



HAL
open science

Découverte et caractérisation d'une nouvelle forme de méthionyl-ARNt synthétase nucléaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Daphné Laporte

► **To cite this version:**

Daphné Laporte. Découverte et caractérisation d'une nouvelle forme de méthionyl-ARNt synthétase nucléaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Mycologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ066 . tel-01565221

HAL Id: tel-01565221

<https://theses.hal.science/tel-01565221>

Submitted on 19 Jul 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

UMR7156

THÈSE présentée par :

Daphné LAPORTE

soutenue le : 30 septembre 2016

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Découverte et caractérisation d'une
nouvelle forme de Méthionyl-ARNt
synthétase nucléaire chez la levure
*Saccharomyces cerevisiae***

THÈSE dirigée par :
Mr BECKER Hubert

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Mr HAKIMI Mohamed-Ali
Mr MIRANDE Marc

Docteur, INSERM
Docteur, CNRS

AUTRES MEMBRES DU JURY :
Mr LESCURE Alain

Docteur, Université de Strasbourg

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury, le Dr Mohamed-Ali Hakimi, le Dr Alain Lescure et le Dr Marc Mirande, qui me font l'honneur de juger mon travail.

Je remercie également le Dr Ivan Tarassov de son accueil au sein de l'UMR 7156, dans laquelle j'ai effectuée mon stage de Master 2 puis ma thèse.

Merci à toi, Hubert, de m'avoir accordé ta confiance et de tous les précieux conseils que tu m'as donné alors que je ne faisais pas encore partie de l'équipe, puis pendant ces 4 ans. Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse durant laquelle je me suis passionnée pour la MetRS et ses (nombreux) aspects ! Mais merci également de m'avoir épaulée dans les bons moments comme dans les mauvais, et d'avoir fait de moi une chercheuse. Je garderai tout ça en mémoire mais également tous les bons conseils en matière de vin, de cuisine, etc !

Bruno, je te remercie pour ton aide et tes avis, toujours pondérés et dispensés dans la quiétude ! Continue à inculquer l'importance des contrôles négatifs et surtout, ne perd pas ton calme légendaire, même avec ton futur « Affreux » thésard ! Merci de m'avoir prévenu dès le début de ma thèse de l'importance de la vie en dehors du labo ! Tes qualités humaines n'ont d'égale que ta persévérance de chercheur.

Ludovic, toi qui as été là toute la première moitié de ma thèse ! Merci d'avoir pris le temps pour m'apprendre ces merveilleuses techniques de biologie moléculaire à la microbiologiste que j'étais ! Je me souvient encore de mon 2^{ème} jour de thèse où tu m'as fais faire des purif d'ARN DIRECT histoire d'être dans le bain ! Et surtout, merci d'avoir pris soin de mes oreilles avec tes goûts musicaux raffinés !

Gaétan ! Et bien finalement, on a fait un bon bout de chemin ensemble. Nous avons souvent été comme chien et chat, mais toujours dans la bienveillance et le respect de l'autre (quoique, quand je repense à Kendji... 😊). Je te souhaite bon courage pour cette dernière année de thèse, et te souhaite de trouver ta voie !

Sylvain, nouvelle recrue de talent, je ne peux qu'être satisfaite que le sujet MetRS te revienne ! Je ne doute pas une seule seconde que tu sauras le porter encore plus loin qu'il n'est maintenant.

Johann, nos routes quittent l'UMR 7156 en même temps, donc tout d'abord je souhaite une très bonne continuation à Tours au scientifique hors pair que tu es ! Je te remercie pour tous tes conseils qui ont fait avancer le sujet MetRS lorsque j'en avais le plus besoin.

A l'Affreux du labo : un petit mot pour toi aussi, je te souhaite le meilleur pour cette thèse qui commence ! Et surtout, ne soit pas trop pressé quand tu fais tes manip ! Les Dr Senger et Fischer (welcome back !) y veilleront j'en suis certaine !

Aux anciens post-doc l'équipe : Yuhei et Jo. Ce fut un plaisir de croiser votre route, les biochimistes que vous êtes m'ont toujours impressionnée ! Merci pour toutes vos astuces de post-doc et l'initiation à la purification de protéine ! Et moi aussi je sais faire des aminoacylations maintenant !

A tous le labo, Merci ! Merci Sylvie pour l'enthousiasme dont tu fais toujours preuve ; Aline, pour ton sourire et nos petites discussions ; Bruno R, pour tes astuces bio ; Anne-Marie, pour ton empathie sans égal ; Romuald, pour ta bonne humeur quotidienne ; Yann, pour ton soutien ces derniers mois.

Impossible de citer tout le monde, mais je garde une pensée particulière pour chacun soyez-en certain !

Delphine. Nos souvenirs du congrès en Grèce ont marqué le début d'une belle amitié. Merci d'avoir été une oreille attentive et d'avoir distillé tes précieux conseils. Ma jumelle de thèse, je remercie Magali et Joëlle de m'avoir mis sur ma route ! Je vous souhaite de vivre encore plein de bonnes expériences comme celles-ci, et pourquoi pas, en Grèce ?

A mon groupe d'amies du DUT génie biologique option Agronomie promo 2007-2009. Car c'est là où tout a commencé ! Merci à vous les filles, d'être là après ces

nombreuses années, pour ces nombreux fous rires et discussions. Il paraît que toute amitié qui dure plus de 7 ans durera toute une vie ! Je ne sais pas si c'est scientifiquement prouvé, mais moi je n'en doute pas !

Marine. A ma plus belle rencontre de ces deux dernières années ! Tu es une fille formidable, merci d'avoir su me faire comprendre que derrière une tête de mule peut se cacher un cheval généreux (qui manie les réseaux sociaux à la perfection ;) ! Vous avez été l'élément indispensable à la réussite de ma thèse en me donnant les moments d'évasion nécessaires, mais également en étant une source de bienveillance et de conseils inépuisable. Merci pour la confiance que tu m'accordes chaque jour.

Merci a mes parents d'avoir fait de moi une personne persévérante, qualité indispensable pour tout doctorant, mais surtout, ce que je suis ! Merci a mes sœurs pour ces moments de décompressions durant la thèse et son écriture !

Et enfin, Julien ! Je ne peux que remercier le destin de t'avoir mis sur ma route ! Tout simplement, merci de m'avoir soutenu ces 3 dernières années, de m'avoir poussée quand je n'osais pas, pour tous les moments partagés, et surtout, de croire plus en moi que quiconque.

Introduction	13
I L'expression des gènes chez les eucaryotes	15
I.1 La Transcription et ses acteurs	15
I.1.1 Généralités	15
I.1.2 Les facteurs de transcription	15
I.1.3 Les coactivateurs.....	19
I.1.4 L'ARN polymérase II	19
I.2 La traduction eucaryotique.....	20
I.2.1 Généralités sur la traduction cytoplasmique	20
I.2.2 Existence d'une traduction nucléaire	23
I.2.3 Les caractéristiques des aminoacyl-ARNt synthétases	23
I.2.4 Les particularités de la traduction mitochondriale.....	25
II Biogénèse des ARNt.....	29
II.1 Maturation des extrémités 3' et 5' des ARNt suite à leur transcription 30	
II.2 Les introns et l'épissage.....	30
II.3 Les modifications post-transcriptionnelles	31
III Trafic nucléocytoplasmique des macromolécules.....	32
III.1 Le transport nucléo-cytoplasmique des protéines.....	32
III.1.1 Le pore nucléaire	32
III.1.2 L'import nucléaire des protéines	33
III.1.3 Le système d'export nucléaire.....	38
III.2 Le trafic nucléocytoplasmique des ARNt.....	41
III.2.1 Les différentes voies d'exports nucléaires.....	41
III.2.2 Les transporteurs intranucléaires.....	43
III.2.3 L'import rétrograde	43
IV Diversité et composition des complexes multisynthétasiques à travers les organismes	46
IV.1 Chez les procaryotes.....	48
IV.1.1 Existence d'un complexe bactérien.....	48
IV.1.2 Chez les Archées	48
IV.2 Les MSC eucaryotes	50
IV.2.1 Emergence de nouveaux domaines et protéines.....	50
IV.2.2 Chez les mammifères.....	54
IV.2.3 Chez d'autres métazoaires	55
IV.2.4 Chez les protozoaires	55
IV.2.5 Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
V Le système méthionine dans l'aminocyclation	60
V.1 Le système méthionine chez les procaryotes.....	61
V.1.1 La MetRS procaryotique	62
V.1.2 La formylation de l'ARNt _f ^{Met}	63
V.2 Le système méthionine chez les Eucaryote	64

V.2.1	Le système méthionine mitochondrial.....	64
V.2.2	Le système méthionine cytoplasmique.....	66
VI	Rôles non-canoniques des aminoacyl-ARNt synthétases	72
VI.1	Comment une aaRS peut-elle acquérir de nouvelles fonctions ?	72
VI.2	Les aminoacyl-ARNt synthétases nucléaires	73
VI.2.1	La TyrRS humaine cytoplasmique et son rôle dans la réponse au stress oxydatif.....	73
VI.2.2	Biosynthèse du Ap4A par la LysRS cytoplasmique humaine	74
VI.2.3	Contrôle du développement vasculaire par la SerRS	74
VI.2.4	Participation de la MetRS cytoplasmique humaine à la transcription des ARNr	75
VI.2.5	Localisation nucléaire de la MetRS de <i>S. cerevisiae</i>	76
VI.2.6	Indices de l'existence d'une aminoacylation nucléaire de l'ARNt chez les eucaryotes.....	76
VI.3	Les MetRS et leur implication dans la réponse au stress oxydatif	77
VI.4	Les autres fonctions non-canoniques des aaRS et protéines auxiliaires chez les métazoaires.....	78
VI.4.1	La LysRS cytoplasmique humaine	78
VI.4.2	La LysRS mitochondriale humaine.....	79
VI.4.3	Propriétés de cytokines de la TyrRS cytoplasmique humaine	79
VI.4.4	Propriétés de cytokines de la TrpRS cytoplasmique humaine.....	79
VI.4.5	La GluProRS cytoplasmique humaine et la réponse inflammatoire	80
VI.4.6	La LeuRS cytoplasmique humaine et l'activation de la voie TOR.....	80
VI.4.7	La HisRS cytoplasmique humaine , première aaRS identifiée dans les syndromes anti-synthétasiques.....	80
VI.4.8	Fonctions additionnelles des protéines auxiliaires de l'Humain.....	80
VI.4.9	La GlnRS du parasite <i>Entamoeba histolytica</i>	82
VI.5	Fonctions additionnelles des aaRS de champignons.....	82
VI.5.1	La TyrRS mitochondriale de <i>Neurospora crassa</i> et l'épissage des introns	82
VI.5.2	La LeuRS mitochondriale de <i>S. cerevisiae</i> et l'épissage des introns	82
VI.5.3	La GluRS cytoplasmique de <i>S. cerevisiae</i>	83
VI.5.4	La LysRS mitochondriale de <i>S. cerevisiae</i>	83
VI.5.5	La GlyRS cytoplasmique de <i>S. cerevisiae</i>	83
VI.5.6	La TyrRS de <i>S. cerevisiae</i>	83
VI.6	Fonctions non canoniques des aaRS d' <i>E. coli</i>	84
VII	Le métabolisme de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
VII.1	Le métabolisme du glucose et la fermentation	84
VII.1.1	Avantages de la fermentation	84
VII.1.2	La détection du glucose par la cellule	85
VII.1.3	Inhibition de la fonction mitochondriale par la voie Mig1/Hxk2.....	86
VII.1.4	Régulation par la voie TOR.....	86
VII.2	La transition diauxique.....	87

VII.2.1	La voie Snf1	87
VII.2.2	La voie TOR	89
VII.2.3	Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale	89
VIII	Mon sujet de thèse	91
IX	Article de revue n°1 : Idiosyncrasies in decoding mitochondrial genomes.....	93
X	Article de revue n°2 : Exploring the evolutionary diversity and assembly modes of multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes: Lessons from unicellular organisms.	106

Matériel et méthodes	119
I Microbiologie	121
I.1 Souches de bactéries.....	121
I.2 Souches de levure.....	121
I.3 Milieux de culture	122
I.3.1 Milieux pour la culture des bactéries	122
I.3.2 Milieux pour la culture des levures.....	123
I.4 Systèmes de double hybride.....	124
I.4.1 Double hybride bactérien.....	124
I.4.2 Double hybride levure	126
II Techniques de biologie moléculaire.....	128
II.1 Préparation des bactéries chimiocompétentes	128
II.2 Transformation des bactéries chimiocompétentes.....	128
II.3 Méthodes d'obtention et d'étude des acides nucléiques	128
II.3.1 Extraction de l'ADN de levure	128
II.3.2 Extraction phénol-chloroforme des acides nucléiques.....	129
II.3.3 Précipitation des acides nucléiques à l'éthanol et à l'isopropanol	129
II.3.4 Amplification par PCR et clonage	129
II.3.5 Mutagenèse par PCR du gène <i>MES1</i>	132
II.3.6 Modification enzymatique des acides nucléiques.....	134
II.3.7 Plasmides générés.....	135
II.3.8 Transcription <i>in vitro</i>	137
II.3.9 Purification des transcrits sur gel dénaturant.....	139
II.3.10 Renaturation et stockage des transcrits d'ARNt ^{Met}	139
II.3.11 Mesure des concentrations en acides nucléiques.....	140
II.4 Préparation et transformation de levures chimiocompétentes.....	140
III Techniques de génétique de la levure.....	141
III.1 Disruption d'un gène nucléaire.....	141
III.2 Tests en goutte	141
III.3 Chasse de plasmide sur 5 FOA.....	141
III.4 Croisements de levures, sporulation et sélection des ségréants	142
IV Techniques de biologie cellulaire.....	142
IV.1 Purification de noyaux de levure	142
IV.2 Techniques de microscopie.....	144

IV.2.1	Culture des levures.....	144
IV.2.2	Coloration Hoechst de l'ADN des noyaux	144
V	Méthodes d'obtention et d'étude des protéines	145
V.1	Extractions protéiques et purifications	145
V.1.1	Préparation d'extraits protéiques totaux pour immunodectection	145
V.1.2	Fractionnement subcellulaire	146
V.1.3	Extraction des protéines nucléaires	146
V.1.4	Purification d'affinité en tandem (TAP).....	147
V.1.5	Purification des protéines MBP-MetRS et MBP-MetRS Δ 142 surproduites dans <i>E. coli</i>	148
V.1.6	Préparation d'un anticorps anti-MetRS	149
V.1.7	Purification d'Arc1 recombinant.....	149
V.2	Analyse de la qualité des protéines obtenues.....	150
V.2.1	Mesure des concentrations protéiques.....	150
V.2.2	Concentration et conservation des solutions de protéines et analyse de leur pureté	150
V.2.3	Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes et coloration au bleu de Coomassie	151
V.2.4	Immunodétection des protéines	152
V.3	Mesure de l'activité des protéines	153
V.3.1	Détermination de l'efficacité d'amination (k_{cat}/K_M) des aaRS	153
V.3.2	Traitement des données cinétiques.....	154
VI	Techniques de bioinformatique.....	154
VI.1	Identification d'un NLS putatif.....	154
VII	Article de revue n°3 : Nonconventional localizations of cytosolic aminoacyl-tRNA synthetases in yeast and human cells.....	155

Résultats et discussions.....195

Chapitre I :197

Le complexe AME synchronise l'expression des sous-unités du complexe V de la chaîne respiratoire d'origines génétiques nucléaires et mitochondriales chez *S. cerevisiae*.....197

I	Contexte.....	199
I.1	Les souches désynchronisées et resynchronisées.....	199
II	Apport de mon travail à cette étude.....	200
II.1	Découverte du 1 ^{er} NLS de la MetRS	200
II.2	Recherche des interactants de la MetRS nucléaire	200
II.2.1	La technique de purification par affinité en tandem.....	201

II.2.2	Le double hybride bactérien.....	206
II.2.3	Le double hybride levure	210
II.3	La MetRS possède un 2 nd NLS.....	215
III	Discussion.....	218
IV	Article : « Expression of Nuclear and Mitochondrial Genes Encoding ATP Synthase Is Synchronized by Disassembly of a Multisynthetase Complex. »	220

Chapitre II :237

Découverte d'une forme clivée nucléaire de MetRS chez *S. cerevisiae*.....237

I	Contexte de la découverte	239
II	Purification de la MetRS de <i>S. cerevisiae</i>	241
III	Interaction de la forme clivée avec Arc1.....	244
IV	Recherche de la protéase impliquée dans le mécanisme de protéolyse partielle de la MetRS	246
IV.1	Le clivage des protéines.....	246
IV.2	Localisation intracellulaire et diversité des protéases de <i>S. cerevisiae</i> 246	
IV.3	Identification des voies de clivages potentielles de la MetRS	248
IV.3.1	Confirmation de l'existence d'un clivage de la MetRS <i>in vitro</i>	248
IV.3.2	La voie Rim13-dépendante.....	250
IV.3.3	La voie ubiquitine-dépendante	251
V	Existence du mécanisme de clivage dans la MetRS humaine	257
V.1	Pourquoi s'intéresser à un potentiel clivage de la MetRS humaine	257
V.2	Résultats.....	257
V.2.1	Clonage et expression de la MetRS humaine dans <i>S. cerevisiae</i>	257
V.2.2	Test de viabilité des souches obtenues	258
V.2.3	Localisation subcellulaire de la MetRS humaine dans la levure.....	259
VI	Discussion.....	261
VII	Article 2 « Existence of two essential and functionally distinct nuclear methionyl-tRNA synthetases in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> »	263

Conclusion générale et perspectives.....293

Bibliographie297

Annexe327

Introduction

I L'expression des gènes chez les eucaryotes

L'information génétique de chaque cellule est contenue dans son ADN. Enchaînement répétitif de nucléotides, un gène peut sembler inerte à première vue. Et pourtant, c'est ce gène, modifié épigénétiquement ou non, qui pousse les machineries transcriptionnelle et traductionnelle à fonctionner, dans le but ultime de s'exprimer. Mon objet d'étude, *Saccharomyces cerevisiae*, est une cellule individuelle eucaryote, c'est pourquoi je détaillerai la transcription et la traduction des eucaryotes dans les paragraphes qui suivent.

I.1 La Transcription et ses acteurs

I.1.1 Généralités

Il s'agit de la première étape de l'expression des gènes. Se déroulant dans le noyau chez les eucaryotes, elle est physiquement séparée de la traduction qui se déroule dans le cytoplasme, même si quelques études ont montré l'existence d'une traduction nucléaire (abordé en § I.2), alors que chez les procaryotes les deux mécanismes sont couplés et se déroulent dans un compartiment unique.

I.1.2 Les facteurs de transcription

Lorsqu'on évoque la transcription, il faut tout d'abord parler de facteurs transcriptionnels. Qu'ils soient activateurs ou répresseurs, les facteurs transcriptionnels reconnaissent de façon séquence-spécifique les régions d'ADN en amont du gène dans sa région promotrice. Tous les gènes codant des protéines requièrent probablement la fixation d'un ou plusieurs facteurs de transcription. Leur indispensabilité est due aux nucléosomes qui suppriment tout niveau basal de transcription, même minime (Sekinger et al., 2005).

D'un point de vue structural, les facteurs de transcription possèdent des motifs de liaison à l'ADN bien spécifiques, permettant de les classer en 3 grandes catégories, de la plus répandue à la moins répandue : les doigts de zinc, les glissières et les hélice-

coude-hélice (Krishna, 2003; Luscombe et al., 2000) (**Figure 1**). Chaque catégorie contient des sous-types qui sont décrits dans le **Tableau 1** ci-dessous.

Type de domaine à liaison à l'ADN	Sous-type	Particularité	Exemples de facteurs de transcription	Références
Doigts de zinc	Doigts de zinc /C2H2	Ubiquitaire - monomère - stabilisé par Zn - Cys/His - coeur Phe/Leu	Adr1, Mig1	Ciriacy, 1975 ; Lundin, 1994
	Articulation zinc /C6	Spécifique aux fungi -2 Zn liés à 6 Cys - Homo ou hétérodimère	Gal4, Leu3	Ma, 1987 ; Friden, 1987
	GATA/C4	Ubiquitaire - Découvert pour le métabolisme azoté	Gln3, Gat1	Mitchell, 1984 ; Coffman, 1996
Glissière	Glissière à leucine/Bzip	Hétérodimère en général ou homodimère. Résidus Leu	Gcn4, Yap1	Hope, 1987 ; Fernandes, 1997
	bHLH	Hétérodimère en général Hélice-boucle-région basique	Ino2, Pho4	Loewy, 1984 ; Berben, 1988
Hélice-coude-hélice	-	Homo ou hétérodimère	Mata1, Mata2	Bender, 1987 ; Porter, 1986
	«Forkhead»	3 hélices et 2 larges boucles	Mcm1, Hsf1	Lydall, 1991 ; Wiederrecht, 1988

Tableau 1. Classification des différents types de facteurs de transcription de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, leurs particularités et les exemples de facteurs appartenant à ces types.

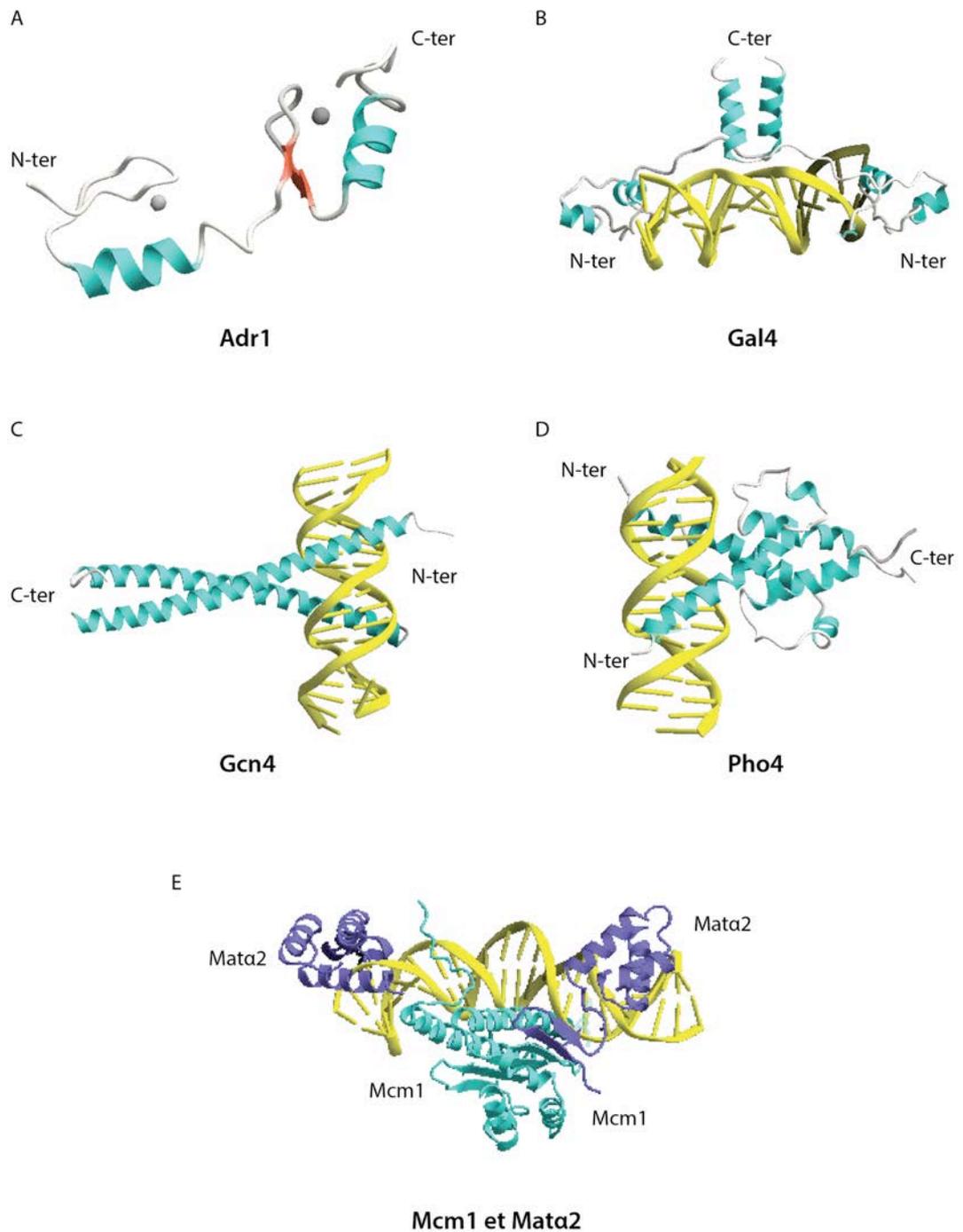


Figure 1. Structures cristallographiques de facteurs de transcription. **A** : Adr1 (Zn_2/Cys_2). **B** : Homodimère de Gal4 (Zn_2/Cys_6) en interaction avec l'ADN. **C** : Homodimère de Gcn4 (bZip) en interaction avec l'ADN. **D** : Homodimère de Pho4 (bHLH) en interaction avec l'ADN. **E** : Hétérotétramère de Mcm1 (Hélice-coude-hélice « forkhead ») et Mata2 (Hélice-coude-hélice), en interaction avec l'ADN. En turquoise : hélices α , en bleu ou violet: un des monomère lorsqu'il s'agit d'un hétérodimère ; en rouge : brin β ; en jaune : ADN ; sphère grise : Atome de zinc. N-ter : partie N-terminale de la protéine. C-ter : partie C-terminale de la protéine. Fichiers .pdb téléchargés sur www.rcsb.org/pdb/

De par leur capacité à lier l'ADN, les facteurs de transcription dictent l'expression des gènes. Généralement, les facteurs de transcription possèdent des signaux de

localisation nucléaire (NLS) leur permettant d'être importés dans le noyau, compartiment de la transcription des gènes nucléaires (Hahn et al., 2008).

Les facteurs activant la transcription, nommés « activateurs », sont constitués de deux sous-unités : un domaine d'activation et un domaine de liaison à l'ADN. Ces deux sous-unités sont présentes dans une même séquence peptidique ou sous forme d'hétérodimère. Les domaines d'activation et de liaison à l'ADN possèdent généralement une grande modularité : ils peuvent agir seuls, avec leur sous-unité privilégiée, ou encore s'inter-changer avec d'autres sous-unités variées. Les activateurs reconnaissent leur séquence cible, recrutent les coactivateurs et redirigent le gène et les coactivateurs à la périphérie nucléaire, où se trouve la machinerie transcriptionnelle (Ptashne, 1988).

Il existe des facteurs transcriptionnels nommés « répresseurs transcriptionnels » qui au contraire des activateurs, bloquent la transcription. Pour ce faire, les répresseurs transcriptionnels recrutent des complexes qui maintiennent la chromatine dans un état dit « répressif » c'est-à-dire condensé et qui par conséquent ne permet pas la liaison d'un activateur et le recrutement des coactivateurs (Kadosh and Struhl, 1998).

La régulation de l'activité des facteurs transcriptionnels peut se faire par la modulation du niveau d'expression des gènes qui les codent, comme c'est le cas de *GCN4*, codant le facteur transcriptionnel homonyme (Hinnebusch, 2005). La transcription de son ARNm est dé-réprimée en conditions de carences en acides aminés (aa), et ainsi, le facteur de transcription Gcn4 induit la transcription des gènes codants les protéines nécessaires aux voies de biosynthèse des aa. La régulation peut également être effectuée par la modulation de l'import nucléaire du facteur de transcription, en altérant ou non l'interaction de ces facteurs avec les karyophérines (Komeili and O'Shea, 2000), protéines permettant l'import nucléaire. Par exemple, en condition de carence en phosphate la forme déphosphorylée du facteur de transcription Pho4 est importée dans le noyau par Kap121, où Pho4 active la transcription de gènes liés au métabolisme du phosphate (Komeili and O'Shea, 1999). Au contraire, la forme phosphorylée de Pho4 ne peut plus interagir avec son facteur d'import, et ainsi n'est pas importée dans le noyau et ne joue plus son rôle d'activateur transcriptionnel.

I.1.3 Les coactivateurs

Charnières de la régulation transcriptionnelle, les coactivateurs sont les principales cibles des activateurs transcriptionnels. Ces complexes protéiques d'une taille de plusieurs MDa permettent l'augmentation du niveau de transcription par leur liaison directe à l'ARN pol II ou par leur activité de modification de la chromatine. Chez la levure, ces coactivateurs se nomment Médiator (complexe de 25 sous-unités)(Biddick and Young, 2005) ; SAGA (complexe de 20 sous-unités)(Baker and Grant, 2007) ; TFIID (complexe de 14 sous-unités) (Cler et al., 2009).

I.1.4 L'ARN polymérase II

Il existe quatre ARN polymérases (ARN pol) chez les levures, chacune ayant une fonction spécifique. Tandis que l'ARN pol I transcrit les ARN ribosomiques (ARNr), excepté l'ARNr 5S, et que l'ARN pol III transcrit les ARN de transfert (ARNt), l'ARNr 5S, l'ARNsn U6, les ARNsno possédant un promoteur interne et l'ARN RPR1 de la Rnase P, les gènes codant des protéines sont transcrits par l'ARN pol II qui transcrit également les ARNsn (sauf U6), et les ARNsno possédant un promoteur indépendant (Dieci et al., 2009; Hahn and Young, 2011; Paule and White, 2000; Willis, 1993). L'ARN pol IV est totalement dédiée à la transcription des gènes mitochondriaux.

L'ARN pol II contient 12 sous-unités (Rpb) numérotées de 1 à 12 (Rpb1 à Rpb12) dans l'ordre décroissant de leur taille (**Figure 2**).

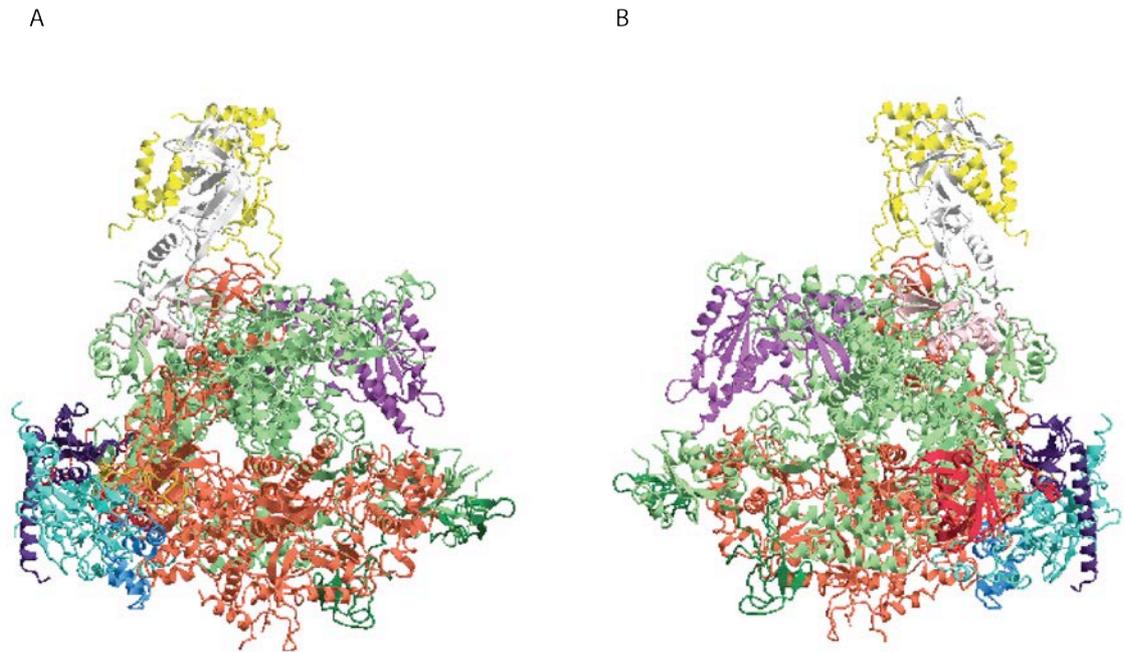


Figure 2. Structure cristallographique de l'ARN pol II de *S. cerevisiae*, à une résolution de 3,8 Å. Vue des 2 faces de l'ARN pol II (**A** puis rotation à 180° pour **B**). En vert clair : Rpb1 ; en orange foncé : Rpb2 ; en turquoise : Rpb3 ; en jaune : Rpb4 ; en violet : Rpb5 ; en rose clair : Rpb6 ; en gris clair : Rpb7 ; en rouge : Rpb8 ; en vert foncé : Rpb9 ; en bleu : Rpb10 ; en violet foncé : Rpb11 et en doré orangé : Rpb12.

Elles sont toutes essentielles, excepté Rpb4 et Rpb9 (Li and Smerdon, 2002). Les sous-unités les plus grandes, Rpb1 et Rpb2, correspondent aux sous-unités β et β' bactériennes. Rpb3 et Rpb11 sont les homologues des sous-unités bactériennes α , dimériques. Enfin, Rpb6 correspond à la sous-unité bactérienne ω , indispensable pour la stabilité de l'ARN pol bactérienne.

Lors de l'initiation de la transcription, l'ARN pol II est recrutée par les facteurs de transcription. Elle interagit également avec les coactivateurs qui modulent la transcription.

I.2 La traduction eucaryotique

I.2.1 Généralités sur la traduction cytoplasmique

La traduction est le processus indispensable à la biosynthèse des protéines. Celle-ci se compose de plusieurs étapes qui aboutissent au décodage, dicté par le code génétique (**Figure 3**), des triplets de nucléotides appelés codons, contenus dans l'ARNm, en leurs aa correspondants.

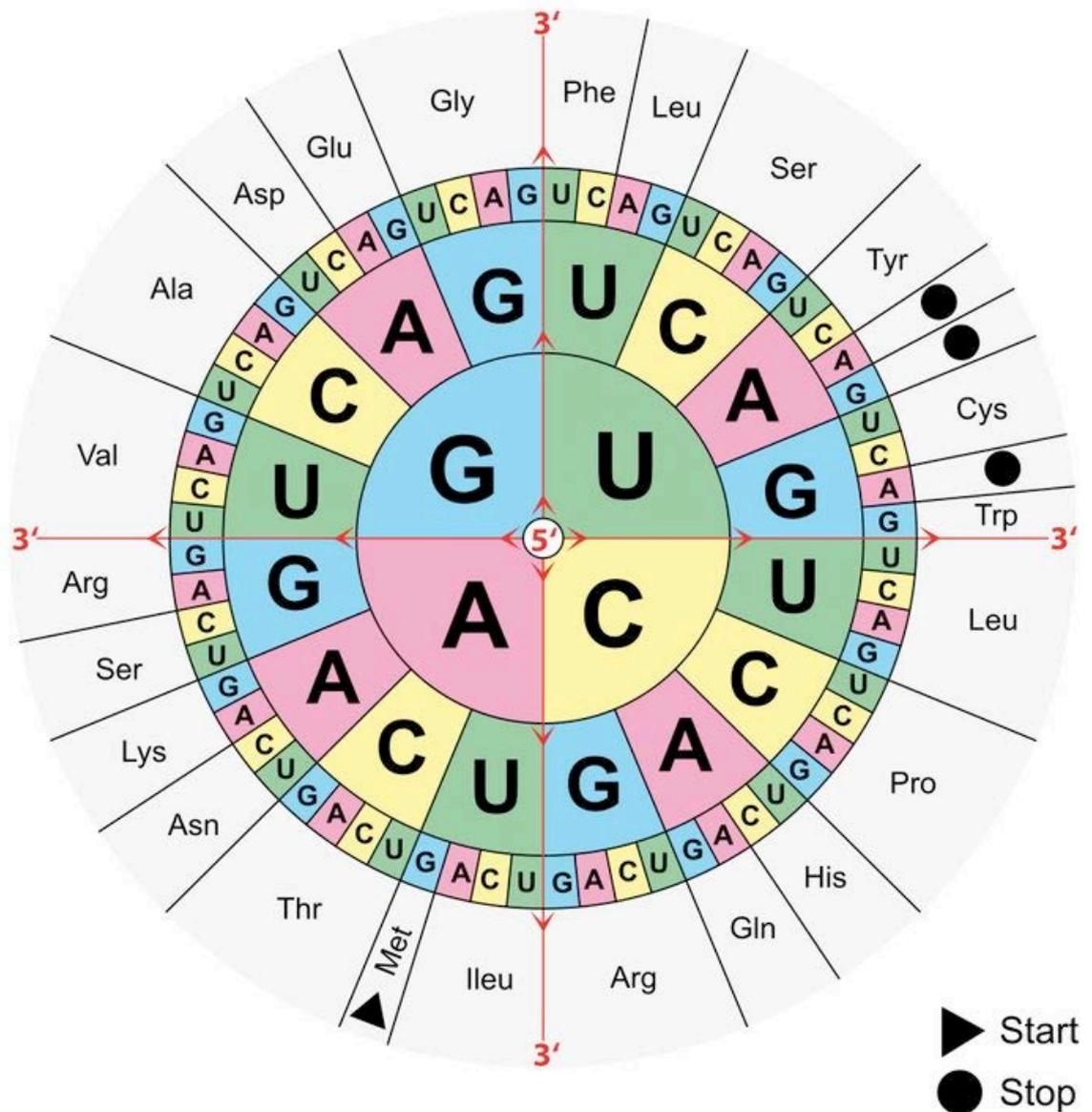


Figure 3. Le code génétique standard. Le code à 3 lettres est utilisé pour l'abréviation des aa.

Il existe 64 combinaisons différentes de codons, parmi lesquelles 61 permettent l'incorporation d'un aa et 3 provoquent l'arrêt de la traduction (codons stop). Cependant, chez la levure, l'ensemble des codons ne code que pour 20 aa, qui sont décodés par des codons différents : on parle alors de codons synonymes. Il convient de noter que dans certains organismes, le codon UGA code la sélénocystéine (Cone et al., 1976; Gonzalez-Flores et al., 2013), 21^{ème} aa protéinogénique identifié chez les procaryotes et dans certaines branches des eucaryotes, et le codon UAG code la pyrrolysine (Pyl), 22^{ème} aa protéinogénique identifié chez les archées méthanogènes et certaines bactéries, *Desulfitobactérium hafniense* et *Acetohalobium arabicum* (Hao et

al., 2002; Herring et al., 2007; Prat et al., 2012; Srinivasan et al., 2002). Le décodage des codons de l'ARNm s'effectue au sein du ribosome, plateforme ribonucléoprotéique composée de deux sous-unités, la 40S et la 60S, de taille et de fonction différente.

La traduction se décompose en trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation, et la terminaison. La première étape est généralement considérée comme l'étape limitante et également la plus documentée (Dever et al., 2016). Lors de l'initiation CAP-dépendante, la sous-unité 40S, dont le site A est occupé par l'ARNt méthionyl initiateur (Met-ARNt_i^{Met}) et le facteur d'initiation de la traduction eIF2 lié au GTP, se fixe sur le complexe de la coiffe en 5' de l'ARNm (Kozak, 1999). Elle scanne ensuite l'extrémité 5' non traduite jusqu'à rencontrer le premier codon AUG, reconnu par appariement de bases avec le Met-ARNt_i^{Met} ainsi qu'avec les facteurs d'initiation. La sous-unité 40S alors en pause recrute la sous-unité 60S, ce qui aboutit à la formation du complexe 80S. Le Met-ARNt_i^{Met} se retrouve alors dans le site P et les facteurs d'initiations sont relargués, l'élongation peut alors débuter. Les aa-ARNt sont acheminés dans le site A accepteur du ribosome par le facteur d'élongation eEF1A-GTP. La reconnaissance codon-anticodon provoque l'hydrolyse du GTP d'eEF1A et ainsi, le transfert de l'aa de l'ARNt. eEF1A-GDP quitte le ribosome et est recyclé sous forme eEF1A-GTP par le facteur eEF1B. Il y a formation d'une liaison peptidique entre le COOH du peptide naissant et le NH₂ de l'aa porté par l'ARNt présent dans le site A. L'ARNt déchargé contenu dans le site P et le peptidyl-ARNt contenu dans le site A sont alors respectivement transloqués dans le site E (exit) et le site P. La translocation est permise par l'hydrolyse du facteur de translocation eEF2-GTP qui se fixe dans le site A, puis eEF2-GDP est relargué du site A. Le site A vaquant est alors prêt à lier un nouveau complexe aa-ARNt-eEF1A-GTP.

L'étape de terminaison est catalysée par le complexe eRF1-eRF3-GTP. De par sa structure globale ressemblant à un ARNt, eRF1 (Song et al., 2000) reconnaît de manière spécifique les codons stop (UAA, UAG, UGA) et est également impliqué dans l'hydrolyse de la liaison peptidyl-ARNt, ce qui permet de relâcher le polypeptide synthétisé (Jackson et al., 2012). eRF3 accélère la libération du peptide néosynthétisé, et améliore ainsi l'efficacité de la terminaison (Alkalaeva et al., 2006).

I.2.2 Existence d'une traduction nucléaire

On explique généralement que la traduction a lieu dans le cytoplasme mais cependant, quelques études font état de l'existence d'une traduction nucléaire. Une première étude de 1954 dans laquelle les auteurs indiquaient une incorporation rapide d'aa radioactifs dans des protéines nucléaires de cellules de thymus (Allfrey, 1954), puis une seconde étude montrant l'isolation des polyribosomes à partir de noyaux purifiés de cellules HeLa (Goidl et al., 1975), ont suscité un fort intérêt pour la question. Une étude datant du début des années 2000 a même permis la visualisation de la traduction de manière directe dans des noyaux isolés de cellules de mammifères, à l'aide d'ARNt^{Lys} biotinylés (Iborra et al., 2001). Malgré plusieurs études amenant à la conclusion de l'existence d'une traduction nucléaire, des doutes subsistent en raison de la crainte de contaminations cytoplasmiques (NATHANSON, 2003). A ce jour, le phénomène reste énigmatique, même s'il semble que près de 10% des protéines pourraient être traduites dans le noyau et plus précisément, dans le nucléole (McLeod et al., 2014).

I.2.3 Les caractéristiques des aminoacyl-ARNt synthétases

Les ARNt sont aminoacylés par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS), formant ainsi un aa-ARNt servant au décodage des codons. Les aaRS sont classées en 2 catégories, les aaRS de classe I et celles de classe II, selon l'architecture de leur site catalytique, leur structure cristallographique, les propriétés chimiques des aa dont elles sont spécifiques, le côté du bras accepteur de l'ARNt qu'elles reconnaissent (petit ou grand sillon) qui détermine l'OH (2' ou 3') qui sera estérifié par l'aa lors de l'aminacylation de l'ARNt (Eriani et al, 1990, Cusack et al, 1990) (**Tableau 2**). Alors que les aaRS de classe I tendent à être monomériques, celles de classe II sont exclusivement dimériques ou tétramériques.

	Classe I	Classe II
Structure du domaine catalytique	Domaine de Rossmann (5 brins β parallèles séparés par hélices α)	7 brins β antiparallèles entourés d'hélices α
Motifs conservés du site actif	HIGH, KMSKS	G ϕ x ϕ x ϕ xP ϕ ϕ FR ϕ EH/RxxxFxxxD/E G ϕ G ϕ G ϕ D/ER ϕ ϕ ϕ ϕ
Résidu accepteur	2'OH	3'OH
Sous-classes et assemblages	<p>Ia Methionyl-ARNt synthétase $\alpha 2$, α Isoleucyl-ARNt synthétase α Leucyl-ARNt synthétase α Cystéinyl-ARNt synthétase α Valyl-ARNt synthétase α Arginyl-ARNt synthétase α</p> <p>Ib Lysyl-ARNt synthétase α Glutamyl-ARNt synthétase α Glutaminyl-ARNt synthétase α</p> <p>Ic Tyrosyl-ARNt synthétase $\alpha 2$ Tryptophanyl-ARNt synthétase $\alpha 2$</p>	<p>IIa Histidyl-ARNt synthétase $\alpha 2$ Prolyl-ARNt synthétase $\alpha 2$ Séryl-ARNt synthétase $\alpha 2$ Thréonyl-ARNt synthétase $\alpha 2$, α Alanyl-ARNt synthétase $\alpha 2$, α, $\alpha 2\beta 2$ Glycyl-ARNt synthétase $\alpha 2$</p> <p>IIb Lysyl-ARNt synthétase $\alpha 2$ Aspartyl-ARNt synthétase $\alpha 2$ Asparaginylyl-ARNt synthétase $\alpha 2$</p> <p>IIc Phénylalanyl-ARNt synthétase $\alpha 2\beta 2$, α Pyrolysyl-ARNt synthétase $\alpha 2$ O-phosphoryl-ARNt synthétase $\alpha 4$</p>

Tableau 2. Les deux classes d'aminocyl-ARNt synthétases et leurs caractéristiques. Les caractéristiques d'oligomérisation sont valables pour les procaryotes et les eucaryotes. S'il y a des différences d'oligomérisation, l'ordre est le suivant : procaryote, eucaryotes. S'il y a des différences au sein des procaryotes, l'ordre est le suivant : bactéries, archées (cas de l'AlaRS).

Certains aa-ARNt sont mésacylés, c'est-à-dire aminoacylés avec un aa non-homologue, ce qui conduit à l'incorporation d'un aa différent de celui codé par le codon complémentaire de l'anticodon de l'ARNt. L'édition des aa-ARNt mésacylés permet, normalement, d'éviter que ce phénomène se produise.

Certaines aaRS comme la LeuRS d'*E. coli* sont capables d'éditer des aa-ARNt mésacylés. Il existe deux types de mécanismes d'édition. Le premier, nommé édition pré-transfert, permet de cliver l'aa~AMP avant que l'aa mésactivé soit transféré sur l'ARNt. Le second est l'édition post-transfert, qui édite l'aa mésactivé après son transfert sur l'ARNt par hydrolyse de la liaison ester. Ces mécanismes peuvent avoir lieu en *cis* grâce aux domaines d'édition dont sont dotées certaines aaRS, comme le domaine CP1 de la LeuRS, ou en *trans* par des domaines d'édition indépendants (Jakubowski, 2012; Martinis et Boniecki, 2010 ; An et al, 2004).

Malgré des mécanismes d'éditions efficaces, il arrive qu'un aa-ARNt mésacylé soit tout de même incorporé lors de la synthèse protéique. Ces erreurs de traductions peuvent potentiellement conduire à des dysfonctionnements. Cependant, il a été remarqué que chez la bactérie, la levure, et l'Humain, la mésacylation de l'ARNt^{Met} se produit en condition de stress oxydatif, suggérant un rôle bénéfique de cette aminoacylation incorrecte dans la réponse à ce stress (Wiltrout, 2012, Jones, 2011, Lee, 2014). Ce phénomène est détaillé dans la partie « fonctions additionnelles des aaRS » (§ V.I).

I.2.4 Les particularités de la traduction mitochondriale

Les particularités du décodage du génome mitochondrial font l'objet d'un article de revue présenté à la fin de l'introduction (§ IX p. 89).

I.2.4.1 Le génome mitochondrial, élément essentiel de la traduction mitochondriale

La mitochondrie possède son propre génome minimal, codant pour quelques protéines, des ARNr et certain des ARNt nécessaires à la traduction mitochondriale. Chez la levure *S. cerevisiae*, le génome mitochondrial code les ARNr 15S et 21S, 7 protéines de la chaîne respiratoire, Cox1, -2 et -3, appartenant à la cytochrome *c* oxydase, Cytb, le cytochrome *b*, Atp6, -8 et -9, sous-unités du rotor F₀ de l'ATP synthase et une protéine ribosomique, Var1, appartenant à la petite sous-unité du mitoribosome (Foury et al, 1998). Le reste des protéines nécessaires au décodage de ce génome ou encore à la biogénèse de la chaîne respiratoire, est codé par génome nucléaire traduit dans le cytoplasme et est importé dans la mitochondrie, soit environ 750 protéines chez la levure (Sickmann et al, 2003). Bien qu'en théorie, le génome mitochondrial code pour tous les ARNt nécessaires à la traduction mitochondriale, certains ARNt codés par le génome nucléaires sont importés dans la mitochondrie : un ARNt^{Lys}(CUU) aussi appelé tRK1, et deux ARNt^{Gln} (Rinehart et al, 2005, Tarassov et al, 1995) Le cas de l'ARNt^{Lys}(CUU) est particulier puisque celui-ci doit obligatoirement être aminoacylé pour être importé par la LysRS mitochondriale et modifié post-transcriptionnellement pour être fonctionnel en conditions de stress thermique (Kamenski et al, 2007).

