that specifically interacts with yeast seryl-tRNA synthetase. *FEMS Microbiology Letters* *214*, 101-106.
- Rodriguez, A., De La Cera, T., Herrero, P., and Moreno, F. (2001). The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal* *355*, 625-631.
- Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G.A., Prabhu, Y., Rojas, A.L., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Raposo, G., van der Sluijs, P., and Bonifacino, J.S. (2008). Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *The Journal of cell biology* *183*, 513-526.
- Romby, P., and Springer, M. (2003). Bacterial translational control at atomic resolution. *Trends in Genetics* *19*, 155-161.
- Roth, S., Kumme, J., and Schuller, H.J. (2004). Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* *45*, 121-128.
- Rould, M.A., Perona, J.J., Soll, D., and Steitz, T.A. (1989). Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP at 2.8 Å resolution. *Science* *246*, 1135-1142.
- Ruan, B., Palioura, S., Sabina, J., Marvin-Guy, L., Kochhar, S., Larossa, R.A., and Soll, D. (2008). Quality control despite mistranslation caused by an ambiguous genetic code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 16502-16507.
- Rubio, M.A., Rinehart, J.J., Krett, B., Duvezin-Caubet, S., Reichert, A.S., Soll, D., and Alfonzo, J.D. (2008). Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 9186-9191.
- Ruggero, K., Guffanti, A., Corradin, A., Sharma, V.K., De Bellis, G., Corti, G., Grassi, A., Zanovello, P., Bronte, V., Ciminale, V., *et al.* (2014). Small Noncoding RNAs in Cells Transformed by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: a Role for a tRNA Fragment as a Primer for Reverse Transcriptase. *Journal of virology* *88*, 3612-3622.
- Saad, N.Y., Schiel, B., Brayé, M., Heap, J.T., Minton, N.P., Dürre, P., and Becker, H.D. (2012). Riboswitch (T-box)-mediated Control of tRNA-dependent Amidation in *Clostridium acetobutylicum* Rationalizes Gene and Pathway Redundancy for Asparagine and Asparaginyl-tRNA^{Asn} Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 20382-20394.

- Saad, N.Y., Stamatopoulou, V., Braye, M., Drinas, D., Stathopoulos, C., and Becker, H.D. (2013). Two-codon T-box riboswitch binding two tRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 12756-12761.
- Sachs, M.S., and Geballe, A.P. (2006). Downstream control of upstream open reading frames. *Genes & development* *20*, 915-921.
- Saha, A.R., Hill, J., Utton, M.A., Asuni, A.A., Ackerley, S., Grierson, A.J., Miller, C.C., Davies, A.M., Buchman, V.L., Anderton, B.H., *et al.* (2004). Parkinson's disease alpha-synuclein mutations exhibit defective axonal transport in cultured neurons. *J Cell Sci* *117*, 1017-1024.
- Saini, P., Eyler, D.E., Green, R., and Dever, T.E. (2009). Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* *459*, 118-121.
- Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourden, L., Le Crom, S., Lemoine, S., Tanty, V., Devaux, F., and Jacq, C. (2008). Yeast Mitochondrial Biogenesis: A Role for the PUF RNA-Binding Protein Puf3p in mRNA Localization. *PLoS one* *3*, e2293.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C.A., Chavatte, L., Kinter, M., Ting, S.M., Dignam, J.D., Kim, S., Driscoll, D.M., *et al.* (2004). Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* *119*, 195-208.
- Sarkar, S., Azad, A.K., and Hopper, A.K. (1999). Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 14366-14371.
- Sauerwald, A., Zhu, W., Major, T.A., Roy, H., Palioura, S., Jahn, D., Whitman, W.B., Yates, J.R., 3rd, Ibbá, M., and Soll, D. (2005). RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* *307*, 1969-1972.
- Saxena, S.K., Rybak, S.M., Davey, R.T., Youle, R.J., and Ackerman, E.J. (1992). Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *Journal of Biological Chemistry* *267*, 21982-21986.
- Schäfer, I.B., Rode, M., Bonneau, F., Schüssler, S., and Conti, E. (2014). The structure of the Pan2–Pan3 core complex reveals cross-talk between deadenylase and pseudokinase. *Nature structural & molecular biology* *21*, 591-598.
- Schimmel, P. (2008). Development of tRNA synthetases and connection to genetic code and disease. *Protein science : a publication of the Protein Society* *17*, 1643-1652.
- Schmid, E.M., Ford, M.G., Burtey, A., Praefcke, G.J., Peak-Chew, S.Y., Mills, I.G., Benmerah, A., and McMahon, H.T. (2006). Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* *4*, e262.
- Schmidt, O., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* *11*, 655-667.