I.2.4.2 Les aaRS mitochondriales

Aucune aaRS mitochondriale n'est codée par le génome mitochondrial. Toutes sont codées par le génome nucléaire, et importées dans la mitochondrie. Chez la levure plusieurs situations existent : i) Les TrpRS (Myers et al, 1985), ThrRS (Pape et al, 1985), PheRS (Koerner et al, 1987), LeuRS (Herbert et al, 1988), MetRS (Tzagoloff et al, 1989), LysRS (Gatti et al, 1991), IleRS, GluRS, ArgRS (Tzagoloff et al, 1995), TyrRS (Chow et al, 1993) et AspRS (Landrieu et al, 1997) mitochondriales sont codées par un gène distinct de celui qui code l'aaRS cytosolique. Les SerRS, ProRS, AsnRS et CysRS mitochondriales ont uniquement été montrées comme étant des protéines mitochondriales putatives puisqu'aucun travail n'a prouvé leur localisation. ii) Dans d'autres cas, il existe un seul gène codant à la fois l'aaRS cytoplasmique et l'aaRS mitochondriale, en raison de l'existence d'une séquence décodée alternativement en un signal d'adressage mitochondrial. C'est le cas du gène *GRS1*, dont l'ARNm contient un site d'initiation de la traduction alternatif, permettant ainsi la traduction de la GlyRS cytoplasmique ou, lors de l'initiation de la traduction alternative, celle de la GlyRS mitochondriale (Turner et al, 2000). iii) Il existe des cas pour lesquels ce site d'initiation de la traduction alternatif est atypique. L'exemple de l'AlaRS est tout à fait remarquable puisque le gène *ALA1* permet la production de deux isoformes, une courte pour l'AlaRS cytoplasmique et une longue pour l'AlaRS mitochondriale, dont la traduction est initiée à partir d'un codon autre qu'AUG, le codon ACG (Tang et al, 2004). En revanche, le signal de localisation mitochondrial de la forme longue semble composé du peptide N-terminal additionnel de cette forme de l'AlaRS et des 18 résidus suivants également présents dans la forme courte (Huang et al, 2006) iv) Un unique gène peut également produire deux ARNm différents. C'est le cas du gène *VAS1*, permettant la production de deux ARNm de taille différente, le plus court produisant la ValRS cytoplasmique, la plus longue la ValRS mitochondriale (Chatton et al, 1988). Le cas est le même pour la HisRS mitochondriale, codée par le gène nucléaire *HIS1* (Natsoulis et al, 1986). (v) Enfin, en toute logique, la mitochondrie de levure devrait posséder 20 aaRS mitochondriales codées par des gènes nucléaires. Or, ce n'est pas le cas, l'exemple le plus étudié étant celui de l'absence de GlnRS mitochondriale. Une étude a montré que la GlnRS cytoplasmique était importée dans la mitochondrie afin d'aminoacyler deux isoaccepteurs d'ARNt^{Gln} codés par le génome mitochondrial et importé dans la mitochondrie (Rinehart et al, 2005). Or, ce constat n'était pas en cohérence avec l'existence d'une amidotransférase ARNt-

dépendante (AdT), essentielle à la respiration. En revanche, une autre étude a montré que la GluRS cytoplasmique contient une séquence d'adressage mitochondrial, conférant à la GluRS une double localisation cytoplasmique et mitochondriale (Frechin et al, 2009). Associée à la protéine d'ancrage Arc1 lors de la fermentation, une partie de la GluRS n'est plus liée à Arc1 et est importée dans la mitochondrie en respiration. Dans ce compartiment, la GluRS cytoplasmique est néanmoins discriminante puisqu'elle n'aminoacyle que l'ARNt^{Gln} mitochondrial. Le Glu-ARNt^{Gln} mitochondrial formé par la GluRS cytoplasmique est ensuite transamidé en Gln-ARNt^{Gln} par l'AdT GatFAB mitochondriale. Ce phénomène est notamment rendu possible par la dynamique du complexe multisynthétasique auquel la GluRS appartient, détaillé dans la partie « Diversité et composition des complexes multisynthétasiques à travers les organismes » (§ IV).

1.2.4.3 Le ribosome mitochondrial ou mitoribosome

Le mitoribosome de levure a fortement divergé de ses homologues bactériens et cytoplasmiques, puisqu'il se compose d'une grande sous-unité 54S, formée de 46 protéines dont 13 étant uniques, et d'une petite sous-unité 37S, formée de 36 protéines (Amunts et al, 2014, Greber et al, 2016). Dans tous les ribosomes, à la surface de la grande sous-unité, il existe une structure nommée « protubérance centrale », permettant le contact de la grande sous-unité avec la petite sous-unité du ribosome ainsi qu'avec l'ARNt (Dinman et al, 2005). Elle est formée par l'ARNr 5S dans les ribosomes bactériens, archéens et cytosoliques (Yusupov et al, 2001, Dunkle et al, 2011 Ben-Shem et al, 2011). Le ribosome mitochondrial possède également cette protubérance centrale (**Figure 2**) mais cependant, il n'existe pas de gène d'ARNr 5S dans les génomes mitochondriaux humains ou de levures. Malgré la démonstration biochimique de l'import mitochondrial de l'ARNr 5S dans les cellules de mammifères (Smirnov et al, 2011, Magalhaes et al, 1998), la structure par Cryo-EM du mitoribosome de mammifère n'a pas révélé de densité correspondant à cet ARNr. L'ARNr 5S serait remplacé soit par l'ARNt^{Phe} mitochondrial dans la structure cristallographique obtenue par cryo-EM (**cryogenic electron microscopy**) du mitoribosome de sanglier, soit par l'ARNt^{Val} mitochondrial dans la structure obtenue par cryo-EM du mitoribosome provenant de culture de cellules humaines (**Figure 4**) (Greber et al, 2014 ; Brown et al, 2014).

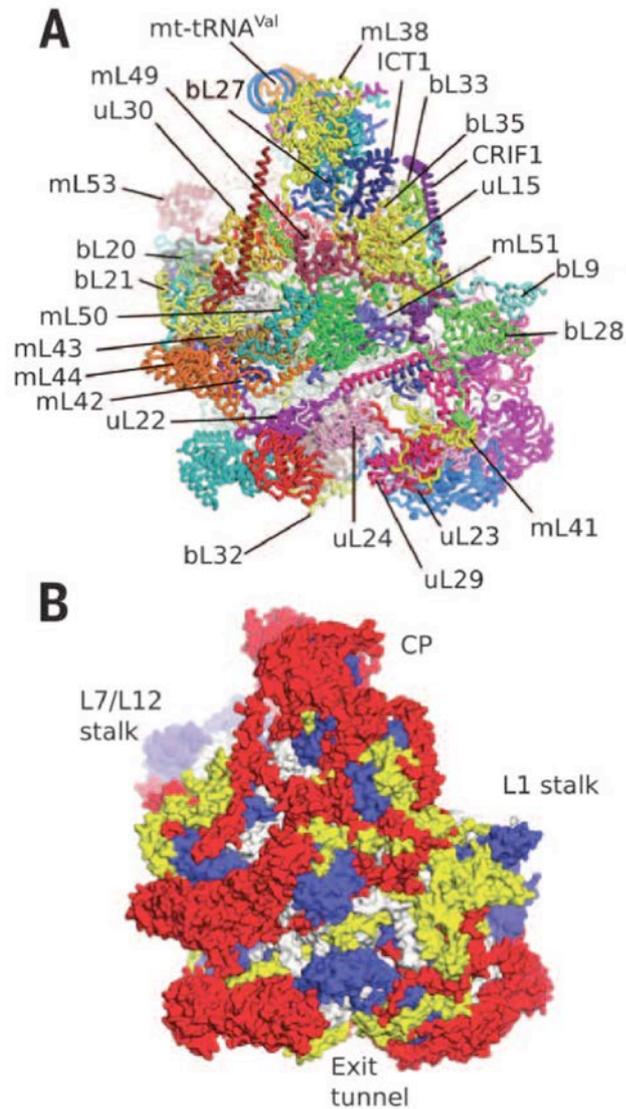


Figure 4. Structure cristallographique de la grande sous-unité du ribosome mitochondrial d'*Homo sapiens*, à une résolution de 3.4 Å, face exposant le CP (protubérance centrale) (figure d'après Brown, 2014). **A.** Localisation des protéines ainsi que de l'ARNt^{Val} remplaçant l'ARNr 5S. **B.** En bleu : régions communes au ribosome bactérien. En jaune : extension des protéines homologues. En rouge : régions spécifiques du ribosome mitochondrial. En gris : ARNr ; CP : Protubérance centrale.

Selon la structure cristallographique des mitoribosomes de *S. cerevisiae*, l'ARNr 5S est également absent de cette protubérance centrale, mais ne semble pas non plus remplacé par un quelconque ARNt (Amunts et al, 2014).

Le mitoribosome de *S. cerevisiae* ayant pour partenaire une protéine, MbaI, permettant l'ancrage membranaire, serait donc associé à membrane interne de la mitochondrie (Ott et al, 2006). Son association à cette membrane permettrait, comme pour le mitoribosome humain, un couplage de la traduction des protéines avec leur insertion membranaire (Greber et al, 2014 ; Ott et al, 2010), puisque toutes les protéines

codées par le génome mitochondrial, à l'exception de Var1, sont des sous-unités de complexes respiratoires ancrés dans la membrane interne mitochondriale.

II Biogénèse des ARNt

Les aa-ARNt permettent le décodage génétique de par le lien qu'ils font entre la transcription des gènes et leur traduction en protéines. La taille des ARNt varie entre 73 et 90 nucléotides. Ils sont composés de 5 régions structurées qui adoptent une structure secondaire globale dite en « feuille de trèfle » se repliant en une structure tridimensionnelle en « L renversé » (**Figure 5**). Chez *S. cerevisiae*, on ne compte pas moins de 286 gènes d'ARNt dont la transcription génère 64 ARNt isoaccepteurs.

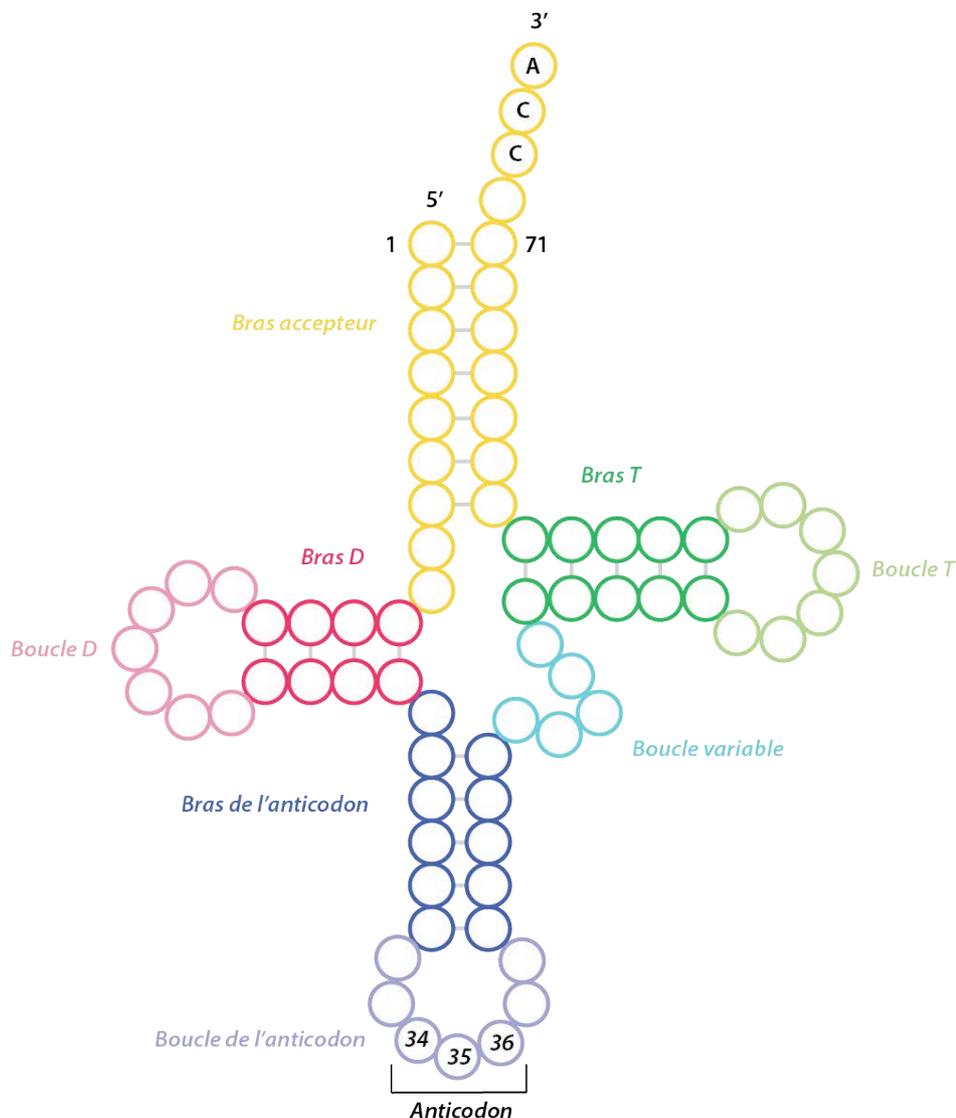


Figure 5 Domaines des ARNt.

II.1 Maturation des extrémités 3' et 5' des ARNt suite à leur transcription

A la suite de leur transcription par l'ARN polymérase III, les transcrits primaires d'ARNt possèdent tous environ 12 nucléotides supplémentaires en 5' et 3' qui seront éliminés lors de la maturation (O'Connor et al, 1991). En 5', les nucléotides additionnels sont clivés par la RNase P, une endoribonucléase. Chez la levure, la RNase P nucléaire est constituée de neuf protéines différentes et d'un ARN essentiel RPR1, tandis que la RNase P mitochondriale ne contient qu'une seule protéine, codée par le génome nucléaire, et un ARN, codé par le génome mitochondrial (*RPM1*), qui diffère par sa longueur et sa structure de RPR1 (revue par Esakova et Krasilnikov, 2010 ; Dang et al, 1993; Martin et al, 1997). La maturation de l'extrémité 5' est presque toujours réalisée exclusivement par une RNase P à l'exception de l'ARNt^{His} qui en plus de sa maturation par la RNase P nécessite la réinsertion en 5' d'un nucléotide supplémentaire, G₋₁, qui s'appariera à la base discriminatrice (C73) et indispensable à son histidinylation (Gu, 2003, Gu, 2005).

Chez les levures, la maturation de l'extrémité 3' implique plusieurs endo- et exonucléases (Phizicky et Hopper, 2010).

Tous les ARNt matures contiennent une séquence « CCA » en 3', indispensable à l'aminacylation. Chez les bactéries, la séquence CCA fait partie du gène, mais leur génome contient néanmoins un gène codant pour l'enzyme ajoutant le CCA, une ARNt nucléotidyl-transférase ou CCCase, qui répare le 3' des ARNt si le CCA est dégradé (Zhu et Deutscher, 1987). Chez la levure et les vertébrés, le CCA n'est pas codé par le gène de l'ARNt et est systématiquement ajouté post-transcriptionnellement par la CCCase. Chez la levure, il n'existe qu'un seul gène *CCA1*, produisant plusieurs isoformes d'ARNt nucléotidyl-transférases, Cca I, Cca II et Cca III, respectivement distribuées dans la mitochondrie, le cytoplasme et le noyau (Aebi et al, 1990 ; Martin et al, 1994).

II.2 Les introns et l'épissage

Les introns contenus dans les ARNt sont pour la plupart situés directement en 3' de l'anticodon. La proportion d'introns varie fortement selon les espèces. Chez *S. cerevisiae*, environ 20% des gènes d'ARNt codés par le génome nucléaire en

contiennent. Les bactéries n'ont que très peu d'introns dans leurs gènes d'ARNt, alors que certaines archées en possèdent jusqu'à 50%. Finalement, seuls 5% des gènes d'ARNt Humain possèdent des introns. (<http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/>)

Les ARNt de *S. cerevisiae* contenant des introns sont les suivants : l'ARNt^{Pro}, l'ARNt^{Ser}, l'ARNt^{Phe}, l'ARNt^{Lys}, l'ARNt^{Leu}, l'ARNt^{Ile}, l'ARNt^{Tyr}, l'ARNt^{Trp}. Leur épissage se déroule en 3 grandes étapes. La première consiste en la coupure de l'intron par le complexe Sen d'ARNt endonucléases (Knapp et al, 1978). Chez la levure et les vertébrés, celui-ci se présente sous la forme d'un hétérotétramère dont deux des protéines le formant sont conservées des archées aux Humains (Trotta et al, 1997). Lors de la seconde étape, les deux extrémités 5' et 3' précédemment libérées après coupure sont reliées par l'ARNt ligase Trl1 (Phizicky et al, 1986). La troisième étape consiste en le retrait du 2' phosphate généré lors de l'étape précédente et est catalysé par une 2' phosphotransférase (Spinelli et al, 1997).

Entre organismes, des différences s'observent également au niveau du lieu de l'épissage. Tandis que chez l'Humain, il s'effectue dans le noyau (Melton et al, 1980 ; Lund et al, 1998), chez la levure, la localisation cytoplasmique des enzymes participant à ce processus comme le complexe Sen d'ARNt endonucléases indique que l'épissage s'effectue dans ce compartiment, et plus précisément à la surface des mitochondries (Yoshihisa et al, 2003).

II.3 Les modifications post-transcriptionnelles

Il existe environ 85 modifications post-transcriptionnelles différentes dans les ARNt, toutes espèces confondues, dont 25 dans les ARNt de levure (El Yacoubi et al, 2012, Phizicky et al, 2010). Pendant plusieurs années, le rôle de ces modifications est resté énigmatique, puis leur étude par des expériences de génétique classique, de biochimie, et de bioinformatique, a permis d'identifier la quasi-totalité des protéines dédiées aux modifications post-transcriptionnelles des ARNt (Phillips et Kjellin-Stråby, 1967 ; Laten et al, 1978, Martzen et al, 1999, Winzeler et al, 1999).

Les positions de l'ARNt les plus fréquemment modifiées sont la première (position 34) et dernière base (position 36) de l'anticodon. Ces modifications permettent de moduler la reconnaissance codon-anticodon en augmentant ou

restreignant le nombre de codons qui peuvent être reconnus par l'anticodon de l'ARNt. La déamination de l'A₃₄ en inosine est, par exemple, un cas très étudié (Gerber, 1999).

Malgré une forte conservation des modifications à travers l'échelle évolutive, seule une minorité des gènes codant les enzymes de modifications est essentielle chez la levure. C'est le cas des gènes *TRM6/GCD10* et *TRM61/GCD14*, dont les produits catalysent la méthylation de A₅₈ de l'ARNt^{iMet}, ainsi que les gènes *TAD2* et *TAD3*, dont les produits sont nécessaires à la conversion de l'A₃₄ en inosine 34 (I₃₄) de l'ARNt^{Pro}(IGG), ARNt^{Ala}(ICG), ARNt^{Ile}(IAU), ARNt^{Ser}(IGA), ARNt^{Thr}(IGU) et de l'ARNt^{Val}(IAC) (Anderson et al, 1998, Gerber et Keller, 1999, <http://modomics.genesilico.pl/>).

III Trafic nucléocytoplasmique des macromolécules

III.1 Le transport nucléo-cytoplasmique des protéines

III.1.1 Le pore nucléaire

Dans les cellules eucaryotiques, le matériel génétique est isolé des agressions extérieures par l'enveloppe nucléaire. Le pore nucléaire permet aux macromolécules de traverser cette enveloppe nucléaire. Le pore nucléaire est une structure macromoléculaire conservée évolutivement chez les eucaryotes, ayant une masse moléculaire allant de 60 MDa à 125 MDa pour la levure et l'Humain respectivement (Rout et al, 2000 ; Cronshaw et al, 2002 ; DeGrasse et al, 2009). Sa structure tridimensionnelle a été obtenue par microscopie électronique, révélant une taille de 100 nm de diamètre pour celui de la levure, et 130 nm pour celui des vertébrés (Yang et al, 1998 ; Aitchison et Rout, 2012 pour revue). Environ trente protéines différentes de la classe des nucléoporines le composent, chacune présente 8 fois ou par multiple de 8, pour former une structure orthogonale. De par sa taille, le pore nucléaire permet la diffusion de métabolites et de petites protéines, et même si un transport actif est nécessaire pour les plus grosses protéines, il ne nécessite pas leur dépliement, contrairement aux protéines importées dans la mitochondrie (Wilcox et al, 2005).

Le pore nucléaire est composé de plusieurs parties. L'anneau membranaire est la structure permettant au pore nucléaire d'être encre dans l'enveloppe nucléaire, et se compose de 3 protéines membranaires différentes appelées « Poms » (Alber et

2007b). Le core du complexe est formé par l'anneau interne et l'anneau externe, qui sont constitués par une douzaine de protéines conservées structurellement, les « Nups ». Cette structure permet de donner la forme du pore mais également sa robustesse. De façon intéressante, un tiers des protéines Nups, les « FG-Nups », possèdent un domaine caractéristique conservé, formé de répétitions de phénylalanine-glycine (pour « FG ») espacées par 20 aa polaires (Hurt et al, 1988). L'ensemble forme de longs filaments désordonnés sur les anneaux internes et externes (Denning et al, 2003). Les FG-Nups forment une barrière sélective par leur interaction faible mais néanmoins spécifique avec les facteurs d'import nucléaire des protéines. Enfin, de part et d'autre du pore se trouvent les filaments cytoplasmiques et le panier nucléaire. Ceux-ci réceptionnent les cargos d'import et d'export nucléaire des protéines (Walther et al, 2001).

III.1.2 L'import nucléaire des protéines

Les petites molécules et protéines de moins de 40 kDa de levure peuvent diffuser passivement à travers le pore nucléaire, tandis que les plus grosses protéines nécessitent un transport actif. C'est dans ce but qu'existent des signaux de localisation nucléaire.

III.1.2.1 Les NLS classiques et leur import nucléaire

Les NLS dits « classiques » (NLSc), sont les NLS les mieux caractérisés, composés d'aa basiques. Au sein de cette classe, on distingue les NLSc « monopartites » des « bipartites ». Le plus connu des NLSc monopartite est celui de l'antigène T du simian virus 40 (SV-40), découvert il y a maintenant plus de 30 ans (Kalderon et al, 1984). Le NLSc du SV40 est monopartite, puisque sa séquence est composée d'aa basiques d'un seul tenant : ¹²⁶PKKKRRV¹³². Le NLSc bipartite le plus connu est celui de la nucléoplasmine. Sa séquence d'aa basique est séparée en deux parties par une séquence d'aa plus ou moins aléatoire ¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰. A ce jour, bien que des séquences consensus aient pu être établies pour les NLSc, il existe aussi beaucoup d'exceptions. En effet, les NLS répondent à des caractéristiques de séquence, mais

également de structure (Conti et al, 2000) ou encore de thermodynamiques (Hodel et al, 2001), ce qui rend leur prédiction parfois compliquée.

Dans le cytoplasme, les NLSc sont reconnus par l'importine α . Il en existe une seule chez *S. cerevisiae*, Kap60. Celle-ci se compose de deux domaines fonctionnels : un petit domaine basique en N-terminal, responsable de l'interaction avec l'importine β , et un domaine composé de répétitions d'armadillo, responsable de la reconnaissance du NLS (Kobe, 1999 ; Christie et al, 2016). Le cargo, contenant l'importine α et la protéine à NLS, est ensuite reconnu par l'importine β , formée de domaines « Heat repeat » et également appelée Kap95 chez *S. cerevisiae* (**Figure 6**), qui importe le cargo à travers le pore nucléaire (**Figure 7**).

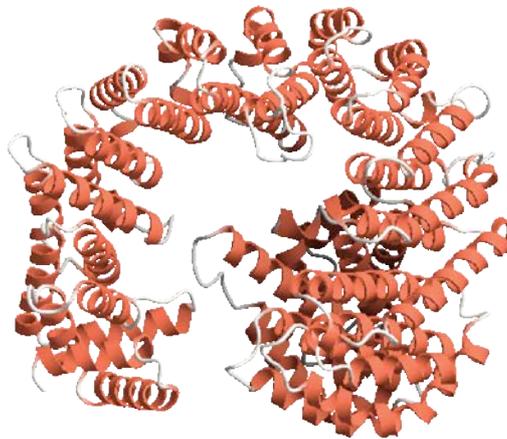


Figure 6. Structure cristallographique de Kap95 de *Saccharomyces cerevisiae* à une résolution de 2,4 Å. En rouge : hélices α formant les domaines « Heat Repeat ».

III.1.2.2 Les NLS PY

Tout d'abord identifiés chez l'Humain, ces NLS sont beaucoup moins décrits dans la littérature que les NLSc car découverts plus tardivement et plus rares. Ils ont été identifiés grâce à la résolution de la structure de la protéine hnRNP A1, une protéine maturant les ARNm, en interaction avec l'importine responsable de son import, Kap β 2 (Lee et al, 2006). En effet, le Dr Chook et son équipe ont mis en évidence qu'en plus d'interagir avec une séquence d'aa basiques de hnRNP A1, Kap β 2 interagissait également avec une proline et une tyrosine. Par l'analyse de bases de données d'autres protéines substrats de Kap β 2, un consensus a pu être établi : Celui-ci se compose d'un

motif hydrophobe ou basique, suivi en C-terminal d'un motif R/K/HX₍₂₋₅₎PY, ce qui a donné le nom de « NLSpy ». Le NLSpy n'est pas vraiment structuré et contient au moins 3 sites d'interaction avec son importine, qui ont chacun une affinité différente et variable selon les cas (Suel et al, 2008). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'homologue de Kap β 2 est Kap104 et aurait un consensus plus minimaliste que Kap β 2, puisque seul le motif R/K/HX₍₂₋₅₎PY serait suffisant pour l'interaction (Lange et al, 2008). A la différence des NLSc, les NLSpy n'interagissent pas avec Kap60.

III.1.2.3 Les autres types de protéines importées et leurs importines β

Mis à part les 2 types de NLS décrits précédemment, il existe d'autres protéines nécessitant d'être importées et toute une gamme d'importines β correspondantes. En effet, il existe 20 importines β chez les eucaryotes supérieures, et 10 chez la levure (Tran et al, 2007 ; Fried et al, 2003) (**Tableau 3**). Le point commun de toutes les importines β est la présence d'un domaine « Heat Repeat », (**Figure 6**) permettant l'import nucléaire et la liaison à la Ran-GTP (également connue sous le nom de Gsp1-GTP). Les importines β sont responsables de l'import des protéines ribosomiques, des ARNt, des histones, et de la RAN servant au recyclage du mécanisme (**Tableau 3**).

Nom	Protéine/signal reconnu	Essentialité	Homologue Métazoaire
Kap60	NLSc	Oui	Importine α
Kap95	Kap60, NLSc	Oui	Importine- β 1
Kap104	NLSpy (Nab2, Hrp1, protéines liant l'ARNm)	TS	Transportine / Transportine 2
Kap123	Histones, protéines ribosomiques	Non	Importine 4
Kap111/Mtr10	Npl3 (protéine liant l'ARNm), ARNt	TS	Transportine SR1 ou SR2
Kap121 / Pse1	Protéines ribosomiques, Histones, Yra1, Spo12, Ste12, Yap1, Pho4	Oui	Importine 5/ Importine- β 3/ RanBP5
Kap119/Nmd5	Protéines ribosomiques, Histones, Hog1, Crz1, Dst1	Non	Importine 7
Kap108 /Sxm1	Lhp1, protéines ribosomiques	Non	Importine 8

Kap114	Protéines liant les tata-box, histones, Nap1, Sua7	Non	Importine 9
Kap122 / Pdr6	Toa1, Toa2, TFIIA	Non	-
Kap120	Rpf1	Non	-
Ntf2	Ran/Gsp1 (forme GDP)	Oui	NTF2
Kap142/Msn5	Protéine de réplication A	Non	-

Tableau 3. Les différentes importines de *S. cerevisiae* et leurs éventuels homologues Métazoaires.
TS : Thermosensible ; Nom1 / Nom 2 : utilisé lorsqu'il existe 2 noms différents pour une même protéine ; NLSc : NLS classique.

III.1.2.4 La dissociation du complexe et le recyclage de l'importine β

Le cargo, importé dans le noyau, nécessite une dissociation accomplie par le système Ran-GTPase (**Figure 7**). La protéine Ran existe sous deux formes : la forme liée au GTP (Ran-GTP) ou celle liée au GDP (Ran-GDP). Lorsque les conditions de croissance sont optimales, la Ran-GTP est présente en gradient du cytoplasme vers le noyau, étant peu abondante dans le cytoplasme pour devenir largement abondante dans le noyau. Le gradient de Ran-GTP permet un import nucléaire sans risque de dissociation du cargo dans le cytoplasme, puis la dissociation rapide du cargo lorsqu'il est dans le noyau.

La Ran-GTP interagit avec les domaines « Heat Repeat » de l'importine β (Görlich et al, 1997 ; Lee et al, 2005). Cette interaction provoque un changement de conformation de l'importine β , ce qui a pour effet de relarguer le cargo. Lorsque l'importine α est présente en tant qu'intermédiaire entre l'importine β et la protéine importée, le relargage se fait immédiatement par un mécanisme d'autoinhibition (Kobe, 1999) : Le domaine libéré de l'importine α se trouve en compétition avec le NLS pour un même site d'interaction au sein de sa propre séquence, ce qui provoque la dissociation du complexe. L'importine α est ensuite recyclée par une exportine : CAS chez l'Humain, ou Cse1 chez la levure (Kutay et al, 1997). Cette exportine est entièrement dédiée à ce processus, car l'importine α est très abondante et que le mécanisme de recyclage doit être rapide afin de garantir une efficacité optimale de l'import nucléaire.

Après ces étapes d'import nucléaire et de dissociation du complexe, l'importine β liée à la Ran-GTP sont également recyclées (**Figure 7**). Une karyophérine responsable de l'export nucléaire (une exportine) prend en charge ce cargo par la reconnaissance d'un signal d'export localisé sur la Ran-GTP pour l'exporter (Yoneda et al, 1999). Lors de la

traversée du pore nucléaire, la Ran-GTP est hydrolysée en la forme Ran-GDP par la Ran-GAP cytoplasmique, ce qui provoque la dissociation du cargo de recyclage. Ntf2, importine spécifique de la Ran-GDP, réimporte ensuite cette dernière dans le noyau où elle sera re-convertie en Ran-GTP par le facteur d'échange de la guanine, Ran-GEF ou Rrc1. L'importine β peut alors repartir à la recherche de nouveaux cargos à importer.

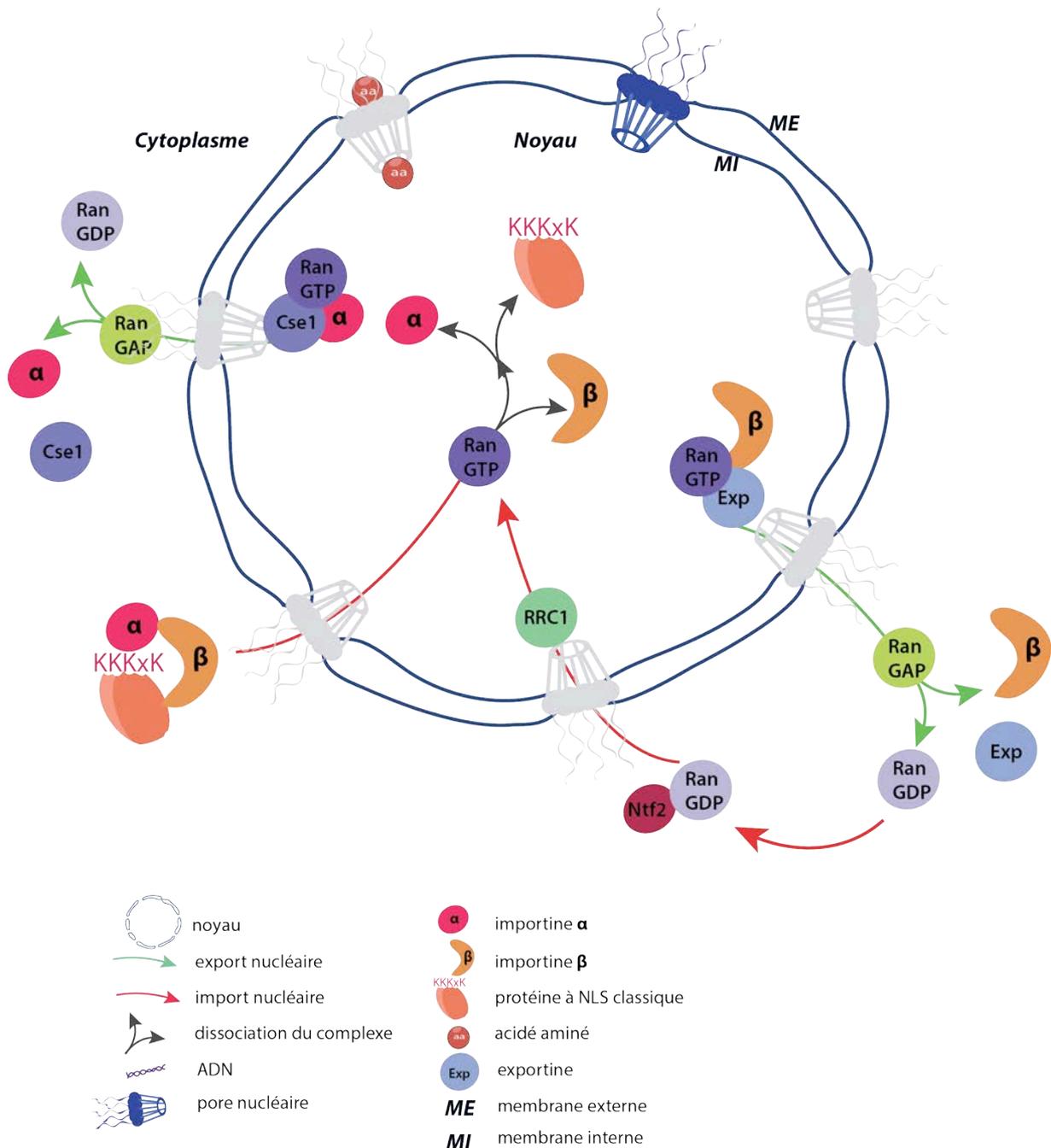


Figure 7. L'import nucléaire des protéines à NLSc et le recyclage de ses acteurs. L'importine α reconnaît le NLS d'une protéine, puis le cargo est importé dans le noyau par l'importine β . Le complexe se dissocie, puis les importines sont recyclées par des voies différentes. Tons rouges/orangés : protéines liées à l'import nucléaire. Tons violets/verts : protéines dédiées au recyclage des facteurs d'import.

III.1.3 Le système d'export nucléaire

Tout comme les protéines importées dans le noyau, les protéines qui en sont exportées possèdent un peptide signal nommé signal d'export nucléaire, ou NES. Celui-ci correspond à une séquence riche en leucine dont le consensus, beaucoup mieux conservé que les NLS, est composé de la séquence suivante : L-X2-3 -(L,I,M,F,M)-X2-3 -L-X-(L,I,V) (Bogerd et al, 1996 ; Bogerd et al, 1999). Le premier NES découvert a été celui de la protéine Rev du VIH, qui est certainement le NES le plus étudié d'entre tous puisqu'il a permis d'élucider le mécanisme par lequel la protéine Rev permet l'expression du génome du VIH dans les cellules infectées (Fischer et al, 1995).

III.1.3.1 Export des protéines par Crm1 et recyclage des acteurs

L'exportine Crm1/exportine1 chez les eucaryotes supérieurs, ou Crm1/Xpo1 chez la levure, est la karyophérine responsable de l'export des protéines possédant un NES (Stade et al, 1997 ; Neville et al, 1997). Crm1 est certainement la plus polyvalente des exportines, prenant en charge des protéines très différentes les unes des autres tels que des facteurs de transcription, des protéines liant l'ARN, des régulateurs du cycle cellulaire, Ainsi, chez la levure, la délétion du gène codant Xpo1 est létale, mais l'inhibition de Xpo1 est possible pour de courtes durées par la leptomycine B, dont l'effet a été découvert lors de l'étude de la protéine Rev du VIH (Wolff et al, 1997).

Tout comme l'import nucléaire, le système d'export nucléaire nécessite un gradient de Ran-GTP. La protéine à exporter est reconnue par Crm1/Xpo1 dans le noyau, avec parfois la présence d'un adaptateur. Crm1/Xpo1 interagit alors avec la Ran-GTP, puis le cargo est exporté du noyau (**Figure 8**). Le complexe se dissocie ensuite par l'interaction forte de la protéine cytoplasmique Ran-BP1 pour « **Ran Binding Protein** » également nommée Yrb1 chez *S. cerevisiae*, avec la Ran-GTP (Bischoff et al, 1995 ; Maurer et al, 2001). Il a été montré que la protéine de 23 kDa Yrb1, principalement cytoplasmique, pouvait être importée ou diffusait dans le noyau. Dans ce cas là, Yrb1 est exportée par la Ran-GTP et Xpo1. Le complexe intermédiaire Yrb1-Ran-GTP est ensuite hydrolysé par la Ran-Gap cytoplasmique, ce qui provoque la dissociation du complexe. Le recyclage de la Ran-GDP se fait ensuite comme expliqué précédemment (**Figure 8**). Le recyclage de Crm1/Xpo1 n'est, quant à lui, pas connu de manière précise, mais il semblerait que chez l'Humain, il se fasse selon un mécanisme Ran-dépendant (Kehlenbach et al, 1998).

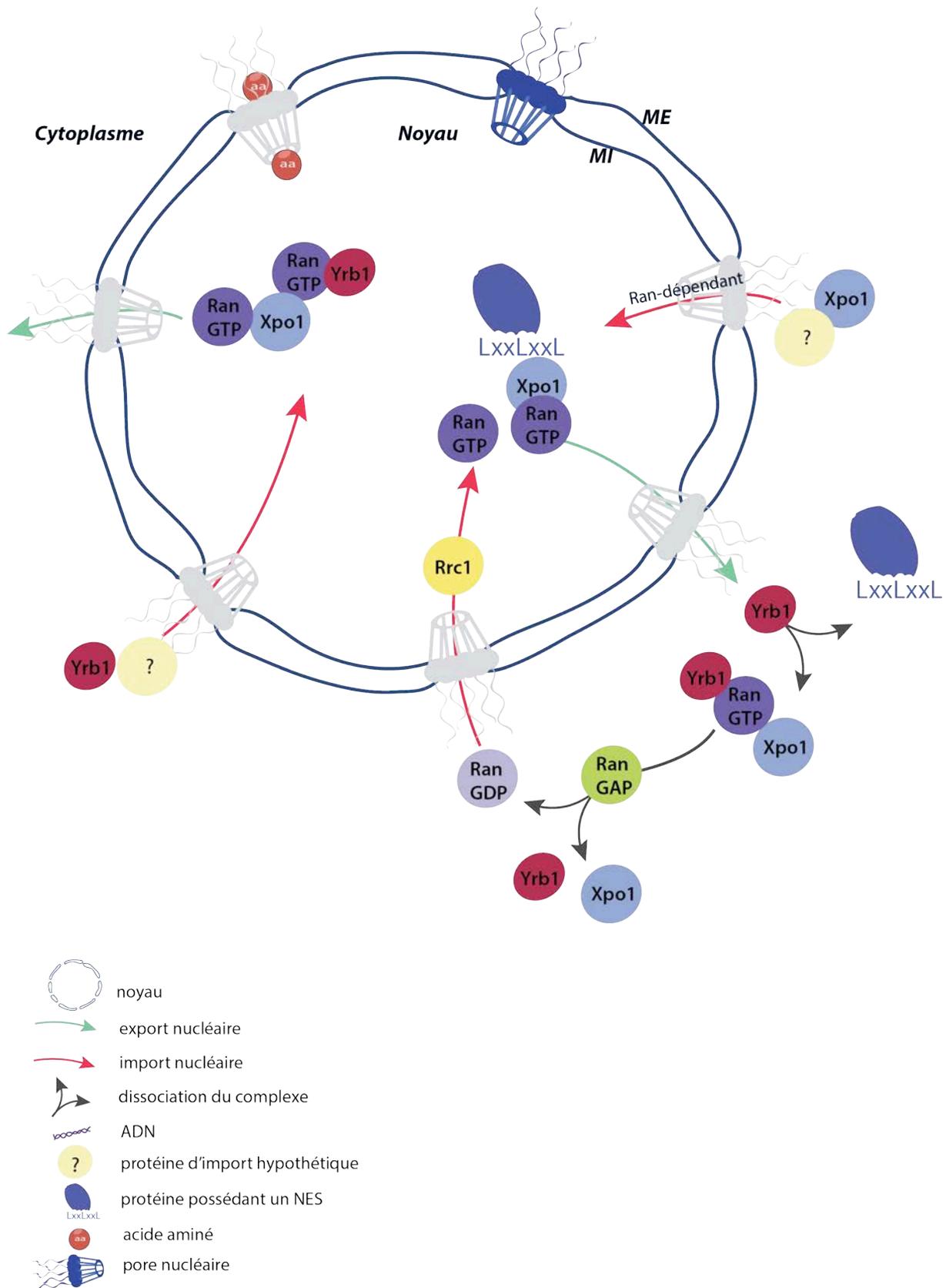


Figure 8. L'export nucléaire des protéines et le recyclage de ses acteurs. La protéine à exporter, contenant un NES, est présente dans le noyau. Elle est reconnue par Xpo1, puis ce complexe interagit avec Ran-GTP pour être exporté du noyau. Dans le cytoplasme, le complexe se dissocie par l'interaction de Ran-GTP avec Yrb1. Ran-GTP est hydrolysé par Ran-GAP. Les acteurs de l'export sont ensuite recyclés.

III.1.3.2 Autres exportines

La levure compte au total 5 exportines différentes, dont Xpo1 et Cse2, décrites précédemment. Les 3 restantes sont dédiées à l'export des ARNt (auquel sera dédiée le § III.2), des sous unités ribosomiques, des ARNm et des micro ARN (ARNmi).

III.1.3.3 L'export des ARNm

L'export nucléaire des ARNm est indispensable pour qu'ils soient accessibles à la machinerie traductionnelle, présente dans le cytoplasme. L'exportine responsable de ce mécanisme est la protéine Mex67/Mtr2 initialement connue pour ce rôle et codée par un gène essentiel (Segref et al, 1997). NXF1/NXT1 est son homologue métazoaire (Katahira et al, 1999). Mex67 ne possède toutefois qu'une faible affinité pour les ARNm ce qui implique que de nombreux autres intermédiaires participent à ce processus (pour un tableau complet de ces intermédiaires, se référer à la revue de Nino et al, 2013). De façon intéressante, Mex67 fonctionne indépendamment de la Ran-GTP, mais nécessite une interaction avec les protéines du pore nucléaire et plus particulièrement les FG-Nups.

III.1.3.4 L'export des sous-unités ribosomiques

Les sous unités ribosomiques peuvent être exportées par différentes exportines. Crm1 constitue la voie majeure d'export de la sous unité 60S, *via* la présence d'adaptateurs. L'export de la sous-unité pré-60S nécessite l'adaptateur Nmd3, qui contient le NES reconnu par Crm1 (Gadal et al, 2001). Cependant, une autre exportine, Mex67/Mtr2, connue pour l'export des ARNm, est également capable d'effectuer l'export du pré-60S (Yao et al, 2007). De plus, l'ARNr 5S qui interagit avec l'hétérodimère formé, pourrait également participer à ce transport.

Enfin, une troisième exportine est redondante pour ce rôle. Arx1, protéine de la levure codée par un gène non-essentiel, est aussi capable d'exporter le pré-60S (Bradatsch et al, 2007). Elle n'a en revanche pas d'homologue chez l'Humain, contrairement aux deux précédentes.

III.2 Le trafic nucléocytoplasmique des ARNt

III.2.1 Les différentes voies d'exports nucléaires

III.2.1.1 La voie Los1-dépendante

Chez la levure, la première voie d'export des ARNt identifiée fut celle dépendant de Los1, qui exporte les ARNt néo-synthétisés (Sarkar et al, 1998 ; Hellmuth et al, 1998). Los1 a tout d'abord été identifié comme étant impliqué dans l'épissage des ARNt, puis comme un composant du cytosquelette nucléaire en raison de son insolubilité (Shen et al, 1993).

Afin d'exporter les ARNt, Los1 interagit avec la Ran-GTP et nécessite également une interaction avec les nucléoporines Nup2 et Nsp1 (Hellmuth et al, 1998). Le complexe se dissocie ensuite dans le cytoplasme par l'hydrolyse du GTP en GDP par la Ran-Gap, puis les acteurs sont recyclés comme expliqué précédemment par Rrc1 (**Figure 8**). La délétion de *LOS1* ou des mutations dans le gène de la Ran Gap provoquent une accumulation des pré-ARNt non épissés, suggérant deux hypothèses plausibles : i) que l'épissage du pré-ARNt soit effectué dans le cytoplasme et non pas dans le noyau, ou, ii) que Los1 permette le transport intranucléaire des ARNt pour un épissage nucléaire (Sarkar, 1998). Il sera découvert plus tard que chez *S. cerevisiae* à la différence des vertébrés, l'épissage a bien lieu dans le cytoplasme (Yoshihisa et al, 2007 ; Hopper et Shaheen, 2008). Il a également été rapporté que Los1 est capable d'exporter les ARNt aminoacylés (Steiner-Mosonyi et Mangroo, 2004).

Il a été montré que chez l'Humain, des éléments structuraux des ARNt interviennent dans la reconnaissance par Xpo-t (homologue de Los1), puisque des mutations affectant la structure des ARNt abolissent l'export et l'interaction avec Xpo-t (Tobian et al, 1985). Cela a notamment été montré pour l'ARNt_i^{Met}, qui présente des défauts d'export nucléaire lorsqu'il comporte des mutations affectant sa structure tridimensionnelle. La structure de Xpo-t, en interaction avec la Ran-GTP et l'ARNt^{Phe}, a été résolue, permettant d'accéder aux bases moléculaires de la reconnaissance ARNt-Exportine qui résident dans les domaines HEAT-repeat de Xpo-t (Cook et al, 2009) (**Figure 9**).

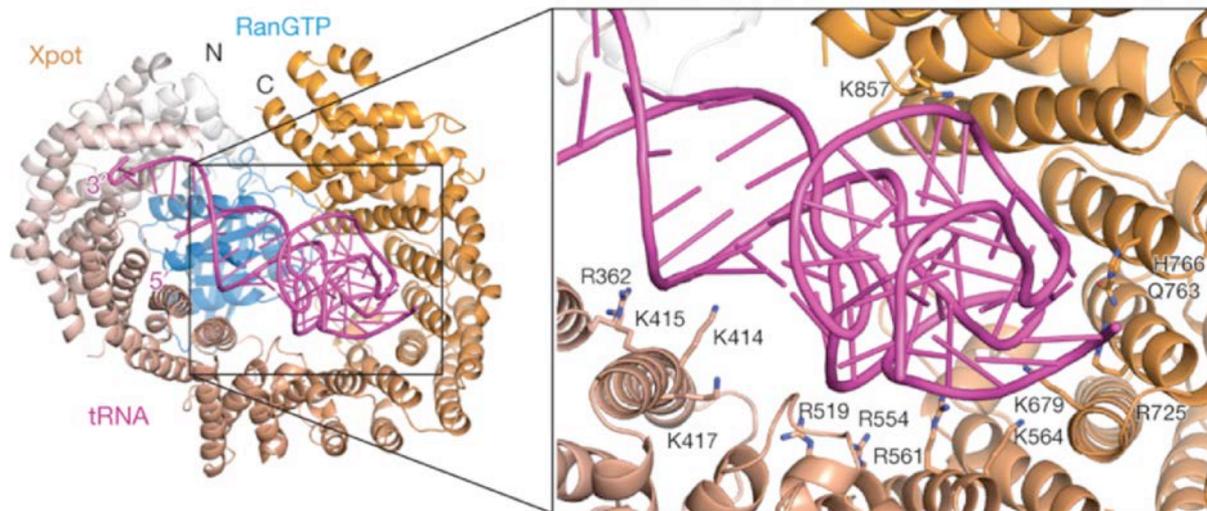


Figure 9 Structure cristallographique de l'exportine d'*H. sapiens* Xpo-t en interaction avec l'ARNt^{Phe} et la RanGTP à une résolution de 3,2 Å. (d'après Cook et al, 2009). En rose : ARNt^{Phe}. En orange : Xpo-t, composés de domaines HEAT repeat. En bleu : RanGTP

A la différence de Los1 chez la levure, Xpo-t exporte préférentiellement les ARNt matures et épissés (Arts et al, 1998). Chez la levure, la délétion du gène *LOS1* affecte l'export des ARNt mais n'est pas létale, suggérant l'existence d'une voie alternative (Hopper et al, 1980).

III.2.1.2 La voie Msn5-dépendante et eEF1A

Cette voie alternative pourrait être accomplie par la protéine Msn5 (**Figure 8**), également responsable de l'import de protéines mais également de l'export de protéines tel que le facteur de transcription Pho4 (Yoshida et al, 2001 ; Kaffman et al, 1998 ; Takano et al, 2005). La délétion du gène *MSN5* provoque en effet des défauts d'export nucléaire des ARNt (Strub et al, 2007), mais n'est pas synthétique létale avec la délétion de *LOS1*, indiquant qu'il ne s'agit pas de la seule voie indépendante de Los1. Chez l'Humain, Exp-5, l'homologue de Msn5, est responsable de l'export des ARNt aminoacylés, ainsi qu'eEF1A, lorsque ce dernier interagit avec les ARNt (Bohnsack et al, 2002). Chez *S. cerevisiae*, cette voie d'export des ARNt aminoacylés semble être effectuée uniquement par eEF1A, également de manière indépendante de Los1 (Grosshans et al, 2000).

Ainsi, 3 voies d'exports des ARNt sont actuellement connues chez *S. cerevisiae*, réalisées par Los1, Msn5 et eEF1A (**Figure 10**), et, une autre (au minimum) reste à ce jour inconnue.

III.2.1.3 Une voie Arc1-dépendante ?

Cette quatrième voie pourrait être accomplie par Arc1, puisque *LOS1* et *ARC1* sont synthétiques létaux ce qui suggère que les produits des deux gènes participent, au moins en partie, à la même voie métabolique (Simos et al, 1996) (**Figure 10**). Cependant, ce rôle n'a pas été approfondi et le mécanisme impliquant Arc1 pour exporter les ARNt n'est pas connu. Arc1 étant exclu du noyau par un mécanisme dépendant de Xpo1 (Galani et al, 2005), il se pourrait qu'avant son exclusion nucléaire, il lie les ARNt et les exporte. *In vitro*, il lie fortement l'ARNt^{Glu}, l'ARNt^{eMet}, l'ARNt^{Lys}, l'ARNt^{Phe} et l'ARNt^{Arg} ainsi que de manière nettement plus faible, l'ARNt^{iMet}, l'ARNt^{Pro}, l'ARNt^{Ser}, l'ARNt^{Ala}, l'ARNt^{Tyr}, l'ARNt^{Trp} et l'ARNt^{Asp} (Deinert et al, 2001). La grande variété d'ARNt avec lesquelles Arc1 interagit corroborerait l'hypothèse selon laquelle cette protéine serait impliquée dans l'export des ARNt.

III.2.2 Les transporteurs intranucléaires

Utp8 semble être un transporteur intranucléaire d'ARNt, et facilite l'export des ARNt en interagissant avec des facteurs d'exports tels que Los1 et Msn5 (Steiner-Mosonyi et al, 2003 ; Strub et al, 2007). Tout comme Utp8, Cex1 a été identifié comme étant impliquée dans le transport intranucléaire des ARNt. Son domaine central, composé de domaines « Heat Repeats » lui confère la capacité de lier les ARNt, tandis que son domaine kinase-like N-terminal lui permet d'interagir avec Los1, Msn5 et eEF1A, impliqués dans l'export nucléaire des ARNt (McGuire et al, 2007). De plus, le gène *CEX1* avait été montré comme étant synthétique léthal avec *ARC1*, indiquant que les protéines qu'ils codent sont impliquées dans la même voie métabolique. Cependant, ce résultat n'a pas pu être reproduit par notre équipe (thèse du Dr. L. Enkler).

III.2.3 L'import rétrograde

Dans un premier temps, le transport nucléo-cytoplasmique des ARNt fut considéré comme unidirectionnel, du noyau vers le cytoplasme. Puis, il y a une décennie, plusieurs études ont montré qu'il existait une voie d'import rétrograde des ARNt du cytoplasme vers le noyau (Takano et al, 2005 ; Shaheen et Hopper, 2005) (**Figure 10**).

Au cours de l'une de ces études, des expériences menées avec des hétérocaryons (levures avec 2 noyaux différents donc 2 génomes différents) ont permis de montrer qu'un ARNt codé par le génome du premier noyau pouvait rejoindre le deuxième noyau. Dans la même étude, dans des cellules haploïdes sauvages, les ARNt s'accumulent dans le noyau en condition de carences en aa, ce qui n'est pas le cas lorsque *MTR10* est délété, indiquant que l'importine Mtr10 pourrait être responsable l'import des ARNt en conditions de carences en aa.

L'import rétrograde des ARNt a été montré chez *S. cerevisiae* pour l'ARNt^{Tyr}, l'ARNt^{Ile}, l'ARNt^{Pro} (Takano et al, 2005), l'ARNt^{His} (Shaheen et Hopper, 2005), l'ARNt^{Leu} (Grosshans et al, 2000), l'ARNt^{Phe} (Ohira et al, 2011), l'ARNt^{Arg} (Chu et al, 2013) et l'ARNt^{Lys} (Kramer et al, 2013) ainsi que pour et l'ARNt^{Glu} de *D. discoideum* (Shaheen, 2005). Lors d'une carence en aa ou en glucose, les ARNt^{eMet} et ARNt^{iMet} sont présents sous leur forme aminoacylée dans le noyau des levures, suggérant un import rétrograde de ces ARNt déjà chargés, ou une aminoacylation nucléaire (Whitney et al, 2007).

Ces accumulations nucléaires réversibles des ARNt, observées en condition de carence, pourraient également signifier que les ARNt s'accumulent dans le noyau dans le but de réguler l'expression des gènes en réponse au stress nutritionnel.

L'intérêt de l'import rétrograde n'est pas encore totalement établi. Dans des cellules de levure déficientes pour l'import rétrograde, des défauts de la taille et des modifications des ARNt sont observés (Kramer et al, 2013). Ce résultat suggère une importance de l'import rétrograde en tant que « contrôle qualité » de l'intégrité des ARNt, du moins pour les ARNt^{Lys}, ARNt^{Tyr}, et ARNt^{Ile}, étudiés dans cet article.

Ce mécanisme existe également chez l'Humain, dans lequel il est détourné par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). L'ARNt^{Lys}, l'ARNt^{Gly} et l'ARNt^{Glu} favorisent l'import nucléaire ATP-dépendant d'une partie des complexes de rétrotranscription, l'autre partie étant importée par l'importine 7 (Fassati et al, 2003 ; Zaitseva et al, 2006). Pour ce faire, la boucle de l'anticodon de l'ARNt se lie au complexe viral tandis que le bras T interagit avec les facteurs cellulaires de l'import nucléaire.

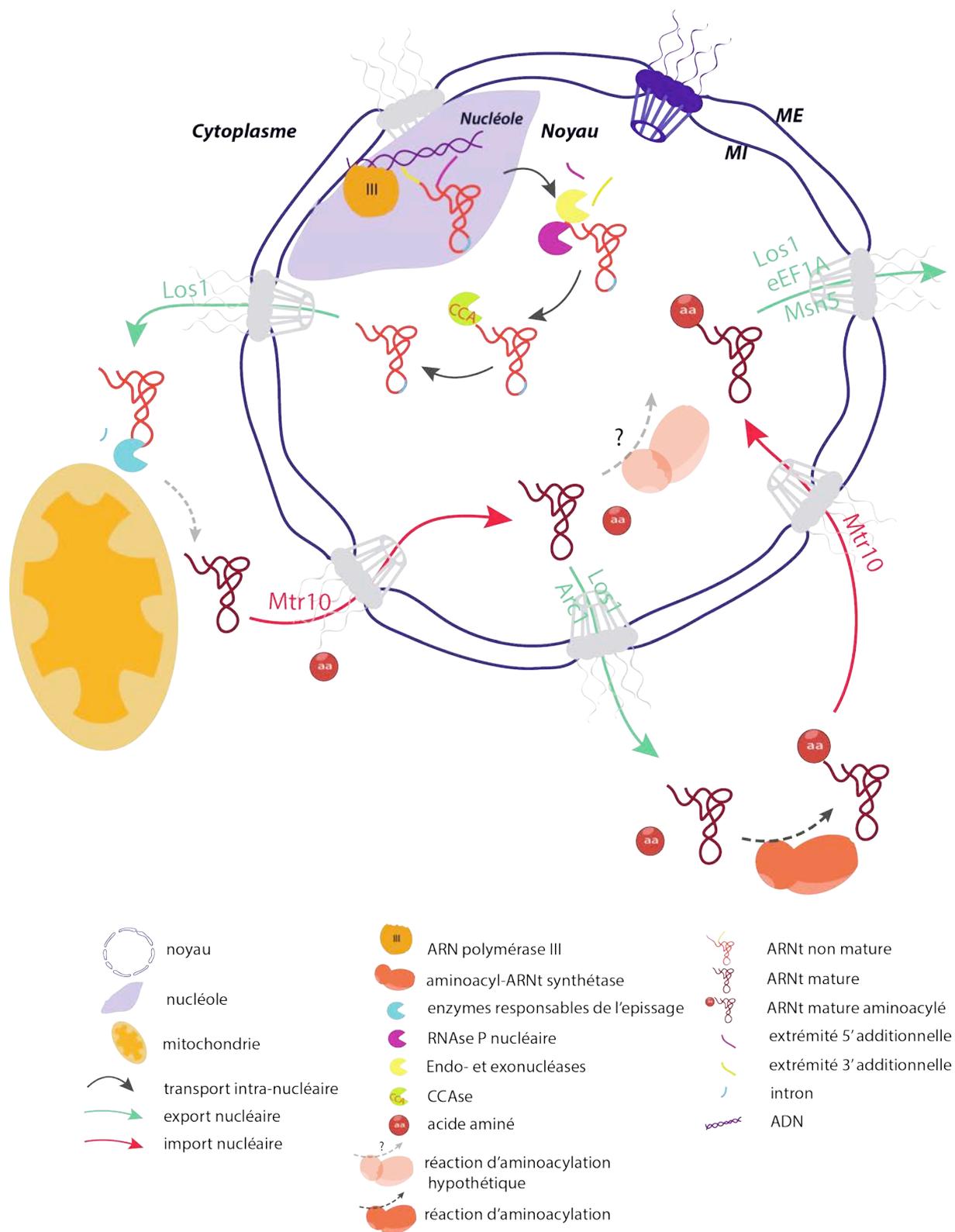


Figure 10. Les voies connues du trafic nucléo-cytoplasmique des ARNt et de l'import rétrograde des ARNt.

IV Diversité et composition des complexes multisynthétasiques à travers les organismes

Les complexes multisynthétasiques (MSC) font l'objet d'un article de revue présenté à la fin de l'introduction (§ X p. 107).

Les complexes multisynthétasiques sont largement répandus des archées aux mammifères en passant par les levures et d'autres eucaryotes unicellulaires. Il s'agit d'assemblages d'au moins deux aaRS différentes, contenant ou non des protéines auxiliaires (Laporte et al, 2014).

Les complexes semblent plus minimalistes chez les archées (**Figure 11, figure 18**), mais ils n'en sont pas moins importants puisqu'ils permettent un acheminement et un recyclage plus efficace de l'ARNt, ainsi qu'une augmentation de l'efficacité catalytique de certaines aaRS. Les MSC d'archées sont composés majoritairement d'aaRS de classe II et de protéines de la traduction, et leur assemblage semble effectué par les aaRS elles mêmes.

Une évolution majeure est observée dans les MSC eucaryotes, il y a émergence de protéines auxiliaires spécialisées dans l'assemblage et possédant des domaines d'interactions avec l'ARNt. La complexité de l'organisme semble corrélée à la taille du MSC : 3 protéines chez *S. cerevisiae*, 11 chez les mammifères, et des MSC de taille intermédiaire chez d'autres organismes évolutivement inférieurs. Tout MSC eucaryote se compose au minimum d'une protéine auxiliaire, de la MetRS et de la GluRS, ce qui fait du complexe AME le complexe minimaliste, idéal pour la compréhension des mécanismes primaires des MSC eucaryotes (**Figure 11, figure 18**).

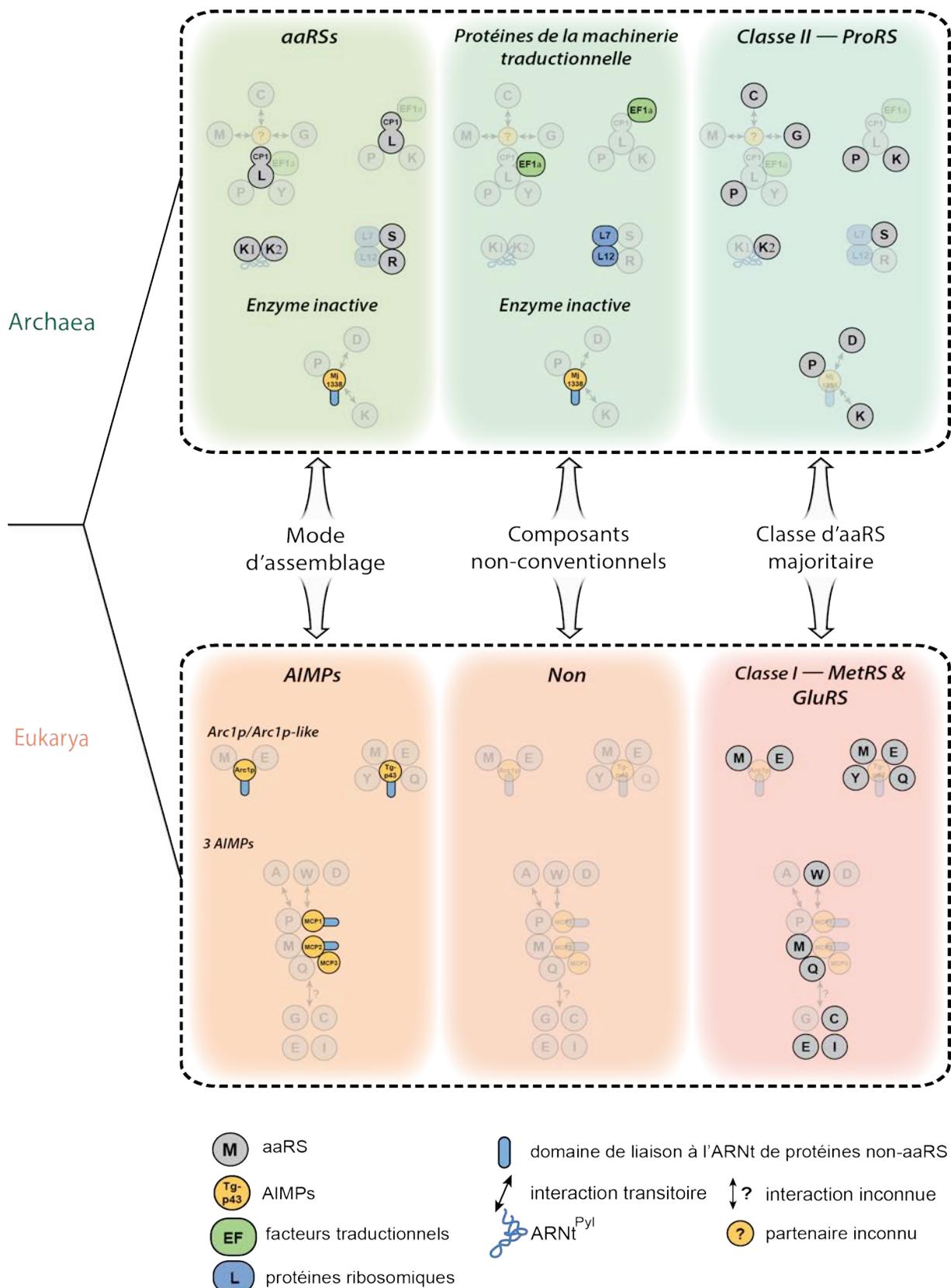


Figure 11. Comparaison des complexes multisynthétasiques archéens et eucaryotiques.

IV.1 Chez les procaryotes

IV.1.1 Existence d'un complexe bactérien

Aujourd'hui encore, l'existence d'un MSC chez la bactérie *Escherichia coli* reste mystérieuse. En 1987, Harris montre la présence d'un MSC ayant une taille variant de 400 kDa à 1 MDa selon la technique de cassage des cellules employée, cette variation de taille suggérant la fragilité du MSC (**Figure 18**). Depuis, aucune étude n'a confirmé l'existence d'un tel MSC chez les bactéries. Néanmoins, nous savons que les aaRS bactériennes ont la capacité de former des complexes, comme par exemple l'AspRS et le transamidosome (Bailly et al, 2007).

IV.1.2 Chez les Archées

Le premier MSC d'archée a été décrit chez l'organisme halophile *Haloarcula marismortui* et contiendrait presque toutes les aaRS (Goldgur et al, 1994, Laporte et al, 2014). Ce MSC est résistant à la dissociation face à toute une gamme de chromatographies, suggérant une plus grande stabilité que celui décrit chez *E. coli*.

Le MSC d'archée le plus étudié est celui de *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Ce complexe est composé du facteur d'élongation EF1A et de la LeuRS, ProRS et LysRS assemblées selon une stœchiométrie 2-2-2 (Prætorius-Ibba et al, 2005 ; Prætorius-Ibba et al, 2007 ; Hausmann et al, 2007) (**Figure 18**). Au sein de ce complexe, la LeuRS joue le rôle de noyau central et lie la LysRS et la ProRS *via* ses domaines N- et C-terminal respectivement. EF1A est quant à lui inclus dans le complexe par l'interaction avec le domaine CP1 de la LeuRS. D'après les constantes cinétiques des enzymes purifiées après surproduction en système hétérologue bactérien, associées en complexe ou non, le rôle de ce complexe serait d'augmenter l'efficacité catalytique de la ProRS de 5 fois, l'affinité de la LysRS pour son substrat de 3 fois, ainsi que la vitesse catalytique de la LeuRS de 8 fois. Il a ainsi été proposé que le rôle du MSC soit d'accélérer l'acheminement du Leu-ARNt^{Leu}, du Pro-ARNt^{Pro}, et du Lys-ARNt^{Lys}, vers les facteurs EF1A du complexe, et ainsi, vers les ribosomes en cours de traduction.

Chez cette archée, un deuxième MSC a été identifié grâce à l'utilisation de la méthode du double hybride levure pour la recherche d'interactants de la SerRS (Godinic-Mikulcic et al, 2011). Ce complexe contient deux aaRS, l'ArgRS et la SerRS, ainsi

que deux protéines ribosomiques, L7 et L12 (**Figure 18**). Alors que les constantes catalytiques de l'ArgRS restent inchangées lorsqu'elle fait partie du complexe, la vitesse catalytique de la SerRS purifiée après surproduction en système hétérologue bactérien est augmentée de 4 fois en complexe par rapport à l'enzyme seule. Le rôle de cette association serait de permettre une utilisation rapide des Ser-ARNt^{Ser} et Arg-ARNt^{Arg} par le ribosome, en raison de sa proximité immédiate conférée par l'association des protéines L7 et L12 au MSC.

Chez *Methanocaldococcus jannaschii*, il existe également un MSC dont le core est composé de la ProRS et de Mj1338, une enzyme métabolique putative homologue à une déshydrogénase, ainsi que transitoirement, de la LysRS et l'AspRS (Lipman et al, 2003) (**Figure 18**).

Chez *Thermococcus kodakarensis*, une chromatographie d'affinité de la LeuRS a permis de mettre en évidence un MSC composé de la LeuRS, de la ProRS, de la TyrRS, de la GlyRS, de la CysRS, de la MetRS, de protéines ribosomiques de la sous-unité 30S, d'EF1A, d'EF2, d'IF2 et d'IF2B (Raina et al, 2012) (**Figure 18**). Ce MSC, contenant des composants de l'appareil de traduction, permet l'aminacylation des ARNt à proximité du ribosome et donc potentiellement, leur incorporation directe à la traduction, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle les MSC sont importants dans l'acheminement des ARNt au ribosome durant la traduction.

Enfin, chez *Methanosarcina barkeri*, un MSC nécessaire à la formation du pyrrolysyl-ARNt^{Pyrrolysine} (Pyl-ARNt^{Pyl}) a été découvert (Polycarpo et al, 2003) (**Figure 18**). Il existe deux voies permettant la synthèse du Pyl-ARNt^{Pyl}, dont l'une d'elle, la voie indirecte, implique la LysRS de classe I et celle de classe II. Individuellement, les deux LysRS sont incapables de mésacyler l'ARNt^{Pyl}, mais associées sous forme de complexe, elles acquièrent la capacité de lysiler l'ARNt^{Pyl}. Cependant, l'enzyme de modification du Lys-ARNt^{Pyl} n'ayant pas été identifiée à ce jour, l'utilisation de cette voie indirecte reste à encore à être démontrée. En revanche, l'existence d'une PylRS et d'une voie de biosynthèse de la Pyl a été démontrée, prouvant que la synthèse du Pyl-ARNt^{Pyl} peut se faire de manière directe (Srinivasan et al, 2002).

Il existe donc une grande variété de MSC chez les archées, et ces complexes possèdent des points communs tels que la présence quasi-systématique de la ProRS (**Figure 9**). Quelques-uns de ces MSC contiennent des facteurs de la traduction ou des protéines ribosomiques, certainement dans le but de recruter les aaRS et les aa-ARNt à

proximité de la machinerie traductionnelle et ainsi, d'améliorer l'efficacité de la traduction. Par opposition aux MSC d'eucaryotes, ces complexes sont dépourvus de protéines d'assemblage et l'accrétion des aaRSs en complexes semble n'être médiée que par leur capacité intrinsèque à interagir entre-elles.

IV.2 Les MSC eucaryotes

IV.2.1 Emergence de nouveaux domaines et protéines

Une nouvelle catégorie de protéines apparaît dans les MSC eucaryotes, il s'agit des protéines auxiliaires spécialisées dans l'assemblage. Le MSC eucaryote est perçu comme un réservoir d'aaRS pouvant s'en détacher afin d'accomplir des fonctions alternatives (présentées dans le § VI).

Les protéines incluses dans les MSC, aaRS ou protéines auxiliaires, ont fait l'acquisition de domaines typiques d'interaction entre protéines, tels que les domaines GST-like et les domaines WHEP.

Les domaines GST-like sont des domaines ressemblant à la glutathion-S-transférase. Certains sont bien conservés dans les aaRS d'un organisme à l'autre, comme celui de la GluRS ou de la MetRS (**Figure 11, figure 12**).

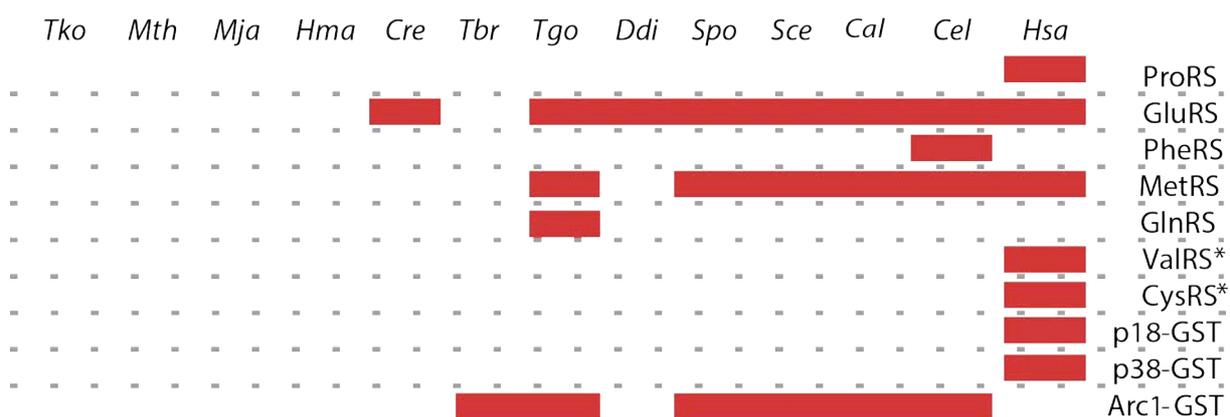


Figure 12. Répartition des domaines GST-like chez les différentes aaRS et protéines auxiliaires, dans différents organismes. En rouge : présence du domaine GST-like dans la protéine (colonne de droite) de l'organisme précisé (ligne du dessus). Les aaRS suivies d'un astérisque (*) sont celles n'ayant pas été détectées dans le MSC malgré la présence du domaine GST-like. Les organismes sont présentés de la manière suivante : abréviation; nom latin complet (souche si nécessaire). Tko; *Thermococcus kodakarensis* (KOD1), Mth; *Methanothermobacter thermautotrophicus* (str Delta H), Mja; *Methanocaldococcus jannaschi* (DSM 2661), Hma; *Haloarcula marismortui* (ATCC 43049), Ddi; *Dictyostelium discoideum* (AX4), Spo; *Schizosaccharomyces pombe* (972 h-), Sce; *Saccharomyces cerevisiae* (S288C), Cal; *Candida albicans* (WO-1), Cel; *Caenorhabditis elegans*, Hsa; *Homo sapiens*, Tbr; *Trypanosoma*

brucei (strain 927/4 GUTat10.1), Tgo; *Toxoplasma gondii* (strain ME49), Cre; *Chlamydomonas reinhardtii* (strain CC-1373).

Les structures des GST-like d'Arc1, de la MetRS et de la GluRS de *S. cerevisiae* ont été cristallisées en duplexes (Arc1-GluRS et Arc1-MetRS) puis superposées pour obtenir le modèle du trimère, ce qui a permis de montrer que cette structure particulière permet l'accrétion de ces protéines en complexe (Simader et al, 2006) (**Figure 18**, plus d'information sera donnée dans la partie spécifique au MSC de *S. cerevisiae* § IV.2.5). Les domaines GST-like de la MetRS, de la GluProRS (**Figure 13**) ainsi que de deux protéines auxiliaires du MSC humain ont également été cristallisés, permettant de confirmer l'hypothèse selon laquelle ces protéines s'assemblent en complexe *via* leurs domaines GST-like (Cho et al, 2015).

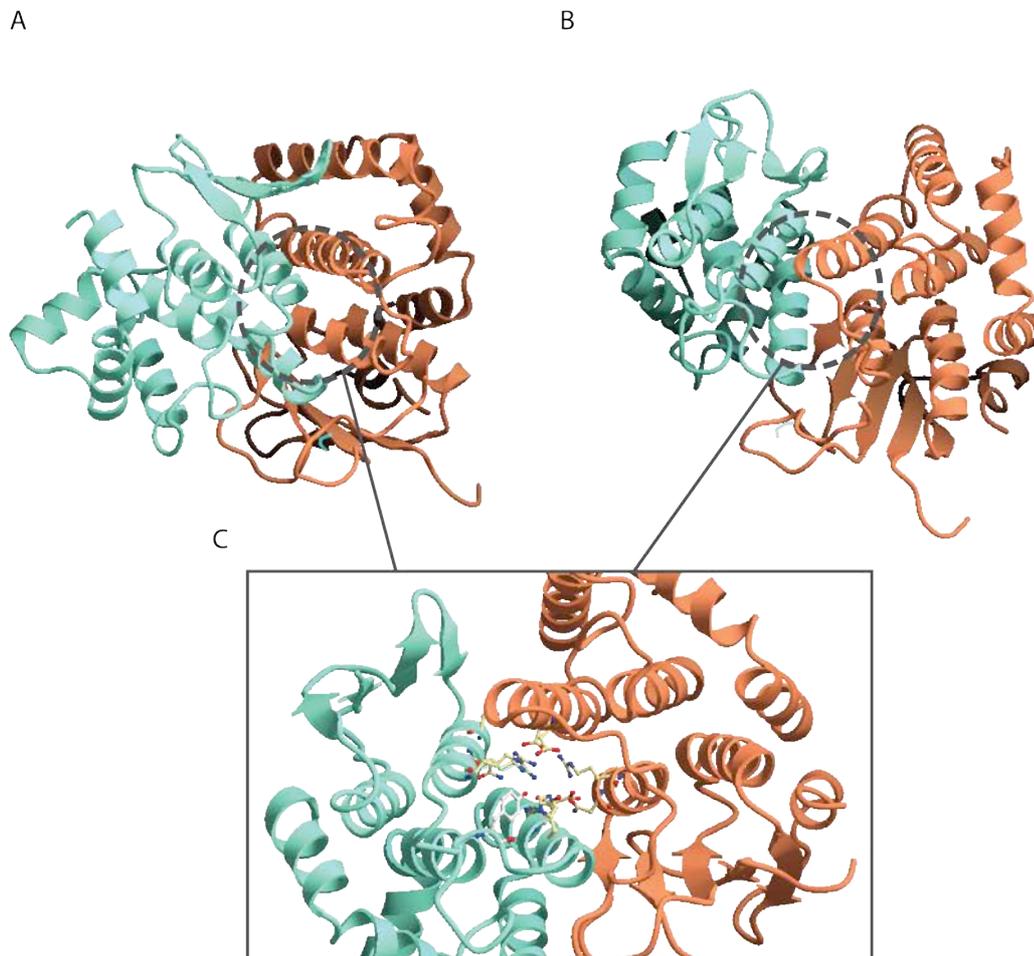


Figure 13. Structure cristallographique des domaines GST-like de la GluProRS (bleu) et d'AIMP2/p38 (orange) d'*Homo sapiens* à une résolution de 2,6 Å. En A et en B, vues différentes des domaines GST-like. En C, zoom sur la région d'interaction entre les deux protéines montrant les résidus impliqués qui sont majoritairement polaires et chargés.

Les domaines WHEP ont d'abord été rapportés comme existant uniquement chez les eucaryotes supérieurs, puis ont été découverts dans des protéines d'eucaryotes plus simples tel que *Chlamydomonas*, une algue unicellulaire (Ray et al, 2014). Ils ont été nommés ainsi en raison de leur découverte dans la TrpRS (**WRS**), l'HisRS (**HRS**) et la GluProRS (**EPRS**) avant d'être découverts dans d'autres aaRS (**Figure 14**).

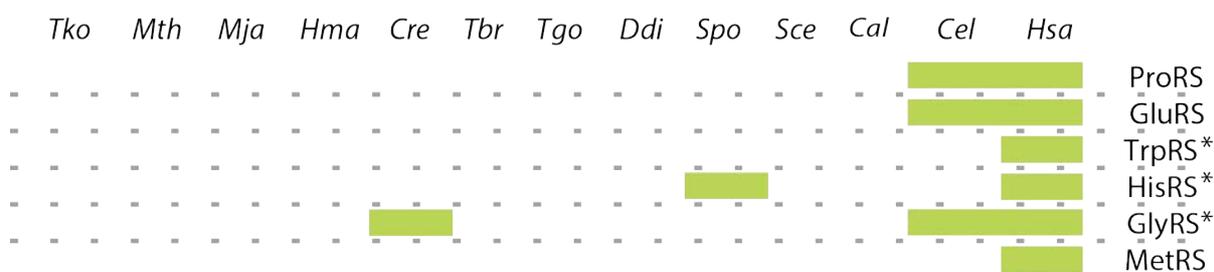


Figure 14. Répartition des domaines WHEP dans les aaRS dans différents organismes. En vert : présence du domaine WHEP dans la protéine (colonne de droite) de l'organisme précisé (ligne du dessus). Les aaRS suivies d'un astérisque (*) sont celles n'ayant pas été détectées dans le MSC malgré la présence du domaine WHEP. Les organismes sont présentés de la manière suivante : abréviation; nom latin complet (souche si nécessaire). Tko; *Thermococcus kodakarensis* (KOD1), Mth; *Methanothermobacter thermautotrophicus* (str Delta H), Mja; *Methanocaldococcus jannaschi* (DSM 2661), Hma; *Haloarcula marismortui* (ATCC 43049), Ddi; *Dictyostelium discoideum* (AX4), Spo; *Schizosaccharomyces pombe* (972 h-), Sce; *Saccharomyces cerevisiae* (S288C), Cal; *Candida albicans* (WO-1), Cel; *Caenorhabditis elegans*, Hsa; *Homo sapiens*, Tbr; *Trypanosoma brucei* (strain 927/4 GUTat10.1), Tgo; *Toxoplasma gondii* (strain ME49), Cre; *Chlamydomonas reinhardtii* (strain CC-1373)

La GluProRS, la TrpRS et la GlyRS d'*Homo sapiens* ont été cristallisées, permettant de découvrir que la structure tridimensionnelle des domaines WHEP forme invariablement une structure en hélice-tour-hélice (**Figure 15**) (Jeong et al, 2000 ; Yang et al, 2003 ; Qin et al, 2016). Les domaines WHEP permettent l'accrétion en complexe et peuvent lier l'ARN (notamment l'ARNm), comme le domaine WHEP de la GluProRS (Cahuzac et al, 2000), mais ils possèdent également des fonctions additionnelles, qui seront présentées dans le § VI.

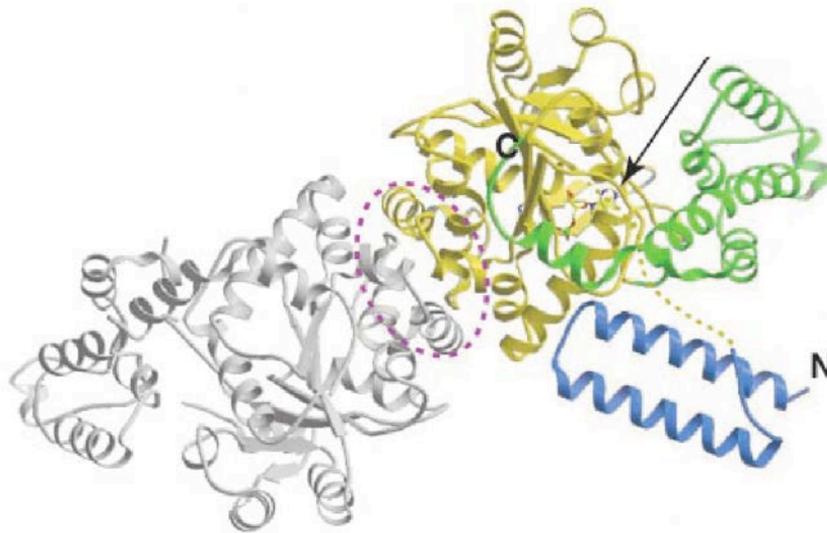


Figure 15. Structure cristallographique à une résolution de 2,1 Å de la TrpRS dimérique d'*H. sapiens* en interaction avec l'AMP, (Figure originale d'après Yang et al, 2003). L'un des deux dimères est présenté en couleurs. En bleu : domaine WHEP. En vert : domaine de liaison à l'anticodon. En jaune : domaine catalytique formant un pli de Rossmann. En gris : deuxième TrpRS. Entourré en pointillés violets : site d'interaction entre les deux TrpRS. N : partie N-terminale. C : partie C-terminale. La flèche pointe l'AMP.

Chez les eucaryotes, l'émergence du domaine « EMAP-II-like » (Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide II) permet d'augmenter l'efficacité d'aminacylation en *cis* (comme pour la MetRS d'*O. sativa*) ou en *trans* (comme pour p43 d'*H. sapiens*) des aaRS (Kaminska et al, 1999 ; Renaults et al, 2001). (Figure 16B), La structure de ce domaine ressemble à la protéine bactérienne interagissant avec les ARNt, Trbp111 dans sa forme dimérisée (tRNA Binding Protein) (Figure 16A)

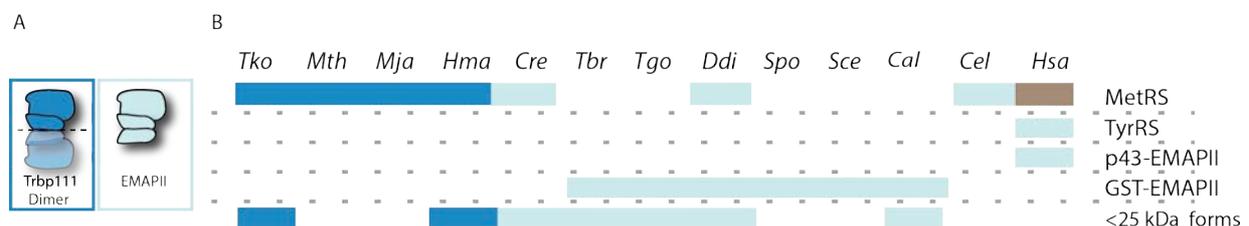


Figure 16. A. Structures schématiques de Trbp111 et EMAPII-like B. Distribution de ces domaines dans des aaRS ou protéines auxiliaires d'aaRS de différents organismes. En bleu foncé : domaines Trbp111-like. En bleu clair : Domaines Emapii-like. En gris : Domaine WHEP, ajouté pour comparaison Tko; Thermococcus kodakarensis (KOD1), Mth; Methanothermobacter thermautotrophicus (str Delta H), Mja; Methanocaldococcus jannaschi (DSM 2661), Hma; Haloarcula marismortui (ATCC 43049), Ddi; Dictyostelium discoideum (AX4), Spo; Schizosaccharomyces pombe (972 h-), Sce; Saccharomyces cerevisiae (S288C), Cal; Candida albicans (WO-1), Cel; Caenorhabditis elegans, Hsa; Homo sapiens, Tbr; Trypanosoma brucei (strain 927/4 GUTat10.1), Tgo; Toxoplasma gondii (strain ME49), Cre; Chlamydomonas reinhardtii (strain CC-1373).

IV.2.2 Chez les mammifères

A ce jour, le MSC des mammifères nommé complexe MARS est le plus imposant par la taille connu. Il associe 9 aaRS (la MetRS, l'AspRS, la LysRS, la LeuRS, l'ArgRS, la GlnRS, l'IleRS et la GluproRS, protéine de fusion issue d'un seul gène chez les mammifères) et 3 protéines auxiliaires p43, p38, p18, historiquement nommées ainsi en référence à leur taille, plus récemment renommées AIMP1, -2 et -3 (AIMP pour : **A**minoacyl-tRNA synthetase **I**nteracting **M**ultifunctional **P**rotein) (Bandyopadhyay et Deutscher, 1971 ; Mirande et al, 1983 ; Kerjan et al, 1994 ; Lee et al, 2004) (**Figure 18**).

p43 permet l'ancrage de la GlnRS et de l'ArgRS. P18 ancre la MetRS, au complexe, et p38 associe la LysRS, l'AspRS et la GluproRS ; la LeuRS et l'IleRS ne semble pas ancrées au complexe MARS par une interaction avec une protéine auxiliaire (Kaminska et al, 2009a). Afin d'accomplir leur rôle de protéines d'ancrage, les AIMP sont dotées de domaines spécifiques permettant l'interaction entre protéines. La séquence de p43 présente 60% d'identité avec celle d'Arc1 ce qui en fait son unique homologue structural. P43 possède un domaine EMAPII-like lui permettant d'interagir avec des ARNt et des protéines (Quevillon et al, 1997). La protéine p38 contient un domaine leucine-zipper et un domaine GST-like, utilisés pour l'interaction entre protéines ; p18 contient également un domaine GST-like. Des expériences de purification d'affinité à partir de foie de lapin ont permis de déterminer la stoechiométrie du MSC (Dias et al, 2013). Il se compose de deux exemplaires de la GluproRS, de la LysRS, de l'AspRS, de p43 et de p38, et d'un exemplaire de l'IleRS, de la MetRS, de la GlnRS, de l'ArgRS, de la LeuRS et de p18.

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, mais leurs résultats sont divergents. Les expériences de microscopie électronique ont révélé un complexe asymétrique compacté, contenant trois domaines en forme de Y avec un profond sillon central (Norcum et Boisset, 2002 ; Norcum, 1999). Les expériences de SAXS ont, quant à elles, révélé un complexe très étendu contenant des excroissances distribuées le long du complexe (Dias et al, 2013).

Le rôle essentiel du complexe MARS n'est pas clairement établi, puisque l'absence des protéines auxiliaires n'est pas létal pour la cellule, mais en revanche, fait diminuer la vitesse de croissance des cultures cellulaires de 30%. De plus, les souris AIMP1^{-/-}

développent des phénotypes de maladie auto-immune (Han et al, 2007). Le rôle du complexe MARS ne semble pas, à première vue, relié à l'augmentation des activités catalytiques des aaRS, selon les travaux effectués par l'équipe du Dr Waller (Mirande et al, 1983). Toutefois, la co-sédimentation du complexe MARS avec les polysomes et le complexe VEGA (ValRS-EF1A et le facteur d'échange de Guanine) (Kaminska et al, 2009b), pourrait indiquer un rôle en adéquation avec la théorie de l'acheminement des aa-ARNt aux ribosomes. Les travaux effectués ces dernières années ont permis de mettre en évidence que le MSC sert de plateforme de rétention pour les aaRSs, qui, lorsqu'elles en sont libérées, peuvent accomplir des fonctions additionnelles et parfois non-canoniques, ce sujet sera détaillé ultérieurement dans l'introduction (§ VI).

IV.2.3 Chez d'autres métazoaires

Le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* possède un complexe de 1 MDa composé de huit aaRS, nommément la MetRS, la LeuRS, l'IleRS, la GluRS, la GlnRS, l'ArgRS, la LysRS et la ValRS ainsi que d'une protéine d'assemblage, homologue de p38 du MSC de mammifère (Havrylenko et al, 2011) (**Figure 18**). Une seule protéine auxiliaire a été identifiée dans ce complexe, mais cependant, la MetRS possède un domaine ressemblant à p43 à son extrémité C-terminale, importante pour son ancrage et celui de l'ArgRS et de la GlnRS dans le MSC de ce vers (Havrylenko et al, 2010). La présence de ce domaine, permettant la formation du complexe, semble être primordiale puisque son absence provoque la stérilité des vers. Une autre différence notable est l'absence de la ProRS, dont la fusion avec la GluRS n'a pas eu lieu dans cet organisme.

Des protéines telles que la chaperonne Hsp90 et le facteur EF1A ont été co-purifiées avec ce complexe, suggérant un rôle de ce MSC dans l'acheminement des aa-ARNt au ribosome et le recyclage des ARNt. Ce MSC co-purifie avec EF1A et contient la ValRS, ce qui suggère que le complexe VEGA (Motorin et al, 1988) n'est pas encore apparu dans cet organisme, ou alors que ces deux complexes ont fusionné.

IV.2.4 Chez les protozoaires

IV.2.4.1 *Trypanosoma brucei*

Une étude récente menée chez *Trypanosoma brucei*, agent causal de

trypanosomiasés chez les animaux, a démontré l'existence d'un MSC d'une taille de 1,2 MDa, organisé comme celui des mammifères (Cestari et al, 2013) (**Figure 18**). Il se compose de 3 protéines auxiliaires MCP1-2-3 (**M**ars **C**omplex-associated **P**roteins) qui lient au moins 6 aaRS : la ProRS, la MetRS, l'AspRS, la GlnRS, l'AlaRS et la TrpRS. La présence de la GluRS, de l'IleRS, de la GlyRS et de la CysRS dans le MSC n'a pas pu être confirmée lors d'expériences de purification d'affinité couplées à l'identification par spectrométrie de masse, malgré leur capacité à migrer à une masse similaire à celle du MSC en gel natif.

Les protéines auxiliaires ont des homologues issus de différentes espèces. Par exemple, MCP-1 semble plus proche d'Arc1 de *S. cerevisiae*, alors que MCP-2 est proche de la protéine bactérienne Trbp111. Des expériences *in vitro* ont montré que MCP-2 est capable de lier des ARNt, tout comme Trbp111 et Arc1. MCP-3 présente des similarités de séquence avec la protéine d'édition bactérienne Ybak. Cette dernière est connue pour deacyler l'Ala-ARNt^{Pro} et le Cys-ARNt^{Pro}, compensant ainsi l'absence de fonction d'édition de la ProRS procaryotique (Ruan et Soll, 2005).

L'association des synthétases en complexe provoque l'amélioration de leurs activités catalytiques. En effet, il a été démontré *in vitro* que l'efficacité catalytique de la MetRS en interaction avec MCP-2 est augmentée. La présence du complexe augmente également la virulence du parasite, puisqu'une souche délétée du gène codant MCP-2 se montre moins virulente qu'une souche sauvage, ce qui en fait une cible intéressante pour des traitements potentiels des trypanosomiasés.

IV.2.4.2 *Toxoplasma gondii*

L'agent causal de la toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, possède un MSC ayant une taille de 1 MDa (Van Rooyen et al, 2014) (**Figure 18**). Il se localise dans le cytoplasme des cellules et il comporte 4 aaRSs : la MetRS, la GluRS, la TyrRS et la GlnRS. Ces 4 aaRS interagissent avec une protéine auxiliaire, Tg-43, *via* son domaine GST-like partageant 20% d'identité avec celui d'Arc1 de *S. cerevisiae*. Tg-p43 contient également un domaine de liaison à l'ARNt, présentant 25% d'identité à celui d'Arc1. En bien des points, ce MSC est comparable à celui de *S. cerevisiae* : ces deux MSC ne contiennent qu'une seule protéine auxiliaire, Tg-43 et Arc1, qui possèdent des domaines similaires, la MetRS et la GluRS font toutes deux partie des deux MSC.

A l'heure actuelle, le rôle de ce complexe n'a pas encore été élucidé puisque la

délétion de Tg-43 n'affecte pas la pathogénicité de la souche et qu'on ne sait pas, par exemple, si l'association en complexe augmente l'efficacité catalytique des aaRS qui y participent.

IV.2.4.3 *Plasmodium*

Récemment, l'existence potentielle d'un MSC chez *Plasmodium falciparum*, agent causal du paludisme, a été soulevée (Bour et al, 2016). En effet, une protéine membranaire nommée tRIP est capable de lier les ARNt humains et possède un domaine de liaison aux ARNt homologues à Trbp111 ainsi que des homologies de séquences avec Arc1 et Tg-43.

IV.2.5 Chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le plus petit MSC eucaryote connu à ce jour est celui de *S. cerevisiae*, et se compose d'une protéine « non-synthétasique » : Arc1, de la MetRS (MRS) et de la GluRS (ERS), c'est pourquoi on le nomme également complexe AME (**Figure 18**). Arc1 a d'abord été identifié comme une protéine se liant aux quadruplex d'acides nucléiques et nommée G4plp (Frantz et Gilbert, 1995), puis comme facteur d'export de l'ARNt (Grosshans et al., 2000 ; Simos et al., 1996).

Le mode d'assemblage de ce complexe est bien connu puisqu'il existe une structure cristallographique des domaines N-terminaux de la MetRS et de la GluRS en interaction avec le domaine N-terminal d'Arc1 (**Figure 17A et 17B**) (Simader et al., 2006). Les domaines N-terminaux de ces 3 protéines adoptent une conformation de type GST-like, et permettent l'interaction d'Arc1 avec la MetRS d'une part, et avec la GluRS d'autre part, selon une stoechiométrie 1-1-1.

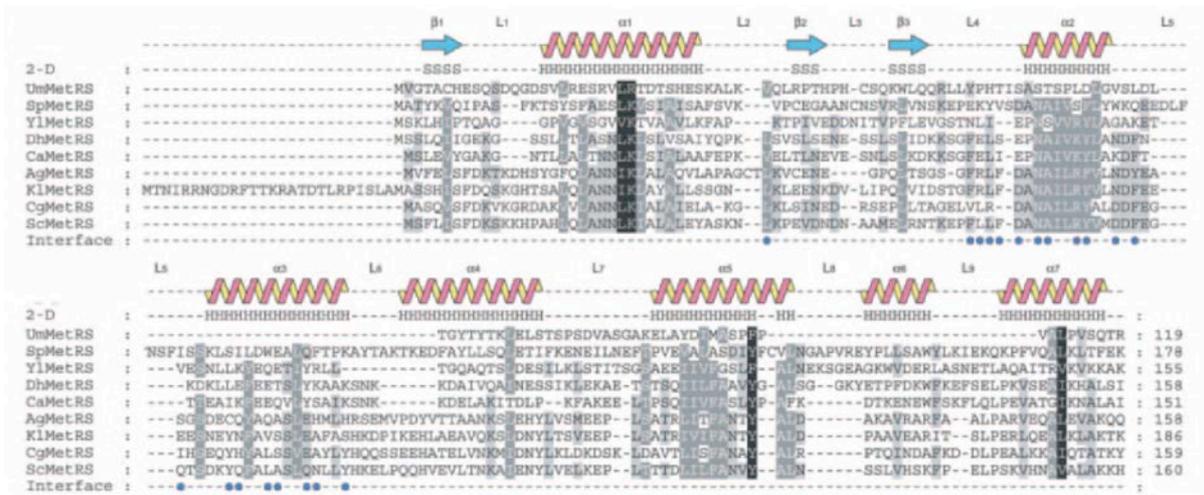
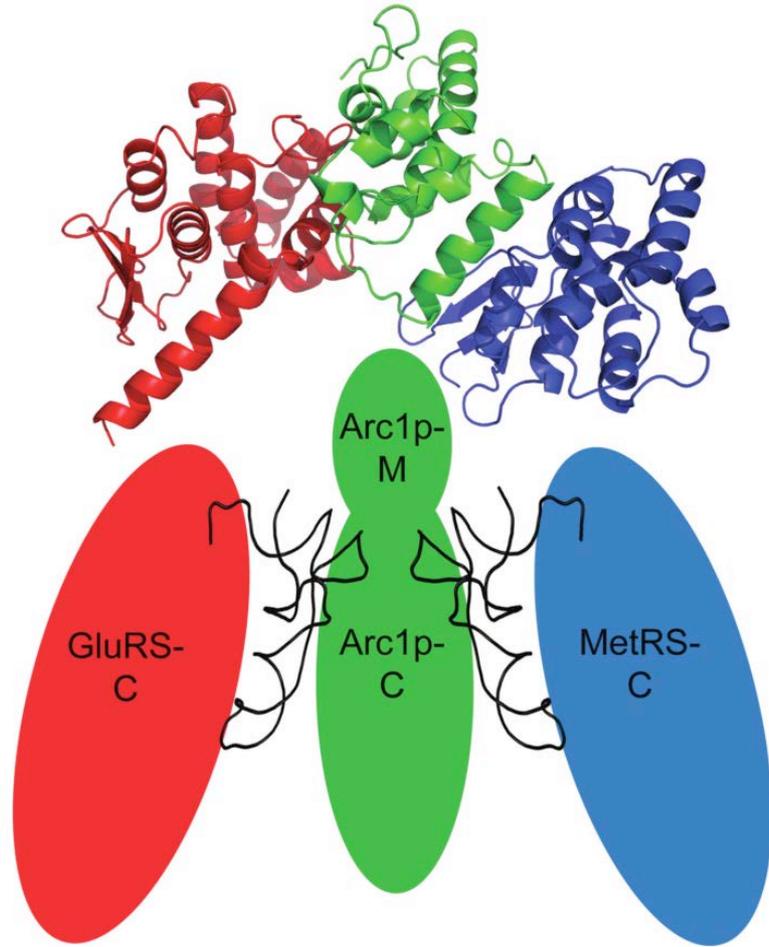


Figure 17. A. Structure schématique du complexe AME de *S. cerevisiae*, (d'après Koehler, 2013). En rouge : GluRS. En vert : Arc1. En bleu : MetRS. Les structures cristallographiques des domaines N-terminaux ont été obtenues par diffraction aux rayons-X.