- Schmidt, W.M., Kraus, C., Hoger, H., Hochmeister, S., Oberndorfer, F., Branka, M., Bingemann, S., Lassmann, H., Muller, M., Macedo-Souza, L.I., *et al.* (2007). Mutation in the Scyl1 gene encoding amino-terminal kinase-like protein causes a recessive form of spinocerebellar neurodegeneration. *EMBO reports* *8*, 691-697.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* *367*, 380-383.
- Schüller, H.-J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* *43*, 139-160.
- Schultz, D.W., and Yarus, M. (1994). Transfer RNA mutation and the malleability of the genetic code. *Journal of molecular biology* *235*, 1377-1380.
- Schultz, D.W., and Yarus, M. (1996). On malleability in the genetic code. *Journal of molecular evolution* *42*, 597-601.
- Sclafani, A., Chen, S., Rivera-Molina, F., Reinisch, K., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2010). Establishing a Role for the GTPase Ypt1p at the Late Golgi. *Traffic* *11*, 520-532.
- Seaman, M.N.J., Harbour, M.E., Tattersall, D., Read, E., and Bright, N. (2009). Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci* *122*, 2371-2382.
- Segev, N. (2001). Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Current Opinion in Cell Biology* *13*, 500-511.
- Sekito, T., Fujiki, Y., Ohsumi, Y., and Kakinuma, Y. (2008). Novel families of vacuolar amino acid transporters. *IUBMB life* *60*, 519-525.
- Sha, Z., Brill, L.M., Cabrera, R., Kleifeld, O., Scheliga, J.S., Glickman, M.H., Chang, E.C., and Wolf, D.A. (2009). The eIF3 interactome reveals the translasome, a supercomplex linking protein synthesis and degradation machineries. *Molecular cell* *36*, 141-152.
- Shaheen, H.H., and Hopper, A.K. (2005). Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 11290-11295.
- Sheppard, K., Akochy, P.-M., Salazar, J.C., and Söll, D. (2007). The *Helicobacter pylori* Amidotransferase GatCAB Is Equally Efficient in Glutamine-dependent Transamidation of Asp-tRNA^{Asn} and Glu-tRNA^{Gln}. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 11866-11873.
- Sheppard, K., Yuan, J., Hohn, M.J., Jester, B., Devine, K.M., and Soll, D. (2008). From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic acids research* *36*, 1813-1825.
- Shiba, K. (2002). Intron Positions Delineate the Evolutionary Path of a Pervasively Appended Peptide in Five Human Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Journal of molecular evolution* *55*, 727-733.

- Shin, B.S., Kim, J.R., Walker, S.E., Dong, J., Lorsch, J.R., and Dever, T.E. (2011). Initiation factor eIF2gamma promotes eIF2-GTP-Met-tRNAⁱ(Met) ternary complex binding to the 40S ribosome. *Nature structural & molecular biology* *18*, 1227-1234.
- Shoemaker, C.J., and Green, R. (2011). Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, E1392-1398.
- Sicheritz-Pontén, T., Kurland, C.G., and Andersson, S.G.E. (1998). A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* *1365*, 545-551.
- 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 research* *34*, 3968-3979.
- Simos, G., Sauer, A., Fasiolo, F., and Hurt, E.C. (1998). A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Molecular 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., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M., and Hurt, E.C. (1996b). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J* *15*, 5437-5448.
- Smirnova, E.V., Lakunina, V.A., Tarassov, I., Krasheninnikov, I.A., and Kamenski, P.A. (2012). Noncanonical functions of aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry Biokhimiia* *77*, 15-25.
- Smith, A.M., Fuchs, R.T., Grundy, F.J., and Henkin, T. (2010). Riboswitch RNAs: Regulation of gene expression by direct monitoring of a physiological signal. *RNA biology* *7*, 104-110.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., and Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 10364-10369.
- Sobala, A., and Hutvagner, G. (2011). Transfer RNA-derived fragments: origins, processing, and functions. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* *2*, 853-862.
- Sobala, A., and Hutvagner, G. (2013). Small RNAs derived from the 5' end of tRNA can inhibit protein translation in human cells. *RNA biology* *10*, 553-563.
- Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* *100*, 311-321.