B. Résidus de la MetRS interagissant avec Arc1, sur la base de la structure déterminée (d'après Simader, 2006). *Ustilago maydis* (Um), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Yarrowia lipolytica* (Yl), *Debaryomyces hanseni* (Dh), *Candida albicans* (Ca), *Kluyveromyces lactis* (Kl), *Ashbya gossypii* (Ag) and *S.cerevisiae* (Sc)

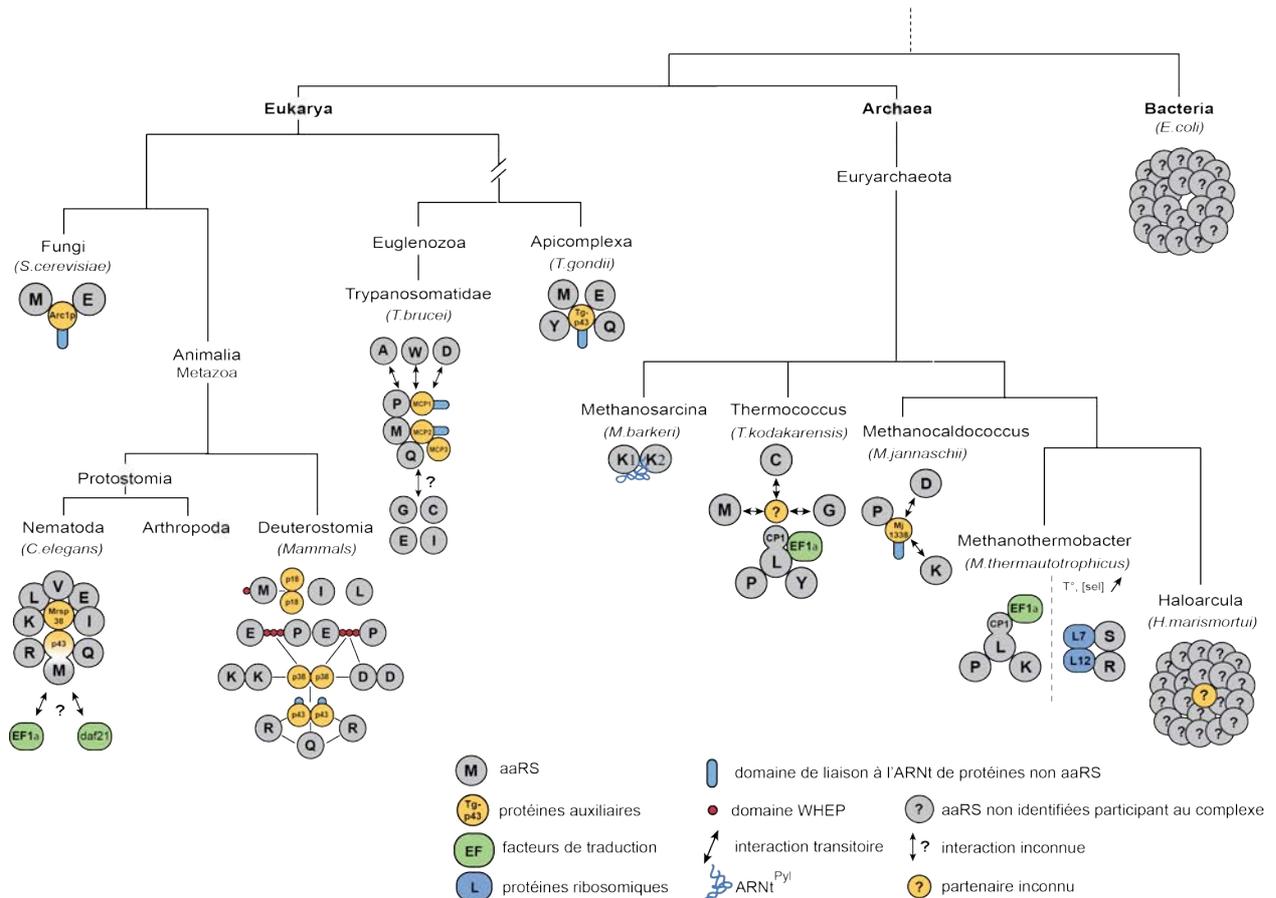
Le domaine central d'Arc1 est riche en lysine et en alanine, ce qui lui permet d'interagir de manière non-spécifique avec les ARN. Enfin, la partie C-terminale adopte

une conformation de type OB-fold, similaire aux domaines EMAPII ou Trbp111 des bactéries, et permet à Arc1 d'interagir de façon plus spécifique avec les ARNt. *In vitro*, Arc1 peut se lier aux ARNt^{Glu} et aux ARNt^{eMet}, mais également aux ARNt^{Phe}, ARNt^{Lys}, ARNt^{Arg}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Pro} et ARNt^{Ala} (Deinert et al., 2001). En revanche ces liaisons sont restreintes aux ARNt^{Glu} et ARNt^{eMet} lorsque le MSC est formé (Koehler et al., 2013). Il convient de souligner que l'ARNt^{iMet} ne se lie que très faiblement à Arc1.

Arc1 possède un NES fort situé dans sa séquence peptidique, l'empêchant ainsi de rester dans le noyau ce qui en fait une protéine cytoplasmique. Même lorsqu'un NLS puissant comme celui du SV40 est fusionné à Arc1, cette dernière reste cytoplasmique (Galani, 2005). La MetRS et la GluRS associées au complexe sont ainsi séquestrées dans le cytoplasme, mais présentent néanmoins une localisation cytoplasmique et nucléaire lorsqu'elles n'interagissent pas avec Arc1 (Galani 2001). La délétion du gène *ARC1* n'est pas létale, mais provoque un ralentissement de la croissance pouvant être expliqué par le fait que l'association à Arc1 améliore les constantes catalytiques des 2 synthétases qui s'y lient. La formation du MSC permet en effet d'augmenter de 10 fois l'efficacité catalytique de la GluRS, de par l'augmentation de son affinité pour l'ARNt^{Glu} (Simos et al, 1996 ; Graindorge et al, 2005). Selon les études, les données cinétiques de la MetRS varient fortement. Ce constat est détaillé ultérieurement dans la partie « le système méthionine chez les eucaryotes » (§ V.2.2).

Ainsi, il a été proposé qu'au sein du MSC, Arc1 délivre les ARNt dans une conformation optimale à ses partenaires, ce qui facilite leur reconnaissance (Simos et al, 1996).

Dans la première partie de ma thèse, vous aurez l'occasion d'en apprendre plus sur le rôle dynamique du complexe AME, mis en lumière par un article traitant du dialogue nucléo-mitochondrial.



V Le système méthionine dans l'aminocyclation

La méthionine (Met) joue un rôle crucial, puisqu'elle est le premier aa incorporé dans toutes les protéines. Le gène de l'ARNt^{Met} qui permet l'incorporation de cette première Met est d'ailleurs le gène d'ARNt le plus conservé au sein du règne du vivant (Marck et Grosjean, 2002) (**Figure 19**). En plus d'être l'aa débutant toutes les protéines synthétisées par le ribosome, la Met est également incorporée au cours de l'élongation de la chaîne polypeptidique. Afin d'accomplir les deux rôles distincts d'initiation et d'élongation, chaque cellule possède deux espèces d'ARNt^{Met} distinctes, spécialisées dans l'initiation ou l'élongation de la traduction.

Après avoir brièvement présenté ces deux rôles, j'expliquerai comment la Met peut être utilisée d'une part pour l'initiation, d'autre part pour l'élongation, chez les procaryotes et les eucaryotes.

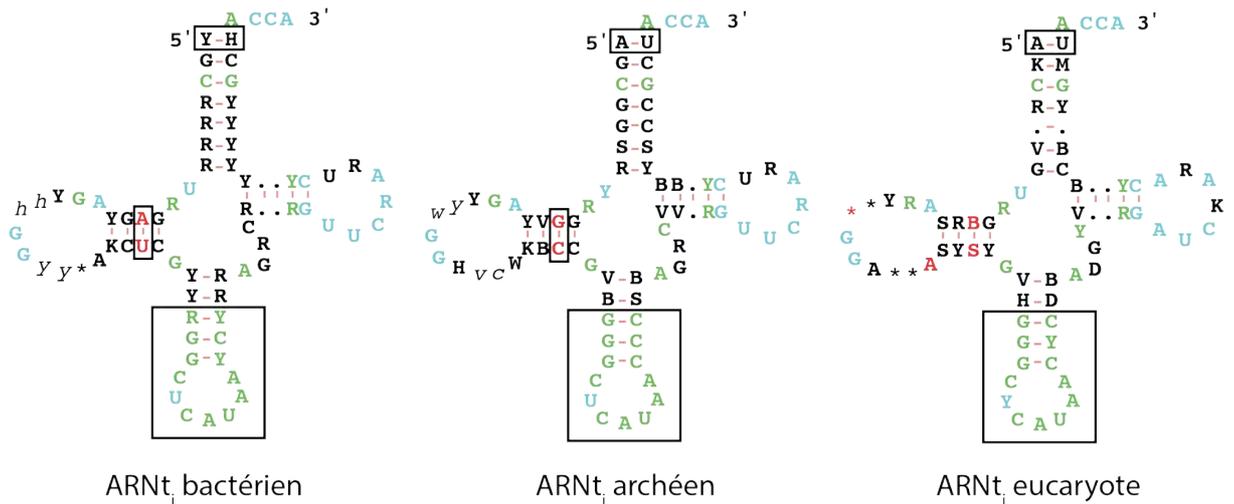


Figure 19. Représentation en feuille de trèfle des séquences matures des ARNt bactériens, archéens et eucaryotes, basées sur la séquence d'ADN (Adaptation de Marck, 2002). En vert : base systématiquement conservée dans les ARNt_i du domaine. En bleu : ce qui est universellement conservé dans tous les ARNt. En rouge : base conservée dans l'ARNt au sein du domaine. * : position toujours manquante. Y : pyrimidine (C ou T) ; R : purine (A ou G) ; H, h : pas G ; V : pas T ; K : Keto (G ou T) ; B : pas A ; W : Weak (A ou T) ; M : amino (A ou C) ; • : n'importe quelle base. Les lettres en minuscule et italique correspondent aux positions parfois absentes dans certaines espèces.

V.1 Le système méthionine chez les procaryotes

D'une manière générale chez les procaryotes l'ARNt_i^{Met}, également appelé ARNt_f^{Met}, est aminoacylé par la MetRS, puis le Met-ARNt_f^{Met} est formylé par la méthionyl-ARNt^{Met} formyltransférase (Clark et Marcker, 1966). Chez les bactéries, il existe une initiation de la traduction à partir de codons non-AUG, les codons GUG ou UUG, uniquement décodés par le fMet-ARNt_f^{Met}. L'initiation de la traduction de plus de 10 % des ARNm d'*E. coli* se fait de manière GUG- ou UUG-dépendante. Le codon AUG reste néanmoins le plus utilisé pour l'initiation de la traduction. C'est celui qui forme la liaison la plus stable avec l'anticodon CAU du fMet-ARNt_f^{Met} et ainsi, il permet une initiation 1,5 à 3 fois plus efficace qu'une initiation GUG-dépendante et 3 à 6 fois plus efficace qu'une initiation UUG-dépendante (Barrick et al, 1994 ; Schmitt et al, 1996).

A l'inverse de la fMet, les Met incorporées lors de la phase d'élongation de la synthèse protéique sont uniquement codées par un codon AUG et sont insérées par un ARNt^{Met} élongateur (ARNt_e^{Met}, parfois abrégé ARNt_m^{Met} dans certains articles).

V.1.1 La MetRS procaryotique

Malgré d'importantes différences de séquence qui distinguent les deux ARNt^{Met} (pour i : C₁-A₇₂, inversion Purine-Pyrimidine 11-24, et les 3 pdb G₂₉-C₄₁, G₃₀-C₄₀, G₃₁-C₃₉.) ceux-ci sont reconnus par une seule et même MetRS. Ainsi, pour *E. coli*, il a été montré par des expériences d'aminocyclation *in vitro* que les bases C₃₄, A₃₅, U₃₆ de l'anticodon constituent un déterminant d'identité (Meinzel et al, 1991). En effet, une mutation de la base G₃₄ en C₃₄ de l'anticodon de l'ARNt^{Ile}(GAU) surproduit puis purifié, en fait un bon substrat pour la MetRS. A l'inverse, une interversion du A₃₅ et du U₃₆ de l'anticodon de l'ARNt^{eMet}, surproduit puis purifié, provoque une baisse dramatique de l'affinité de la MetRS pour cet ARNt.

Les structures tridimensionnelles des MetRS procaryotiques d'*E. coli*, *Thermus thermophilus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Aquifex aeolicus* (**Figure 20**) ont été résolues (Mechulam et al, 1999 ; Sugiura et al, 2000 ; Ingvarsson et al, 2010 ; Nakanishi et al, 2005). Les MetRS possèdent comme toutes les aaRS de classe I le domaine de Rossmann interrompu par des boucles flexibles nommées CP pour « connective peptide » qui sont insérées entre les 2 moitiés du domaine de Rossmann et qui se trouvent en amont de la séquence signature KMSKS conservée au sein des aaRS de classe I.

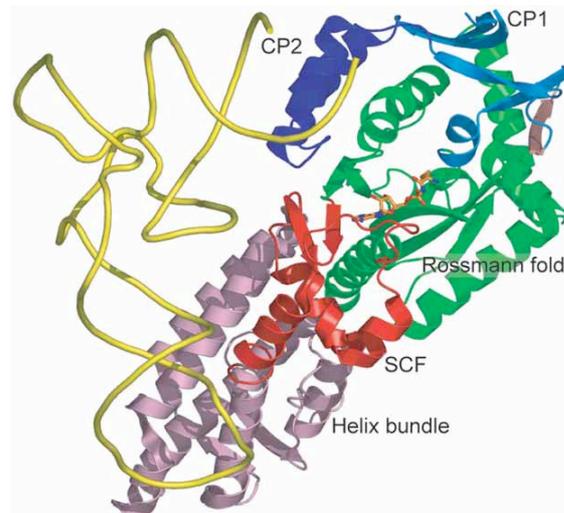


Figure 20. Structure cristallographique de la MetRS d'*Aquifex aeolicus* à 2,7 Å. Figure d'après Nakanishi, 2005. En vert : domaine de Rossmann. En rouge : SCF : « Stem Contact Fold ». En rose : domaine en hélices α . En bleu : insertions CP1 et CP2. En jaune : ARNt^{eMet}.

Chez *E. coli*, les paires de cystéines 145-148 et 158-161 de la MetRS forment un domaine en doigt de zinc, qui ne semble pas exister dans la MetRS de *Mycobacterium tuberculosis* puisqu'aucun atome de zinc n'est retrouvé dans cette MetRS purifiée (Kim et al, 1998). Le domaine C-terminal de la MetRS permet l'interaction avec l'ARNt^{Met}, et

possède une structure ressemblant à l'homodimère Trbp111. Ce domaine C-terminal permet l'homodimérisation, propriété commune de certaines MetRS procaryotiques, à l'exception de celle d'*A. aeolicus* qui ne le possède pas, ainsi que la stabilisation des ARNt (Cassio et Waller, 1971 ; Crépin, 2002 ; Morales, 1999).

V.1.2 La formylation de l'ARNt^{Met}

L'étape de formylation du Met-ARNt^{Met} est effectuée par la formyltransférase, dont celle de *E. coli* a été cristallisée (Schmitt et al, 1996). Le domaine N-terminal consiste en un pli de Rossmann ressemblant à celui des aaRS de classe I, auquel est intégré une boucle flexible. La partie C-terminale de la formyltransférase contient un tonneau β , rappelant le pli OB (Murzin, 1993), (« Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding ») se composant habituellement de cinq brins bêta formant un petit tonneau, permettant la liaison aux nucléotides, retrouvé dans des aaRS mais également d'autres sortes de protéines liant l'ADN et l'ARN. Cette partie C-terminale ainsi que la boucle flexible seraient impliqués dans la liaison de l'ARNt^{Met}.

La formylation de la Met N-terminale est conservée chez les bactéries, les mitochondries et les chloroplastes, suggérant un rôle crucial de cette modification de la Met initiatrice. Cependant, la délétion du gène codant la formyltransférase bactérienne n'est pas létale. Chez *E. coli*, elle provoque un retard de croissance sévère, pouvant être contrebalancé par une surproduction du facteur d'initiation IF2, mais chez *Pseudomonas aureginosa* et *Staphylococcus aureus*, les effets sont de moindre importance (Baumstark et al, 1977 ; Guillon et al, 1992 ; Newton et al, 1999). Le rôle n'en est pas moins important, puisque chez ce dernier, l'absence de fMet provoque des défauts métaboliques : l'abrogation du métabolisme du pyruvate, une absence de dégradation de l'arginine (alors que le catabolisme de l'arginine génère de l'ATP en conditions anaérobiques) et une plus grande sensibilité aux antibiotiques (Mader et al, 2013).

V.2 Le système méthionine chez les Eucaryote

Chez les Eucaryotes, le système méthionine diffère puisqu'il y a, en plus de la traduction cytoplasmique, un système de traduction mitochondrial nécessaire à l'expression des protéines codées par le génome de cet organite.

Il existe ainsi un système méthionine dédié à chaque compartiment réalisant de la synthèse protéique ribosomique. La traduction mitochondriale a conservé de *S. cerevisiae* jusqu'à l'Homme l'existence d'un fMet-ARNt_i^{Met} ainsi qu'un ARNt_e^{Met} (Canaday, 1980 ; Galper et Darnell, 1969). Ce système méthionine mitochondrial fait l'objet de la première partie de ce paragraphe. La traduction cytoplasmique nécessite également, tout comme la traduction bactérienne et organellaire, l'existence de deux types d'ARNt^{Met} : un élongateur et un initiateur, en revanche chez les eucaryotes le Met-ARNt_i^{Met} cytoplasmique n'est pas formylé. Ce système méthionine cytoplasmique fait l'objet de la seconde partie de ce chapitre.

Ces parties sont principalement axées sur les systèmes méthionines de *S. cerevisiae*, mais les systèmes méthionines d'autres organismes seront tout de mêmes évoqués lorsque des différences majeures avec le système méthionine de *S. cerevisiae* existent, ou lorsqu'ils apportent des éléments de compréhension essentiels.

V.2.1 Le système méthionine mitochondrial

V.2.1.1 La MetRS mitochondriale

La MetRS mitochondriale, capable de reconnaître l'ARNt_i^{Met} et l'ARNt_e^{Met}, ne possède pas de doigts de zinc dans son domaine CP1, contrairement à la MetRS d'*E. coli*. Cependant, l'absence de ce doigt de zinc et donc du zinc n'est pas important pour l'activité d'édition puisque la MetRS mitochondriale de *S. cerevisiae* est capable d'éditer par correction pré-transfert l'homocystéyl~AMP *in vivo* et *in vitro* (Jakubowski, 1991 ; Senger, 2001). Cette correction pré-transfert conduit au transfert de l'homocystéine (Hcy) sur une thiolactone et non pas sur l'extrémité 3' de l'ARNt^{Met}, ce qui empêche son incorporation dans les protéines (Jakubowski, 2011).

V.2.1.2 La formylation de l'ARNt^{Met} mitochondrial

Tout comme chez les bactéries, l'ARNt^{Met} mitochondrial est d'abord aminoacylé puis formylé (fMet-ARNt^{Met}). Les premières évidences de l'existence d'un fMet-ARNt^{Met} mitochondrial chez les eucaryotes proviennent d'expériences effectuées sur des cellules HeLa traitées à la puromycine, qui accumulent de la puromycine-Met-formylée (Leder et Bursztyn, 1966). Par la suite, le séquençage de la partie N-terminale des protéines mitochondriales traduites dans les mitochondries de *Bos taurus*, *S. cerevisiae* et *Neurospora crassa* a confirmé que tout comme chez les bactéries, le premier aa incorporé lors de la synthèse protéique mitochondriale est une fMet (Epler et al, 1970 ; Galper et Darnell, 1969 ; Halbreich et Rabinowitz, 1971).

La méthionyl-ARNt formyltransférase des eucaryotes possède une localisation exclusivement mitochondriale (Epler et al, 1970 ; Galper et Darnell, 1969 ; Halbreich et Rabinowitz, 1971). Chez *S. cerevisiae*, *B. taurus* et *N. crassa*, elle est codée par le génome nucléaire, ce qui permet d'étudier aisément son impact génétique (SGD, <http://www.yeastgenome.org>). Afin d'étudier le caractère essentiel de la formylation chez *S. cerevisiae*, l'équipe du Dr Rajbhandari a créé des souches dans lesquelles les gènes codant la méthionyl-ARNt formyltransférase ou l'enzyme synthétisant le donneur du groupement formyl sont délétés, ce qui provoque une déficience de formylation. (Li et al, 2000) Cette étude a permis de montrer que l'absence de formylation du Met-ARNt^{Met} n'impactait pas la synthèse protéique mitochondriale, puisque les souches ont une croissance normale sur milieu non fermentescible et un taux normal de phénotype « petite » (souches ayant perdu la capacité à respirer) sur milieu fermentescible. Chez ces mutants, l'absence du fMet-ARNt^{Met} pourrait néanmoins être contrebalancée par une surproduction du facteur d'initiation IF2 mitochondrial, à l'image des souches d'*E. coli* déficientes en méthionyl-ARNt formyltransférase qui surproduisent le facteur d'initiation IF2 (Baumstark et al, 1977).

Chez l'Homme et les métazoaires en général, le caractère essentiel de la formylation fait débat. En effet, l'IF2 mitochondrial bovin est capable d'initier la traduction de *S. cerevisiae* à partir de Met-ARNt^{Met} non formylé (Tibbetts et al, 2003). En revanche, il existe des maladies associées à des défauts de formylation du Met-ARNt^{Met}. Par exemple, le syndrome de Leigh est provoqué par des mutations dans le gène codant la méthionyl-ARNt formyltransférase (Tucker et al, 2011). Au niveau moléculaire, les personnes atteintes présentent une diminution accrue des niveaux de fMet-ARNt^{Met},

entraînant une faible formylation de Cox1, sous-unité du cytochrome *c* oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire). Or la formylation de Cox1 est indispensable pour l'assemblage du complexe IV (Hinttala et al, 2015), l'absence de formylation provoque donc un défaut d'assemblage du complexe IV et au niveau physiologique, des déficiences de la chaîne respiratoire mitochondriale (OXPHOS).

V.2.2 Le système méthionine cytoplasmique

Chez tous les eucaryotes étudiés à ce jour, il n'existe qu'un seul gène nucléaire codant pour une MetRS cytoplasmique : jusqu'à présent, il était logique et admis que les deux ARN^t_{Met}, élongateur et initiateur, nécessaires à la traduction cytoplasmique étaient aminoacylés par une unique MetRS, dans le cytoplasme ; nous verrons qu'un certain nombre de résultats que obtenus durant ma thèse suggèrent que la méthionylation des ARN^t_{Met} cytoplasmiques est plus complexe qu'imaginée au départ.

V.2.2.1 Modifications post-transcriptionnelles de l'ARN^t_{Met} cytoplasmique de *S. cerevisiae* et régulations

L'ARN^t_{Met} de *S. cerevisiae* contient 11 modifications post-transcriptionnelles différentes, la plupart non-essentiels et de fonctions inconnues (**Figure 21**). On sait en revanche que la modification m¹A₅₈ est indispensable à la stabilité de l'ARN^t_{Met} et essentielle à *S. cerevisiae* (Anderson et al, 1998). Cette modification est accomplie par la 1-méthyladénosine méthyltransférase, dimère formé de Gcd10 et Gcd4. Les ARN^t_{Met} ne possédant pas cette modification m¹A₅₈ sont polyadénylés puis dégradés par la voie de surveillance nucléaire Trf4/Rrp6.

Rit1, 2'-O-ribosyl phosphate transférase, catalyse la ribosylation de l'A₆₄ de l'ARN^t_{Met}, modification conservée chez toutes les levures, ce qui empêche ensuite cet ARN^t d'interagir avec le facteur d'élongation eEF1A (Glasser et al, 1991) (**Figure 21**). Ainsi, l'ARN^t_{Met} ribosylé en A₆₄ est discriminé de l'ARN^t_{eMet} au cours de la traduction. Dans les souches *rit1Δ*, dépourvues de Rit1, l'ARN^t_{Met} décode, en plus des AUG initiateurs, les AUG intra-séquence. Ces souches sont donc capables de croître sans ARN^t_{eMet} (Aström et Bystrom, 1994 ; Shin et al, 2011).

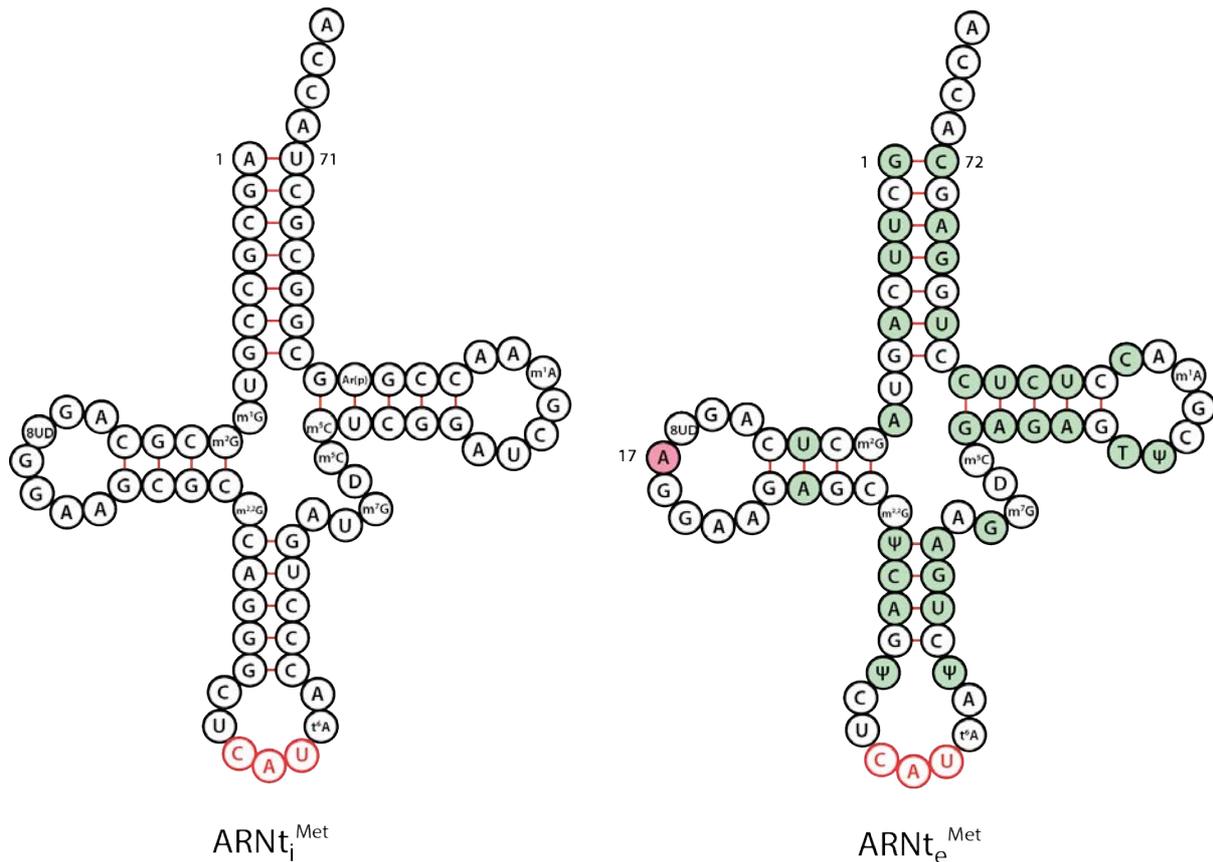


Figure 21. Différences entre les $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$ et $\text{ARNt}_e^{\text{Met}}$ de *S. cerevisiae* et leurs modifications. En vert : pdb différentes de l' $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$ dans l' $\text{ARNt}_e^{\text{Met}}$. En rouge : Anticodon. m¹G : 1-méthylguanosine. m²G : 2-méthylguanosine. 8UD : dihydrouridine. m^{2,2}G : N2,N2-diméthylguanosine. t⁶A : N6-thréonylcarbamoyladénosine. m⁷G : 7-méthylguanosine. m⁵C : 5-méthylcytidine. m¹A : 1-méthyladénosine. Ar(p) : 2'-O-ribosyladénosine (phosphate). Ψ : pseudouridine.

L' $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$ est la cible de cascades de régulations métaboliques. Dans des cellules HeLa, il a été montré qu'il était dégradé spécifiquement en réponse à un stress thermique de 43°C alors que d'autres ARNt ne le sont pas ($\text{ARNt}_e^{\text{Met}}$, ARNt^{Lys} , ARNt^{Leu} , ARNt^{Pro}) (Watanabe et al, 2013). Au contraire, l' $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$ n'est pas dégradé dans des conditions de stress à pH acide, stress oxydatif (ethanol ou peroxyde d'hydrogène), stress salin, démontrant la spécificité de la dégradation lors du stress thermique. Cette dégradation est provoquée par la voie mTOR, et plus précisément par les endonucléases Xrn1 et Xrn2. Le stress thermique provoque également une accumulation de l' $\text{ARNt}_i^{\text{Met}}$ dans le noyau au cours du temps (en heures), ce qui entraîne une diminution de la traduction.

V.2.2.2 Les caractéristiques structurales de la MetRS cytoplasmique

A la différence de la MetRS bactérienne, la MetRS cytoplasmique eucaryotique est monomérique (Fasiolo et al, 1985). En effet, la MetRS eucaryotique ne possède pas de domaine Trbp111-like à son extrémité C-terminale, c'est pourquoi elle ne dimérise pas. En revanche, la MetRS de plante *Oryza sativa* a fait l'acquisition d'un domaine EMAP II-like (**Figure 22**), ressemblant en partie à Trbp111 dimérisé (Kaminska et al, 1999) permettant d'augmenter l'affinité de la MetRS pour l'ARNt^{Met} mais ne permettant pas sa dimérisation (Kaminska et al, 1999).

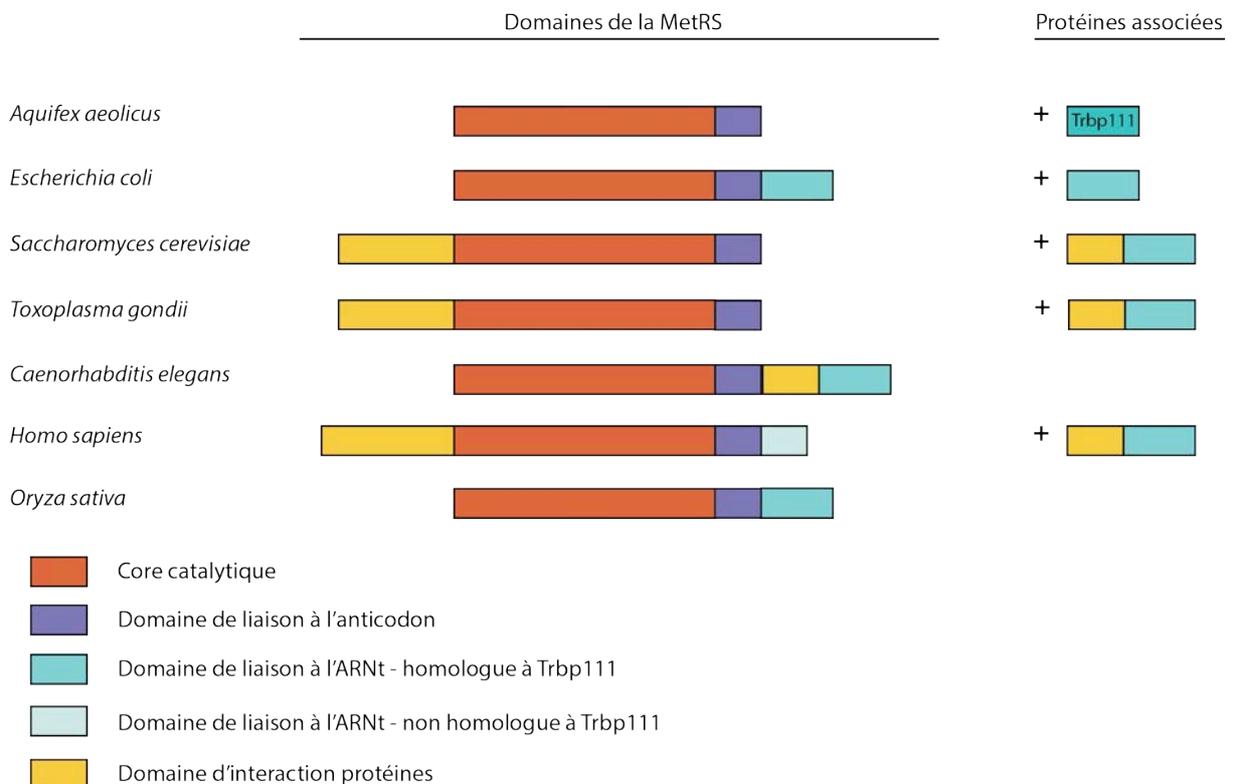


Figure 22. Organisation modulaire des MetRS cytoplasmiques de différents organismes.

Tout comme la MetRS d'*E. coli*, la MetRS cytoplasmique de *S. cerevisiae* possède un domaine CP1 qui contient un groupe de cystéines aux positions 337, 340, 350, 353 formant un doigt de zinc indispensable à son activité d'aminacylation de l'ARNt^{Met} purifié issu de *S. cerevisiae* (Senger et al, 2001) (**Figure 24**). Le domaine CP1 confère à la MetRS cytoplasmique, tout comme à la MetRS mitochondriale, la capacité d'éditer l'Hcy avant son transfert, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Jakubowski, 1991 ; Senger et al, 2001). Enfin, la MetRS cytoplasmique contient une glissière à leucines (**Figure 23**), élément souvent retrouvé dans les facteurs de transcription, en sa partie N-terminale, se situant

entre les résidus 110 et 137 (Walter et al, 1989). Une information plus anecdotique, est que la MetRS contient une sérine acétylée à son extrémité N-terminale.

A ce jour, il n'existe pas de structure tridimensionnelle de MetRS eucaryotique entière, mais néanmoins le domaine N-terminal de la MetRS de *S. cerevisiae* a été cristallisé (**Figure 23**). Ce domaine N-terminal constitue une extension par rapport aux MetRS procaryotiques (**Figure 22**).

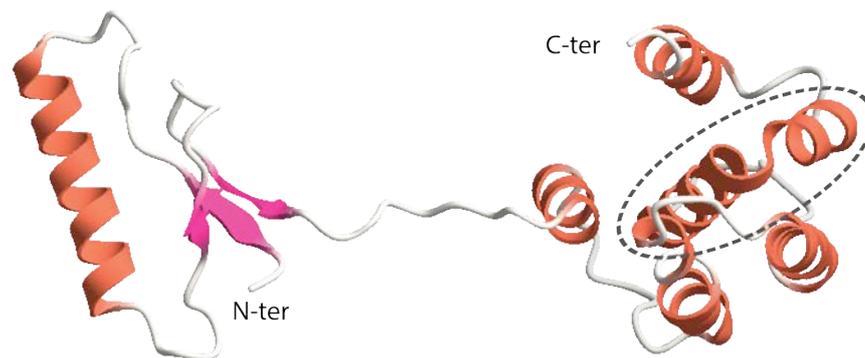


Figure 23. Structure cristallographique du domaine N-terminal de la MetRS de *S. cerevisiae*, à une résolution de 2,2 Å. En orange : hélices α ; en rose : brins β ; N-ter : partie N-terminale ; C-ter : partie C-terminale. Cette structure se termine au 162^{ème} aa. Entouré en pointillé : glissière à leucine.

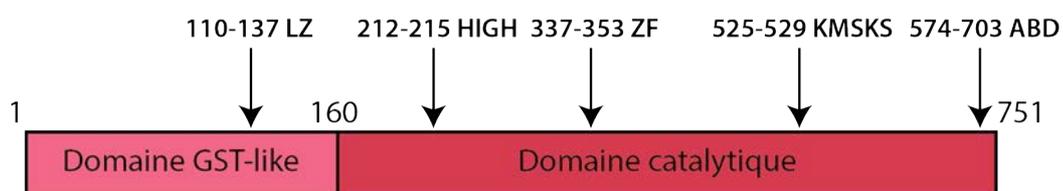


Figure 24. Domaines spécifiques de la MetRS cytoplasmique de *S. cerevisiae*. LZ : glissière à Leucines. ZF : Doigt de zinc. ABD : Domaine de liaison à l'anticodon.

Bien que le gène *MES1* codant la MetRS cytoplasmique de levure soit un gène essentiel (Walter et al, 1983), la MetRS mitochondriale est capable de compléter l'absence de MetRS cytoplasmique mais uniquement si l'ARN_t^{Met}_{e ou ARN_t^{Met}_i sont surproduits, et cette complémentation est nettement plus efficace lorsque l'ARN_t^{Met}_i est surproduit (Senger et al, 2001).}

V.2.2.3 Les caractéristiques cinétiques de la MetRS cytoplasmique

Chez *S. cerevisiae*, les déterminants d'identité majeurs d'une MetRS (tronquée de son domaine N-terminal) pour son ARN_t^{Met} (transcrit *in vitro*, mais dont le nucléotide A₁ a été remplacé par G₁, pour des raisons d'efficacité de transcription par la T7 RNA polymérase) sont les 3 bases de l'anticodon : C₃₄, A₃₅, U₃₆ et la base discriminatrice A₇₃ (Despons et al, 1991 ; Senger et Fasiolo, 1996), alors que cette dernière n'est pas un déterminant d'identité pour les MetRS bactériennes (Schulman et Pelka, 1983). De plus, la conformation de l'ARN_t ainsi que certain nucléotides du bras D sont primordiaux pour la reconnaissance par la MetRS.

Chez *S. cerevisiae*, l'association avec Arc1 ou non permet de modifier l'affinité de la MetRS pour son ARN_t^{Met}. Cependant, les données cinétiques varient selon les études :

- Des expériences d'aminacylation réalisées avec une MetRS native surproduite et purifiée dans une souche RS453 *arc1Δ*, avec un ARN_t^{Met} (espèce non précisée) partiellement purifié de *S. cerevisiae*, montrent une augmentation de 3 à 4 fois de l'efficacité catalytique de la MetRS en présence d'Arc1, exprimé en système hétérologue bactérien puis purifié (Golinelli-Cohen et al, 2007).

- Les expériences d'aminacylation réalisées avec de la MetRS purifiée à partir de *S. cerevisiae*, dont la séquence a été tronquée de son domaine N-terminal, avec un ARN_t^{Met} purifié de *S. cerevisiae* (par le Dr. G. Keith, purification par contre-courant), montrent une augmentation de 50 fois de l'efficacité catalytique de la MetRS en présence d'Arc1, exprimé dans une souche de *S. cerevisiae* RS453 sous la forme d'une protéine de fusion avec la protéine A de *S. aureus* (Despons et al, 1992 ; Simos et al, 1996). Cependant, ce résultat ne corrèle pas avec l'étude du Dr Simos et de ses collègues, qui ont démontré qu'Arc1 (surproduit en système hétérologue bactérien et purifié par chromatographie d'affinité sur matrice Ni-Nta) interagit très faiblement avec l'ARN_t^{Met}, (issu d'ARN_t total commercial de chez Roche, détecté par Northern Blot par une sonde spécifique) *in vitro*. De ce fait, le mécanisme par lequel Arc1 augmente l'efficacité catalytique de la MetRS vis à vis de son ARN_t^{Met} reste énigmatique.

- Enfin, des expériences d'aminacylation, réalisées avec un complexe AME surproduit dans *E. coli* puis purifié et de l'ARN_t total de levure purifié sur gel, ont montré que le signal émis par le [S³⁵]Met-ARN_t^{Met} était beaucoup plus faible que celui du

[S³⁵]Met-ARNt_e^{Met}, (Wiltrout et al, 2012). Ce résultat signifie que dans les conditions testées, l'ARNt_i^{Met} a été aminoacylé de manière beaucoup moins efficace que l'ARNt_e^{Met}. Les auteurs de ce papier ont supposé que la cellule utilisait peut-être deux catégories différentes de Met pour aminoacyler les deux ARNt^{Met}. Nous apporterons des éléments de réponse à ce constat dans le chapitre II de la partie « résultats et discussions ».

V.2.2.4 Discrimination des ARNt^{Met} durant la synthèse protéique

Tout comme IF2 chez les bactéries, eIF2 reconnaît spécifiquement l'ARNt_i^{Met}. L'interaction entre eIF2 et l'ARNt_i^{Met} se fait en partie grâce à la première paire de bases (pdb) A₁-U₇₂, conservée dans les ARNt_i^{Met} utilisés lors des traductions bactérienne, organellaire et cytoplasmique (Farruggio, 1996). La mutation de cette première pdb en un G₁-C₇₂, qui correspond à la première pdb de l'ARNt_e^{Met}, diminue considérablement l'affinité de eIF2 pour ARNt_i^{Met}.

Il a également été montré chez l'Humain ainsi que chez *S. cerevisiae* que lorsque cette première pdb A₁-U₇₂ de l'ARNt_i^{Met} est muté en G₁-C₇₂, l'ARNt_i^{Met} muté peut être utilisé pour le décodage des codons Met élongateurs, *in vivo* et *in vitro* (Aström et Bystrom, 1994 ; Drabkin et al, 1998).

D'après une étude menée chez *S. cerevisiae*, il apparaît également que les pdb conservées C₃-G₇₀ du bras accepteur et G₃₁-C₃₉ du bras de l'anticodon régulent la stabilité du complexe de pré-initiation de la traduction (Dong et al, 2014).

Des études menées chez le blé, montrent que le Met-ARNt_i^{Met} est exclu de l'élongation par le facteur d'élongation eEF1A qui a une affinité beaucoup moins grande pour celui-ci que pour le Met-ARNt_e^{Met} (plus de 100 nM contre 0,8 nM respectivement) (Dreher et al, 1999). Cette différence d'affinité entre l'ARNt_i^{Met} et l'ARNt_e^{Met} pour eEF1A est due à la phosphorybosition du G₆₄, de l'ARNt_i^{Met}, en faisant ainsi un anti-déterminant d'identité, ainsi qu'à la nature de la première pdb du bras accepteur. Comme détaillé précédemment, ce mécanisme de discrimination est aussi observé chez *S. cerevisiae*, dont l'ARNt_i^{Met} est ribosylé en A₆₄. Il est donc supposable que cette modification soit utilisée dans différentes branches du vivant comme anti-déterminant d'identité d'eEF1A. pour l'ARNt_i^{Met}.

VI Rôles non-canoniques des aminoacyl-ARNt synthétases

Canonique « se dit de la forme naturelle, intrinsèque, principale de certains êtres » (Larousse). Une fonction non-canonique représente donc une fonction additionnelle et normalement non majoritaire. Au fil du temps, les aaRS ont évolué et acquis de nouvelles fonctions, que l'on appelle aujourd'hui rôles non-canoniques. Longtemps inconnues, ces fonctions prennent de plus en plus d'importance sachant qu'elles jouent un rôle crucial au sein des cellules et qu'elles sont parfois en connexion avec des pathologies. Dans ce chapitre, après avoir brièvement expliqué comment une aaRS acquiert de nouvelles fonctions, je listerai les différentes fonctions non-canoniques qu'elles exercent, nucléaires puis autres.

VI.1 Comment une aaRS peut-elle acquérir de nouvelles fonctions ?

Alors que chez les procaryotes, les protéines sont « simplement » détournées de leur fonction primaire (exemple : enzyme métabolique inactive), chez les eucaryotes, on note l'acquisition de modules additionnels et la liaison à des protéines spécialisées. En effet, chez les eucaryotes, sont apparues les protéines auxiliaires, permettant d'ancrer des aaRS capables de se relocaliser dans un compartiment particulier, à savoir le cytoplasme, lieu de la synthèse protéique. En se détachant des protéines auxiliaires, les aaRS sont alors libres de rejoindre des compartiment, *a priori* insoupçonnés et d'accomplir d'autres fonctions que l'aminacylation de leur ARNt homologue.

Certaines aaRS, comme la MetRS, possèdent des domaines en doigts de zinc. Ce domaine est parfois utilisé pour l'interaction entre protéines ou avec l'ADN, mais cela n'a pas été démontré dans le cas de la MetRS. Ce domaine pourrait être utilisé pour des fonctions additionnelles, puisque l'on sait par exemple qu'il s'agit d'un domaine typique des facteurs de transcription.

Enfin, le domaine EMAP-II-like, qui permet d'augmenter l'efficacité d'aminacylation de la MetRS, possède également des propriétés de cytokines, ce qui en fait un domaine multifonctionnel.

VI.2 Les aminoacyl-ARNt synthétases nucléaires

Il existe plusieurs cas répertoriés d'aaRS présentes dans le noyau, à des fins enzymatiques ou non. Après avoir fait l'état de l'art concernant les rôles non-canoniques fonctionnels nucléaires connus des aaRS et la façon dont laquelle elles sont importées dans le noyau, je discuterai du rôle enzymatique des aaRS au sein de ce compartiment, dans lequel leur présence semble inadéquate.

Des études bioinformatiques portant sur séquences peptidiques des aaRS de *S. cerevisiae* ont permis de montrer que plus de la moitié d'entre elles (quinze) possèdent des NLS putatifs (Schimmel, 1999). A ce jour, leur présence concrète n'a pas été confirmée ni infirmée, mais une telle étude est en cours au laboratoire. Seule la MetRS cytoplasmique, dont la séquence peptidique ne contient pas de NLS putatif, selon cet article, a été montrée comme importée dans le noyau de *S. cerevisiae*, ce qui fait l'objet du premier chapitre de la partie « résultats et discussions ».

VI.2.1 La TyrRS humaine cytoplasmique et son rôle dans la réponse au stress oxydatif

Une partie de la TyrRS humaine se relocalise dans le noyau lorsque son ARNt homologue est peu abondant (Fu et al, 2012). Des TyrRS mutées dans ses NLS putatifs et fusionnées à la GFP ont été créées, puis leur observation par microscopie a permis de d'identifier leur NLS. Dans une seconde expérience, les NLS putatifs ont été fusionnés à la GFP et étrangement, ils n'ont pas induit une relocalisation nucléaire de la GFP observable par microscopie, mais uniquement par immunodétection de la GFP dans des fractions subcellulaires. Ces expériences ont néanmoins permis d'identifier le NLS de la TyrRS qui est classique, formé de la séquence riche en lysines ²⁴²KKKLKK²⁴⁷ se situant dans le domaine de liaison à l'anticodon. Cette séquence est conservée jusqu'aux TyrRS des insectes, puis est dégénérée dans la branche des levures et des plantes. En plus de provoquer l'import nucléaire, la séquence comportant le NLS permet également de lier l'ARNt^{Tyr} (des mutations dans cette séquence font diminuer l'affinité de l'enzyme pour son substrat). Le NLS est donc inaccessible lorsqu'un ARNt est lié au domaine de liaison à l'anticodon.

La relocalisation nucléaire de la TyrRS a lieu lors de la réponse au stress oxydatif (Wei et al, 2014). Dans le noyau, elle séquestre TRM28 et son partenaire HDAC1, répresseurs de la transcription E2F1-dépendante. En temps normal, HDAC1 desacétyle E2F1, ce qui empêche ce dernier d'activer la transcription de certains gènes. La séquestration de HDAC1 permet le maintien de l'acétylation d'E2F1 et lève ainsi l'inhibition de la transcription de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et du cycle cellulaire. Il existe un inhibiteur de HDAC1, la Trichostatine A (TSA), qui mime le rôle de la TyrRS nucléaire et a pour effet de protéger les cellules des dommages liés au stress oxydatif provoqué par les UV. Le resveratrol, quant à lui, provoque la relocalisation nucléaire de la TyrRS (Sajish et Schimmel, 2015).

VI.2.2 Biosynthèse du Ap4A par la LysRS cytoplasmique humaine

Il a été découvert très tôt que la LysRS, hors du complexe MARS, est capable de synthétiser la diadénosine tétraphosphate (Ap4A) (Randerath et al, 1966 ; Wahab et yang, 1985). Sa synthèse est initiée par la phosphorylation de la sérine 207 de la LysRS, ce qui induit un changement de sa conformation et provoque ainsi son relargage du MSC (Yannay-Cohen et al, 2009 ; Carmi-Levy 2008). Libérée du MSC, la LysRS se relocalise dans le noyau dans lequel elle synthétise l'Ap4A qui est nécessaire à la levée de l'inhibition du facteur de transcription MITF (microphthalmia transcription factor) (Carmi-Levy, 2011). Cependant, le NLS de la LysRS n'a pas encore été identifié.

VI.2.3 Contrôle du développement vasculaire par la SerRS

La SerRS cytoplasmique humaine participe au contrôle transcriptionnel des gènes impliqués dans le développement vasculaire (Amsterdam et al., 2004; Guo and Schimmel, 2013). Le NLS qui lui permet de rejoindre le noyau pour accomplir cette fonction est situé dans le domaine UNE-S, un domaine unique, spécifique aux SerRS des vertébrés (Xu, 2012). Il s'agit d'un NLS bipartite : ⁴⁸²KKQKKQEXXKKK⁴⁹⁴, dont la mutation provoque une absence de sa localisation nucléaire dans des cellules HeLa et HEK 293T ainsi qu'un défaut de développement vasculaire chez le poisson zèbre. De plus, la mutation F383V, bien qu'éloignée du NLS, abolit totalement l'import nucléaire de la SerRS. La résolution de la structure cristallographique ainsi qu'une série de mutants a

permis de mettre en évidence le rôle de ce résidu, qui serait de stabiliser le domaine UNE-S et ainsi le NLS. Dans le noyau, la SerRS empêche c-Myc de se lier au promoteur du gène codant VEGFA (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor **A**) (Shi, 2014). Ensuite, en se liant à ce promoteur, la SerRS recrute l'histone déacétylase Sirt2 permettant de lever l'acétylation provoquée par c-Myc et ainsi, en contrôlant l'expression de VEGFA, la SerRS participe au contrôle du développement vasculaire.

VI.2.4 Participation de la MetRS cytoplasmique humaine à la transcription des ARNr

La MetRS cytoplasmique humaine, dans les cellules en prolifération, présente une localisation nucléolaire (Ko et al, 2000). La première étude rapportant une telle localisation date de 1983 et concernait des cellules rénales de rat-kangourou mais était restée incomprise (Dang et al, 1983). Cette localisation nucléolaire de la MetRS est stimulée par différents facteurs de croissance tels que l'insuline et le PDGF. De plus, elle est positivement corrélée à l'activité de l'ARN polymérase I. Le traitement des cellules par des anticorps spécifiques dirigés contre la MetRS provoque la décroissance de la synthèse d'ARNr, indiquant que la MetRS joue un rôle dans la biogénèse des ARNr dans le nucléole.

Afin d'être importée dans le noyau, la MetRS possède au moins deux NLS. Le premier se compose de la séquence ⁷²⁴PWKRIKG⁷³⁰, et le second est constitué de quatre lysines consécutives : K⁸⁹⁷ à K⁹⁰⁰. Dans cette étude, le mécanisme qui permet à la MetRS de quitter le MSC n'a pas été élucidé, mais la phosphorylation de certains résidus de la protéine est une piste qui est envisagée. En effet, la MetRS possède un certain nombre de sites consensus cibles de la caséine kinase II, connue pour son implication dans le contrôle de la croissance et la régulation de la transcriptions des ARNr. Nous verrons dans le chapitre 1 de la partie « résultats et discussions » que la MetRS cytoplasmique de levure présente des caractéristiques de localisation et fonctionnelles similaires à celle de la MetRS humaine.

VI.2.5 Localisation nucléaire de la MetRS de *S. cerevisiae*

Auparavant, la présence de la MetRS de *S. cerevisiae* dans le noyau avait déjà été rapportée par Galani *et al*, 2001. Cet article indique que lorsque la MetRS est libérée du complexe AME, elle se localise en partie dans le noyau, alors que lorsqu'elle est associée à Arc1, la MetRS est totalement exclue du noyau. En réalité, le complexe pourrait naviguer de façon très rapide entre le cytoplasme et le noyau, puisque Arc1 possède un NLS putatif, que la délétion de son domaine N-terminal provoque une localisation cytoplasmique et nucléaire visible au microscope, mais qu'Arc1 est exclu très rapidement du noyau en raison d'un NES reconnu par Xpo1 (Schimmel, 1999 ; Galani et al, 2005).

Le premier et le deuxième chapitre de la partie « résultats et discussion » de ma thèse concernent le(s) rôle(s) de la MetRS de levure dans le noyau.

VI.2.6 Indices de l'existence d'une aminoacylation nucléaire de l'ARNt chez les eucaryotes

La présence d'aaRS dans le noyau a été découverte à la fin des années 1990. Tout d'abord grâce à des expériences menées sur des oocytes de *Xenopus*, qui ont permis de montrer que les ARNt^{Ala}, ARNt^{Asn}, ARNt^{Leu}, ARNt^{Lys}, ARNt^{Tyr}, ARNt^{Phe} de cet organisme ainsi que l'ARNt^{Met} humain étaient aminoacylés dans le noyau, suggérant par la même la présence d'aaRS dans ce compartiment (Lund, 1998). De plus, dans ce même article il a été montré qu'un blocage de l'aminacylation provoquait des retards d'export nucléaire de certains ARNt (l'ARNt^{Asn} et l'ARNt^{Tyr}).

Par la suite, le même constat a été fait chez la levure (Sarkar et al., 1999) pour les ARNt^{Ile}, ARNt^{Tyr} et ARNt^{eMet}. Une autre étude portant sur *S. cerevisiae* a permis de montrer que l'ARNt^{Met} (espèce non précisée) provenant de noyaux purifiés était aminoacylé (Steiner-Mosonyi and Mangroo, 2004) suggérant que soit cet ARNt a été aminoacylé dans le noyau, soit qu'il a été importé sous sa forme déjà aminoacylée.

VI.3 Les MetRS et leur implication dans la réponse au stress oxydatif

Dans plusieurs organismes, des études ont montré l'implication de la MetRS dans la réponse au stress oxydatif, en misméthionylant des ARNt non-homologues (Netzer et al, 2009).

Dans des cellules humaines HeLa et HEK293T, lors du stress oxydatif, les sérines 209 et 825 de la MetRS humaine sont phosphorylées par ERK1/2, provoquant une augmentation de l'affinité de la MetRS pour des ARNt non homologues (Lee, 2014). Cette hypothèse a été émise suite à des tests d'aminacylation du mutant phosphomimétique de la MetRS, ayant une affinité 6 fois plus grande pour l'ARNt^{Lys} que pour l'ARNt^{Met} transcrits *in vitro*. De plus, *in vivo*, une cellule exprimant un tel mutant présente des niveaux réduits d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), par comparaison avec une cellule exprimant une MetRS dont les sérines 209 et 825 ne sont jamais phosphorylées. Une réduction du niveau d'expression de la MetRS par ARNsi provoque une augmentation de la mortalité cellulaire en conditions de stress oxydatif, ce qui conforte l'hypothèse de l'implication de la MetRS humaine dans ce mécanisme.

Tout comme son homologue humain, la MetRS de *S. cerevisiae* misméthionyle les ARNt, et plus particulièrement les ARNt^{Lys} et ARNt^{Arg}, en réponse au stress oxydatif (Wilttrout, 2012). Les expériences d'aminacylation de cette étude ont été effectuées avec le complexe AME surproduit chez *E. coli* puis purifié, avec des transcrits *in vitro* des ARNt, ce qui a amené les auteurs de cette étude à supposer qu'il existe, *in vivo*, un mécanisme permettant de moduler cette misméthionylation.

Enfin, la MetRS bactérienne est également capable de mésacyler les ARNt^{Arg} et ARNt^{Thr} en réponse à un stress oxydatif (Jones et al., 2011). *E. coli* tolère d'ailleurs jusqu'à 10% de misméthionylation détectable dans son protéome.

A l'heure actuelle, la raison pour laquelle ces organismes utilisent cette stratégie de protection contre le stress oxydatif n'est pas connue. L'hypothèse est que les Met mésincorporées dans les protéines intercepteraient les ROS à la place d'autres molécules acceptrices et seraient ainsi oxydées en Met sulfoxides, puis réduites par la méthionine sulfoxyde réductase (Levine et al, 1996 ; Levine et al, 2001).

Les Met misincorporées à la surface des protéines serviraient donc en quelque sorte d'antioxydant ou d'absorbant de ROS.

VI.4 Les autres fonctions non-canoniques des aaRS et protéines auxiliaires chez les métazoaires

VI.4.1 La LysRS cytoplasmique humaine

L'aaRS la plus documentée pour ses fonctions non-canoniques est la LysRS cytoplasmique humaine puisqu'elle possède au moins 3 fonctions additionnelles connues, dont une nucléaire présentée précédemment.

VI.4.1.1 Rôle dans la migration cellulaire

Dans des lignées cancéreuses traitées au TNF- α , la LysRS est sécrétée dans le milieu extérieur sous sa forme entière puis se lie aux macrophages, provoquant la sécrétion de TNF- α et la migration cellulaire (Park et al, 2005).

La LysRS promeut aussi la migration de cellules cancéreuses (Kim et al, 2012). Phosphorylée par P38 MAPK, elle quitte le MSC pour une localisation membranaire, où elle interagit avec le récepteur de la laminine 67LR, et le stabilise en inhibant sa dégradation ubiquitine-dépendante. Ce résultat suggère un rôle prépondérant de la LysRS dans la migration cellulaire laminine-dépendante, et ainsi le développement des métastases.

VI.4.1.2 Implication avec le VIH

Depuis les années 1990, il est connu que l'isoaccepteur 3 de l'ARNt^{Lys} cytoplasmique Humain est nécessaire à la rétro-transcription du VIH, et qu'il est sélectivement empaqueté, avec les autres isoaccepteurs d'ARNt^{Lys} et la LysRS dans les virions néoformés (Jiang et al, 1993). Il a également été montré que la LysRS forme un complexe avec les protéines virales Gag et Pol (Javanbakht et al, 2003). De plus, elle est responsable de la sélection de l'isoaccepteur nécessaire à la rétrotranscription du virus (Cen et al, 2001). La diminution de l'expression de la LysRS provoque une baisse de l'incorporation de l'ARNt^{Lys} dans les virions entraînant une baisse de l'infectiosité du virus, et sa surexpression provoque l'effet contraire (Gabor et al, 2002). Cependant, il

existe une controverse concernant la LysRS impliquée dans ce mécanisme, puisqu'il n'est pas totalement établi s'il s'agit de la LysRS cytoplasmique ou mitochondriale (Kobbi et al., 2011; Halwani et al., 2004).

VI.4.2 La LysRS mitochondriale humaine

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative progressive qui touche les neurones moteurs et entraîne des paralysies. 20% des cas sont associés à des mutations de *SOD1*, gène codant la superoxyde dismutase (Wong et al., 1995). Une étude a montré que l'enzyme Sod1 portant les mutations pathogéniques interagit préférentiellement avec la LysRS mitochondriale, alors que la version de Sod1 native en est incapable (Kawamata et al., 2008). Cette interaction anormale induit une mauvaise conformation puis une agrégation de la LysRS, rendant cette dernière non-importable dans la mitochondrie et sujette à la dégradation par le protéasome.

VI.4.3 Propriétés de cytokines de la TyrRS cytoplasmique humaine

Dans des conditions apoptotiques, la TyrRS est sécrétée dans le milieu extracellulaire puis clivée en deux domaines distincts par la leukocyte elastase, une protéase extracellulaire (Wakasugi and Schimmel, 1999). Le domaine C-terminal clivé montre une activité chimiotactique envers les cellules immunes et stimule l'angiogénèse (Wakasugi et al., 2002). Le domaine N-terminal quant à lui est similaire à l'interleukine 8.

VI.4.4 Propriétés de cytokines de la TrpRS cytoplasmique humaine

Il existe plusieurs variants d'épissage de l'ARNm de la TrpRS (Liu, 2004). Sous l'influence de l'interferon γ (IFN- γ), cytokine anti-proliférative connue pour stimuler la production d'autres facteurs anti-angiogéniques, 2 messagers additionnels de la TrpRS sont produits. Il a été montré que ces variants, une fois traduits, ont une activité angiostatique (Otani et al., 2002).

VI.4.5 La GluProRS cytoplasmique humaine et la réponse inflammatoire

La GluProRS possède la capacité de bloquer l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (Sampath et al, 2004). En effet, la production d'IFN- γ stimule la phosphorylation de la GluProRS dans ses domaines WHEP, l'aaRS bi-fonctionnelle est ainsi relâchée du MSC (Arif et al, 2009). Elle se lie alors au complexe GAIT, qui inhibe la traduction d'ARNm codant des protéines impliqués dans la réponse à l'inflammation comme la céruloplasmine (Arif et al., 2011).

VI.4.6 La LeuRS cytoplasmique humaine et l'activation de la voie TOR

La LeuRS humaine est capable de percevoir la concentration intracellulaire en leucine, et induit les premières étapes de la réponse mTORC1 (Han et al, 2012). Pour ce faire, la LeuRS interagit avec la Rag GTPase afin que celle-ci active mTORC1. Le même mécanisme a également été montré pour la LeuRS de la levure *S. cerevisiae* (Bonfils et al, 2012).

VI.4.7 La HisRS cytoplasmique humaine , première aaRS identifiée dans les syndromes anti-synthétasiques

L'HisRS est la cible d'autoanticorps chez des patients atteints de myosite (Dang, 1985). Il s'agit de la première aaRS découverte comme étant impliquée dans une maladie auto-immune. D'autres auto-anticorps dirigés contre la ThrRS, l'AlaRS, l'IleRS, la GlyRS, l'AspRS, l'AsnRS, la PheRS et la TyrRS ont été identifiés par la suite, conduisant à la caractérisation de ce qu'on appelle un « syndrome anti-synthétasique » (Mahler et al., 2015).

VI.4.8 Fonctions additionnelles des protéines auxiliaires de l'Humain

VI.4.8.1 P38

P38 est un régulateur positif de p53 en réponse au stress génotoxique (Han et al, 2008). L'atténuation de l'expression de p38 provoque, par un mécanisme réversible, une augmentation de la résistance à l'apoptose induite par les dommages à l'ADN. Le mécanisme est initié par une phosphorylation de p38, qui se détache du complexe

multisynthétasique et se relocalise dans le noyau où il interagit avec p53 et le stabilise, en inhibant sa dégradation ubiquitine-dépendante. P38 est donc un facteur pro-apoptotique, de par son interaction avec p53.

VI.4.8.2 P43

La phosphorylation de p43 provoque son détachement du MSC et lui permet d'interagir avec gp96, une protéine chaperon se localisant au niveau du réticulum endoplasmique (Han et al, 2007 ; Kim et al, 2010). P43 améliore la dimérisation de cette dernière, et lui permet d'interagir avec son récepteur spécifique. Des souris déficientes en p43 présentent les symptômes du lupus, maladie auto-immune, attribuable à une sur-représentation de gp96 à la surface des cellules.

P43 possède également une activité de cytokine (Ko et al, 2001). En effet, elle est sécrétée par des macrophages traités au facteur TNF α , ce qui a pour effet de stimuler la prolifération des fibroblastes et la réparation de blessures (Park et al, 2005). Lors de sa sécrétion en conditions apoptotiques, p43 peut-être clivée afin de libérer son domaine EMAP, mais celui-ci n'a pas autant d'activité cytokine que la protéine entière. Sécrétée à faible concentration, p43 promeut la migration des cellules endothéliales, mais à fortes doses elle provoque leur apoptose, ce qui suggère qu'elle possède une double activité angiogénique et anti-angiogénique (Park et al., 2002). P43 utilise des domaines distincts, dont la suppression ou au contraire leur relargage lui permet de moduler ses différentes fonctions (Han et al., 2008).

VI.4.8.3 P18

P18 est la protéine qui permet l'ancrage de la MetRS au sein du MSC. Un homozygote muté pour le gène codant p18 n'est pas viable, tandis qu'un hétérozygote est fortement susceptible aux tumeurs, indiquant un rôle potentiel dans la réponse aux tumeurs (Park et al, 2005 ; Park et al, 2006). Ceci est dû à un blocage de l'expression de p53, suppresseur de tumeurs.

En réponse aux dommages à l'ADN, la MetRS phosphorylée sur la S₆₆₂ par la kinase GCN2 change de conformation et relargue p18 qui se relocalise dans le noyau, où elle active ATM/ATR, couple de kinases impliquées dans la réparation de l'ADN (Kwon et al., 2011; Yang et al., 2003).

VI.4.9 La GlnRS du parasite *Entamoeba histolytica*

Chez l'amibe parasitaire *Entamoeba histolytica*, l'antibiotique G418 provoque la mort cellulaire programmée *in vitro* (Monroy et al., 2010). L'étude de l'expression des gènes en réponse à ce stress a révélé une très importante surexpression de la GlnRS suivi de sa baisse progressive, suggérant une activité anti-apoptotique de la GlnRS.

VI.5 Fonctions additionnelles des aaRS de champignons

VI.5.1 La TyrRS mitochondriale de *Neurospora crassa* et l'épissage des introns

Très tôt, il a été découvert que des mutants de la TyrRS mitochondriale de *Neurospora crassa* étaient déficients pour l'épissage d'un grand nombre d'introns du groupe I, suggérant l'implication de la TyrRS dans ce mécanisme (Akins and Lambowitz, 1987). Cette activité d'épissage est due à la présence d'un nouveau domaine de liaison à l'ARN localisé à l'extrémité N-terminale de la TyrRS et ne présentant pas d'homologie avec les domaines de la TyrRS d'*E. coli* ou la TyrRS mitochondriale de *S. cerevisiae* (Cherniack et al., 1990; Paukstelis et al., 2005). Ce domaine interagit avec d'autres domaines *en cis* ce qui permet à la protéine de catalyser l'épissage. Le site d'épissage reconnu par la TyrRS est un motif conservé au sein des introns du groupe I, présentant des similarités structurales avec des ARNt (Caprara et al., 1996). Des comparaisons de séquences couplées à des expériences de biochimie ont permis de montrer qu'il s'agit d'une caractéristique unique et conservée au sein du phylum des *Pezizomycotina*, qui contient également *Aspergillus nidulans* et des pathogènes de l'Homme tel que *Podospora anserina* (Kämper et al., 1992; Paukstelis and Lambowitz, 2008).

VI.5.2 La LeuRS mitochondriale de *S. cerevisiae* et l'épissage des introns

Chez *S. cerevisiae*, il existe également une aaRS mitochondriale impliquée dans l'épissage des introns du groupe I, la LeuRS (Labouesse et al., 1985). C'est son domaine CP1, initialement dédié à l'édition d'ARNt mésacylés, qui est également impliqué dans ce

mécanisme d'épissage (Rho et al., 2002; Sarkar et al., 2012). Ce domaine est capable à lui seul de promouvoir l'épissage, alors que ce n'est pas le cas pour le domaine CP1 de la LeuRS d'*E. coli*. De façon intéressante, les LeuRS de *Mycobacterium tuberculosis* et mitochondriale humaine sont capables de compléter un défaut d'épissage de la LeuRS mitochondriale de levure (Houman et al., 2000). Cela ne signifie pas qu'un tel mécanisme existe dans ces organismes, mais, au moins, que le domaine et la fonction sont conservés dans des organismes éloignés.

VI.5.3 La GluRS cytoplasmique de *S. cerevisiae*

La GluRS cytoplasmique, en plus d'acyler l'ARNt^{Glu} cytoplasmique, possède une fonction atypique. En effet, lors de la transition diauxique, la GluRS est importée dans la mitochondrie où elle mésacyle l'ARNt^{Gln} mitochondrial (Frechin et al, 2009). Cet ARNt mésacylé est ensuite utilisé comme substrat par l'AdT GatFAB.

VI.5.4 La LysRS mitochondriale de *S. cerevisiae*

La LysRS est responsable de l'import mitochondrial du seul isoaccepteur d'ARNt^{Lys} codé par le génome nucléaire (Tarassov et al., 1995). Cependant, elle n'en est pas capable seule et nécessite la présence de l'énolase, une enzyme glycolytique (Entelis et al., 2006).

VI.5.5 La GlyRS cytoplasmique de *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, il existe un mutant déficient pour la formation de l'extrémité 3' des ARN défaut pouvant être complété par la surexpression de la GlyRS, suggérant qu'il s'agit d'un facteur de terminaison de la transcription (Magrath and Hyman, 1999). Elle pourrait interagir avec l'extrémité 3' de certains ARNm ayant une similarité de séquence avec les ARNt.

VI.5.6 La TyrRS de *S. cerevisiae*

Des expériences de double hybride levure ont mis en évidence une forte interaction entre la TyrRS et Knr4, protéine impliquée dans la synthèse de la paroi

(Dagkessamanskaia et al., 2001). Cette interaction aurait un rôle crucial car elle serait indispensable pour la synthèse de la paroi durant la sporulation.

VI.6 Fonctions non canoniques des aaRS d'*E. coli*

Enfin, il existe également quelques activités non-canoniques chez les aaRS d'*E. coli*.

L'AlaRS inhibe la transcription de son propre gène, en se liant à une séquence palindromique en amont du site de démarrage de la transcription (Putney and Schimmel, 1981). Cette répression est élevée lorsque la concentration en alanine augmente, qui a pour effet d'augmenter l'affinité de l'AlaRS pour la séquence d'ADN.

La ThrRS est également capable de réguler négativement la traduction de son propre ARNm. Elle se lie à la séquence 5' UTR de son ARNm qui mime la tige-boucle de l'ARNt^{Thr}, empêchant ainsi par gêne stérique la fixation de la sous-unité 30S du ribosome et l'initiation de sa traduction (Romby et al., 1996; Springer et al., 1986).

VII Le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*

VII.1 Le métabolisme du glucose et la fermentation

VII.1.1 Avantages de la fermentation

Le glucose est la source de carbone favorite de la levure *S. cerevisiae*. Elle l'utilise préférentiellement par fermentation, grâce à la glycolyse, même lorsque l'oxygène est disponible dans son milieu. Ce phénomène est appelé « effet Crabtree » (De Deken, 1966), et consiste en la répression du métabolisme oxydatif par le métabolisme fermentaire, soit la « répression catabolique ». Le bilan énergétique du glucose utilisé par fermentation est bien plus important qu'en respiration. Il est souvent rapporté que l'effet Crabtree existe en raison de capacités respiratoires insuffisantes de *S. cerevisiae*. Néanmoins, fermenter le glucose permet à *S. cerevisiae*, dans la nature, d'utiliser de façon très rapide le substrat (glucose, fructose) en produisant de l'éthanol qui inhibe la croissance des autres microorganismes concurrents et qui peut ensuite être consommé

par respiration. Il s'agit d'un puissant avantage dans la course au développement des levures sauvages dans leur écosystème naturel.

VII.1.2 La détection du glucose par la cellule

Pour pouvoir fermenter, il est nécessaire que la cellule détecte la présence de glucose. *S. cerevisiae* a développé plusieurs mécanismes dédiés à ce processus. L'un des mécanismes implique deux protéines transmembranaires, Snf3 et Rgt2, (Neigeborn et al., 1986; Ozcan et al., 1996). Snf3 possède une forte affinité pour le glucose ce qui lui permet de le ressentir lorsque la concentration est faible, tandis que Rgt2 perçoit le glucose lorsque la concentration est élevée. Ces deux protéines induisent la production des gènes *HXT*, qui codent au minimum 20 transporteurs de glucose auxquels elles ressemblent structurellement (Gancedo, 2008).

Lorsque Snf3 et Rgt2 sont liées au glucose, elles activent les caséines kinases Yck1 et Yck2, qui en réponse phosphorylent les protéines régulatrices paralogues Mth1 et Std1 (Santangelo, 2006). Ces deux dernières sont ainsi dégradées par le protéasome, et déstabilise leur interactants Rgt1, répresseur transcriptionnel des gènes *HXT* (Polish, 2005). Rgt1 nécessite une phosphorylation afin de lier l'ADN et d'inhiber la transcription (Palomino et al, 2006). Elle est effectuée par la kinase Snf1 en conditions de privation de glucose, dont nous parlerons ultérieurement.

Une autre voie de détection du glucose est celle de l'AMPC/PKA. Une fois encore, elle débute par une protéine membranaire, Gpr1, couplée à Gpa2, qui interagit avec l'adénylate cyclase Cyr1 (Yun et al, 1998). En présence de glucose détecté par Gpr1, Cyr1 convertit l'ATP en AMPC qui par compétition avec la PKA, provoque la disruption du complexe PKA-Bcy (Toda et al, 1987). La PKA, (protéine kinase A) tétramère composée de Tpk1, Tpk2 et Tpk3, est ainsi libre d'activer la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans la glycolyse, la prolifération et la croissance (Toda et al, 1987; Kraakman et al, 1999). Dans le même temps, PKA inhibe également la transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress et la gluconéogénèse. La PKA a une activité de phosphorylation primordiale, puisque les cellules ayant une activité PKA élevée échouent à acquérir les caractéristiques essentielles à la survie à la phase stationnaire, comme la résistance au stress osmotique et aux températures élevées (Zaman et al, 2008). Au contraire, les cellules ayant une activité PKA faible présentent

ces caractéristiques de phase stationnaire même lorsque les concentrations en glucose sont élevées. Les cibles privilégiées de la PKA sont le facteur de transcription Msn2 ainsi que la kinase Rim15. Le complexe transcriptionnel Ccr4p–Not est également une des cibles de PKA. Enfin, la voie PKA possède d'autres cibles telles que Srb9p, d'autres sous-unités du complexe médiateur de l'ARN polymérase II ainsi que des protéines interagissant avec la partie C-terminale de Rpb1.

VII.1.3 Inhibition de la fonction mitochondriale par la voie Mig1/Hxk2

Avant de fermenter un sucre, *S. cerevisiae* inhibe sa fonction oxydative, et donc sa fonction mitochondriale, par la voie Mig1-Hxk2, également appelée « voie de répression par le glucose ». Hxk2 (hexokinase 2) a d'abord été découvert pour sa fonction de phosphorylation de l'hydroxyle porté par le C₆ du glucose cytoplasmique, étape indispensable du métabolisme du glucose. Or, en conditions de fermentation, 14% de la quantité totale de Hxk2 est localisée dans le noyau de *S. cerevisiae* (Herrero et al, 1998). La présence de Hxk2 dans le noyau est concomitante avec celle de Mig1, répresseur transcriptionnel. Hxk2 et Mig1 forment un complexe à l'intérieur de ce compartiment, Hxk2 permettant de cacher une séquence de phosphorylation sur Mig1, ce qui a pour effet d'empêcher sa phosphorylation par la kinase Snf1 et le maintient actif (Ahuatzi et al, 2004). La localisation nucléaire de Mig1 présente une forte corrélation avec la répression de la transcription de *SUC2*, qui code une invertase nécessaire à l'utilisation de sources alternative de carbone tel que le sucrose ou le raffinose. Par sa liaison à l'ADN, Mig1 inhibe la transcription d'environ 350 gènes.

VII.1.4 Régulation par la voie TOR

Enfin, il semblerait que la voie TOR, particulièrement décrite pour la régulation du cycle de l'azote, puisse également réguler le cycle du glucose chez *S. cerevisiae* (Hardwick et al, 1999). L'activité de TOR est régulée par deux complexes, TORC1 et TORC2, composés chacun de 4 et 7 protéines respectivement. En présence de rapamycine, inhibiteur de cette voie, le niveau transcriptionnel de gènes induits par le glucose diminue, et au contraire, la transcription des gènes réprimés par le glucose

augmente. A l'heure actuelle le mécanisme de régulation n'est pas connu, à savoir si TOR ressent directement la concentration en glucose ou s'il interagit avec d'autres facteurs.

VII.2 La transition diauxique

Lorsque le glucose du milieu devient limitant, la levure ralentit sa croissance et reprogramme son métabolisme. Ce phénomène se traduit au niveau moléculaire par une réorganisation du transcriptome et du protéome, qui permettra ensuite à la levure d'utiliser, par respiration, les produits issus de la fermentation. Durant ce réarrangement a lieu la biogénèse des mitochondries, siège du cycle de Krebs permettant la production d'ATP, ce qui en fait la « centrale énergétique » de la cellule.

Ce passage, d'une phase de croissance exponentielle en fermentation à la transition diauxique, est stressante en raison du manque de nutriments, et comparable à l'entrée en phase stationnaire. L'entrée dans la phase de transition diauxique est contrôlée par les voies de la PKA, TOR, Snf1. Tandis que les deux premières, présentées dans la partie précédente, sont des régulatrices négatives, Snf1 est une régulatrice positive.

VII.2.1 La voie Snf1

VII.2.1.1 Fonctionnement de Snf1

La voie Snf1 est indispensable pour la croissance dans un milieu sans glucose. Lorsqu'on parle du complexe protéine kinase Snf1, il s'agit en fait d'un hétérotrimère (Amadeo, 2007) composé de Snf1, sous-unité catalytique, Snf4, sous-unité régulatrice γ , et une sous-unité β codée par *GAL83*, *SIP1*, ou *SIP2* (Vincent et al, 2001). Le glucose régule la localisation des sous-unités β . En fermentation, tous les complexes aux sous-unités β différentes se localisent dans le cytoplasme. Lors de la transition diauxique, ceux contenant Gal83 se relocalisent dans le noyau, Sip1, dans la vacuole, et Sip2, restent cytoplasmiques, ce qui signifie que leur fonction n'est pas totalement redondante.

Le complexe Snf1 est activé en absence de glucose, par le biais d'une phosphorylation de Snf1 accomplie par l'une des trois kinases qui lui sont dédiées, codées par les gènes *SAK1*, *ELM1*, et *TOS3* (Hong et al, 2003 ; Elbing et al, 2006). Leurs

rôles sont redondants, mais chacune des délétions de ces gènes à un impact variable sur l'activité de Snf1, le plus fort étant celui de la délétion de *SAK1*, et le plus minime celui de la délétion de *TOS3*. Il existe une phosphatase, Glc7/Reg1, qui contrecarre l'activité de Snf1 en la déphosphorylant (Sanz et al, 2000). Au contraire, la forme active de Snf1 inhibe Glc7/Reg1 par phosphorylation, créant une boucle de rétrocontrôle positif (Cherkasova et al, 2010).

VII.2.1.2 Régulations par la voie Snf1

Snf1 régule l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de sources de carbone alternatives au glucose, et ce par l'intermédiaire d'une grande variété de facteurs de transcription. Le répresseur transcriptionnel Mig1 est l'un d'entre eux, régulant les gènes impliqués dans les métabolismes de sources de carbone telles que le sucrose, galactose, et maltose. En l'absence de glucose, Snf1 réprime l'activité de répresseur de Mig1 par une phosphorylation (Treitel et al., 1998).

Le facteur transcriptionnel Adr1 est quant à lui nécessaire à l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans le métabolisme de l'éthanol. Lors de la présence de glucose, Adr1 est négativement régulé par PKA (Cherry et al., 1989). Or, lorsqu'il n'y a plus de glucose, Adr1 est activé par la voie Snf1 (Ratnakumar et al., 2009). Cependant, les mécanismes exacts ne sont pas connus.

Cat8 et Sip4 sont deux activateurs transcriptionnels de gènes impliqués dans la néoglucogénèse en l'absence de glucose (Roth and Schüller, 2001). La transcription du premier est inhibée par Mig1, et activée par Hap (Walther et al., 2001). Le second est lui activé par l'interaction avec Gal83 ainsi qu'une phosphorylation par Snf1.

Durant le changement de source carbonée, Snf1 promeut également l'activation du facteur de transcription Hsf1, un facteur régulant les gènes de réponse au choc thermique (Hahn and Thiele, 2004). Hsf1 est phosphorylé dépendamment de Snf1, sur un site différent du site de phosphorylation ciblé lors d'un choc thermique. Il peut ainsi lier les promoteurs de gènes tels que *HSP82*, *CUP1*, *HSP30*, et *SSA3*.

Snf1 régule également de façon négative Msn2 (Mayordomo et al., 2002). En l'absence de glucose, Msn2 est déphosphorylé par Reg1/Glc7, et se relocalise ainsi dans le noyau pour activer la transcription de gènes de réponse au stress. En revanche, à long terme, Msn2 est re-phosphorylé dépendamment de Snf1, provoquant sa relocalisation

cytoplasmique. Cela signifie que Snf1 est impliqué dans l'adaptation à long terme au stress carboné.

En bref, Snf1 régule une grande variété de gènes. En l'absence d'activité de Snf1, ce sont effectivement plus de 400 gènes dont l'expression est diminuée (Zaman et al., 2008). Son implication dans divers procédés tels que la néoglucogénèse, le métabolisme de sources alternatives de carbone fermentescibles ou non, son implication dans la réponse au stress, ainsi que la β oxydation des acides gras, en font un nœud crucial pour l'homéostasie de la cellule lors de la transition diauxique.

VII.2.2 La voie TOR

La voie TOR tient un rôle primordial dans l'adaptation à la respiration puisqu'elle régule l'expression de gènes du cycle de Krebs, notamment ceux menant à la synthèse de l' α -cétoglutarate à partir de l'acétyl-CoA (Ljungdahl et Daignan-Fornier, 2012). L' α -cétoglutarate est un élément central du métabolisme respiratoire puisqu'il est le précurseur de plusieurs métabolites, dont le glutamate.

VII.2.3 Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale

Cet organelle serait issu de l'endosymbiose d'une protéobactérie par une archée (Margulis, 1970 ; Lopez-Garcia and Moreira, 1999). Indispensable à la respiration, il est notamment le lieu de production de l'ATP et du cycle de Krebs.

La chaîne respiratoire, lieu de la synthèse d'ATP, se compose de cinq complexes. Le complexe I, ou NADH oxydase, le complexe II, ou succinate désydrégénase, le complexe III, ou cytochrome *bc*₁, le complexe IV, ou cytochrome *c* oxydase, le complexe V, ou ATP synthase (Ackerman and Tzagoloff, 2005). Son rôle consiste à transporter des électrons de part et d'autre des complexes, afin de pomper les protons vers l'espace intermembranaire, là où leur concentration est élevée. Les donneurs d'électrons sont fournis par le cycle de Krebs, tandis que l'accepteur final d'électrons est l'oxygène. Le complexe V synthétise l'ATP grâce à l'efflux de protons qui regagnent la matrice, là où leur concentration est moins élevée (**Figure 25**).

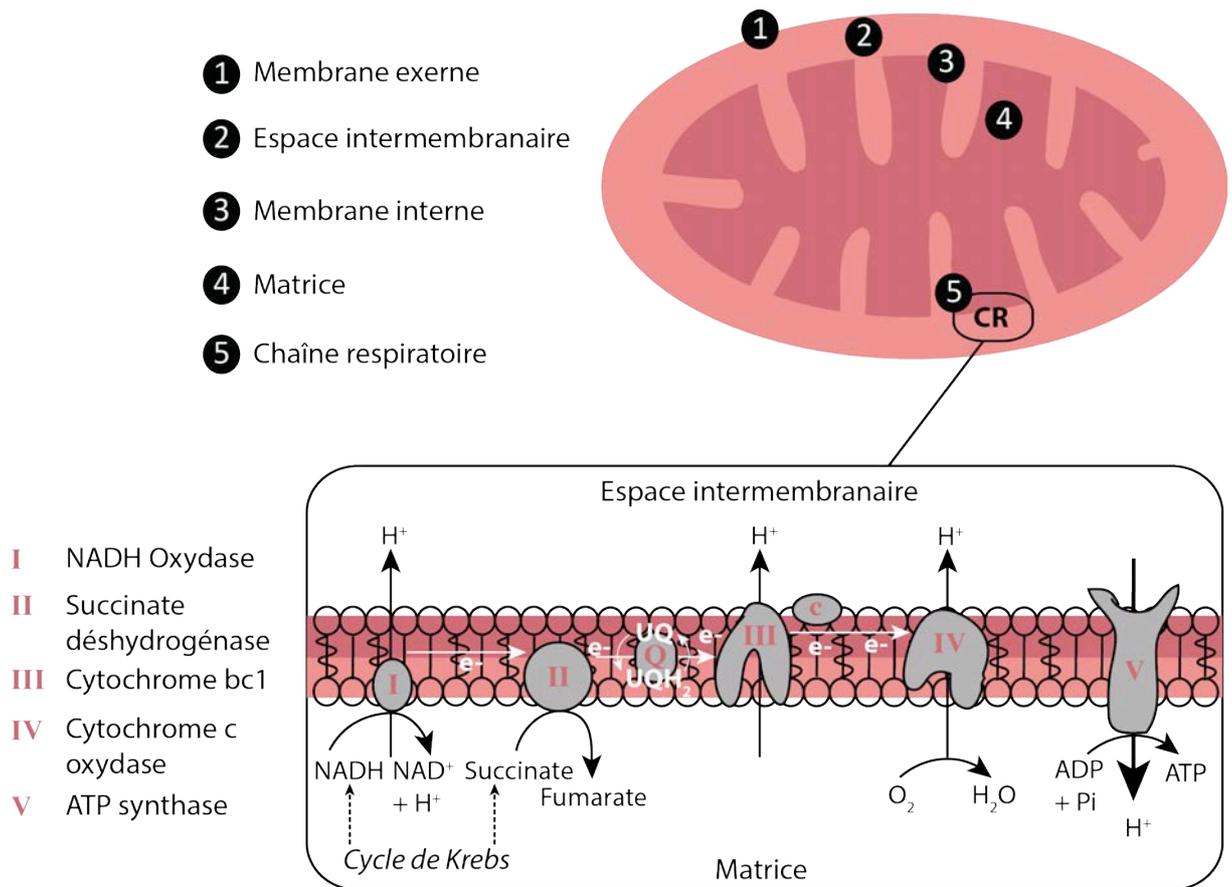


Figure 25. Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne respiratoire, se trouvant au niveau de la membrane interne mitochondriale, fait transiter les électrons le long des complexes.

La synthèse de complexes fonctionnels de la chaîne respiratoire mitochondriale nécessite un assemblage correct de leurs sous-unités protéiques. Celles-ci sont codées séparément par les génomes nucléaire et mitochondrial, qui doivent donc entretenir un véritable «dialogue» pour produire ces sous-unités avec la bonne stoechiométrie. Ce dialogue est particulièrement vital lorsque la levure utilise la respiration pour produire son énergie puisque ce métabolisme conduit à une augmentation significative du réseau mitochondrial et à une synthèse accrue de complexes respiratoires. Il est appelé « dialogue nucléo-mitochondrial », et fait l'objet de l'article du chapitre I de la partie « résultats et discussions » de ma thèse.

VIII Mon sujet de thèse

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le complexe AME de *S. cerevisiae* a été caractérisé en détail. Cependant, la dynamique de ce MSC a longtemps été ignorée. C'est cette l'analyse de cette dynamique qui constituait le projet de recherche principal du laboratoire lors du début de ma thèse en septembre 2012. Ludovic Enkler et le Dr. Mathieu Frechin venaient de prouver que lors de la transition diauxique, le complexe AME se dissocie en réponse à l'inhibition de la transcriptio d'*ARC1*, provoquant la relocalisation synchrone de la MetRS et de la GluRS respectivement dans le noyau et la mitochondrie. Dans le noyau, la MetRS régule la transcription de gènes codant les sous-unités de la chaîne respiratoire dont Rip1, la protéine Rieske du cytochrome *bc1* ainsi qu'Atp1 sous-unité du domaine F₁ de l'ATP synthase. Des expériences de purification par affinité en tandem de la MetRS avaient montré que la MetRS nucléaire interagissait avec des sous-unités de RNA Pol II telles que Rpb7 et Rpb4. Ayant été engagée pour étudier le rôle transcriptionnel de la MetRS, j'ai initié mon projet de thèse par la recherche des signaux d'imports nucléaire de cette protéine et de ses interactants nucléaire lui permettant d'être importée dans le noyau lors de la transition diauxique. Cette étude a été incluse dans la publication intitulée « Expression of Nuclear and Mitochondrial Genes Encoding ATP Synthase Is Synchronized by Disassembly of a Multisynthetase Complex » parue dans la revue *Molecular cell* et fait l'objet du premier chapitre de ma thèse.

Des résultats additionnels obtenus lors de cette étude grâce à une analyse par double hybride, complémentaires à l'article publié, m'ont permis de montrer que le domaine N-terminal de la MetRS est impliqué dans l'activité de régulation de la transcription médiée par la MetRS, et d'identifier les karyophérines responsables de son import nucléaire.

J'ai ensuite constaté que la délétion du premier NLS n'abolissait pas l'import nucléaire de la MetRS, ce qui m'a amené à la découverte d'un deuxième NLS mais également d'une forme clivée de la MetRS dans le noyau des levures. Mon sujet de thèse a alors pris une tournure différente, puisque l'objectif principal est devenu d'étudier et de caractériser cette forme clivée de MetRS. Celle-ci n'est pas issue d'un site d'initiation

de la traduction alternatif mais d'un clivage protéolytique d'une partie du domaine N-terminal. Cette forme clivée de MetRS est incapable d'interagir avec Arc1, et possède certainement un NLS, c'est pourquoi elle se relocalise dans le noyau. Nous avons généré des mutants ponctuels de résidus situés dans la partie N-terminale de la MetRS pour lesquels ce clivage est drastiquement réduit, ce qui nous a permis d'émettre des hypothèses concernant les protéases impliquées dans la maturation de cette MetRS nucléaire. Par des approches de génétique, nous avons pu montrer que la forme clivée est strictement nucléaire et essentielle pour la croissance des levures, et que cette fonction essentielle n'est pas portée par la MetRS non maturée. Nous avons également montré que cette forme clivée de MetRS nucléaire était active pour l'aminacylation l'ARNt et que comme attendu son activité de charge de l'ARNt est Arc1-indépendante puisqu'elle ne peut pas s'y lier et qu'Arc1 est activement exporter du noyau. Sachant que la MetRS entière qui se trouve principalement en complexe avec Arc1 (au sein du MSC AME) et qu'Arc1 interagissant préférentiellement avec l'ARNt^{Met} augmente de manière significative l'aminacylation de cet espèce d'ARNt^{Met}, nous avons émis l'hypothèse que cette MetRS tronquée pouvait avoir pour fonction principale d'aminacyler l'autre espèce d'ARNt^{Met} : l'ARNt_i^{Met}. Si tel devait être le cas, il y aurait compartimentalisation de l'aminacylation des ARNt^{Met} chez *S. cerevisiae* et une MetRS dédiée à l'aminacylation de chacune des 2 espèces d'ARNt^{Met}.

Enfin, nous avons également débuté une étude afin de vérifier l'existence d'un mécanisme similaire pour la MetRS d'*H. sapiens*, également capable de rejoindre le noyau de cellules humaines et dotée de deux NLS, tout comme la MetRS de *S. cerevisiae*. Pour ce faire, nous avons construit une souche de levure humanisée pour la MetRS. Cette étude nous a permis de découvrir que la MetRS d'*H. sapiens* complémente l'absence de la MetRS endogène de la levure et de confirmer qu'elle est également importée dans les noyaux de celles-ci.

IX Article de revue n°1 : 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.Genefinity.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

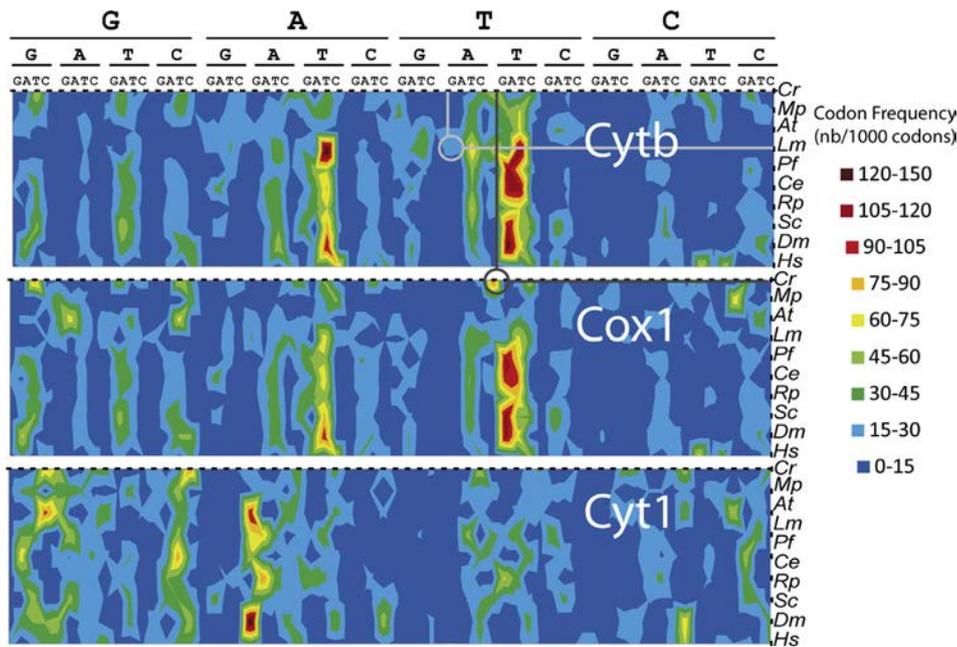


Fig. 1. A small survey of codon usage for three respiratory chain proteins across diverse genera. Organisms surveyed were *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Marchantia polymorpha* (Mp), *Arabidopsis thaliana* (At), *Rickettsia prowazekii* (Rp), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (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

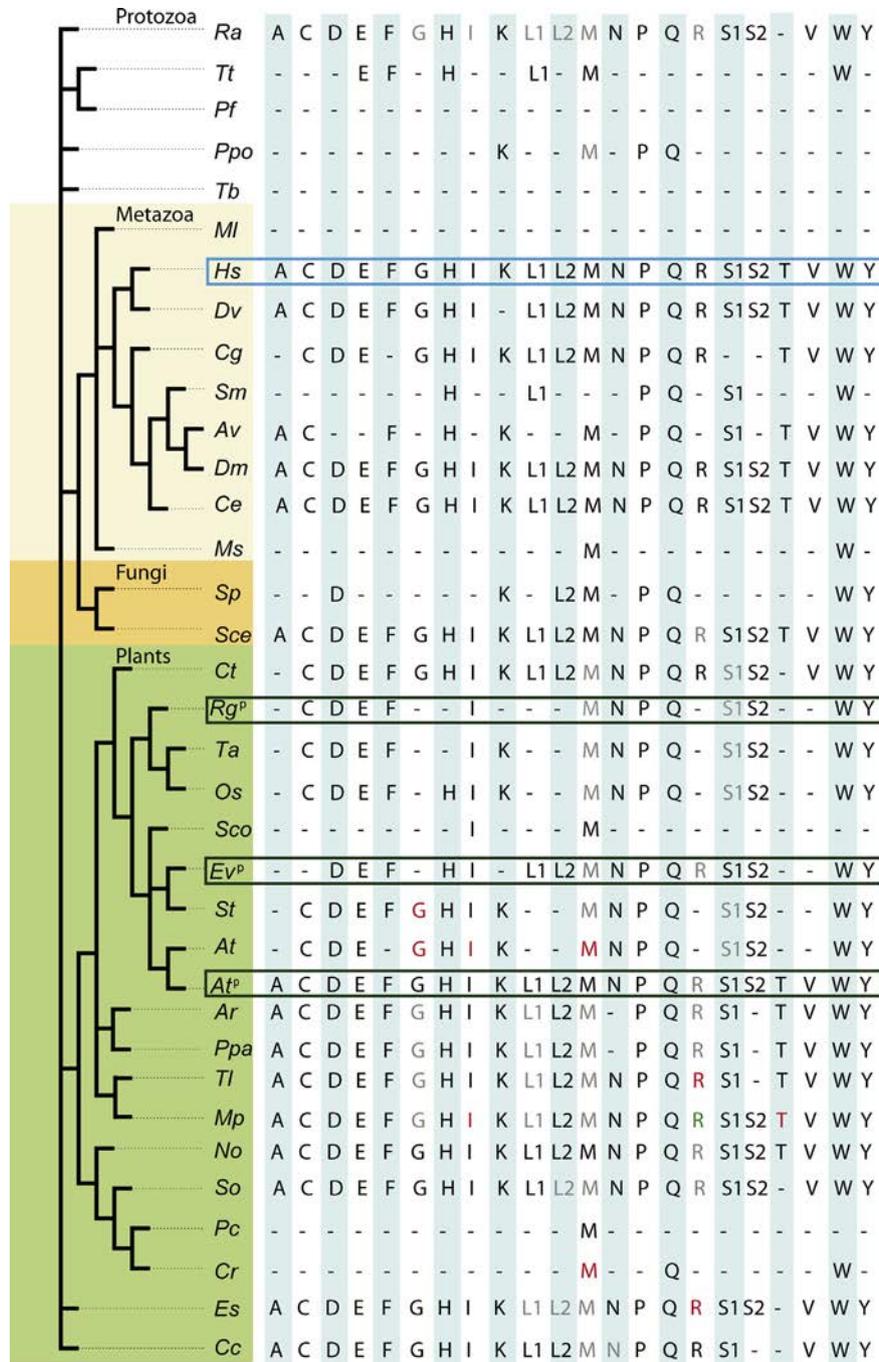


Fig. 2. Transfer RNA genes encoded by mitochondrial genomes of evolutionary divergent organisms. Only a few examples representative of the situation are given. The set of 22 mt tRNA genes of *Homo sapiens* was taken as arbitrary reference (blue frame). Amino acids in gray or green indicate that 2 or 3 isoceptor 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 isoceptor tRNA is missing to carry out mt translation. *Hs*, *Homo sapiens* (J01415); *Dv*, *Didelphis virginiana* (Z29573); *Dm*, *Drosophila melanogaster* (U37541); *Ce*, *Caenorhabditis elegans* (U37541); *Sm*, *Steganacarus magnus* (EU935607); *Av*, *Armadillidium vulgare* (EU935607); *Cg*, *Crassostrea gigas* (AF177226); *Ms*, *Metridium senile* (AF000023); *MI*, *Mnemiopsis leidyi* (JF760210); *Sce*, *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 *Rgp* (*Rhizanthella gardneri*, NC_014874), *Evp* (*Epifagus virginiana*, NC_014874) and *Atp* (*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	diatom (2ary) [†]	plastids (2ary)	
	Os	At					Pt	Pf	Tg
A	3	2	2	3	2	2	2	1	1
C	3	3	4	3	2	2	2	1	1
D	3	3	3	2	2	2	2	2	1
E	3	2	1	2	2	2	2	2	2
F	3 (type?)	3 (1+a+b)	3 (1+a+b)	4 (type?)	2 (a+b)	3 (1+a+b)	4 (type?)	3 (1+a+b)	3 (1+a+b)
G	2	2	2	2	1	2	2	1	2
H	2	2	2	2	1	2	2	2	2
I	1	2	2	2	1	2	2	2	2
K	2	2	3	2	2	2	2	2	2
L	3	2	2	2	2	2	2	2	2
M	3	2	3	2	2	2	2	2	2
N	3	3	3	2	1	2	2	2	1
P	2	2	2	2	2	2	2	2	1
Q	2	1	1	1	1	1	2	1	1
R	2	2	1	2	1	1	1	2	2
S	3	2	4	2	2	2	2	2	2
T	2	3	4	2	2	2	2	1	2
V	4	2	2	2	2	2	2	2	2
W	3	2	2	2	1	2	2	2	2
Y	4	3	2	2	2	2	2	2	2
# aaRS genes	53	45	49	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.