- Springer, M., Plumbridge, J.A., Butler, J.S., Graffe, M., Dondon, J., Mayaux, J.F., Fayat, G., Lestienne, P., Blanquet, S., and Grunberg-Manago, M. (1985). Autogenous control of Escherichia coli threonyl-tRNA synthetase expression in Vivo. *Journal of molecular biology* *185*, 93-104.
- Stack, J.H., Dewald, D.B., Takegawa, K., and Emr, S.D. (1995). Vesicle-Mediated Protein-Transport - Regulatory Interactions between the Vps15 Protein-Kinase and the Vps34 Ptdins 3-Kinase Essential for Protein Sorting to the Vacuole in Yeast. *Journal of Cell Biology* *129*, 321-334.
- Stanford, D.R., Whitney, M.L., Hurto, R.L., Eisaman, D.M., Shen, W.C., and Hopper, A.K. (2004). Division of labor among the yeast sol proteins implicated in tRNA nuclear export and carbohydrate metabolism. *Genetics* *168*, 117-127.
- Stansfield, I., Jones, K., Kushnirov, V., Dagkesamanskaya, A., Poznyakovski, A., Paushkin, S., Nierras, C., Cox, B., Ter-Avanesyan, M., and MF., T. (1995). The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* *14*, 4365-4373.
- Starzyk, R., M., Webster, T., A., and Schimmel, P. (1987). Evidence for dispensable sequences inserted into a nucleotid fold. *Science* *237*, 1614-1618.
- Stathopoulos, C., Jacquin-Becker, C., Becker, H.D., Li, T., Ambrogelly, A., Longman, R., and Soll, D. (2001). *Methanococcus jannaschii* prolyl-cysteinyl-tRNA synthetase possesses overlapping amino acid binding sites. *Biochemistry* *40*, 46-52.
- Steiner-Mosonyi, M., Leslie, D.M., Dehghani, H., Aitchison, J.D., and Mangroo, D. (2003). Utp8p Is an Essential Intranuclear Component of the Nuclear tRNA Export Machinery of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 32236-32245.
- Stevens, T., Esmon, B., and Schekman, R. (1982). Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell* *30*, 439-448.
- Stevens, T.H., and Forgac, M. (1997). STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION OF THE VACUOLAR (H⁺)-ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *13*, 779-808.
- Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature reviews Molecular cell biology* *8*, 195-208.
- Stuart, R.A. (2008). Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* *40*, 411-417.
- Sullivan, A., Uff, C.R., Isacke, C.M., and Thorne, R.F. (2003). PACE-1, a novel protein that interacts with the C-terminal domain of ezrin. *Experimental cell research* *284*, 224-238.
- Swayne, T.C., Zhou, C., Boldogh, I.R., Charalel, J.K., McFaline-Figueroa, J.R., Thoms, S., Yang, C., Leung, G., McInnes, J., Erdmann, R., *et al.* (2011). Role for cER and Mmr1p in anchorage of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Current biology : CB* *21*, 1994-1999.

- Takano, A., Endo, T., and Yoshihisa, T. (2005). tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science* *309*, 140-142.
- Tang, F., Peng, Y., Nau, J.J., Kauffman, E.J., and Weisman, L.S. (2006). Vac8p, an armadillo repeat protein, coordinates vacuole inheritance with multiple vacuolar processes. *Traffic* *7*, 1368-1377.
- Taylor, S.S., and Kornev, A.P. (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in biochemical sciences* *36*, 65-77.
- Terabayashi, T., Funato, Y., Fukuda, M., and Miki, H. (2009). A coated vesicle-associated kinase of 104 kDa (CVAK104) induces lysosomal degradation of frizzled 5 (Fzd5). *The Journal of biological chemistry* *284*, 26716-26724.
- Teter, S.A., and Klionsky, D.J. (2000). Transport of proteins to the yeast vacuole: autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting, and role of the vacuole in degradation. *Seminars in cell & developmental biology* *11*, 173-179.
- Thompson, D.M., Lu, C., Green, P.J., and Parker, R. (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *Rna* *14*, 2095-2103.
- Thompson, D.M., and Parker, R. (2009). Stressing out over tRNA cleavage. *Cell* *138*, 215-219.
- Ting, S.M., Bogner, P., and Dignam, J.D. (1992). Isolation of prolyl-tRNA synthetase as a free form and as a form associated with glutamyl-tRNA synthetase. *Journal of Biological Chemistry* *267*, 17701-17709.
- Trempe Norcum, M. (1999). Ultrastructure of the eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex derived from two dimensional averaging and classification of negatively stained electron microscopic images. *FEBS Letters* *447*, 217-222.
- Triana-Alonso, F.J., Chakraborty, K., and Nierhaus, K.H. (1995). The Elongation Factor 3 Unique in Higher Fungi and Essential for Protein Biosynthesis Is an E Site Factor. *Journal of Biological Chemistry* *270*, 20473-20478.
- Tuller, T., Carmi, A., Vestsigian, K., Navon, S., Dorfan, Y., Zaborske, J., Pan, T., Dahan, O., Furman, I., and Pilpel, Y. (2010). An Evolutionarily Conserved Mechanism for Controlling the Efficiency of Protein Translation. *Cell* *141*, 344-354.
- Tumbula, D.L., Becker, H.D., Chang, W.Z., and Söll, D. (2000). Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature* *407*, 106-110.
- Ueta, M., Wada, C., and Wada, A. (2010). Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* *15*, 43-58.

- Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H., and Wada, A. (2005). Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes to Cells* *10*, 1103-1112.
- Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., Watanabe, K., and Suzuki, T. (2005). Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *The Journal of biological chemistry* *280*, 1613-1624.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* *9*, 654-659.
- van der Laan, M., Bohnert, M., Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2012). Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends in cell biology* *22*, 185-192.
- van der Vegt, J.P., van Nuenen, B.F., Bloem, B.R., Klein, C., and Siebner, H.R. (2009). Imaging the impact of genes on Parkinson's disease. *Neuroscience* *164*, 191-204.
- van Rooyen, J.M., Murat, J.-B., Hammoudi, P.-M., Kieffer-Jaquinod, S., Coute, Y., Sharma, A., Pelloux, H., Belrhali, H., and Hakimi, M.-A. (2014a). Assembly of the Novel Five-Component Apicomplexan Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex Is Driven by the Hybrid Scaffold Protein Tg-p43. *PLoS ONE* *9*, e89487.
- van Rooyen, J.M., Murat, J.B., Hammoudi, P.M., Kieffer-Jaquinod, S., Coute, Y., Sharma, A., Pelloux, H., Belrhali, H., and Hakimi, M.A. (2014b). Assembly of the Novel Five-Component Apicomplexan Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex Is Driven by the Hybrid Scaffold Protein Tg-p43. *PloS one* *9*, e89487.
- Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. (2005). A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol* *3*, e189.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes & development* *15*, 1104-1114.
- Vitreschak, A., Rodionov, D., Mironov, A., and Gelfand, M. (2004). Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends in genetics : TIG* *20*, 44 - 50.
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., and Rapoport, T.A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* *124*, 573-586.
- Vogtle, F.N., Burkhart, J.M., Rao, S., Gerbeth, C., Hinrichs, J., Martinou, J.C., Chacinska, A., Sickmann, A., Zahedi, R.P., and Meisinger, C. (2012). Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *11*, 1840-1852.