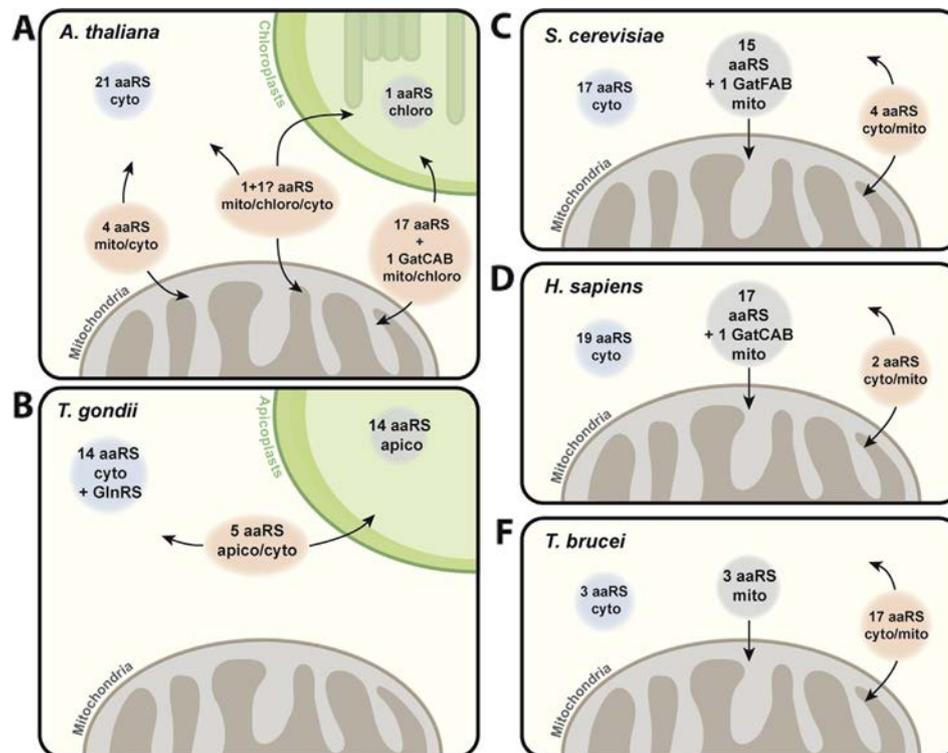


Fig. 3. Aminoacyl-tRNA synthetases (and amidotransferases) localization in *A. thaliana*, *T. gondii*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens* and *T. brucei*. In all these organisms, all the aaRS-encoding genes are localized in the nucleus. A) In *A. thaliana*, most organellar aaRSs are shared between the 2 organelles 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 *Podospora 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}(^{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

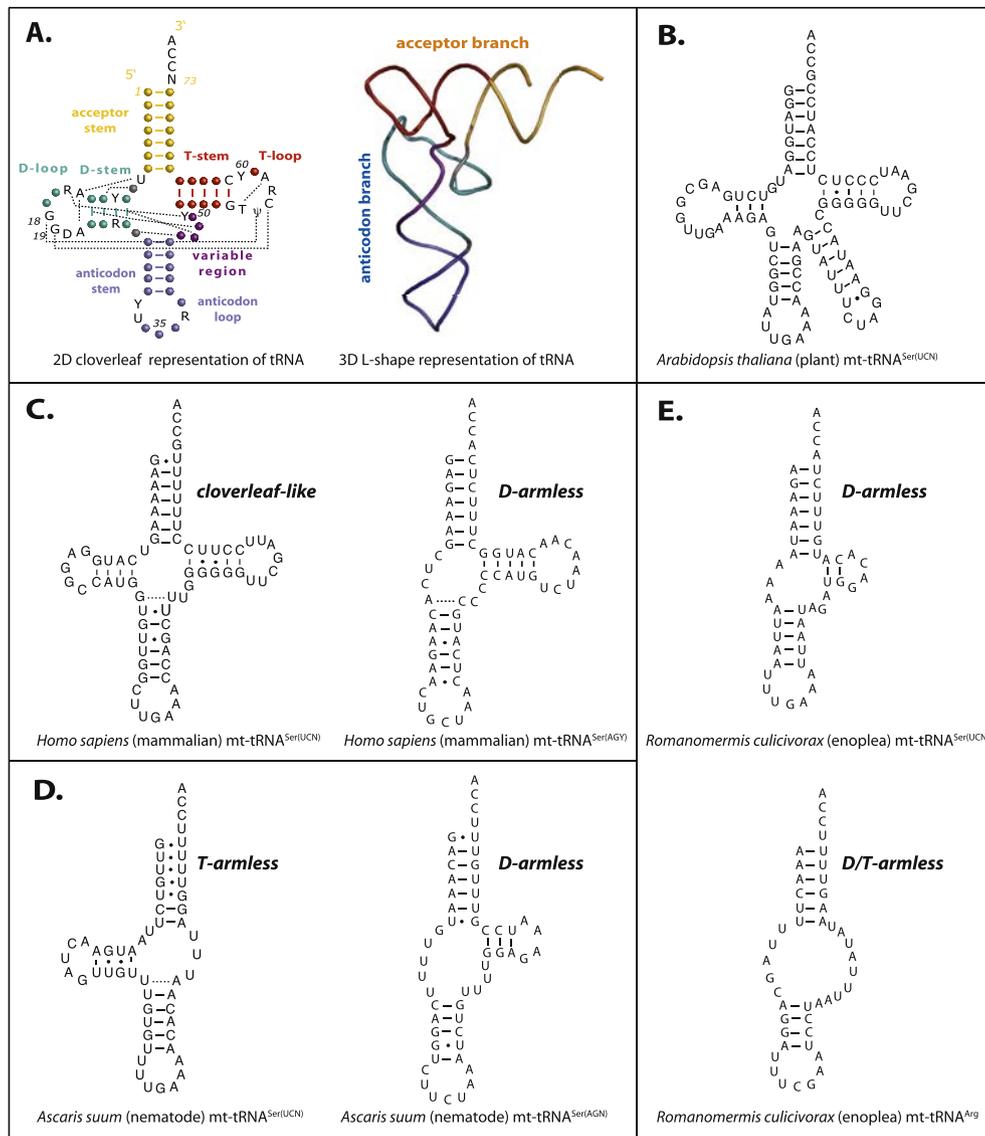


Fig. 4. Atypical structural properties of mitochondrial tRNAs. A) 2D and 3D representations of canonical tRNA [89,90]. tRNA's domains are colored and named. Conserved and semi-conserved nucleotides are indicated. Long distance interactions are displayed using dashed lines. B) Mt tRNA^{Ser(UCN)} from *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

- M.W. Gray, G. Burger, B.F. Lang, The origin and early evolution of mitochondria, *Genome Biol.* 2 (2001) 1–5.
- 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.
- H. Schwenzer, 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.
- A. Schneider, Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation, *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 1033–14053.
- 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.
- 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.
- F. Juhling, J. Putz, C. Florentz, P.F. Stadler, Armless mitochondrial tRNAs in enoplea (nematoda), *RNA Biol.* 9 (2012) 1161–1166.
- 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.
- 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.
- 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.
- E. Trotta, Selection on codon bias in yeast: a transcriptional hypothesis, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 9382–9395.
- H. Zur, T. Tuller, Strong association between mRNA folding strength and protein abundance in *S. cerevisiae*, *EMBO Rep.* 13 (2012) 272–277.
- M.M. Fonseca, S. Rocha, D. Posada, Base-pairing versatility determines wobble sites in tRNA anticodons of vertebrate mitogenomes, *PLoS One* 7 (2012) e36605.
- 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.
- 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.
- K. Fredrick, M. Ibba, How the sequence of a gene can tune its translation, *Cell* 141 (2010) 227–229.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- S. Wende, E.G. Platzer, F. Juhling, J. Putz, C. Florentz, P.F. Stadler, M. Mörl, Biological evidence for the world’s smallest tRNAs, *Biochimie* 100 (2014) 151–158.
- T. Lithgow, A. Schneider, Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes, *Philos. Trans. R. Soc. B* 365 (2010) 799–817.
- T. Salinas, A.M. Duchêne, L. Maréchal-Drouard, Recent advances in tRNA mitochondrial import, *Trends Biochem. Sci.* 33 (2008) 320–329.
- J.D. Alfonzo, D. Söll, Mitochondrial tRNA import – the challenge to understand has just begun, *Biol. Chem.* 390 (2009) 717–722.
- 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.
- P. Kamenski, O. Kolesnikova, V. Jubenet, 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.
- R.G. Dorrell, C.J. Howe, What makes a chloroplast? Reconstructing the establishment of photosynthetic symbioses, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 1865–1875.
- 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.
- 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.
- M. Frechin, A.M. Duchêne, H.D. Becker, Translating organellar glutamine codons: a case by case scenario? *RNA Biol.* 6 (2009) 31–34.
- 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.
- A.M. Duchêne, A. Giritch, B. Hoffmann, V. Cognat, D. Lancelin, 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.
- 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. Vandenbol, 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 (VASI) 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. Lightowers, 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. Böhme, 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 *Podospora anserina* 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. Krashennikov, 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 rRNA 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 pyloalis* (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. Middendorff, 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^{Lys}, *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. Altmann, 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^{Set} 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 isoacceptor 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^{Set} 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. Chackalovcak, 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.

X Article de revue n°2 : Exploring the evolutionary diversity and assembly modes of multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes: Lessons from unicellular organisms



Review

Exploring the evolutionary diversity and assembly modes of multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes: Lessons from unicellular organisms



Daphné Laporte, Jonathan L. Huot, Gaétan Bader, Ludovic Enkler, Bruno Senger, Hubert Dominique Becker*

UMR 'Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie', CNRS, Université de Strasbourg, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2014

Revised 3 October 2014

Accepted 6 October 2014

Available online 12 October 2014

Edited by Wilhelm Just

Keywords:

Multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex

Unicellular

AIMP

GST-like domain

WHEP domain

EMAPII domain

Assembly mode

Evolution

ABSTRACT

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) are ubiquitous and ancient enzymes, mostly known for their essential role in generating aminoacylated tRNAs. During the last two decades, many aaRSs have been found to perform additional and equally crucial tasks outside translation. In metazoans, aaRSs have been shown to assemble, together with non-enzymatic assembly proteins called aaRSs-interacting multifunctional proteins (AIMPs), into so-called multi-synthetase complexes (MSCs). Metazoan MSCs are dynamic particles able to specifically release some of their constituents in response to a given stimulus. Upon their release from MSCs, aaRSs can reach other subcellular compartments, where they often participate to cellular processes that do not exploit their primary function of synthesizing aminoacyl-tRNAs. The dynamics of MSCs and the expansion of the aaRS functional repertoire are features that are so far thought to be restricted to higher and multicellular eukaryotes. However, much can be learnt about how MSCs are assembled and function from apparently 'simple' organisms. Here we provide an overview on the diversity of these MSCs, their composition, mode of assembly and the functions that their constituents, namely aaRSs and AIMPs, exert in unicellular organisms.

© 2014 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During ribosomal protein synthesis, mRNA codons are decoded through base pairing with the anticodon of aminoacylated tRNAs. Therefore, maintenance of the genetic code and of the information stored as nucleotide triplets in genes relies on the rules that govern the recognition of a given tRNA by its corresponding aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS) [1]. The term 'second genetic code' has been introduced to describe this concept [2]. AaRSs belong to one of the most ancient family of proteins and are mainly known for their primary function, which is to charge each tRNA species with its cognate amino acid (aa) [3]. Originally characterized and isolated in the late 50s and early 60s [4–6], aaRSs have been extensively studied since then. Interestingly, the propensity of several aaRSs to form complexes called multi-synthetase complexes (MSCs) was already discovered in the early 1970s [7,8]. Their potential to assemble into

supramolecular complexes was initially discovered in mammals, in which the MSC is composed of eight aaRSs and three auxiliary proteins, named 'aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins' (AIMP) [7,8]. MSC formation was believed to be restricted to higher eukaryotes, as the 20 aaRSs isolated either from *Saccharomyces cerevisiae* or from *Escherichia coli* were found to be only in a free form [9,10]. However, although all aaRSs from *E. coli* were initially purified in their free forms using a methodology combining ion-exchange and adsorption chromatography, the existence of an MSC in *E. coli* was reported a decade later [11]. So far, this is the only study reporting the presence of MSCs in the bacterial branch of the tree of life. This study was not pursued any further, as, during the next decades, research mostly focused on deciphering the molecular determinants that determine the tRNA-aaRS recognition [12].

From an evolutionary point of view, the accepted scheme is that primitive aaRSs contained solely a contemporary catalytic core that was capable of activating aa. New domains were later recruited to these amino acid-activating polypeptides, either by

* Corresponding author. Fax: +33 (0)3 88 65 13 65.

E-mail address: h.becker@unistra.fr (H.D. Becker).

fusion or insertion, allowing the ancestral aaRS to bind RNA helices that corresponded to the contemporary tRNA acceptor arm (accepting minihelix) [13]. These primitive tRNA–aaRS pairs then evolved, mainly through accretion of new domains (e.g. of the anticodon minihelix and anticodon-binding domain) to give rise to the modern tRNAs and aaRSs. Although the details of their evolutionary history are still a matter of debate, the modular organization of aaRSs strongly suggests that they result from a piece-wise sequential addition of domains to the aa-activating core [3,14]. Besides the anticodon-binding domain, other functional domains, including the editing domains [15] were later added to the aaRS sequence, as well as modules that have not been assigned any function so far [16–18]. Contemporary aaRSs should thus be regarded as catalytic folds that attracted, throughout evolution, several other independent modules, which are not necessarily associated with tRNA aminoacylation.

Some of these additional modules are made of folds that are typically involved in protein–protein interactions, as, for example, the glutathione transferase (GST) domain. Such modules might have allowed aaRSs to assemble into complexes, like the MSCs [19,20]. Others domains, like the EMAP II domains, might have allowed aaRSs to accomplish tasks that are completely unrelated to protein synthesis [21]. It has even been proposed that the capacity of these multitasking enzymes to assemble in MSCs allows for both enhanced efficiency of tRNA aminoacylation of the participating aaRSs [22–24] and annexation of this essential and central process of aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) synthesis to other cellular pathways [25–27].

The evolutionary origin of MSCs is still unclear, and the advantage brought in by the accretion of aaRSs into MSCs was for a long time an open question. Recently, it was proposed that metabolic events might have facilitated the incorporation of as many as eight aaRSs into the MSCs of higher eukaryotes [25]. The consensual concept that has emerged during the last decade is that MSCs are reservoirs for releasable and multifunctional aaRSs [28–30]. Sequestration inside MSCs confines aaRSs activities to their primary tRNA charging activity, while they can carry out alternative regulatory roles upon release. As most of these non-conventional roles include regulation of gene expression [27,31] or participation in a signaling pathway [32], the released aaRSs often relocate to a new subcellular compartment (e.g. the nucleus or the mitochondrion) [26,27,31]. However, it is not known if the nuclear relocalization of MSC-released aaRSs is independent or not of regular nuclear import mechanisms that have been associated with aaRS-mediated tRNA channeling or the control of tRNA integrity and functionality [33,34]. All eukaryotic MSCs characterized so far were primarily isolated from cytosolic fractions [24,35], thus, these complexes are considered to be exclusively restricted to the cytosol. Consequently, they can act as a dynamic cytosolic anchors for relocating aaRSs [27]. However, the presence of MSCs in other subcellular compartments was so far not exhaustively investigated. There is even one study reporting the presence of a complex containing 13 aaRSs in nuclear extracts from Chinese hamster ovarian cells and rabbit kidney cells [36]. This complex was proportionally less abundant than its cytosolic orthologue, but was shown to be more stable, suggesting that it might not be as dynamic as the cytosolic MSC and, thus, more likely to be involved in tRNA export from the nucleus.

In this review, we focus on the various features of the MSCs that have been identified in low-complexity organisms such as bacteria, archaea, fungi and protozoans. We describe their components (aaRSs and AIMPs), their domain architectures and assembly modes and by comparing them to those found in MSCs from multicellular organisms, we propose that MSCs segregate in two different evolutionary types.

2. Main text

2.1. MSCs composition and functions in low-complexity organisms and in metazoan

Overall, most of the knowledge on MSCs almost exclusively originates from studies made on a few metazoan species and especially on human cells. As a consequence of this narrow sampling of the species in which MSCs have been looked for and characterized, we have a biased view of the function of these complexes. Based on their expected roles of dynamical platforms for relocating aaRSs, the presence of MSCs in prokaryotes, in which the quasi-totality of the cellular processes takes place in a single compartment, would be difficult to explain. In addition, there are contradicting reports concerning the presence of MSC in some prokaryotes and their compositions have not always been fully deciphered. Finally, when tested, the only role that could be attributed to MSCs from low-complexity organisms was an enhancement of the tRNA aminoacylation efficiency of their participating aaRSs [24], making these complexes apparently less interesting to study than their metazoan orthologues.

2.1.1. Bacterial MSC

In 1987, almost a decade after the purification of 20 individual aaRSs from *E. coli*, a study reported the isolation of a MSC from the same bacterial species [11]. Strangely, depending on the method used to break cells, the molecular weight of the complex varied from 1 MDa (freeze press) to 400 kDa (sonication). The complex could only be isolated on 6% agarose columns but not by regular size-exclusion chromatography on Sephadex-based columns. This complex does not seem to contain all *E. coli* aaRSs, since, given the pool of aaRSs present in this species, the expected size of a MSC containing all of them would be of 2.4 MDa. This discrepancy in the size of the complex, suggests that the strength of the protein–protein interactions mediating the assembly of the complex is extremely weak. Moreover, such a MSC has never been isolated from any of the numerous other bacterial species from which aaRSs have been extracted and purified; and this study still is the only one reporting the presence of a MSC in *E. coli*. For these reasons, the existence of bacterial MSCs remains, to our opinion, to be clearly demonstrated, despite the fact that bacterial aaRSs have indeed been found to form complexes [37,38]. However, these complexes cannot be considered as MSCs *per se*, since they only contain a single aaRS species.

2.1.2. Archaeal MSCs

2.1.2.1. *Haloarcula marismortui*. The first archaeal MSC that has been described was isolated from *H. marismortui* [39]. This halophilic and marine organism contains one or two big complexes that include almost all twenty aaRSs (Fig. 1). This complex is resistant to dissociation when subjected to various chromatographic separations (size-exclusion, ion exchange, hydroxyapatite and reversed phase). However, no additional information concerning the presence or absence of non-enzymatic anchoring proteins (AIMPs) or concerning the potential role of this MSC is available.

2.1.2.2. *Methanothermobacter thermautotrophicus*. The methanogenic archaea *M. thermautotrophicus* contains a well-characterized MSC. This complex represents the best-studied archaeal MSC, so far [30,40–42]. This macromolecular edifice is composed of 3 aaRSs: leucyl- (LRS); prolyl- (PRS); and lysyl-tRNA synthetase (KRS), and the elongation factor 1A (EF-1A) (Fig. 1). The presence of LRS seems to be essential, as it probably acts as an assembly factor for PRS, KRS and EF-1A. When subjected to size-exclusion chromatography, the three aaRSs coelute at high molecular weight (600 kDa) suggesting that they assemble with a 2-2-2

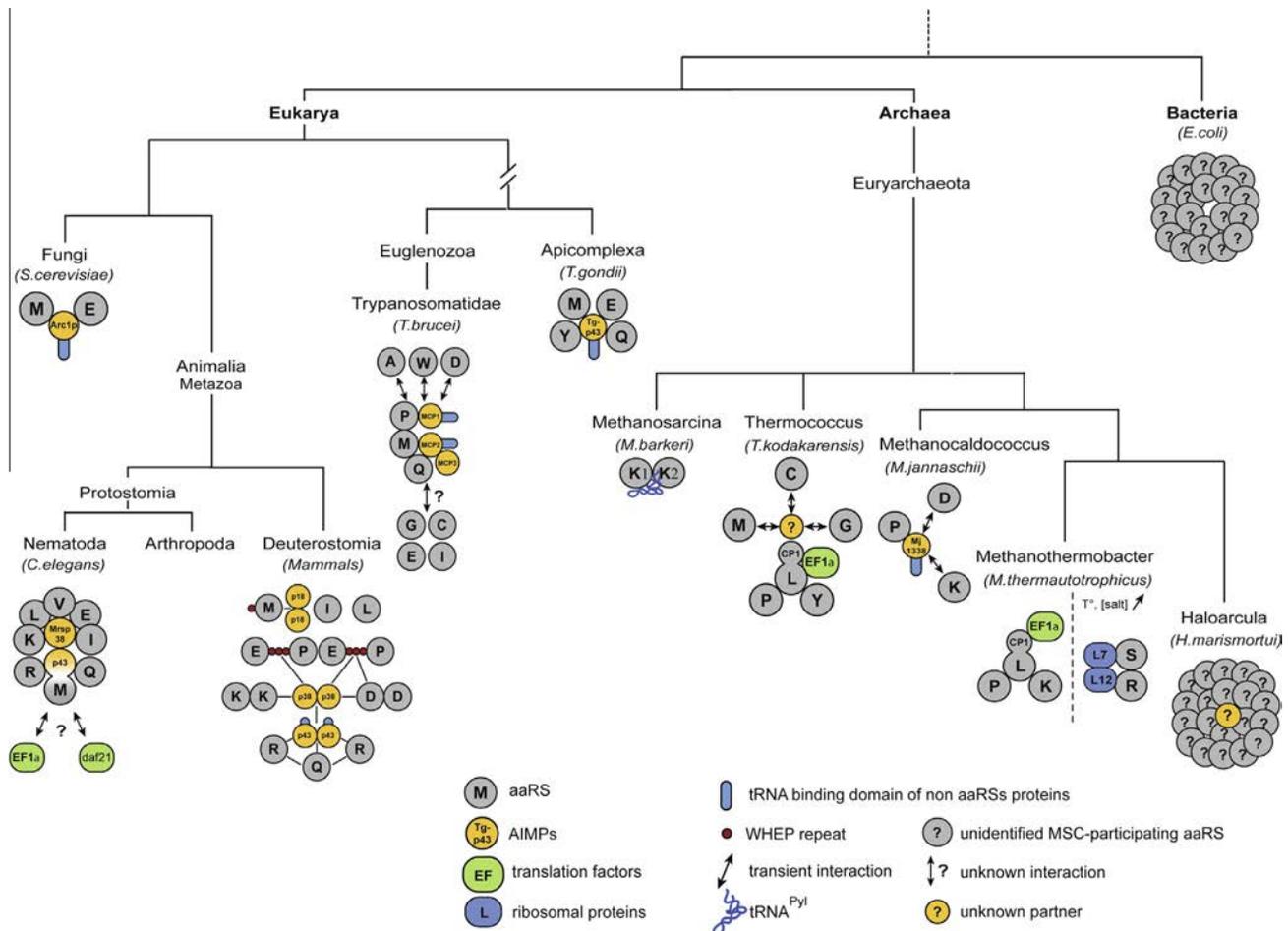


Fig. 1. Composition and architecture of all characterized MSCs. Schematized phylogenetic tree presenting the various organisms in which a MSC has been identified and the corresponding illustration of the MSC's architecture and/or composition. The one-letter code is used for each aaRS (gray). K1 and K2 refer to Class 1 and Class 2 KRSS, respectively.

stoichiometry. KRS and PRS bind to the N- and C-terminal part of LRS, respectively, whereas EF-1A binds the connective peptide (CP1) of LRS that is responsible for its amino acid proofreading activity [43]. This CP1 domain is a post-transfer editing domain, and its activity is not affected by EF-1A binding. Within the complex, the catalytic efficiency of PRS and KRS is improved. When bound to EF-1A, LRS displays an increased tRNA aminoacylation efficiency owing to an 8-fold increased k_{cat} for Leu-tRNA^{Leu} synthesis compared to free LRS. A modest enhancement of EF-1A GTP hydrolysis is also observed when this factor is bound to LRS. In the light of these observations, it was proposed that the *M. thermotrophicus* MSC intensifies aa-tRNA channeling (at least in the case of Leu-tRNA^{Leu}, Pro-tRNA^{Pro}, Lys-tRNA^{Lys}) from aminoacyl-tRNA synthesis to its delivery to translating ribosomes.

A second MSC has been identified in *M. thermotrophicus* via protein-protein interaction detection methods, in which arginyl-tRNA synthetase (RRS) was used as bait. This second complex contains two aaRSs: seryl-tRNA synthetase (SRS); and RRS. The latter was found to interact with its tRNA^{Arg} substrate within the complex [23] (Fig. 1). The ribosomal proteins L7 and L12, which are normally located at the ribosome stalk, have also been found to participate in this complex [44]. Although the activity of RRS was shown to remain unaffected within this complex, the activity of SRS shows a 4-fold increase as compared to the free enzyme. Similarly, the catalytic activity of SRS increases with temperature and salt concentration when associated with RRS. It was proposed that this MSC is involved in tRNAs recycling, as its association with

translating ribosomes may help to avoid tRNA diffusion, and promote fast tRNA re-aminoacylation to enable immediate re-used for the decoding of the next downstream mRNA codons.

2.1.2.3. *Methanocaldococcus jannaschii*. In *M. jannaschii*, PRS was co-purified with the protein encoded by the Mj1338 ORF. This protein has been annotated as a putative metabolic enzyme involved in methanogenic metabolism [45] (Fig. 1). This enzyme has been identified as an inactive paralogue of Hmd (H_2 -forming methylene-tetrahydromethanopterin dehydrogenase). It has been shown that in *Methanothermobacter marburgensis*, HmdII and HmdIII, two other paralogues of Hmd, do not exhibit Hmd activity [46]. Interestingly, transcription of the genes coding for HmdII and HmdIII is regulated by H_2 concentration: transcription of *hmdII* is up regulated and that of *hmdIII* is down regulated under H_2 -limited growth conditions. These findings suggest that HmdII and HmdIII are indirectly involved in methanogenesis. In *M. jannaschii*, HmdII/Mj1338 and HmdIII can bind to both PRS and tRNA^{Pro}, thereby forming ternary complexes. However the precise architectures of these particles have not yet been established [47]. HmdIII/Mj1338 also binds other archaeal aaRSs such as KRS and aspartyl-tRNA synthetase (DRS), suggesting the existence of another HmdII/Mj1338-containing MSC in this archaeal species. The systematic presence of an enzyme involved in methanogenesis in the *M. jannaschii* MSCs pinpoints toward a possible link between energy production and translation. Thus, it is possible that in methanogenic archaea MSCs can couple energy production to energy use for

protein synthesis in response to environmental conditions. However, an Mj1338-containing MSC remains questionable, since it was not ruled out whether these aaRSs co-bind together to Mj1338 or bind separately in the original paper. Mj1338 was shown to also bind, separately, human KRS and PRS by the same method, suggesting a potential non-specific protein interaction.

2.1.2.4. *Thermococcus kodakarensis*. In *T. kodakarensis*, affinity purification chromatography using LRS as bait resulted in the co-elution of 5 other aaRSs: PRS; tyrosyl- (YRS); glycyl- (GRS); methionyl- (MRS); and cysteinyl-tRNA synthetase (CRS), together with EF-1A, elongation factor 2 (EF-2), initiation factor 2 (IF-2) and -2B (IF-2B) and several ribosomal proteins [48] (Fig. 1). In agreement with the composition of this MSC, purified ribosome fractions of *T. kodakarensis* exhibited the tRNA aminoacylation activities of PRS, LRS and YRS, confirming the association between these aaRSs and the protein synthesis machinery. Additionally, the catalytic efficiency of LRS was found to be increased when it associates with EF-1A in its GTP-bound form but not in the GDP-bound state. This indicated that only the activated elongation factor could act as an enhancer for LRS. As a consequence, the *T. kodakarensis* MSC was proposed to increase the activities of its associated aaRSs in order to boost the rate of protein synthesis.

2.1.2.5. *Methanosarcina barkeri*. In *M. barkeri*, monomethylamine methyltransferase genes contain amber stop codons that are reassigned to pyrrolysine (Pyl) [49]. For their translation, the monomethylamine methyltransferase mRNAs require synthesis of a Pyl-charged amber suppressor tRNA pyrrolysine (tRNA^{Pyl}). *M. barkeri* was shown to use two different strategies to generate pyrrolysyl-tRNA^{Pyl} (Pyl-tRNA^{Pyl}). The first pathway is essential, and involves the direct aminoacylation of tRNA^{Pyl} with Pyl by a pyrrolysyl-tRNA synthetase [50]. A second and additional pathway involves both class 1 KRS (KRS1) and class 2 KRS (KRS2), which misacylate tRNA^{Pyl} with lysine, as well as a still unidentified tRNA-dependent amino acid-modifying enzyme that converts this mischarging lysine into Pyl. Interestingly, lysylation of tRNA^{Pyl} by KRS1 and KRS2 can only be achieved through the formation of a ternary complex, in which tRNA^{Pyl} is sandwiched by both KRSs, as each KRS is individually unable to mischarge tRNA^{Pyl} [51] (Fig. 1). In this complex, KRS1 acts as a stabilizer, whereas KRS2 catalyses misacylation of tRNA^{Pyl} with lysine. However, the rate of tRNA^{Pyl} charging is 100-fold slower, compared to the one of the cognate tRNA^{Lys} by each of these KRSs. It was thus surmised that this complex is more likely to be involved in modulating the level of suppressing Pyl-tRNA^{Pyl} available in the cell.

2.1.3. Fungal MSCs

2.1.3.1. *S. cerevisiae*. The AME (Arc1p-MRS-ERS) complex from *S. cerevisiae* is one of the most studied MSCs. This complex was discovered in the mid 1990's and is made of two aaRSs—MRS and glutamyl-tRNA synthetase (ERS)—and one AIMP, Arc1p, which is homologous to the AIMP1/p43 assembly factor of the mammalian MSC [24,52] (Fig. 1). Arc1p was initially identified as a cofactor for nuclear export of tRNA by Hurt and colleagues, who used the synthetic lethality approach to identify a genetic relationship between the *LOS1* (encoding an exportin) and *ARC1* (encoding Arc1p) genes [24].

Arc1p acts as an ark for the two aaRSs [53,54]. It specifically binds the N-terminal GST-like domains of MRS and ERS via the GST-like domains that are located in its N-terminus. Complete deletion of N-terminal extensions of the two aaRSs is not lethal, but abolishes their interaction with Arc1p. Formation of the AME complex causes nuclear exclusion of the three AME proteins, as Arc1p is actively excluded from the nucleus through the Xpo1p-dependent nuclear export pathway [55]. Indeed, even when

artificially fused to a strong nuclear localization signal, Arc1p is still very efficiently exported from the nucleus, suggesting that Arc1p contains a strong nuclear export signal (NES), although a classical leucine rich NES (target of Xpo1) has not been clearly identified. The accumulation of Arc1p-NLS fusion protein in the nucleus of yeast *xpo1* mutant strain confirmed the presence of a strong NES. Notably, deletion of the N-terminal sequence of Arc1p allows its entry in the nucleus, suggesting that the Arc1p NES is located within this protein region [56]. Along the same line, deletion of *ARC1* results in nuclear relocation of MRS and to a lesser extent, of ERS [56]. However, the mechanism and structural determinants governing the nuclear relocation of Arc1p, MRS and ERS remain to be identified. Moreover, although nuclear localization of Arc1p can be fully understood given its expected role in exporting tRNA from this organelle, the function of ERS and MRS in the nucleus remains puzzling. One possibility would be that they participate in a quality control step for newly transcribed tRNAs, as also suggested for other nucleus-localizing aaRSs in other organisms [33,34]. It is still unknown whether all or only a subset of the aaRSs are capable of entering the nucleus, and whether MSCs, like the AME complex, control nuclear localization of their aaRS components. As only a few such MSCs have been characterized so far, one could speculate that, if they exist, they must be highly dynamic.

For a long time after its discovery, the function of the *S. cerevisiae* AME complex had been associated with the improvement of the tRNA aminoacylation efficiency (k_{cat}/K_M) of MRS and ERS [24,57]. This efficiency enhancement is mediated by the tRNA binding domain in the C-terminus of Arc1p that probably compensates for the low affinity of MRS and ERS for their cognate tRNAs [58]. Therefore, the catalytic efficiency of Arc1p-bound MRS is increased by 500-fold as compared to the free enzyme. However, another study reported only a 3 to 4-fold increase of the aminoacylation efficiency of MRS upon binding to Arc1p, leaving unclear the degree by which Arc1p enhance the charging efficiency of MRS [59]. This gain in tRNA aminoacylation efficiency is mainly due to an Arc1p-mediated lowering of the K_M of MRS for its cognate tRNA [24], which allows AME-assembled MRS to be far more efficient at low tRNA^{Met} concentrations. Similarly to MRS, the catalytic efficiency of Arc1p-bound ERS is enhanced compared to the free enzyme, owing to a 100-fold increase in the affinity of Arc1p-bound ERS for its cognate tRNA^{Glu} [57].

Interestingly, both Arc1p-bound MRS and free MRS have been shown to mismethylate tRNAs in vivo and in vitro under oxidative stress [60]. These mischarged Met-tRNAs are subsequently used during translation generating proteins containing misincorporated methionines. Previous reports showed that these additional methionine residues can protect the proteins against reactive oxygen species (ROS) [61,62]. If these misincorporated methionines replacing non-methionine residues are, for example, located near the active site of an enzyme, their oxidation will shield this strategic position against ROS. The AME complex would not be necessary for this defense mechanism in vivo, since the extent of mismethylation does not vary between a wild type and an *arc1Δ* strain, suggesting that MRS alone might be able to mismethylate tRNAs [60]. However, it is still not known whether binding to Arc1p also enhances the charging efficiency of MRS for non-cognate tRNAs, like it does for its cognate tRNA^{Met}. If this would be the case, the AME complex would not then increase the extent of protection against ROS but could modify the speed of the response to oxidative stress.

The fact that *S. cerevisiae* MRS and ERS are far more efficient in tRNA charging when assembled in the AME complex than in their free forms suggested that the role of this MSC would strictly be confined to improve aa-tRNA synthesis. For that reason the AME MSC was not considered to be a dynamic complex and the

existence and localization of Arc1p-unbound MRS and ERS was not exhaustively checked. Recently it was shown that when yeast cells switch from fermentation to respiration expression of Arc1p is decreased [27] triggering the release of ERS. Free ERS is then able to relocate to the mitochondria and act as a mitochondrial non-discriminating ERS that misacylates mitochondrial-encoded tRNA^{Gln} with glutamate [27]. The glutamate acylating tRNA^{Gln} is then transamidated by the mitochondrial GatFAB amidotransferase into glutamine yielding a correctly paired Gln-tRNA^{Gln} species. These findings show that Arc1p, and thus the AME complex, plays the role of an anchoring platform that regulates the subcellular location of ERS in response to which metabolism—fermentation or respiration—is used by *S. cerevisiae*. Since the mitochondrial transamidation reaction involving the cytosolic ERS and the GatFAB AdT, is the only pathway through which yeast cells generate the mitochondrial Gln-tRNA^{Gln}, the dynamics of AME complex is essential for the expression of the mitochondrial genes and thus the ability of yeast cells to respire.

To summarize, the yeast AME complex would have two different roles. In fermenting yeast cells binding of ERS and MRS to the AIMP protein Arc1p improves their aminoacylation efficiency. Concomitantly, Arc1p (and thus the AME complex) also serves as an anchoring platform sequestering ERS in the cytoplasm in fermenting cells, and releasing ERS so that it can relocate in the mitochondria when cells need to respire. What happens to MRS in respiring yeast cells is still unknown. Obviously, the decrease in Arc1p levels upon switch to respiration should also trigger the release of MRS, and, since deletion of *ARC1* triggers nuclear relocation of MRS, one could imagine that MRS could relocate to this compartment in respiring cells to perform yet undetermined functions.

2.1.3.2. *Schizosaccharomyces pombe*. Analysis of the initiation factor 3 (eIF3p) interactome in the fission yeast *S. pombe* [63] revealed the presence of a translasome: a super-complex linking protein synthesis and degradation. Seven aaRSs were identified within this complex: threonyl-tRNA synthetase (TRS); SRS; MRS; DRS; phenylalanyl-tRNA synthetase (FRS); ERS; and GRS together with a protein that was identified as a cofactor for MRS and ERS. The 7 aaRSs and the MRS and ERS cofactor protein may constitute a MSC in *S. pombe*. Notably, MRS, ERS and their cofactor are the most highly abundant proteins in this putative MSC. Thus, this study suggests the existence in fission yeast of an MSC that would be similar to the *S. cerevisiae* AME complex, composed of MRS, ERS, and a cofactor protein that resembles Arc1p. However, it is still not known whether the other aaRSs found in the translasome are part of this MSC. The role of the putative *S. pombe* MSC is still unknown, but it has been shown that the function of the translasome, of which this MSC is part of, is to increase translation efficiency.

2.1.4. Protozoan MSCs

2.1.4.1. *Trypanosoma brucei*. A recent study revealed that the protozoan pathogen *T. brucei*, which causes human African trypanosomiasis, harbors a 1.2 MDa MSC [22].

Remarkably, this complex is organized like a mammalian MSC. Indeed, it contains 3 AIMPs called MCP1–2–3 (for MARS Complex-associated Proteins), which bind to at least 6 aaRSs: PRS, MRS, DRS, glutaminyl- (QRS), alanyl- (ARS) and tryptophanyl-tRNA synthetase (WRS) (Fig. 1). Four of these aaRSs (PRS, MRS, DRS and QRS) are also found in the mammalian MSC. Sequence homology searches have revealed that the three AIMPs of *T. brucei* have homologues in various organisms. For example, MCP1 has a tRNA-binding domain and a GST-like domain and therefore resembles the yeast protein Arc1p that binds ERS and MRS. Given the sequence similarity between MCP2 and the bacterial tRNA-binding

protein Trbp111 or eukaryotic tRNA binding proteins, it is possible that MCP2 contains a tRNA-binding domain and does not simply serve as a scaffold protein within the protozoan MSC. This hypothesis has been confirmed in in vitro studies, in which MCP2 was shown to bind various tRNAs. Interestingly, MCP3 shares some sequence similarity with the bacterial protein YbaK, which has been shown to be a free-standing editing domain that deacylates mischarged cysteinyl-tRNA^{Pro} or alanyl-tRNA^{Pro}, thereby compensating the lack of these editing activities of ProRS [64,65]. Thus, in the *T. brucei* MSC, MCP3 might be involved in misacylated tRNA editing and the proofreading of aa-tRNAs generated by the MSC aaRSs.

Overall, the role of the *T. brucei* MSC is probably to enhance the catalytic efficiency of the aaRSs building the complex. Indeed, it was shown that, in vitro, MCP2 increases the rate of tRNA^{Met} aminoacylation. Other, in vivo experiments showed that an MCP2-deficient *T. brucei* strain is less infectious than a wild-type strain. Taken together, these results suggest that the MSC of *T. brucei* is important for the parasite's fitness. Consequently, it represents an attractive drug target in the search for treatments against human African trypanosomiasis.

2.1.4.2. *Toxoplasma gondii*. Recently, an MSC was isolated from the apicomplexan, *T. gondii*, which is the pathogen causing toxoplasmosis [66]. This 1 MDa complex is localized in the cytoplasm of the parasite and is composed of 4 aaRSs: MRS; ERS; QRS; and tyrosyl-tRNA synthetase (YRS), and a single AIMP called Tg-p43 (*T. gondii* p43). The 4 aaRSs are bound to Tg-p43 through their N-terminal GST-like domains, which are similar to the GST-like domains of the *S. cerevisiae* Arc1p (Fig. 1). Tg-p43 also contains a tRNA binding domain that shares sequence similarity with both human AIMP1/p43 and yeast Arc1p. Notably, the *T. gondii* MSC resembles to the *S. cerevisiae* AME complex in several ways: the subcellular localization of the complex is the same; both MSCs contain MRS and ERS; and their AIMPs are highly similar in terms of sequence homology and structural domains.

Interestingly, the mutant parasite in which the gene encoding Tg-p43 has been deleted is viable and its pathogenicity is not affected by the loss of Tg-p43. The MSC is therefore not involved in the parasite virulence. However, it is still not known whether binding of the 4 aaRSs to Tg-p43 modulates their catalytic efficiencies, leaving the role of the *T. gondii* MSC still enigmatic.

2.1.5. Metazoan MSCs

2.1.5.1. Nematodes. The worm *Caenorhabditis elegans* also has a 1 MDa MSC. This MSC is composed of MRS, LRS, IRS, ERS, QRS, RRS, KRS and valyl-tRNA synthetase (VRS) and contains an AIMP called mrsp-38 (MARS Scaffold Protein 38 orthologue of the AIMP2/p38) [67]. The main differences with the mammalian MSC are that AIMP3/p18, DRS and PRS are not part of this complex whereas VRS is. Another discrepancy is that MRS is fused to a domain that resembles the mammalian AIMP1/p43 [68]. This appended domain replaces AIMP3/p18 for anchoring of MRS to the complex. In addition to the classical MSC components, the chaperone protein HSP90/Daf21 and the elongation factor EF-1A have been co-purified with the *C. elegans* MSC. However, the role of these additional proteins within the MSC is not known. Hsp90/Daf21 might be involved in the MSC assembly, whereas EF-1A might contribute to aa-tRNA channeling to the ribosome. Some experiments show that inactivation of MRS leads to sterility phenotype, but the exact role of the *C. elegans* MSC remains unknown.

2.1.5.2. The mammalian MSC. The mammalian MSC is composed of eight aaRSs: MRS; DRS; KRS; RRS; LRS; QRS; isoleucyl- (IRS); and glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS), and 3 AIMPs: AIMP1/

p43; AIMP2/p38; and AIMP3/p18 (Fig. 1) [69]. The work undergone during the last decade on the mammalian MSC revealed that these complexes are reservoirs for releasable aaRSs used as regulatory and signaling factors [28,29]. Indeed, the human MRS can be released from the MSC, and relocates to the nucleolus to activate gene transcription [31]. In human macrophages, bi-functional EPRS has been shown to be released from the MSC following treatment with γ -interferon [70], thereby promoting translational silencing of a specific set of mRNAs that encode pro-inflammatory proteins [26]. Most of the MSC-participating aaRSs have been shown to be released in response to a specific stimulus and often to relocate to new subcellular compartments, where they exert a non-conventional role that is unrelated to protein synthesis [29]. The increased

number of aaRSs and AIMP3 building these MSCs in higher eukaryotes may be viewed as a mean to expand the diversity of the response repertoire to stimuli.

2.2. Anchoring domains found in MSC components

In metazoa, AIMP3s are the pivotal components that enable aaRSs to assemble into MSCs [71]. These assembly factors provide the protein-binding domains required for aaRS recruitment to MSCs and sometimes also contain RNA-binding domains that may be involved in MSC functions. As the composition and architecture of the metazoan MSCs is relatively well conserved, the presence of an MSC in any higher eukaryotic species can easily

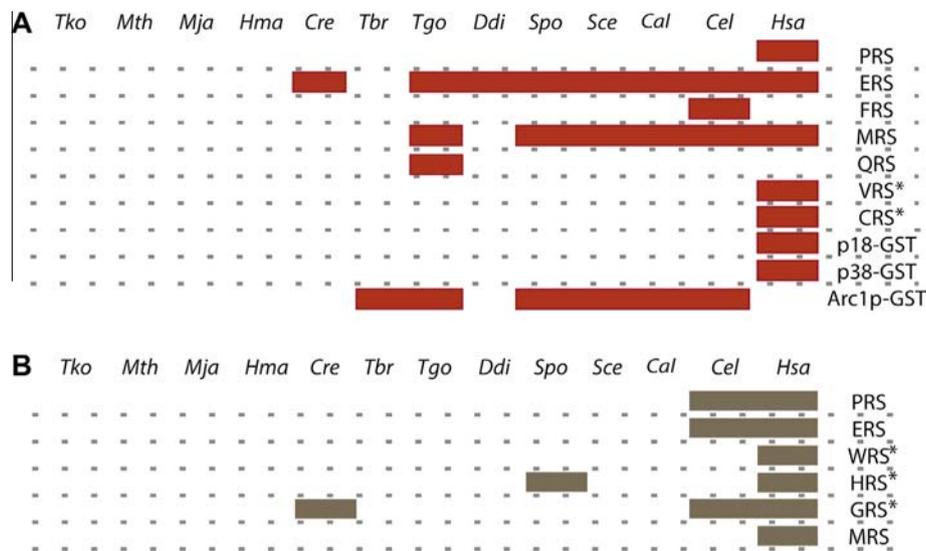


Fig. 2. Distribution of GST-like and WHEP protein-binding domains in the MSC components from 11 unicellular and 2 multicellular species. The organisms (abbreviated by their initials; top lane) that are displayed (one column for each organism) were selected because they have been shown to contain a MSC (all but *Ddi* and *Cre*), or out of phylogenetic interest. The presence of a GST-like (A) or WHEP domain (B) in one of the listed aaRS or AIMP protein (last columns in (A) and (B)) of the corresponding organism is symbolized by a red or gray box respectively. AaRSs listed in (A) or (B) correspond to those in which a GST-like or WHEP domain has been identified in at least one of the presented species (top lane). AIMP3s were divided into three categories: p18-GST and p38-GST which are only present in the *Hsa* MSC, and Arc1p/Arc1p-like protein present in *Spo*, *Sce*, *Cal*, *Cel*, *Tgo* and *Tbr* MSCs. AaRSs labeled with an asterisk (*) corresponds to those which have not been found in the MSC. Protein-binding domains were identified by PSI-Blast search using the protein sequence of the *S. cerevisiae* Arc1p GST-like domain (Accession: CAA64750.1 GI: 1620460) or that of the human EPRS GST-like domain (Accession: AAI36466.1, GI:223460490) or using the protein sequence of the human MRS WHEP domain (Accession: BAA95668.1, GI: 7804468) or that of the human EPRS WHEP domain (Accession: AAI36466.1, GI:223460490) with the NCBI protein database. Organisms studied were, in full name: *Tko*; *Thermococcus kodakarensis* (KOD1), *Mth*; *Methanothermobacter thermautotrophicus* (str Delta H); *Mja*; *Methanocaldococcus jannaschi* (DSM 2661), *Hma*; *Haloarcula marismortui* (ATCC 43049) *Ddi*; *Dictyostelium discoideum* (AX4), *Spo*; *Schizosaccharomyces pombe* (972 h-), *Sce*; *Saccharomyces cerevisiae* (S288C), *Cal*; *Candida albicans* (WO-1), *Cel*; *Caenorhabditis elegans*, *Hsa*; *Homo sapiens*, *Tbr*; *Trypanosoma brucei* (strain 927/4 GUTat10.1), *Tgo*; *Toxoplasma gondii* (strain ME49), *Cre*; *Chlamydomonas reinhardtii* (strain CC-1373).

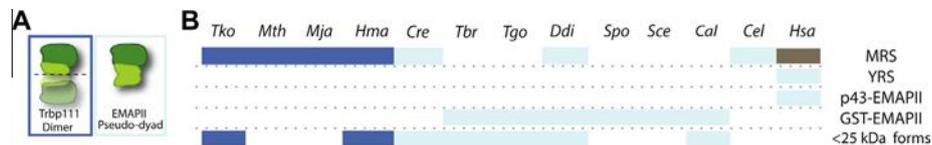


Fig. 3. EMAPII-like RNA-binding domains and their distribution among aaRSs and aaRS-related proteins. Panel A: two types of EMAPII-like domains have been found. These are the dimer-forming trbp111 type and the monomeric EMAPII type. The dimer-forming C-terminal part of trbp111 is shown in light green while the remainder of the monomer is shown in dark green. These colors are retained for the corresponding areas of EMAPII. The EMAPII type domain is homologous to trbp111 but has a C-terminal extension which folds into a structural mimic of the trbp111 dimer core, forming what has been called a pseudo-dyad. The dimer interface of trbp111 and the pseudodyad of EMAPII are both RNA-binding. Panel B: distribution of EMAPII-like domains in 11 unicellular and 2 multicellular organisms. The organisms (abbreviated by their initials; top lane) that are displayed (one column for each organism) were selected because they have been shown to contain a MSC (all but *Ddi* and *Cre*), or out of phylogenetic interest. Shown (last column) are five sorts of protein in which these domains were found (lines): small proteins estimated at 25 kDa or less mostly composed of a trbp111 or EMAPII domain, Arc1p-like GST-fused EMAPII proteins, and p43-like proteins. Dark blue bands indicate where trbp111 type domains were found, while light blue bands indicate where EMAPII type domains were found. Shown in dark gray for comparison is the RNA-binding WHEP insertion domain of *Hsa* MRS. Domains were identified by PSI-Blast using the protein sequence of *Aquifex aeolicus* trbp111 (Accession: 1PYB_D; GI:34810889) or of the *H. sapiens* p43 EMAPII domain (Accession: AAC60647.1, GI:833999) with the NCBI database. Organisms studied were, in full name: *Tko*; *Thermococcus kodakarensis* (KOD1), *Mth*; *Methanothermobacter thermautotrophicus* (str Delta H), *Mja*; *Methanocaldococcus jannaschi* (DSM 2661), *Hma*; *Haloarcula marismortui* (ATCC 43049), *Ddi*; *Dictyostelium discoideum* (AX4), *Spo*; *Schizosaccharomyces pombe* (972 h-), *Sce*; *Saccharomyces cerevisiae* (S288C), *Cal*; *Candida albicans* (WO-1), *Cel*; *Caenorhabditis elegans*, *Hsa*; *Homo sapiens*, *Tbr*; *Trypanosoma brucei* (strain 927/4 GUTat10.1), *Tgo*; *Toxoplasma gondii* (strain ME49), *Cre*; *Chlamydomonas reinhardtii* (strain CC-1373).

be verified by searching for structural homologues of AIMPs. On the contrary, the composition of MSCs that have been characterized in unicellular organisms is so diversified that the presence of an MSC in a given species cannot be easily established. The main reason for this is that unicellular MSCs do not systematically use AIMPs (or easily identified appended domains) to bind and aggregate aaRSs (Fig. 1). How these MSCs assemble and what protein-binding domains are used to build these particles has still not been extensively analysed. In this section, we list the domains known to mediate protein- or RNA-binding that have been identified in components of MSCs from unicellular organisms (Figs. 2 and 3).

2.2.1. Protein-binding domains

In order to form MSCs, aaRSs from eukaryotes interact with each other and/or with AIMPs through specific protein-binding domains such as GST-like domains or WHEP domains. Leucine zipper (LZ) are also involved for the formation of complexes in higher eukaryotes but have not yet been found in aaRSs from lower eukaryotes and are therefore not described in this section. UNE-X domains, unique domains specific to each aaRS, are not described in this section because they are not always protein- or RNA-binding domains [72].

2.2.1.1. GST-like domains. In lower eukaryotes, GST-like domains have been shown to mediate the formation of homo and heterodimers. For example, in the AME complex of the budding yeast *S. cerevisiae*, MRS and ERS associate with the anchoring protein AIMP Arc1p via GST-like domains of the N-terminal regions of all three proteins [19]. Among lower eukaryotes, GST-like domains have also been found in ERS and MRS from *S. pombe*, *Candida albicans* and *T. gondii*, in ERS of *Dictyostelium discoideum*, but also in Arc1p-like proteins from *S. pombe*, *C. albicans* and *D. discoideum* as well as in Tg p43 of *T. gondii* (Fig. 2). Interestingly, the GST-like domain of a *D. discoideum* Arc1p-like protein has a higher similarity with GST-like domains from metazoa (33% of identities and 61% of similarities with the GST-like domain of EPRS from *Homo sapiens*) than GST-like domains from yeast, in accordance with the proteome of *D. discoideum* [73]. The presence of GST-like domains in several aaRSs and anchoring Arc1p-like proteins in *C. albicans* and *D. discoideum* suggests that aaRSs might assemble into MSCs in these organisms. The identification of such MSCs will give us insights into not only protein-binding domains, but also the strategy used for MSC assembly (i.e. with an anchoring factor or with an aaRSs).

In metazoans, the number of aaRSs participating to MSCs is higher than in lower organisms (between 9 and 12 in *H. sapiens* depending on the counting and 8 in *C. elegans*), and concomitantly, the number of aaRSs harboring GST-like domains is also higher (4 for *H. sapiens* and for *C. elegans*). GST-like domains could then be seen as a means to strengthen interactions in MSCs, eventually leading to more diverse role like interactions with other partners to accomplish additional functions such as the interaction between the GST-like domain of human CRS with eEF-1H [74].

2.2.1.2. WHEP domains. The WHEP protein-binding domain has been reported to be strictly restricted to aaRSs of higher eukaryotes. This domain has been named after its presence in WRS, histidyl-tRNA synthetase (HRS) and EPRS and consists of 46 amino acids organized into a Helix-Turn-Helix (HTH) fold. WHEP domains are involved in protein-protein interactions, but also in RNA binding. They are mostly located in the aaRS N-terminus (as, for example, in HRS, GRS and WRS from *H. sapiens*) and less commonly in the aaRS C-terminus (MRS in *H. sapiens* and ERS in *C. elegans*). Exceptionally they can also occupy a central position like in human EPRS, in which 3 WHEP repeats link the ERS and the PRS fused sequences. In this fusion enzyme, WHEP repeats were first shown

to be able to bind RNA [75–77], but a recent study revealed that WHEP repeats bind proteins as well: for example, non-structural associated protein (NSAP1), associates with the third WHEP repeat of EPRS [78]. However, compared to the GST domain which is the major domain mediating MSC assembly, the use of the WHEP domain to anchor aaRSs in MSCs is limited to a few MSC-participating aaRSs. In addition, half of the WHEP-containing aaRSs do not participate to MSCs (GRS, WRS and HRS), suggesting that the presence of WHEP domains in aaRSs from a given species is not a strong indicator that they will assemble into a MSC.

In lower eukaryotes aaRSs, only one WHEP domain could be identified, namely in the *S. pombe* HRS (Fig. 2), and interestingly this aaRS is not part of the translosome [79]. However, it remains unclear whether this domain in *S. pombe* is involved in RNA-binding or protein-protein interactions. HRS from various organisms share low similarities in their N-terminal parts, and a study performed on *T. brucei* revealed that the N-terminal part of HRS forms a HTH domain [80], whereas in *H. sapiens*, this region harbors a WHEP domain. The finding that WHEP domains were acquired early in the history before the separation of plants and animals [81] re-opens the debate of how and why some aaRSs have gained and retained this domain.

2.2.1.3. Other unclassified protein-binding domains. In archaeal aaRSs, no authentic protein-binding domains like the GST-like domains or WHEP domains could be found (Fig. 2). However, it has been shown that *M. thermotrophicus* LRS interacts with KRS and PRS [82]. As mentioned previously (Section 2.1.1), KRS and PRS interact with the N- and C-terminal part of LRS, respectively. The C-terminal extension of PRS could mediate this interaction [83]. In contrast, in *H. sapiens* and *C. elegans*, the C-terminal part of LRS binds to the leucine-zipper (LZ) of RRS in their respective MSCs [84]. Further work is needed to characterize the domains or folds by which archaeal aaRSs participating in MSCs bind to each other.

2.2.2. tRNA-binding domains

EMAPII-like domains attracted the attention of researchers working in the field when it was discovered that this domain had a cytokine activity. The name EMAPII comes from: Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide II, and corresponds to the cytokine activity that was first described for this domain [85]. It was later found that the precursor of EMAPII is the AIMP1/p43 of the MSC present in higher eukaryotes [21]. EMAPII-like domains were then also identified as individual and autonomous proteins, like Trbp111 in *Aquifex aeolicus*, and CsaA in *Bacillus subtilis*. Importantly, EMAPII is often found at the C-terminus of MRS in various organisms [86–88].

Structural studies showed that EMAPII-like domains can be divided into two categories: the shorter type resembling trbp111 (trbp111-like), which serves as a dimerization domain; and the longer EMAPII type, which has a C-terminal extension that prevents dimerization. This longer EMAPII type bears structural similarity to the interface of the dimerized trbp111 (Fig. 3A), which is also called “pseudo-dyad” and forms an RNA-binding site. Consequently, the presence of a trbp111-like domain in some bacterial and archaeal MRSs enables their dimerization. In higher eukaryotes, MRSs most probably cannot dimerize, as the trbp111-like domain is replaced by the pseudo-dyad type of EMAPII [89].

The appearance in eukaryotes of the pseudo-dyad type of EMAPII that is unable to dimerize coincides with the appearance of EMAPII-like domains in aaRSs other than MRS, as well as in AIMPs. In many of the organisms in which MSCs have been found, EMAPII-like domains seem to be present either in MRS or in AIMPs, including Arc1p and AIMP1/p43, but very rarely in both (Fig. 3B). This could be due to the transfer of the tRNA-binding role, within a

given MSC, from one protein to another. For example, in the yeast AME complex, EMAPII is located in the C-terminus of Arc1p and absent from MRS. If this EMAPII domain would be fused to the C-terminus to MRS instead this domain would likely also be able to bind tRNA in a similar manner as it does in the Arc1p scaffold [90]. However, the reason why EMAPII is located in Arc1p rather than in MRS is that Arc1p requires a tRNA binding domain to export tRNAs from the nucleus [91]. EMAPII domains are not only RNA-binding domains but also signaling entities, and EMAPII domains released from human AIMP1/p43 and YRS following cleavage have distinct functions [21,92]. This signaling role is not restricted to EMAPII domains of higher eukaryotes, as the unicellular parasite *Entamoeba histolytica*, overexpresses MRS and KRS in response to inflammatory signals, and the C-terminal EMAPII domains of these enzymes are released following cleavage to modulate host immune response [93]. Although no MSC has yet been identified in *Entamoeba*, similar signaling functions may eventually

be found for EMAPII-containing AIMP1s or MSC-participating aaRSs of other lower eukaryotes.

2.3. The diversity of assembly modes in MSCs from low complexity organisms

Whereas in higher eukaryotes there seems to be a conserved architecture and strategy to assemble MSCs, in unicellular organisms, the composition and assembly modes of MSCs is far more diverse (Fig. 1) and unpredictable. The diversity of the proteins (AIMP1s, aaRSs or unrelated proteins) and protein-binding domains mediating assembly of these complexes makes the validation of the presence of a MSC in a given species using bioinformatics unreliable. For example, MSCs in eukaryotes, especially the metazoa, assemble with the help of interaction domains that are found either on aaRSs or on AIMP1s. The extent to which this occurs is slightly lesser in the case of unicellular eukaryotes such as

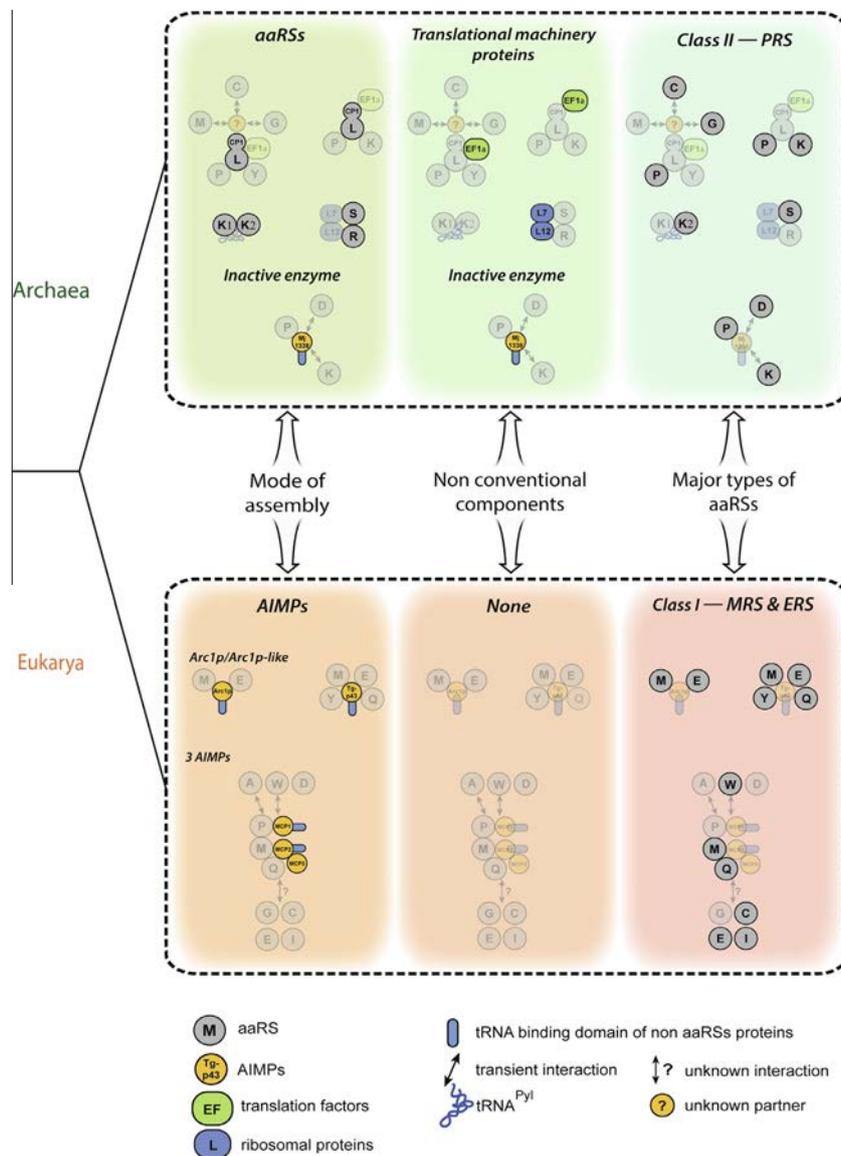


Fig. 4. Existence of two types of MSCs in low complexity organisms. Based on their assembly mode, the presence of non-conventional components and the most represented classes of aaRSs, MSCs from unicellular organisms segregate into either an archaeal- (top, green) or eukaryal-type (bottom, orange) complex. Shades (green or orange) highlight each of the 3 features (listed in the middle of the figure) that were used for the classification of the presented MSCs. Proteins mediating assembly of the MSCs, the non-conventional components and the aaRSs corresponding to most represented class of aaRSs participating to these MSCs are shown in bold, with the remaining

S. cerevisiae and *T. brucei*, where well-defined MSC-associated domains like EMAPII, GST-like and WHEP (either in aaRSs or AIMP-Ps) are less commonly found. In archaea, the trend toward simplicity continues and aaRSs assemble into MSCs apparently without the help of any well-defined protein-binding domains. As such, the difficulty in predicting from genomic data whether or not an MSC may exist in a given organism may prove to be inversely proportional to its complexity. In the eukaryotes, the presence of WHEP domains on aaRSs, or the presence of genes encoding the EMAPII domain in conjunction with GST-like or EF-Tu-like domains are good indicators of the presence of an MSC. More robust experiments could then confirm this, as well as discover any novel or unusual components of an MSC (such as MCP3 from *T. brucei*). In prokaryotes, the scarcity of well-defined MSC-forming domains means that predicting the presence of MSCs may remain difficult, and highly dependent on classical experimental methods.

Despite this diversity, we attempted to classify MSCs from low complexity organisms by looking at three characteristic traits of MSCs: their mode of assembly and assembly factor, the presence or absence of non-conventional components; and the types of aaRSs that participate in these complexes. This analysis led us to propose that two different assembly modes and types of unicellular MSCs have emerged during evolution: the archaeal and eukaryal MSCs (Fig. 4).

The first distinctive feature between archaeal and lower eukaryote MSCs is their mode of assembly. In unicellular eukaryotes MSCs always assemble through protein–protein interaction domains that are present on AIMP-Ps. Importantly, AIMP-Ps from lower eukaryotes are structural homologs of the metazoan AIMP-Ps. By contrast, in all archaeal MSCs that have been described so far, complex formation is mediated by aaRSs, or other assembly factors, such as elongation factors or ribosomal proteins, but not by AIMP-Ps. It is still largely unknown what domains of these aaRSs, elongation factors or ribosomal proteins mediate the protein–protein interactions involved in MSC assembly. However, most of the archaeal species in which MSCs have been characterized are thermophiles; and in these organisms proteins have a tendency to assemble in complexes through the use of hydrophobic patches. This propensity to aggregate is often considered as an adaptation of these organisms to the extreme temperatures of their environment [94]. One possibility is that these hydrophobic patches could also be used to assemble archaeal MSCs.

The second idiosyncratic feature of the archaeal MSC is the presence of non-conventional components. Ribosomal proteins, translation factors (often elongation factors), or even metabolic enzymes are found in archaeal MSCs. These types of proteins are never found in eukaryal MSCs despite the fact that they are often indirectly linked to eukaryal MSCs. Indeed, a wide range of organisms has been shown to contain translosomes that gather several components of the translation machinery, including MSCs, in a huge mega-complex [67,95,96]. This association of components of the translational machinery with the MSC makes sense because it allows tRNA channeling, recycling and, by avoiding diffusion of aa-tRNA in the cell, improves the rate of mRNA codon reading.

The third major difference between archaeal and eukaryotic MSCs is a bias in aaRS composition. AaRSs segregate in two different classes, class 1 and class 2, mainly based on the fold of their aa- and ATP recognition domain [97]. In archaeal MSCs there are often more class 2 aaRSs than class 1 whereas in eukaryotes class 1 aaRSs are always the most abundant (Fig. 4). Moreover, PRS (a class 2 aaRS) is the most abundant aaRS found in archaeal MSCs (in 3 out of the 5 MSC), whereas MRS and ERS (class 1 aaRSs) are systematically present in the lower eukaryote MSCs.

The fact that PRS is the most abundant aaRSs in archaeal MSCs may be simply related to the properties of archaeal PRS. Indeed some of these enzymes, unlike their bacterial orthologues, are

deprived of editing domains and have an additional C-terminal extension that can thus be used for complex assembly [83,98,99].

The presence of MRS in MSCs from all unicellular eukaryotes may be related to its role as a sensor of oxidative stress. Indeed, it has been shown, from fungi to mammals, that MRS methionylates non-cognate tRNAs under oxidative stress. In *S. cerevisiae*, mismethionylated tRNAs can be used by translating ribosomes [60]. This mechanism is conserved in human cells [100]. tRNA mismethionylation leading to an increased content of methionine in the proteome protects the organism against oxidative through the scavenging of reactive oxygen species (ROS) [61]. As in unicellular eukaryotes MSC-bound MRS is always more efficient in charging tRNA with methionine, its recruitment in MSCs may be viewed as one way to boost the response to oxidative stress.

MSCs may also provide a link between metabolism and protein translation. Indeed, in *M. jannaschii*, aaRSs form a complex with the paralogue of a metabolic enzyme that is inactive but sensitive to H₂ concentrations [45,46], thereby linking aa-tRNA synthesis to methanogenesis. Likewise, AIMP-Ps such as the *S. cerevisiae* Arc1p and the human AIMP1/p43 seem to have a recurrent link with glucose metabolism or sensing. Indeed, Arc1p expression decreases upon glucose depletion [27], and AIMP1/p43 is a known cytokine involved in a wide range of functions including the regulation of glucose metabolism [101]. Noteworthy is the fact that the *S. cerevisiae* ERS (which also participates in the MSC) is linked to the glucose metabolism, and its mitochondrial import in respiring cell is essential [27].

To summarize, bacterial MSC has been identified only in *E. coli* and archaea and lower eukaryotes contain distinct MSCs, with differences in their modes of assembly, components and in the lineage of their aaRSs. The feeling that emerges from the studies made on these MSCs is that the major role for these archaeal and eukaryal MSCs would be to enhance aa-tRNA synthesis and to channel this molecule to the ribosome. However, without further work on the characterized MSCs from low complexity organisms and additional sampling of more species, the reason why these unicellular organisms contain MSCs will still remain mostly obscure.

Acknowledgements

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

References

- [1] Chapeville, F., Lipmann, F., Von Ehrenstein, G., Weisblum, B., Ray Jr., W.J. and Benzer, S. (1962) On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1086–1092.
- [2] de Duve, C. (1988) Transfer RNAs: the second genetic code. *Nature* 333, 117–118.
- [3] Schimmel, P. and Ribas De Pouplana, L. (2000) Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem. Sci.* 25, 207–209.
- [4] Hoagland, M.B. (1955) An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 16, 288–289.
- [5] Hoagland, M.B., Keller, E.B. and Zamecnik, P.C. (1956) Enzymatic carboxyl activation of amino acids. *J. Biol. Chem.* 218, 345–358.
- [6] Ofengand, E.J., Dieckmann, M. and Berg, P. (1961) The enzymic synthesis of amino acyl derivatives of ribonucleic acid. III. Isolation of amino acid-acceptor ribonucleic acids from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 236, 1741–1747.
- [7] Bandyopadhyay, A.K. and Deutscher, M.P. (1971) Complex of aminoacyl-transfer RNA synthetases. *J. Mol. Biol.* 60, 113–122.

- [8] Deutscher, M.P. (1974) Aminoacyl-tRNA synthetase complex from rat liver. *Methods Enzymol.* 29, 577–583.
- [9] Kern, D., Dietrich, A., Fasiolo, F., Renaud, M., Giege, R. and Ebel, J.P. (1977) The yeast aminoacyl-tRNA synthetases. Methodology for their complete or partial purification and comparison of their relative activities under various extraction conditions. *Biochimie* 59, 453–462.
- [10] Kern, D. and Lapointe, J. (1979) The twenty aminoacyl-tRNA synthetases from *Escherichia coli*. General separation procedure, and comparison of the influence of pH and divalent cations on their catalytic activities. *Biochimie* 61, 1257–1272.
- [11] Harris, C.L. (1987) An aminoacyl-tRNA synthetase complex in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169, 2718–2723.
- [12] Yu, C.T. and Zamecnik, P.C. (1963) On the aminoacyl-RNA synthetase recognition sites of yeast and *E. Coli* transfer RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 457–463.
- [13] Schimmel, P. and Ribas de Pouplana, L. (1995) Transfer RNA: from minihelix to genetic code. *Cell* 81, 983–986.
- [14] Delarue, M. and Moras, D. (1993) The aminoacyl-transfer RNA-synthetase family – modules at work. *BioEssays* 15, 675–687.
- [15] Schimmel, P. and Ribas de Pouplana, L. (2001) Formation of two classes of tRNA synthetases in relation to editing functions and genetic code. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66, 161–166.
- [16] Becker, H.D., Roy, H., Moulinier, L., Mazauric, M.H., Keith, G. and Kern, D. (2000) *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 39, 3216–3230.
- [17] Moulinier, L., Eiler, S., Eriani, G., Gangloff, J., Thierry, J.C., Gabriel, K., McClain, W.H. and Moras, D. (2001) The structure of an AspRS-tRNA(Asp) complex reveals a tRNA-dependent control mechanism. *EMBO J.* 20, 5290–5301.
- [18] Oshikane, H., Sheppard, K., Fukai, S., Nakamura, Y., Ishitani, R., Numata, T., Sherrer, R.L., Feng, L., Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S., Mechulam, Y., Soll, D. and Nureki, O. (2006) Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science* 312, 1950–1954.
- [19] 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.
- [20] Simader, H., Hothorn, M. and Suck, D. (2006) Structures of the interacting domains from yeast glutamyl-tRNA synthetase and tRNA-aminoacylation and nuclear-export cofactor Arc1p reveal a novel function for an old fold. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 1510–1519.
- [21] Quevillon, S., Agou, F., Robinson, J.C. and Mirande, M. (1997) The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J. Biol. Chem.* 272, 32573–32579.
- [22] 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. *Mol. Cell Biol.* 33, 4872–4888.
- [23] 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. *J. Biol. Chem.* 286, 3396–3404.
- [24] Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M. and Hurt, E.C. (1996) The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* 15, 5437–5448.
- [25] Eswarappa, S.M. and Fox, P.L. (2013) Citric acid cycle and the origin of MARS. *Trends Biochem. Sci.* 38, 222–228.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Ray, P.S., Arif, A. and Fox, P.L. (2007) Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 32, 158–164.
- [29] 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.
- [30] Hausmann, C.D. and Ibba, M. (2008) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 705–721.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Lund, E. and Dahlberg, J.E. (1998) Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* 282, 2082–2085.
- [34] 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14366–14371.
- [35] Hradec, J. and Dusek, Z. (1978) All factors required for protein synthesis are retained on heparin bound to Sepharose. *Biochem. J.* 172, 1–7.
- [36] Nathanson, L. and Deutscher, M.P. (2000) Active aminoacyl-tRNA synthetases are present in nuclei as a high molecular weight multienzyme complex. *J. Biol. Chem.* 275, 31559–31562.
- [37] Bailly, M., Blaise, M., Lorber, B., Becker, H.D. and Kern, D. (2007) The transamidosome: a dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Mol. Cell* 28, 228–239.
- [38] 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 Res.* 40, 4965–4976.
- [39] Goldgur, Y. and Safo, M. (1994) Aminoacyl-tRNA synthetases from *Haloarcula marismortui*: an evidence for a multienzyme complex in a prokaryotic system. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 32, 1075–1083.
- [40] Praetorius-Ibba, M., Rogers, T.E., Samson, R., Kelman, Z. and Ibba, M. (2005) Association between Archaeal prolyl- and Leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA(Pro) aminoacylation. *J. Biol. Chem.* 280, 26099–26104.
- [41] Hausmann, C.D., Praetorius-Ibba, M. and Ibba, M. (2007) An aminoacyl-tRNA synthetase: elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic Acids Res.* 35, 6094–6102.
- [42] Hausmann, C.D. and Ibba, M. (2008) Structural and functional mapping of the archaeal multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *FEBS Lett.* 582, 2178–2182.
- [43] Li, T., Li, Y., Guo, N., Wang, E. and Wang, Y. (1999) Discrimination of tRNA^{Leu} isoacceptors by the insertion mutant of *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 38, 9084–9088.
- [44] Godinic-Mikulcic, V., Jaric, J., Greber, B.J., Franke, V., Hodnik, V., Anderluh, G., Ban, N. and Weygand-Durasevic, I. (2014) Archaeal aminoacyl-tRNA synthetases interact with the ribosome to recycle tRNAs. *Nucleic Acids Res.*
- [45] 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.
- [46] Afting, C., Kremmer, E., Brucker, C., Hochheimer, A. and Thauer, R.K. (2000) Regulation of the tRNA^{H2}-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd) and HmdIII and HmdIII in *Methanothermobacter marburgensis*. *Arch. Microbiol.* 174, 225–232.
- [47] Oza, J.P., Sowers, K.R. and Perona, J.J. (2012) Linking energy production and protein synthesis in hydrogenotrophic methanogens. *Biochemistry* 51, 2378–2389.
- [48] 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.
- [49] James, C.M., Ferguson, T.K., Leykam, J.F. and Krzycki, J.A. (2001) The amber codon in the gene encoding the monomethylamine methyltransferase isolated from *Methanosarcina barkeri* is translated as a sense codon. *J. Biol. Chem.* 276, 34252–34258.
- [50] Blight, S.K., Larue, R.C., Mahapatra, A., Longstaff, D.G., Chang, E., Zhao, G., Kang, P.T., Green-Church, K.B., Chan, M.K. and Krzycki, J.A. (2004) Direct charging of tRNA^{CUA} with pyrrolysine in vitro and in vivo. *Nature* 431, 333–335.
- [51] Polycarpo, C., Ambrogelly, A., Ruan, B., Tumbula-Hansen, D., Ataide, S.F., Ishitani, R., Yokoyama, S., Nureki, O., Ibba, M. and Söll, D. (2003) Activation of the pyrrolysine suppressor tRNA requires formation of a ternary complex with class I and class II lysyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell* 12, 287–294.
- [52] 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, 6053–6060.
- [53] 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.
- [54] Frechin, M., Kern, D., Martin, R.P., Becker, H.D. and Senger, B. (2010) Arc1p: anchoring, routing, coordinating. *FEBS Lett.* 584, 427–433.
- [55] Galani, K., Hurt, E. and Simos, G. (2005) The tRNA aminoacylation co-factor Arc1p is excluded from the nucleus by an Xpo1p-dependent mechanism. *FEBS Lett.* 579, 969–975.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] Simos, G., Sauer, A., Fasiolo, F. and Hurt, E.C. (1998) A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell* 1, 235–242.
- [59] Golinielli-Cohen, M.P. and Mirande, M. (2007) Arc1p is required for cytoplasmic confinement of synthetases and tRNA. *Mol. Cell. Biochem.* 300, 47–59.
- [60] Wilttrout, E., Goodenbour, J.M., Frechin, M. and Pan, T. (2012) Misacylation of tRNA with methionine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 40, 10494–10506.
- [61] Luo, S. and Levine, R.L. (2009) Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J.* 23, 464–472.
- [62] Vogt, W. (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biol. Med.* 18, 93–105.
- [63] Sha, Z., Brill, L.M., Cabrera, R., Kleinfeld, 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. *Mol. Cell* 36, 141–152.
- [64] An, S. and Musier-Forsyth, K. (2005) Cys-tRNA(Pro) editing by *Haemophilus influenzae* YbaK via a novel synthetase-YbaK-tRNA ternary complex. *J. Biol. Chem.* 280, 34465–34472.
- [65] Ruan, B. and Soll, D. (2005) The bacterial YbaK protein is a Cys-tRNAPro and Cys-tRNA Cys deacylase. *J. Biol. Chem.* 280, 25887–25891.
- [66] 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. (2014) 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.
- [67] Havrylenko, S., Legouis, R., Negrutskii, B. and Mirande, M. (2011) *Caenorhabditis elegans* evolves a new architecture for the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* 286, 28476–28487.
- [68] 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 Sci.* 19, 2475–2484.
- [69] Park, S.G., Ewalt, K.L. and Kim, S. (2005) Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends Biochem. Sci.* 30, 569–574.
- [70] 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. *Mol. Cell* 35, 164–180.
- [71] Mirande, M., Kellermann, O. and Waller, J.P. (1982) Macromolecular complexes from sheep and rabbit containing seven aminoacyl-tRNA synthetases. II. Structural characterization of the polypeptide components and immunological identification of the methionyl-tRNA synthetase subunit. *J. Biol. Chem.* 257, 11049–11055.
- [72] Guo, M. and Yang, X.L. (2014) Architecture and metamorphosis. *Top. Curr. Chem.* 344, 89–118.
- [73] Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafarski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Loulseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B. and Kuspa, A. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435, 43–57.
- [74] Kim, J.E., Kim, K.H., Lee, S.W., Seol, W., Shiba, K. and Kim, S. (2000) An elongation factor-associating domain is inserted into human cysteinyl-tRNA synthetase by alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 28, 2866–2872.
- [75] Cahuzac, B., Berthonneau, E., Birlirakis, N., Guittet, E. and Mirande, M. (2000) A recurrent RNA-binding domain is appended to eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* 19, 445–452.
- [76] 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.
- [77] 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. *J. Biol. Chem.* 273, 11267–11273.
- [78] 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. *Mol. Cell* 29, 679–690.
- [79] 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.
- [80] Merritt, E.A., Arakaki, T.L., Gillespie, J.R., Larson, E.T., Kelley, A., Mueller, N., Napuli, A.J., Kim, J., Zhang, L., Verlinde, C.L., Fan, E., Zuckner, F., Buckner, F.S., van Voorhis, W.C. and Hol, W.G. (2010) Crystal structures of trypanosomal histidyl-tRNA synthetase illuminate differences between eukaryotic and prokaryotic homologs. *J. Mol. Biol.* 397, 481–494.
- [81] Shiba, K. (2002) Intron positions delineate the evolutionary path of a pervasively appended peptide in five human aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Evol.* 55, 727–733.
- [82] Praetorius-Ibba, M., Hausmann, C.D., Paras, M., Rogers, T.E. and Ibba, M. (2007) Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* 282, 3680–3687.
- [83] Ambrogelly, A., Kamtekar, S., Stathopoulos, C., Kennedy, D. and Soll, D. (2005) Asymmetric behavior of archaeal prolyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett.* 579, 6017–6022.
- [84] Ling, C., Yao, Y.N., Zheng, Y.G., Wei, H., Wang, L., Wu, X.F. and Wang, E.D. (2005) The C-terminal appended domain of human cytosolic leucyl-tRNA synthetase is indispensable in its interaction with arginyl-tRNA synthetase in the multi-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* 280, 34755–34763.
- [85] Kao, J., Ryan, J., Brett, G., Chen, J., Shen, H., Fan, Y.G., Godman, G., Familletti, P.C., Wang, F. and Pan, Y.C. (1992) Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267, 20239–20247.
- [86] Crepin, T., Schmitt, E., Blanquet, S. and Mechulam, Y. (2002) Structure and function of the C-terminal domain of methionyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 41, 13003–13011.
- [87] Kawaguchi, S., Muller, J., Linde, D., Kuramitsu, S., Shibata, T., Inoue, Y., Vassilyev, D.G. and Yokoyama, S. (2001) The crystal structure of the tCsaA protein: an export-related chaperone from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* 20, 562–569.
- [88] Swairjo, M.A., Morales, A.J., Wang, C.C., Ortiz, A.R. and Schimmel, P. (2000) Crystal structure of trbp111: a structure-specific tRNA-binding protein. *EMBO J.* 19, 6287–6298.
- [89] Renault, L., Kerjan, P., Pasqualato, S., Menetrey, J., Robinson, J.C., Kawaguchi, S., Vassilyev, D.G., Yokoyama, S., Mirande, M. and Cherfils, J. (2001) Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry. *EMBO J.* 20, 570–578.
- [90] Karanasios, E., Simader, H., Panayotou, G., Suck, D. and Simos, G. (2007) Molecular determinants of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly. *J. Mol. Biol.* 374, 1077–1090.
- [91] Hellmuth, K., Lau, D.M., Bischoff, F.R., Kunzler, M., Hurt, E. and Simos, G. (1998) Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell Biol.* 18, 6374–6386.
- [92] Wakasugi, K. and Schimmel, P. (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* 284, 147–151.
- [93] Castro de Moura, M., Miro, F., Han, J.M., Kim, S., Celada, A. and Ribas de Pouplana, L. (2011) Entamoeba lysyl-tRNA synthetase contains a cytokine-like domain with chemokine activity towards human endothelial cells. *PLoS Negl. Trop Dis.* 5, e1398.
- [94] Vieille, C. and Zeikus, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 1–43.
- [95] 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. *J. Proteome Res.* 12, 1691–1699.
- [96] Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Le Marechal, P., Negrutskii, B. and Mirande, M. (2009) Dynamic organization of aminoacyl-tRNA synthetase complexes in the cytoplasm of human cells. *J. Biol. Chem.* 284, 13746–13754.
- [97] 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.
- [98] Beuning, P.J. and Musier-Forsyth, K. (2001) Species-specific differences in amino acid editing by class II prolyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* 276, 30779–30785.
- [99] Beuning, P.J. and Musier-Forsyth, K. (2000) Hydrolytic editing by a class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8916–8920.
- [100] 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., Embry, A., Dolan, B., Das, S., Hickman, H.D., Berglund, P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W. and Pan, T. (2009) Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. *Nature* 462, 522–526.
- [101] Park, S.G., Kang, Y.S., Kim, J.Y., Lee, C.S., Ko, Y.G., Lee, W.J., Lee, K.U., Yeom, Y.I. and Kim, S. (2006) Hormonal activity of AIM1/p43 for glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14913–14918.

Matériel et méthodes

I Microbiologie

I.1 Souches de bactéries

Souche	Génotype	Utilisation	N° coll
1. XL1 Blue	<i>F' proAB lacIqZΔM15</i> <i>Tn10 TetR, recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac</i>	Transformation s	-80°C
2. Rosetta 2	<i>F' ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)</i> <i>pRARE2 (CamR)</i>	Surproduction de protéines	-80°C
3. BTH101	<i>F-, cya-854, recA1,</i> <i>endA1, gyrA96</i> <i>(NalR), thi1, hsdR17,</i> <i>spoT1, rfbD1,</i> <i>glnV44(AS)</i>	Double hybride bactérien	863

Tableau 4. Souches de bactéries utilisées au cours des expériences. Le numéro de collection indiqué est celui de la collection de souches.

I.2 Souches de levure

Souche	Génotype	Utilisation	Provenance	N° coll
1. RS453 mata	<i>Mat a ade2-1 his3-11,15</i> <i>ura3-52 leu2-3,112 trp1-1</i>	Croisements	Laboratoire	549
2. RS453 mataα	<i>Mat α ade2-1 his3-11,15</i> <i>ura3-52 leu2-3,112 trp1-1</i>	Croisements, analyse du NLS	Laboratoire	550
3. MetRS shuffle	<i>RS43 mat α mes1 ::HIS3</i> <i>pRS316 MES1</i>	Analyse mutants <i>MES1</i> , croisements	Laboratoire (Dr B. Senger)	36
4. Diploïde MES1/mes1	<i>mat α/a ade2-1/ ade2-1,</i> <i>his3-11,15/ his3-11,15</i> <i>ura3-52/ura3-52, leu2-</i>	Dissections tétrades	Laboratoire (Daphné Laporte)	1015

		3,112/leu2-3,112, trp1-1/trp1-1, MES1/mes1			
5. MetRS TAP		S288C: (ATCC 201388: MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0)	TAP-Tag	Euroscarf	612
6. BY4742		MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 trp1 Δ 0	Controles Δ rim13	Laboratoire du Dr S. Friant	1208
8. Y2H Y187	N	Mat α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	Double hybride levure	Laboratoire du Dr B. Charpentier	1307
9. Y2H CG1945	N	Mat α ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -his3	Double hybride levure	Laboratoire Dr B. Charpentier	1308
10. Y2H 2N		CG1945xY187	Double hybride levure	Laboratoire (Daphné Laporte)	(1307 x 1308)
11. rim13 Δ		MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 trp1 Δ 0	Analyse de mutants	Laboratoire (collection délétants)	857
12. WCG4-1121 (pre1 pre2)		^b MAT α pre1-1 pre2-1 ura3 leu2-3,112 his3-11,15 Can. Gal	Degradation de la MetRS par le protéasome	Gerlinger, 1997	856
13. mes1 shuffle Δ arc1		RS43 mat α mes1::HIS3 arc1::KanMx pRS316 MES1	Projet MetRS <i>Homo sapiens</i>	Laboratoire (Daphné Laporte)	1359

Tableau 5. Souches de levures utilisées pour les transformations de plasmides et réalisations des expériences. Le numéro de collection indiqué est celui de la collection de souches.

I.3 Milieux de culture

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120 °C sous une pression de 1,2 bars durant 20 min.

I.3.1 Milieux pour la culture des bactéries

Milieu LB (Luria Broth)

Le milieu LB est utilisé pour la croissance des bactéries *E. coli*. Sa composition, valable pour 1 L de milieu, est la suivante :

Composants	Milieu solide	Milieu liquide
Bacto-tryptone	10 g	10 g

Extrait de levure	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Agar	15 g	-

Tableau 6. Composition du milieu LB.

Si nécessaire, les antibiotiques sont ajoutés après l'autoclavage, aux concentrations finales suivantes : ampiciline (100 µg/mL), kanamycine (50 µg/mL), chloramphénicol (30 µg/mL), streptomycine (100 µg/mL), acide nalidixique (30 µg/mL).

Pour le milieu LB/X-Gal/IPTG, 40 µg/mL de X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) et 0,5 mM d'IPTG sont ajoutés après autoclavage.

I.3.2 Milieux pour la culture des levures

Milieu synthétique SCGlu ou SCGly

Les milieux synthétiques utilisés pour la culture des levures sont composés de 0,67 % (p/v) de « yeast nitrogen base » supplémenté en sulfate d'ammonium (YNB, MP Biomedicals) sans aa, 2 % (p/v) de glucose, ou de glycérol (Gly, v/v) et d'une quantité appropriée d'une mixture d'aa (MP Biomedicals). Les milieux solides contiennent 2 % (p/v) d'agar.

Ce milieu, lorsqu'il est dépourvu d'un aa ou base nucléique particulier, permet la pression de sélection sur le marqueur d'auxotrophie associé au vecteur d'intérêt.

Ce milieu peut être supplémenté en 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT) d'une solution stock filtrée, ajouté après autoclavage, à une concentration finale de 15 mM. Il s'agit d'un analogue toxique de l'histidine, et permet ainsi la sélection des souches prototrophes pour l'histidine.

Ce milieu peut également être supplémenté en acide fluoroarotique (5FOA), converti en fluorodeoxyuridine, analogue toxique de l'uracile. Les souches possédant une voie de biosynthèse complète de l'uracile utiliserons ainsi ce composé toxique. Le milieu permet donc la sélection des souches auxotrophe pour l'uracile. La solution stock est filtrée et ajoutée après autoclavage du milieu à une concentration finale de 2,5 mM. Le pH de ce milieu doit être acide pour garantir l'efficacité, soit un pH optimal d'environ 3.

Milieux riches

Les milieux riches YPD ou YPGly contenant du glycérol à la place du dextrose, ont la composition suivante, valable pour un volume de 1 L (Tableau 7).

Composants	Milieu solide	Milieu liquide
Extrait de levure	10 g	10 g
Peptone	20 g	20 g
Dextrose ou Glycérol	20 g	20 g
Agar	15 g	-

Tableau 7. Composition du milieu YPD ou YPGly.

I.4 Systèmes de double hybride

I.4.1 Double hybride bactérien

Ce système de double hybride se base sur la reconstitution fonctionnelle de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertusis* dans la cellule d'une souche d'*E. coli* dont le gène codant l'adénylate cyclase est délété. La reconstitution d'une adénylate cyclase fonctionnelle permet la production d'AMPcyclique, ce qui provoque la transcription des gènes sous contrôle du promoteur AMPc/CAP (comme par exemple la β -galactosidase). Développé par le Dr Ladant à l'institut Pasteur, il est commercialisé par Euromedex qui fournit les souches et vecteurs de base (Tableau 8).

Souches	Nom	Génotype
	BTH101 (<i>E. coli</i>)	<i>F</i> -, <i>cya</i> -854, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (<i>Nal</i> ^r), <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>spoT1</i> , <i>rfbD1</i> , <i>glnV44(AS)</i>
	DHM1 (<i>E. coli</i>)	<i>F</i> -, <i>cya</i> -99, <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str</i> ^r), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>
Vecteurs	Nom	Production
	pKT25	Protéine étiquetée N-ter avec la sous-unité T25
	pKNT25	Protéine étiquetée C-ter avec la sous-unité T25
	pUT18	Protéine étiquetée C-ter

		avec la sous-unité T18
	pUT18C	Protéine étiquetée N-ter avec la sous-unité T18
Vecteurs contrôles	pKT25 Zip	Contient Gcn4
	pUT18C Zip	Contient Gcn4
Matériel généré	Souche transformé	Combinaisons de vecteurs
	BTH101	pKT25 vide + pUT18 vide
	BTH101	pKT25-NterMetRS-Gfp + pUT18 vide
	BTH101	pKT25-NterMetRS-Gfp + pUT18 Arc1
	BTH101	pKT25-NterMetRS-Gfp + pUT18c Rpb7
	BTH101	pKT25-NterMetRS-Gfp + pUT18 Rpb4
	BTH101	pKT25-NterMetRS-Gfp + pUT18 Kap95
	BTH101	pKT25-NterMetRS-Gfp + pUT18 Zip
	BTH101	pKT25 Zip + pUT18 Arc1
	BTH101	pKT25 Zip + pUT18 Kap95
	BTH101	pKT25 vide + pUT18 Arc1
	BTH101	pKT25 vide + pUT18 Kap95
	BTH101	pKT25 vide + pUT18 Rpb4
	BTH101	pKT25 vide + pUT18c Rpb7
	BTH101	pKT25 vide + pUT18 Zip

Tableau 8. Récapitulatif du matériel de double hybride bactérien.

Nous avons générés les vecteurs suivants :

Nom	Vecteur	Prom.	Gène	Sites	Marqueurs	Etiquette	N° coll
pKT25 vide	-	pLAC	<i>(T25)</i>	-	Kan	T25	162
pKNT25 vide	-	pLAC	<i>(T25)</i>	-	Kan	T25	163
pUT18 vide	-	pLAC	<i>(T18)</i>	-	Amp	T18	172
pUT18C vide	-	pLAC	<i>(T18)</i>	-	Amp	T18	164
Nter MetRS GFP	pKT25	pLAC	<i>MES1 (1-480)</i> <i>GFP</i>	PstI SacI	Kan	T25 N-ter	165
Rpb4	pUT18	pLAC	<i>RPB4</i>	PstI SacI	Amp	T18 C-ter	166
Rpb7	pUT18C	pLAC	<i>RPB7</i>	PstI SacI	Amp	T18 N-ter	167
Kap95	pUT18	pLAC	<i>KAP95</i>	PstI SmaI	Amp	T18 C-ter	168
Arc1	pUT18	pLAC	<i>ARC1</i>	PstI	Amp	T18 C-ter	169

				SacI			
ZIP	pUT18C	pLAC	<i>GCN4</i>	-	Amp	T18 N-ter	170
ZIP 2	pKT25	pLAC	<i>GCN4</i>	-	Kan	T25N-ter	171

Tableau 9 Plasmides générés pour le double hybride bactérien. N° coll : Numéro de collection de plasmides. Prom. : promoteur. Amp : Ampiciline. Kan : Kanamycine. Sites : Sites de restrictions positionnés de part et d'autres du gène en 5' et 3'.

Les gènes codant les protéines à tester sont amplifiés avec des oligonucléotides contenant les sites de restriction utilisés pour le clonage dans le vecteur commercial, ligués dans le vecteur commercial linéarisé. Les vecteurs obtenus sont vérifiés par séquençage, puis transformés dans les souches d'*E. coli* BTH101 fournies avec le kit. Les cellules sont étalées sur milieu LB/X-Gal/IPTG et placées à l'incubateur à 30 °C durant 48 h avant lecture des résultats. Si les colonies formées sont bleues, il y a interaction entre les protéines testées, si les colonies sont blanches, il n'y a pas interaction entre les protéines testées. Il est important que la souche d'*E. coli* soit fraîchement transformée.

I.4.2 Double hybride levure

Ce système de double hybride se base sur la reconstitution fonctionnelle du facteur de transcription Gal4 dans la cellule d'une souche de *S. cerevisiae* possédant un gène rapporteur, *HIS3*, cloné en amont du promoteur *GAL*, cible du facteur de transcription.

Le domaine "Gal4-DB" (binding domain) a été fusionné à la MetRS, alors que le domaine "Gal4-AD" (activation domain) a lui été couplé aux autres protéines testées. Le criblage par complémentation auxotrophique sur milieu sans His permet ainsi de déduire quelles sont les protéines qui interagissent ensemble.

Les souches de levures spécifiques sont transformées par les différents vecteurs créés (Tableau 10, Tableau 11). Les haploïdes de signe opposé sont ensuite croisés, et les diploïdes sont sélectionnés sur milieu SCGlu sans Leu ni Trp. Afin de déterminer si les protéines testées interagissent ensemble ou non, les diploïdes sont soumis à des tests en goutte sur milieu dépourvu de Leu, Trp et His, et supplémenté ou non en 3AT, analogue toxique de l'histidine, servant à mesurer la force d'interaction entre les protéines.

Nom du vecteur	Prom.	Gène	Sites	Marqueurs	Etiquettes
pACT2 MetRS	pADH1	<i>MES1</i>	BamHI XhoI	Leu/Amp	Gal4AD (N-ter) HA (C-ter)
pGBKT7 Arc1	pADH1	<i>ARC1</i>	BamHI Sall	Trp/Kan	Gal4BD (N-ter) HA (C-ter)
pGBKT7 Pgk1	pADH1	<i>PGK1</i>	BamHI Sall	Trp/Kan	Gal4BD (N-ter) HA (C-ter)
pGBKT7 Rpb7	pADH1	<i>RPB7</i>	BamHI Sall	Trp/Kan	Gal4BD (N-ter) HA (C-ter)
pGBKT7 Kap60	pADH1	<i>KAP60</i>	BamHI Sall	Trp/Kan	Gal4BD (N-ter) HA (C-ter)
pGBKT7 Kap104	pADH1	<i>KAP104</i>	BamHI Sall	Trp/Kan	Gal4BD (N-ter) HA (C-ter)

Tableau 10. Plasmides générés pour le double hybride levure. Prom. : promoteur. Amp : Ampiciline. Kan : Kanamycine. Sites : Sites de restrictions positionnés de part et d'autres du gène en 5' et 3'.

Nom	Ploïdie	Génotype	Vecteurs	N° de coll.
Y2H Y187	N	<i>Mat α, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>		1307
Y2H CG1945	N	<i>Mat a ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-his3</i>		1308
Gal4AD	N	<i>Y187</i>	pACT2 vide	771
MetRS	N	<i>Y187</i>	pACT2 MetRS	772
Nucléop	N	<i>Y187</i>	pACT2 nucléoplasmine	773
Gal4BD	N	<i>CG1945</i>	pGBKT7 vide	774
Nufip	N	<i>CG1945</i>	pGBK Nufip	775
Arc1	N	<i>CG1945</i>	pGBKT7 Arc1	776
Pgk1	N	<i>CG1945</i>	pGBKT7 Pgk1	777
Rpb7	N	<i>CG1945</i>	pGBKT7 Rpb7	778
Kap60	N	<i>CG1945</i>	pGBKT7 Kap60	779
Kap104	N	<i>CG1945</i>	pGBKT7 Kap104	780

Tableau 11. Tableau des souches générées pour le test du double hybride levure. Le numéro est celui de la collection de souches.