- Wada, A., Yamazaki, Y., Fujita, N., and Ishihama, A. (1990). Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 2657-2661.
- Wakasugi, K., Slike, B.M., Hood, J., Ewalt, K.L., Cheresch, D.A., and Schimmel, P. (2002a). Induction of Angiogenesis by a Fragment of Human Tyrosyl-tRNA Synthetase. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 20124-20126.
- Wakasugi, K., Slike, B.M., Hood, J., Otani, A., Ewalt, K.L., Friedlander, M., Cheresch, D.A., and Schimmel, P. (2002b). A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 173-177.
- Wang, F., Xu, Z., Zhou, J., Lo, W.S., Lau, C.F., Nangle, L.A., Yang, X.L., Zhang, M., and Schimmel, P. (2013). Regulated capture by exosomes of mRNAs for cytoplasmic tRNA synthetases. *The Journal of biological chemistry* *288*, 29223-29228.
- Wang, X., Zamore, P.D., and Hall, T.M. (2001a). Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Molecular cell* *7*, 855-865.
- Wang, Y.X. (1998). Vac8p, a Vacuolar Protein with Armadillo Repeats, Functions in both Vacuole Inheritance and Protein Targeting from the Cytoplasm to Vacuole. *The Journal of cell biology* *140*, 1063-1074.
- Wang, Y.X., Kauffman, E.J., Duex, J.E., and Weisman, L.S. (2001b). Fusion of docked membranes requires the armadillo repeat protein Vac8p. *The Journal of biological chemistry* *276*, 35133-35140.
- Warren, G., and Wickner, W. (1996). Organelle inheritance. *Cell* *84*, 395-400.
- Watford, M. (1991). The urea cycle: a two-compartment system. *Essays in biochemistry* *26*, 49-58.
- Weisman, L.S. (2006). Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nature reviews Molecular cell biology* *7*, 243-252.
- Weiss, P., Huppert, S., and Kolling, R. (2008). ESCRT-III protein Snf7 mediates high-level expression of the SUC2 gene via the Rim101 pathway. *Eukaryotic cell* *7*, 1888-1894.
- Weiss, P., Huppert, S., and Kolling, R. (2009). Analysis of the dual function of the ESCRT-III protein Snf7 in endocytic trafficking and in gene expression. *The Biochemical journal* *424*, 89-97.
- Westermann, B. (2014). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* *1837*, 1039-1046.
- Wharton, R.P., and Aggarwal, A.K. (2006). mRNA regulation by Puf domain proteins. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* *2006*, pe37.
- Wickens, M., Bernstein, D.S., Kimble, J., and Parker, R. (2002). A PUF family portrait: 3' UTR regulation as a way of life. *Trends in Genetics* *18*, 150-157.

- Wideman, J.G., Gawryluk, R.M., Gray, M.W., and Dacks, J.B. (2013). The ancient and widespread nature of the ER-mitochondria encounter structure. *Molecular biology and evolution* 30, 2044-2049.
- Wilcox, M., and Nirenberg, M. (1968). Transfer RNA as a cofactor coupling amino acid synthesis with that of protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61, 229-236.
- Wilson, D.N., and Doudna Cate, J.H. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Wiltrout, E., Goodenbour, J.M., Frechin, M., and Pan, T. (2012). Misacylation of tRNA with methionine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 40, 10494-10506.
- Wong, F.C., Beuning, P.J., Silvers, C., and Musier-Forsyth, K. (2003). An isolated class II aminoacyl-tRNA synthetase insertion domain is functional in amino acid editing. *The Journal of biological chemistry* 278, 52857-52864.
- Woodson, J.D., and Chory, J. (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature reviews Genetics* 9, 383-395.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2005). Molecular Organization of Target of Rapamycin Complex 2. *Journal of Biological Chemistry* 280, 30697-30704.
- Xu, C., Xu, J., Zhang, Y., Ma, J., Kawakami, H., Maruyama, H., and Kamada, M. (2010). Analysis on the susceptibility genes in two chinese pedigrees with familial Parkinson's disease. *Neurology research international* 2010, 674740.
- Yang, D.C. (1996). Mammalian aminoacyl-tRNA synthetases. *Current topics in cellular regulation* 34, 101-136.
- Yannay-Cohen, N., Carmi-Levy, I., Kay, G., Yang, C.M., Han, J.M., Kemeny, D.M., Kim, S., Nechushtan, H., and Razin, E. (2009). LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Molecular cell* 34, 603-611.
- Yao, P., and Fox, P.L. (2013). Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. *EMBO molecular medicine* 5, 332-343.
- Yao, P., Potdar, A.A., Arif, A., Ray, P.S., Mukhopadhyay, R., Willard, B., Xu, Y., Yan, J., Saidel, G.M., and Fox, P.L. (2012). Coding region polyadenylation generates a truncated tRNA synthetase that counters translation repression. *Cell* 149, 88-100.
- Yokoyama, S., and Nishimura, S. (1995). Modified nucleosides and codon recognition. *American Society for Microbiology Press, Washington, D*, 207-233.
- Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N., and Endo, T. (2003). Possibility of Cytoplasmic pre-tRNA Splicing: the Yeast tRNA Splicing Endonuclease Mainly Localizes on the Mitochondria. *Molecular biology of the cell* 14, 3266-3279.

- Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., and Ideker, T. (2003). Multiple Pathways Are Co-regulated by the Protein Kinase Snf1 and the Transcription Factors Adr1 and Cat8. *Journal of Biological Chemistry* 278, 26146-26158.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H.D., and Noller, H.F. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science* 292, 883-896.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual review of genetics* 42, 27-81.
- Zara, V., Conte, L., and Trumpower, B.L. (2009). Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 89-96.
- Zeng, X., Neupert, W., and Tzagoloff, A. (2007). The Metalloprotease Encoded by ATP23 Has a Dual Function in Processing and Assembly of Subunit 6 of Mitochondrial ATPase. *Molecular biology of the cell* 18, 617-626.
- Zeqiraj, E., and van Aalten, D.M.F. (2010). Pseudokinases-remnants of evolution or key allosteric regulators? *Current Opinion in Structural Biology* 20, 772-781.
- Zhang, Y., Banerjee, S., Wang, Z., Xu, H., Zhang, L., Mohammad, R., Aboukameel, A., Adsay, N.V., Che, M., Abbruzzese, J.L., *et al.* (2006). Antitumor Activity of Epidermal Growth Factor Receptor-Related Protein Is Mediated by Inactivation of ErbB Receptors and Nuclear Factor-κB in Pancreatic Cancer. *Cancer Research* 66, 1025-1032.
- Zhao, Z., Hashiguchi, A., Hu, J., Sakiyama, Y., Okamoto, Y., Tokunaga, S., Zhu, L., Shen, H., and Takashima, H. (2012). Alanine-tRNA synthetase mutation in a family with dominant distal hereditary motor neuropathy. *Neurology* 78, 1644-1649.
- Zhou, M., Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (1998). Regulated Co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *The Journal of biological chemistry* 273, 24649-24653.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtsov, S., Kisselev, L., and Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *Embo J* 14, 4065-4072.
- Zick, M., and Wickner, W. (2012). Phosphorylation of the effector complex HOPS by the vacuolar kinase Yck3p confers Rab nucleotide specificity for vacuole docking and fusion. *Molecular biology of the cell* 23, 3429-3437.

Le complexe multisynthétasique AME de levure : Dynamique de l'édifice et rôles non canoniques de ses composants

Résumé

Les complexes multisynthétasiques (MSC) sont des complexes multi-protéiques identifiés dans un grand nombre d'organismes pro- et eucaryotes. Ils impliquent des protéines d'assemblages et des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRSs), responsables de l'amination de leurs ARNt homologues au cours de la traduction. La taille et la composition des MSC varient selon les organismes, et le rôle de ces complexes n'est pas encore totalement compris. Il semblerait néanmoins que chez les eucaryotes, l'accrétion en complexe soit une stratégie mise en œuvre par les cellules pour empêcher les aaRSs d'assurer des fonctions additionnelles. Chez *S.cerevisiae*, nous montrons que la dynamique du complexe AME, composé de la méthionyl- et de la glutamyl-ARNt synthétase (MRS et ERS) ainsi que de la protéine d'ancrage Arc1p, est dépendante du métabolisme de la levure. En respiration la MRS joue le rôle de facteur de transcription et régule l'expression des gènes nucléaires du complexe III et V de la chaîne respiratoire, tandis que l'ERS active la traduction mitochondriale. Cette étude montre que la relocalisation synchrone est primordiale pour l'adaptation des cellules au métabolisme respiratoire.

Complexe multisynthétasique, aminoacyl-ARNt synthétase, ARNt, *Saccharomyces cerevisiae*, transition diauxique, mitochondrie, transcription, traduction.

Résumé en anglais

Multisynthetase complexes (MSC) are complexes made of several proteins and were identified in a wide variety of organisms from pro- to eukaryotes. They are usually made of assembly factors and aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs), which are responsible for the aminoacylation of their corresponding tRNAs during translation. Depending on the organisms, size and composition of these complexes differ greatly and their role is not fully understood yet. Although it seems that in eukaryotes, accretions of aaRSs into MSC prevent aaRSs to perform their additional functions. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, we show that the dynamic of the AME complex, made of the méthionyl- and glutamyl-tRNA synthetases (MRS and ERS) and the assembly protein Arc1p is linked to yeast metabolism. In respiration, MRS is imported in the nucleus to act as a transcription factor and regulates the expression of nuclear genes belonging to complex III and V of the respiratory chain, while ERS is imported in mitochondria to activate translation. This study shows that synchronous relocation of both aaRSs is crucial for yeast cells to adapt to respiratory metabolism.

Multisynthetase complex, aminoacyl-tRNA synthetase, tRNA, *Saccharomyces cerevisiae*, diauxic shift, mitochondria, transcription, translation.