II Techniques de biologie moléculaire

II.1 Préparation des bactéries chimiocompétentes

Les cellules d'une culture de 60 mL arrêtée en phase exponentielle de croissance ($A_{600\text{nm}} = 0,6$) sont récoltées par centrifugation à 4 °C durant 15 min à 3400 *g* et reprises dans 15 ml de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5 contenant 50 mM de CaCl₂ afin de perméabiliser la paroi. Après 1 h d'incubation dans la glace, la suspension est centrifugée à 4 °C durant 5 min à 1200 *g*, puis les cellules sont remises délicatement en suspension dans 2 mL de la solution précédente et incubées 1 h dans la glace. La suspension de cellules compétentes est complétée avec 10 % de glycérol, (v/v), aliquotée par fractions de 0,2 mL et stockée à -80 °C.

II.2 Transformation des bactéries chimiocompétentes

Avant leur utilisation, les cellules compétentes sont lentement décongelées sur glace. La suspension bactérienne (200 µL, soit environ 10⁸ cellules) est incubée durant 20 min dans la glace en présence de 10 µL de milieu de ligation renfermant 50 ng à 1 µg de plasmide. Les cellules sont ensuite soumises à un choc thermique par incubation durant 45 s à 42 °C pour accélérer le transfert du plasmide à travers la membrane, puis incubées 2 min dans la glace. La suspension cellulaire est ensuite étalée sur milieu LB gélosé, contenant l'antibiotique approprié. Les boîtes de Pétri sont incubées durant la nuit à 37 °C.

II.3 Méthodes d'obtention et d'étude des acides nucléiques

II.3.1 Extraction de l'ADN de levure

2 oeses de cellules de levures prélevées sur milieu gélosé sont resuspendues dans 1 mL de tampon TE puis centrifugés 2 min à 10,000 *g*. Le culot est repris dans 250 µL de tampon Hoffmann contenant 2 % de triton, 1 % de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris

HCl pH 8,0, 1 mM d'EDTA. Un volume de billes de verre 0,45 mm et un volume de phénol-chloroforme sont ajoutés, puis le mélange est vortexé durant 2 min et centrifugé 5 min à 12000 *g*. Le surnageant contenant l'ADN est prélevé et soumis à un phénol chloroforme puis une précipitation de l'ADN à l'éthanol. Le culot est repris dans 80 µL de TE.

II.3.2 Extraction phénol-chloroforme des acides nucléiques

Le phénol est un agent déprotéinisant. La solution aqueuse est agitée durant 10 s en présence d'un volume (*v*) de phénol-chloroforme-acide isolamique (pour l'ADN : Roth phénol pH 7,5 25 :24 :1, pour l'ARN : Roth aquaphenol, pH 4,5) (1/1, *p/v*); après centrifugation durant 5 min à 12,000 *g*, la phase aqueuse, supérieure, est prélevée et soumise à une seconde extraction au phénol-chloroforme puis au chloroforme (*v/v*) pour éliminer les traces de phénol.

II.3.3 Précipitation des acides nucléiques à l'éthanol et à l'isopropanol

Cette étape permet de concentrer les acides nucléiques et d'éliminer les substances solubles dans l'éthanol. La solution est ajustée à 0,25 M en NaCl puis l'acide nucléique est précipité par addition de 3 *v* d'éthanol ou 0,6 *v* d'isopropanol et placé durant 30 min à -80 °C. L'acide nucléique est recueilli par centrifugation durant 20 min à 12000 *g*, lavé à l'éthanol 80 % (*v/v*), séché sous vide et dissout dans le tampon TE ou l'eau MiliQ.

II.3.4 Amplification par PCR et clonage

Le milieu d'amplification de 20 µl renferme 4 µL de tampon Phusion 5X livré par le fournisseur (NEB), 1 à 30 ng d'ADN génomique ou plasmidique et 0,3 µM de chacune des amorces de synthèse "sens" et "antisens" (Tableau 12), prolongées aux extrémités 5' p de sites de restriction adéquats, 0,2 mM de chacun des 4 dNTP ainsi que 0,5 U d'ADN polymérase Phusion polymérase (NEB) de haute fidélité. Les 35 cycles successifs d'amplification sont constitués chacun d'une étape de dénaturation de 10 s à 98 °C, d'une étape d'hybridation à 55-60 °C de 10 à 30 s (la température et la durée sont adaptées aux amorces), et d'une étape de polymérisation à 72 °C dont la durée varie en

fonction de la taille du fragment à amplifier (15-30 s/1 kb). Le produit est purifié par électrophorèse sur gel d'agarose à l'aide du kit Gel purification (Qiagen), cloné dans le vecteur de stockage pJet (ThermoFischer), transformé dans la souche de bactérie XL1, et le vecteur recombinant est digéré par les enzymes de restriction appropriées pour libérer les sites de restriction inclus dans les amorces. Les produits de digestion enzymatique sont à nouveau purifiés sur gel. La bande d'agarose renfermant le fragment d'ADN est découpée, et purifiée par le kit « Gel purification » (Qiagen). Le fragment est finalement inséré dans le vecteur d'expression linéarisé approprié.

Gène ciblé	Amorce sens 5' 3'	N°
	Amorse antisens 5' 3'	Coll
		.
MES1 (NLS)	tctagaATGTCTTTCCTCATTTCCTTTG	184
	ggatccAGGTTCCCTTGTATTGCGC	185
Prom MES1	GAGCTCTGCTAACTTTTGTAGCTACAGCGG	32
	CAAAGGAAATGAGGAAAGACATATGGCTTGTTGTAATTTCCGCT	33
	TTTTTTTC	
MES1	CATATGTCTTTCCTCATTTCCTTTGATAAATCG	34
	GGATCCCACTTGTTGACCACCATATTTGGC (sans codon stop)	35
	GGATCCttaCACTTGTTGACCACCATATTTGGC (avec codon stop)	189
RPB4 (B2H)	ctgcagATGAATGTTTCTACATCAACCTTTC	56
	gagctcATAGAGTGTCTTAGGTTTGACAATTC	57
RPB7 (B2H)	ctgcagATGTTTTTTATTAAGACCTTTCGC	54
	gagctcAATAGCACCCAAATAATCTTCTTTG	55
KAP95 (B2H)	ctgcagATGTCCACCGCTGAATTTGCTC	98
	cccgggTAAGGATAATTGACGCTTCTGTTGCTC	99
ARC1 (B2H)	ctgcagATGTCCGATCTCGTTACCAAGTTC	106
	gagctcACGGACTTGAGCATTAGCAATACTAG	107
MES1 (N-ter	ctgcagATGTCTTTCCTCATTTCCTTTGATAAATCG	186
MetRS)-GFP	cccgggACATTGCCTTATTCAAAGCCGCGG	187
(B2H)		188
Delta	ARC1 GAACATATATATGAACAAATAAATGATAATGG	113
Kanmx	AGGAACTTTTATCATTGCATATACTTTCCC	114

MES1 (Delta 2-55)	catatgTTCCTTTTGTGGATGCTAACGCTATTC MES1 antisens	116 35
MES1 (Delta 2 - 160)	catATGCCACGTGATTCTTCTTCTTTCAAAAACATCGG MES1 antisens	115 35
MES1 (Y2H)	ggatccTAATGTCTTTCCTCATTTCCTTTGATAAATC gtcgacCACTTGTTGACCACCATATTTGGC	166 167
RPB7 (Y2H)	ggatccTAATGTTTTTTATTAAGACCTTTCGC gtcgacAATAGCACCCAAATAATCTTCTTTG	168 169
ARC1 (Y2H)	ggatccTAATGTCCGATCTCGTTACCAAGTTC gtcgacACGGACTTGAGCATTAGCAATACTAG	170 171
KAP60 (Y2H)	ggatccTAATGGATAATGGTACAGATTCTTCCACG gtcgacGTTAAAATTGAATTGTTGGTTGACATTAGAACC	172 173
PGK (Y2H)	ggatccTAATGTCTTTATCTTCAAAGTTGTCTGTCC gtcgacTTTCTTTTCGGATAAGAAAGCAACACC	174 175
MES1 114E	catATGtctGAATTAAGAACCATTGACTACTACAGATTTGATCC MES1 Antisens	163
MES1 121T	catATGTCTACTACAGATTTGATCCTGTTTGCTAACGTTTATGC MES1 Antisens	164
MES1 142K	catATGtctAAATTCAGAAATTGCCATCCAAAGTGCATAACGC MES1 Antisens	165
MES1 114E (clonage MBP)	GGATCCTCCGCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCCAATTCATGGA ATTAAAAGAACCATTGACTACTACAGATTTGATCC (MES1 MBP@) CTGCAGttaCACTTGTTGACCACCATATTTGGCTCTCC	176 177
MES1 121T (clonage MBP)	GGATCCTCCGCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCCAATTCATGAC TACAGATTTGATCCTGTTTGCTAACGTTTATGC MES1 MBP @	178 177
MES1 142K (clonage MBP)	GGATCCTCCGCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCCAATTCATGAA ATTCCCAGAATTGCCATCCAAAGTGCATAACGC MES1 MBP@	179 177
ARN_t^{Met} (pour le clonage dans pUC18)	AGCTTAATACGACTCACtataGCTTGAGTAGCTCAGTAGGAAGAGC GTCAGTCTCATAATCTGAAGGtCGAGAGTTCGAACCTCCTCGAG CAccaG GATCCtggTGCTCGAGGAGAGGTTTCGAACCTCTCGaCCTTCAGATTAT GAGACTGACGCTTCTCTACTGAGCTACTCAAGCtataGTGAGTCGT ATTA	190 191

Tableau 12. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification de gènes ou l'hybridation. Les numéros utilisés sont ceux de la collection d'oligonucléotides.

II.3.5 Mutagenèse par PCR du gène *MES1*

Les oligonucléotides sens et antisens ont une taille d'approximativement 60 nucléotides, et s'hybrident de façon à ce qu'il y ait 30 paire de bases du côté 5' et 3' du nucléotide à muter (Tableau 13). Ils sont ajoutés au milieu réactionnel de PCR (Polymerase Chain Reaction) à une concentration finale de 0,3 µM chacun. L'ADN matrice utilisé est un plasmide, d'une taille d'environ 10 kb, contenant le gène *MES1* et est ajouté au milieu réactionnel de PCR à une concentration finale de 0,03 ng/µL. L'enzyme utilisée est la PrimeSTAR Max DNA polymerase (TAKARA). Le milieu réactionnel contient également les dNTP, et le tampon de PCR, et est 2X concentré. Le programme se compose d'une étape initiale de dénaturation de 30 sec à 98 °C, puis de 30 cycles se composant de : 5 s à 98 °C, 5 s à 60 °C, 4 min 30 s à 68 °C suivis d'une étape finale d'élongation de 5 min à 72 °C. L'efficacité de la PCR est visualisée par le dépôt de 1/10^e du volume total réactionnel sur gel contenant 1 % d'agarose, dans un tampon TAE. L'ADN matrice est éliminé par une digestion enzymatique par *DpnI* (Fast Digest, Thermo Fischer Scientific) selon les instructions du fournisseur. L'ADN néo-synthétisé est ensuite purifié (GeneJET PCR Purification kit, Thermo Fischer Scientific) et utilisé pour une transformation de bactérie. La mutation est vérifiée par séquençage (Eurofins), avec une amorce située au moins à 30 nucléotides de la mutation, et au maximum à 500 nucléotides. Le plasmide contenant la mutation peut alors être utilisé pour transformer la souche de levure adéquate.

Gène ciblé	Amorce sens 5' 3'	N°
	Amorce antisens 5' 3'	Coll.
MES1 (mut K9A)	CcatatgTCTTTCCTCATTTCCCTTGATgctTCGAAGAAACATC	42
	CTGCCCATTTGCAGTTAG	
	CTAACTGCAAATGGGCAGGATGTTTCTTCGAagcATCAAA	43
	GGAAATGAGGAAAGAcatatgG	
MES1 (mut K11A)	CcatatgTCTTTCCTCATTTCCCTTGATAAATCGgctAAACATC	44
	CTGCCCATTTGCAGTTAG	
	CTAACTGCAAATGGGCAGGATGTTTtagcCGATTTATCAAA	45
	GGAAATGAGGAAAGAcatatgG	
MES1 (mut K11A)	CcatatgTCTTTCCTCATTTCCCTTGATAAATCGAAGgctCATC	46

K12A)		CTGCCCATTTGCAGTTAG CTAACTGCAAATGGGCAGGATGagcCTTCGATTTATCAAA 47 GGAAATGAGGAAAGAcatatgG
MES1 K34A)	(mut	CAGCATTATCATTGTCAACTTCAGGTTTTAAATTtagcGCTT 40 GCATATTCAAGTGCTAGGGCA TGCCCTAGCACTTGAATATGCAAGCgctAATTTAAAACCT 41 GAAGTTGACAATGATAATGCTG
MES1 K37A)	(mut	TGCCCTAGCACTTGAATATGCAAGCAAAAATTTAgctCCT 38 GAAGTTGACAATGATAATGCTG CAGCATTATCATTGTCAACTTCAGGagcTAAATTTTTGCTT 39 GCATATTCAAGTGCTAGGGCA
MES1 S10A)	(mut	CcatatgTCTTTCCTCATTTCCCTTTGATAAAgctAAGAAACAT 50 CCTGCCCATTTGCAGTTAG CTAACTGCAAATGGGCAGGATGTTTCTTtagcTTTATCAAA 51 GGAAATGAGGAAAGAcatatgG
MES1 S10D)	(mut	CcatatgTCTTTCCTCATTTCCCTTTGATAAAgatAAGAAACAT 52 CCTGCCCATTTGCAGTTAG CTAACTGCAAATGGGCAGGATGTTTCTTatcTTTATCAAAG 53 GAAATGAGGAAAGAcatatgG
MES1 ATG en AGT)	(Mut	CTTGAAAAAAAAAGCGGAAATTTACAACAAGCcatatgTCTT 180 TCCTCATTTCCCTTTGATAAATCGAAG CTTCGATTTATCAAAGGAAATGAGGAAAGAactatgGCTTG 181 TTGTAAATTTCCGCTTTTTTTTCAAG
MES1 ATG en TTG)	(Mut	CTTGAAAAAAAAAGCGGAAATTTACAACAAGCcatttgTCTT 182 TCCTCATTTCCCTTTGATAAATCGAAG CTTCGATTTATCAAAGGAAATGAGGAAAGAcaaatgGCTTG 183 TTGTAAATTTCCGCTTTTTTTTCAAG
MES1 P205A Y206A)	(Mut	CGAAAGAAACATCTTGATCACTTCGGCATTAgctgctGTCA 192 ACAACGTTCCCACTTGGGTAATATCATCGG CCGATGATATTACCAAGTGTGGAACGTTGTTGACagcagc 193 TAATGCCGAAGTGATCAAGATGTTTCTTTCG
MES1	(Mut	CGAAAGAAACATCTTGATCACTTCGGCATTACCAgctGTC 194

Y206A)	AACAACGTTCCACACTTGGGTAATATCATCGG
	CCGATGATATTACCCAAGTGTGGAACGTTGTTGACagcTG 195
	GTAATGCCGAAGTGATCAAGATGTTTCTTTTCG

Tableau 13. Oligonucléotides utilisés pour réaliser des mutagénèses par PCR. Les numéros sont ceux de la collection d'oligonucléotides.

II.3.6 Modification enzymatique des acides nucléiques

Hydrolyse par les enzymes de restriction

L'ADN à digérer est incubé avec 1 µl d'enzyme (Fast Digest, ThermoFisher) par µg d'ADN durant 5 à 15 min (instructions du fournisseur) à 37 °C dans 20 µl de tampon de restriction universel contenant 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0 à 37 °C), 5 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 0,02 % de Triton X-100 et 0,1 mg/mL de BSA.

Phosphorylation de l'extrémité 5' des oligonucléotides

Elle est effectuée avec la T4 polynucléotide kinase (10 U pour 10 à 20 pmoles d'extrémités), en présence de 50 mM de tampon Tris-HCl pH 7,5, 10 mM d'ATP, 10 mM de MgCl₂ et 5 mM de DTT durant 1 h à 37 °C. L'enzyme est ensuite dénaturée par incubation durant 15 min à 65 °C ou par extraction au mélange phénol-chloroforme.

Déphosphorylation de l'extrémité 5' phosphate du vecteur linéarisé

L'ADN linéarisé (1 µg) est incubé durant 10 min à 37 °C dans 20 µl de tampon contenant 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0 à 37 °C), 5 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 0,02 % de Triton X-100 et 0,1 mg/mL de BSA en présence de 1 µl de phosphatase alcaline bactérienne (FastAP, ThermoFisher). L'enzyme est éliminée par extraction au mélange phénol-chloroforme puis l'ADN est précipité par l'éthanol et recueilli par centrifugation.

Ligation des fragments d'ADN dans un vecteur

Le vecteur linéarisé et déphosphorylé (50 ng à 1 µg) est incubé en présence du fragment à liguer (rapport molaire de Fragment/Vecteur = 1 à 10) dans le tampon Tris-HCl pH 7,55 à 25 °C, Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contenant 1 mM d'ATP, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, et 1 U de T4 ADN ligase dans un volume final de 20 µl. Après 1 h d'incubation à 20 °C, 5 µl du milieu réactionnel est utilisé pour une transformation bactérienne.

II.3.7 Plasmides générés

Les plasmides sont obtenus par préparation de l'ADN plasmidique de la bactérie XL1 précédemment transformée par le vecteur (Tableau 14, Tableau 15). Le kit de miniprep utilisé est fourni par Bio basics Canada inc. Les minipreps sont réalisées à partir de 2 mL de culture de nuit bactérienne. Les maxiprep (plasmides pour la transcription) sont réalisées à partir de 250 mL d'une culture durant la nuit à l'aide du kit fourni par Qiagen. Dans les tableaux de plasmides sont indiqués : le nom du plasmide ainsi qu'entre parenthèse la souche finale utilisée, le numéro correspond à celui du tableau de la section « souche » correspondante.

II.3.7.1 Plasmides à destination des bactéries

Nom (souche transformée)	Vecteur	Prom.	Gène	Sites	Marqueurs	Etiquette	N° souche
MBP-MetRS (2)	pMAL	pTAC	<i>MES1</i>	BamHI PstI	Amp	MBP ter	N- 750
MBP Mes1Δ142 (2)	pMAL	pTAC	<i>MES1</i>	BamHI PstI	Amp	MBP ter	N- 1334
MBP Mes1Δ121 (2)	pMAL	pTAC	<i>MES1</i>	BamHI PstI	Amp	MBP ter	N- 1337
MBP Mes1Δ114 (2)	pMAL	pTAC	<i>MES1</i>	BamHI PstI	Amp	MBP ter	N- 1338
HIS-ARC1 (2)			<i>ARC1</i>		Amp	6 His ter	N- 406
pUC18 Meti (1)	pUC18	T7	<i>Rib</i> <i>+ARN_t^{Met}</i>	HindIII BamHI	Amp	-	1336
pUC18 Mete (1)	pUC18	T7	<i>ARN_t^{Met}</i>	HindIII BamHI	Amp	-	1335

Tableau 14. Plasmides générés à destination des bactéries. Prom. : promoteur. Amp : Ampiciline. Kan : Kanamycine. Sites : Sites de restrictions positionnés de part et d'autres du gène en 5' et 3'.

II.3.7.2 Plasmides à destination des levures

Nom (souche transformée)	Vecteur	Prom	Gène	Sites	Marqueur	Etiquette	ori	N° coll
NLS-GFP (2)	pRS313	<i>pGPD</i>	<i>MES1</i>	<i>XbaI</i>	His/Amp	GFP C-ter	Cen	588

			(1-55) GFP	BamHI					
GFP (2)	pRS313	pGPD	GFP	XbaI BamHI	His/Amp	GFP C-ter	Cen	589	
MetRS GFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1309	
MetRS GFP (3)	pRS314	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Trp/Amp	GFP C-ter	Cen	1352, 1353	
MetRSΔ2-55 GFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1339	
MetRSΔ160 GFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1317	
MES1/MetRS shuffle (3)	pRS316	pMES1	MES1	-	Ura/Amp	-	Cen	35	
MetRS HA (3) (4) (6) (11)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	HA C-ter	Cen	1343, 1344, 1345, 1346	
MetRS Δ142GFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1340	
MetRS Δ142HA (3) (4)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	HA C-ter	Cen	1341 1342	
MetRS Δ121GFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1347	
MetRS Δ121HA (3) (4)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	HA C-ter	Cen	1348 1349	
MetRS K11AGFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1311	
MetRS K11AHA (3) (4)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	HA C-ter	Cen	1075 1188	
MetRS K9AGFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1310	
MetRS K12AGFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1312	
MetRS S10DGFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1316	
MetRS K34AGFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1313	
MetRS K37AGFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1314	
MetRS S10AGFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1315	
MetRS S10DGFP (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1316	
MetRS S10D HA (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1355	
MetRS K11A HA (3)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	HA C-ter	Cen	1354	
MetRSΔ142HA	pRS315	pMES1	MES1	NdeI	Leu/Amp	HA C-ter	Cen	1186	
MetRSk11AHA (4) (double tranfo)	pRS314	pMES1	MES1	BamHI	Trp/Amp	HA C-ter	Cen		
MetRS Human (3) (13)	pRS315	pMES1	MES1	NdeI BamHI	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1356 1358	

Nter MetRSSce - MetRS Human (3)	pRS315	<i>pMES1</i>	<i>MES1</i>	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen	1357
MetRS (3)	AGT+1	pRS315	<i>pMES1</i>	<i>MES1</i>	- <i>BamHI</i>	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen 858
MetRS (3)	TTG+1	pRS315	<i>pMES1</i>	<i>MES1</i>	- <i>BamHI</i>	Leu/Amp	GFP C-ter	Cen 859
UBI (1)			<i>pCUP1</i>	<i>UBI</i>		Leu/Amp	-	2μ 1353 (1350 XL1)
UBI K48R (1)			<i>pCUP1</i>	<i>UBI</i>		Leu/Amp	-	2μ 1352 (1351 XL1)

Tableau 15. Plasmides générés à destination de *S. cerevisiae*. . Prom. : promoteur. Amp : Ampiciline. Sites : Sites de restrictions positionnés de part et d'autres du gène en 5' et 3'. Cen : centromérique. UBI : ubiquitine. Numero de collection : souches.

II.3.8 Transcription *in vitro*

Les séquences de l'ARN_t^{Met} et de l'ARN_e^{Met} ont été obtenues sur la base de données « tRNA DB » de Leipzig (<http://trna.bioinf.uni-leipzig.de/>).

Les gènes d'ARNt destinés à être transcrits *in vitro* ont été reconstitués à partir d'oligonucléotides de synthèse complémentaires ou par synthèse de gène (Eurofins). Les gènes d'ARNt destinés à être transcrits ont été clonés entre les sites *HindIII* et *BamHI* du vecteur pUC18 ; une séquence additionnelle, correspondant au promoteur de l'ARN polymérase du phage T7, est rajoutée en amont et un site de restriction *BstNI* ou *MvaI* est ajoutée en aval du gène.

Le gène de l'ARN_e^{Met} a été reconstitué par hybridation d'oligonucléotides de synthèse complémentaires, contenant directement les sites de restrictions « format digéré » de *HindIII* et *BamHI* en 5' et 3' respectivement de la séquence, le promoteur T7 et la tata Box en 5' ainsi que le CCA en 3'.

Environ 20 pmoles d'oligonucléotides sont phosphorylés avec la T4 polynucléotide kinase en présence d'ATP. Les oligonucléotides complémentaires sont ensuite hybridés dans 10 μl de tampon de ligation par chauffage à 80 °C durant 5 min suivi d'un refroidissement lent jusqu'à la température ambiante. La ligation du gène reconstitué dans le vecteur pUC18 préalablement linéarisé par *BamHI* et *HindIII* est effectué dans 20 μl de milieu de ligation renfermant 2 μl de chacune des solutions de duplexes, 1 μg de vecteur linéarisé pourvu d'extrémités compatibles et déphosphorylé,

2 mM d'ATP et 5 U de T4 ADN ligase. Après 1 h d'incubation à 20 °C, le milieu est utilisé pour la transformation de bactérie puis l'intégrité de l'insert est vérifiée par séquençage.

La séquence de l'ARN_t^{Met} commence par la base « A », ce qui n'est pas optimal pour la transcription par l'ARN T7 polymérase. Ainsi, selon Fechter *et al.*, un ribozyme a été ajouté en 3' du promoteur T7 et de la tata box, et en 5' du gène de l'ARN_t^{Met}. De même que pour l'ARN_e^{Met}, les sites de restrictions *Hind*III et *Bam*HI ont été ajoutés en 5' et 3' respectivement. La séquence a été obtenue par le service synthèse de gène d'Eurofins (Tableau 16).

5'

AAGCTTAATACGACTCACtatagggagataCGGCGCTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACG
GTACCCGGTACCGTCAGCGCCGTGGCGCAGTGGAAGCGCGCAGGGCTCATAACCCTGATGt
CCTCGGATCGAAACCGAGCGGCGCTAccaGGATCC 3'

Tableau 16. Séquence utilisée pour la transcription *in vitro* de l'ARN_t^{Met}. En turquoise : Site de restriction *Hind*III. En bleu : promoteur T7 et tata box. En violet : ribozyme. En rose : gène de l'ARN_t^{Met}. En orange : CCA. En jaune : Sites de restriction *Bst*NI et *Bam*HI.

La linéarisation des vecteurs recombinés par digestion *Bst*NI libère une extrémité –GGT5'p sur le brin codant permettant la synthèse de la séquence CCA à l'extrémité 3'OH du transcrit.

Les transcrits ont été obtenus après 3 h d'incubation à 37 °C de 500 µL d'un tampon contenant 40 mM Tris HCl pH 8,1, 30 mM MgCl₂, 1 mM spermidine, 5 mM DTE, 0,01 % Triton X-100, 4 mM de ATP, CTP, GTP et UTP, 16 mM de GMP, 250 U T7 d'ARN polymérase et de 50 µg du plasmide pUC18 linéarisé par *Mva*I. Si l'on veut produire plus de transcrit, il faut multiplier les tubes plutôt que d'augmenter les volumes.

Après la transcription du transzème contenant l'ARN_t^{Met}, les milieux réactionnels sont dilués 5 fois dans 40 mM Tris HCl pH 8,1 et 30 mM MgCl₂, incubé 1 h à 60 °C ce qui permet d'améliorer le clivage autocatalytique. Cette étape n'est pas réalisée pour l'ARN_e^{Met} qui ne contient pas de ribozyme.

Les réactions sont stoppées par une extraction phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol.

II.3.9 Purification des transcrits sur gel dénaturant

Les transcrits sont purifiés sur gel contenant 12 % d'acrylamide et 8 M urée (40 X 30 X 0,2 cm). L'électrophorèse permet de séparer le transcrit des autres composants du milieu réactionnel, la matrice d'ADN, les nucléotides libres en excès et le pyrophosphate et de séparer le transcrit de taille souhaitée de ceux de plus grande ou de plus petite taille résultant d'une incorporation excédentaire de nucléotides ou de l'arrêt prématuré de la polymérisation. Le gel est d'abord migré à vide durant 30 min à 550 V, afin de permettre l'évacuation des molécules oxydantes tel que le persulfate, initiateur de la polymérisation du gel. Les échantillons sont mélangés à un tampon de charge ARN (formamide, xylène cyanol, glycérol) et chargés dans le gel. La migration s'effectue sur la nuit à 650 V et 55 mA, soit environs 15 h. Les transcrits se trouvent au dessus du xylène cyanol. Le gel est révélé par « UV-shadowing » puis après découpage du gel en fines lamelles à l'endroit révélé, les transcrits sont électro élués par l'utilisation d'une cuve d'électroélution « Schleicher & Schuell Biotrap », 2 fois 1 h à 150 V, puis le sens du courant est inversé durant 30 s avant de récolter l'ARNt. L'ARNt s'accumule dans un compartiment de la cellule ; il est recueilli dans un volume de 1 ml. Une seconde électroélution, effectuée dans les mêmes conditions, permet de vérifier que tout l'ARNt a été élué. L'ARNt est précipité à l'éthanol, sédimenté, lavé, séché et repris dans l'eau. En général plus de 90 % de ARNt est élué à la première élution.

II.3.10 Renaturation et stockage des transcrits d'ARNt^{Met}

Le transcrit l'ARNt_i^{Met} est renaturé par deux étapes de chauffage durant 4 min à 95 °C suivie de 4 min de refroidissement sur glace. 15 mM de MgCl₂ sont ensuite ajoutés et la mixture est incubée 5 min à 65°C puis progressivement amenée à température ambiante pendant 10 min.

Le transcrit l'ARNt_e^{Met} est renaturé par l'incubation à 65 °C en présence de 15 mM de MgCl₂ durant 2 min, puis amené à température ambiante durant 10 min. Leur capacité acceptrice a été mesurée et est de 63 %.

Les 2 transcrits sont stockés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

II.3.11 Mesure des concentrations en acides nucléiques

Les concentrations sont déterminées par mesure de l' $A_{260\text{nm}}$ à partir du coefficient d'extinction spécifique $\epsilon_{260\text{nm}} = 50, 20, \text{ et } 25 \text{ (mg/ml)}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ respectivement pour l'ADN monocaténaire, bicaténaire et l'ARNt. La concentration d'une goutte de $1 \mu\text{L}$ est lue au NanoDrop. Si l' $A_{260\text{nm}}$ est supérieure à 1, limite de linéarité du spectrophotomètre, la solution d'acides nucléiques est diluée dans un volume de $20 \mu\text{L}$, puis la concentration est lue à nouveau.

II.4 Préparation et transformation de levures chimiocompétentes

A J-1, une préculture de la souche à transformer estensemencée dans le milieu adéquat, synthétique avec marqueur d'auxotrophie (si la souche contient déjà des plasmides) ou riche (s'il s'agit d'une souche sauvage). A J-0, 6 h avant l'expérience, la préculture est diluée au $\frac{1}{4}$, puis incubée à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à ce que l' $A_{600\text{nm}}$ atteigne 1. Idéalement, pour une transformation 10 mL de culture à 1 de l' $A_{600\text{nm}}$ sont nécessaires. La culture est centrifugée 3 min à $3500 g$, le surnageant est éliminé puis le culot est resuspendu dans $1/10^{\text{ème}}$ du volume initial de tampon TE contenant $0,1 \text{ M}$ d'acétate de lithium (AcLi). La suspension est à nouveau centrifugée comme précédemment, le surnageant éliminé puis le culot est resuspendu dans $1/100^{\text{ème}}$ du volume initial dans le même tampon que précédemment. $10 \mu\text{L}$ d'ADN simple brin précédemment chauffé 5 min à $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (sperme de saumon soniqué à une concentration de $100 \mu\text{g/mL}$) sont ajoutés, puis la suspension homogénéisée est incubée 2 min à température ambiante. $1 \mu\text{g}$ de l'ADN à transformer est ensuite ajouté, et la suspension est incubée 2 min à température ambiante. $280 \mu\text{L}$ de PEG6000 à 40 % (p/v) sont ajoutés puis la suspension est brièvement vortexée et incubée 45 min à $30 \text{ }^\circ\text{C}$. La transformation se fait par addition de $43 \mu\text{L}$ de DMSO, homogénéisation délicate (il ne faut surtout pas vortexer), suivi d'un choc thermique de 5 min à $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Cette étape est suivie d'une brève centrifugation de 15 s à $13000 g$. Le surnageant est soigneusement et intégralement éliminé, puis le culot est resuspendu dans $100 \mu\text{L}$ du tampon TE contenant $0,1 \text{ M}$ d'AcLi et $100 \mu\text{L}$ d'eau MiliQ stérile. La suspension cellulaire est ensuite étalée sur milieu synthétique permettant la sélection des transformants.

III Techniques de génétique de la levure

III.1 Disruption d'un gène nucléaire

Tout d'abord, il est nécessaire de choisir un gène rapporteur qui permettra de sélectionner les délétants. Celui-ci est soit un gène marqueur d'auxotrophie, soit un gène de résistance à un fongicide tel que le G418.

Le gène marqueur choisi est flanqué, après PCR, de 200 paires de bases identiques à celles qui se trouvent en 5' du codon ATG initiateur du gène à déléter, et de 50 paires de bases identiques à celles qui se situent en aval du codon stop du gène à disrupter. De 1 à 5 µg du fragment PCR ainsi obtenu sont utilisés pour transformer la souche de levure dans laquelle se trouve le gène à disrupter. Les cellules transformées sont étalées sur le milieu permettant la sélection du gène marqueur inséré, et incubées durant 72 h à 30 °C.

III.2 Tests en goutte

Les levures haploïdes ou diploïdes à tester sont cultivées jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance. Après incubation, les levures sont diluées à une absorbance de 0,5 ($A_{600\text{ nm}}$), puis 4 dilutions en cascade successives au 1/10^{ième} sont réalisées. 7 µL de chaque dilution sont déposés sur milieux solides sélectifs SCGlu ou SCGly, supplémentés ou non en 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT). Les boîtes sont ensuite incubées durant 4 jours à 30 °C et les photos sont prises après deux et quatre jours d'incubation (parfois cinq jours lorsque supplémentation en 3AT).

III.3 Chasse de plasmide sur 5 FOA

Afin de chasser le plasmide contenant le marqueur d'auxotrophie *URA3*, les colonies sont repiquées sur milieu synthétique solide contenant du 5-FOA. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 2 jours à 30 °C.

III.4 Croisements de levures, sporulation et sélection des ségrégants

Les souches de signes opposés Mat a et Mat α , à croiser, sont cultivées fraîchement sur milieu gélosé durant 24 h. Chacune est ensuite prélevée à l'aide d'une oese puis mélangées ensemble sur milieu YPD durant 12 h dans le but de former des diploïdes. Le diploïde obtenu est sélectionné par culture sur milieu solide synthétique adéquat (normalement, une même souche contient des marqueurs d'auxotrophies différents pour chacun des signes, ce qui permet la sélection) durant 48 h. Le diploïde est ensuite déposé sur milieu pauvre solide, en quantité importante, et incubé durant 5 jours au moins à 25 °C. La formation de tétrade est observée au microscope entre lame et lamelle, et si le pourcentage de sporulation est correct (10 %), la dissection des tétrades est effectuée. Afin de digérer la paroi des asques, les tétrades prélevées à l'aide d'une oese sont incubées dans un tampon TE contenant 1 M sorbitol et 1 mg/mL de zymolase 100 T. La suspension est délicatement homogénéisée puis incubée durant 5 min à température ambiante. Elle est placée sur une boîte de milieu gélosé adéquat, sous forme d'une goutte qui est étalée par gravité. La dissection se fait au micromanipulateur. La croissance des spores se fait durant minimum 48h avant d'être observée.

IV Techniques de biologie cellulaire

IV.1 Purification de noyaux de levure

Les purifications de noyaux sont incluses dans un article de revue de méthodes des aaRS auquel j'ai contribué, présenté à la fin du matériel et méthodes (§ VII).

Préculture :

A J-2, une préculture de 50 mL de la souche utilisée estensemencée dans le milieu liquide adéquat. A J-1, au matin, la préculture est rafraîchie par l'addition de milieu neuf. En fin d'après midi vers 17 h-17 h 30 min, la culture estensemencée : 2 fois 2 L, à 0,002 d' A_{600nm} (= duplicata). A J-0, vers 9 h-9 h 30 min, l' A_{600nm} de la culture est d'environ 0,7. 1 mL est prélevé pour réaliser un extrait brut.

Préparation des sphéroplastés :

Les 2 L de culture sont centrifugés 4 min à 3500 *g*, puis les culots sont lavés avec de l'eau MiliQ et re-centrifugés comme précédemment. Le culot est ensuite pesé, et devrait avoir une masse d'environ 7 g. Celui-ci est repris dans 100 mM Tris pH 9,4, 10 mM DTT (2 mL/g de culot) et incubé durant 20 min à 30 °C, sous agitation douce (80 rpm). Les cellules sont centrifugées 4 min à 3500 *g* et lavées avec 7 mL/g de culot du tampon 1,1 M Sorbitol, 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,4, puis re-centrifugées comme précédemment. Les cellules sont resuspendues dans 7 mL/g de culot dans le même tampon que précédemment, auxquelles sont ajoutés 5 mg/g de zymolase 20T (Zymolase 20T *Arthrobacter luteus*, poudre lyophilisée 20000 U/g, MP biomedicals) préalablement dissoute dans quelques µL de tampon Sorbitol. 10 µL sont prélevés, dilués dans 990 µL d'eau, vortexés, puis l'A_{600nm} est lue 1 min plus tard. La suspension est incubée 45 min à 30 °C, sous une agitation douce de 80 rpm. 10 µL sont prélevés, dilués dans 990 µL d'eau, vortexés, puis l'A_{600nm} est lue 1 min plus tard. Si l'A_{600nm} a diminué, la digestion est accomplie.

A partir de cette étape, tout est réalisé à 4 °C ou sur glace.

Il faut placer 10¹¹ cellules/tubes Falcon 50. (Classiquement, 1 g de culot = 1,5.10¹⁰ cellules) Les sphéroplastés sont centrifugés 4 min à 3500 *g*, puis lavés avec le tampon précédent, en prenant soin de les resuspendre délicatement et ne surtout pas vortexer. Ils sont ensuite centrifugés comme précédemment et resuspendus dans 20 mL du tampon précédent.

6 mL d'une solution contenant 30 mM de sorbitol et 5 % (p/v) de Ficoll 400 (pour la biologie moléculaire et la biochimie, Roth), contenant des inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free, tablettes de cocktail d'inhibiteurs, Roche), sont placés en dessous de la suspension, à l'aide d'une pipette de 5 mL. Les sphéroplastés sont ensuite centrifugés 10 min à 4000 *g*. Le surnageant est aspiré et les culots stockés sur glace jusqu'à l'étape de lyse, 10 min au maximum.

Enrichissement des noyaux :

Les culots sont repris dans 15 mL de 20 % (p/v) Ficoll 400 dilué dans un tampon contenant 20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,4, 1 mM MgCl₂, et inhibiteurs de protéases, et les sphéroplastés sont lysés par 20 coups de Potter, rapidement, en 5 min maximum. Le lysat est ensuite transféré dans un Falcon 50 préalablement refroidis, puis laissé à refroidir durant 5 min sur glace. La suspension est ensuite centrifugée 5 min à 13,000 *g*

(les noyaux ne culottent pas à cause du Ficoll 400 20 %). Le surnageant est prélevé soigneusement sans toucher le culot, puis transféré dans un nouveau tube et recentrifugé 10 min à 13000 *g*. Le surnageant est aspiré (15 mL doivent être obtenus) et transféré sur un gradient contenant trois couches de 6 g de 50 % (p/v), 40 % (p/v) et 30 % (p/v) de Ficoll 400, dans un tampon contenant 20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,4, 1 mM MgCl₂, et inhibiteurs de protéases. Les gradients sont ensuite ultra-centrifugés 1 h à 58000 *g* (Beckman optima XPN100, rotor SW28 ; 18000 rpm, tubes ultra clear 25X89 mm).

Après ultra-centrifugation, la couche de débris se trouvant au dessus des gradients est retirée, puis l'interface 40-50 % de Ficoll 400 et un peu de la couche à 40 % de Ficoll 400 sont prélevés (une fine couche de noyaux devrait se trouver à l'interface 30-40 % de Ficoll 400, la couche 40 % de Ficoll 400, et l'interface 40-50 % de Ficoll 400). Le Ficoll 400 est retiré par l'ajout de 10 volumes de tampon 20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,4, 1 mM MgCl₂, et inhibiteurs de protéases et centrifugation de 10 min à 10000 *g* afin de sédimenter les noyaux. Les noyaux ont une couleur légèrement marron-jaunâtre.

IV.2 Techniques de microscopie

IV.2.1 Culture des levures

Les levures à observer sont cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance dans le milieu synthétique adéquat au maintien des plasmides. 2 mL sont prélevés et centrifugés durant 3 min à 3500 *g*. Le culot est resuspendu dans 100 µL de milieu frais. 5 µL sont prélevés et placés entre lame et lamelle, puis observé au microscope. Le signal de fluorescence a été acquis par un microscope à épifluorescence ZEISS (AXIO Observer d1), et les images traitées avec le logiciel imageJ.

IV.2.2 Coloration Hoechst de l'ADN des noyaux

La coloration de l'ADN des levures permet la détection des noyaux. La solution stock de Hoechst est constituée par la dissolution de 10 mg/mL de Hoechst (invitrogen) dans du DMSO, puis stocké à l'abris de l'obscurité à -20 °C. 5 µL de solution stock de Hoechst sont ajoutés à 5 mL de culture de levure en phase exponentielle de

croissance dans le milieu synthétique adéquat. La culture est placée à l'incubateur à 30 °C sous agitation durant 20 min. La suspension est centrifugée durant 3 min à 3500 *g* puis l'excédent de Hoechst est retiré par deux lavages dans 1 mL de milieu frais. Le culot est ensuite resuspendu dans 100 µL de milieu frais. Les cellules sont ensuite observées comme précédemment, en tenant compte des longueurs d'ondes d'émission et d'absorption du fluorophore (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

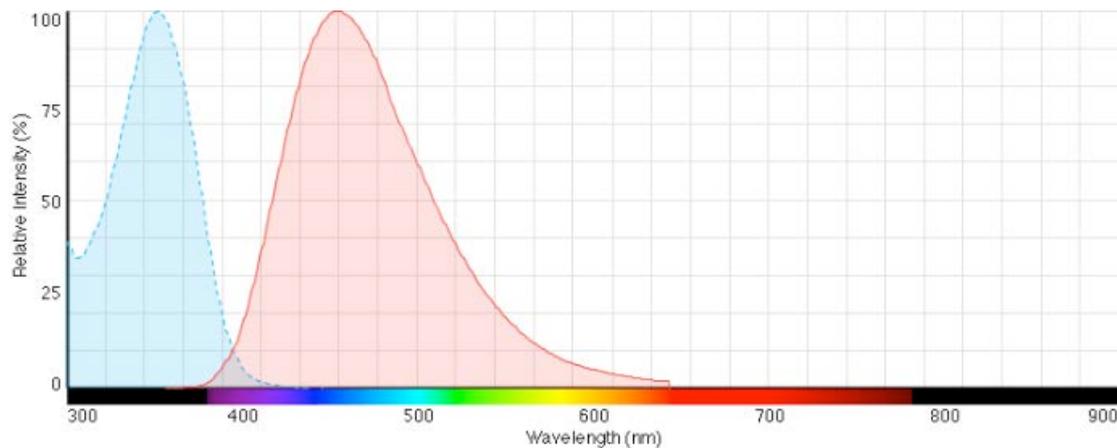


Figure 26. Longueurs d'onde d'absorption (en bleu) et d'émission (en rouge) de la molécule Hoechst liée à l'ADN.

V Méthodes d'obtention et d'étude des protéines

V.1 Extractions protéiques et purifications

V.1.1 Préparation d'extraits protéiques totaux pour immunodetection

A partir d'une culture se trouvant en milieu de phase exponentielle, deux unités d' A_{600nm} sont prélevés et centrifugés à 13,000 *g* durant 3 min. Ensuite, le surnageant est retiré et 100 µL de NaOH 1,85 M sont ajoutés afin de resuspendre le culot. La suspension est incubée 10 min sur glace, puis 100 µL de TCA 100 % est ajouté. La mixture est délicatement homogénéisée et incubée à nouveau 10 min sur glace. Ensuite, le lysat est centrifugé 10 min à 13,000 *g* à 4 °C, le surnageant est retiré, et le culot est resuspendu dans 60 µL de Tris HCl pH 8,0 et 30 µL de bleu de charge pour protéines. L'extrait protéique est incubé 10 min à 37 °C, puis stocké à -20 °C.

V.1.2 Fractionnement subcellulaire

100 mL de cellules sont cultivées dans le milieu SC approprié, puis lorsque $A_{600nm} = 0,7 - 1$, centrifugées 4 min à 1600 *g* à température ambiante puis resuspendues dans 10 mL de tampon de lyse préalablement refroidi (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, puis transférées dans un tube de 2 mL contenant 1/3 du volume en billes de verre puis lysées à la FastPrep (MP Bio ; 6 m.s⁻¹, 6 × 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 centrifugée à 13,000 *g* pendant 10 min à 4 °C. Le culot (P13) est conservé tandis que le surnageant (S13) est transféré dans un nouveau tube et centrifugé 1 h à 10,0000 *g* à 4 °C. Le volume du surnageant (S100) est mesuré et le culot (P100) et le P13 sont repris dans le même volume de tampon de lyse que le S100. Les trois extraits P13 P100 et S100 sont utilisés pour les expériences d'immunolocalisation.

V.1.3 Extraction des protéines nucléaires

Les noyaux obtenus par purification sont resuspendus dans 500 µL de tampon Noyau constitué de 100 mM Tris HCl pH 7,8, 0,1 mM EDTA, 5 mM β-Mercaptoéthanol, 1 mM benzamidine, inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free, tablettes de cocktail d'inhibiteurs, Roche), et transvasés dans un eppendorf de 1,5 mL, puis le Falcon 50 est rincé avec 200 µL de tampon Noyaux supplémentaire. Les noyaux sont cassés par sonication selon le programme suivant : 1 min 20 s de sonication, 1 s on/4 s off, à une amplitude de 30 % dans la glace. Les noyaux sont refroidis durant 2 min sur glace, puis re-soniqués durant 30 s, 1 s on/ s off à une amplitude de 30 %.

Le lysat est centrifugé durant 30 min à 4 °C à 100,000 *g* dans le but de culotter les membranes nucléaires. Les concentrations de protéines nucléaires sont mesurées par la technique colorimétrique de Bradford (réactif « Biorad protein assay, dye reagent concentrate »), selon les instructions du fournisseur.

5 µg d'extraits nucléaires suffisent pour détecter un signal intense de la protéine Nop1, marqueur nucléaire, par immunodétection.

V.1.4 Purification d'affinité en tandem (TAP)

Les souches de levure exprimant une protéine fusionnée à l'étiquette TAP (Tandem affinity purification) sont ensemencées à J-2 dans 1/100^{ème} du volume final de culture souhaité. Le lendemain, environs 16 h avant le début de l'expérience, les cultures sont ensemencées à une $A_{600\text{nm}}$ de 0,005 si le milieu utilisé est du glucose (expérience en fermentation), ou de 0,05 si le milieu utilisé est du glycérol (expérience en respiration). Ici, l' $A_{600\text{nm}}$ est adaptée pour une souche dont le temps de génération est identique à celui d'une souche sauvage RS453. Les cellules sont récoltées par centrifugation durant 5 min à 3500 *g*, et resuspendues dans 1 volume de tampon de lyse (20 mM Hepès pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, inhibiteurs de protéases) auxquelles sont ajoutés 1/3 du volume en billes de verres de 0,5 mm de diamètre. La lyse des cellules est effectuée par broyage mécanique à l'aide d'un appareil FastPrep, selon le programme suivant : 6 fois 30 s à une vitesse de 6 m.s⁻¹, avec incubation dans la glace entre chaque cycle. Après le dernier cycle, le lysat est centrifugé 10 min à 9000 *g* à 4 °C. Le surnageant est ensuite ajouté à une quantité adéquate de résine IgG sepharose (GE healthcare) (selon les instructions du fournisseur et le taux d'expression de la protéine étiquetée) préalablement équilibrée avec le tampon de lyse. Le mélange est placé sous agitation douce en chambre froide durant minimum 90 min. Le surnageant est ensuite éliminé, et la résine lavée avec 20 volumes de tampon 20 mM Hepès-NaOH pH 7,4, 10 mM KCl, inhibiteurs de protéases. Elle est ensuite équilibrée avec 10 volumes de tampon Tev (10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM KCl, 0,1 % NP40, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, inhibiteurs de protéases). 2 volumes de tampon Tev sont ensuite ajoutés à la résine ainsi que la protéase TEV, en concentration adéquate et selon les instructions du fournisseur. La suspension est incubée durant 12 à 16 h en chambre froide sous agitation douce. Le surnageant est ensuite prélevé, et additionné de 3 volumes de tampon CAM (10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM MgAc, 1 mM imidazole, 2 mM CaCl₂, 0,1 % NP40 (v/v), 10 mM β-mercaptoéthanol, inhibiteurs de protéases). L'extrait est incubé 1 h avec une quantité adéquate de résine Cam sepharose (GE Healthcare) (ayant une affinité pour la calmoduline) préalablement équilibrée avec le tampon CAM, et 4 μL/mL de CaCl₂ 1 M est ajouté à l'extrait. La résine Cam sepharose est ensuite rincée avec 20 volumes de tampon CAM, puis pour éluer, 4 volumes de tampon d'élutions sont ajoutés pour une incubation de 5 min (10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM MgAc, 2 mM EGTA, 0,1 % NP40 (v/v), 5 mM β-mercaptoéthanol, inhibiteurs de protéases). Les éluats sont ensuite

récupérés stockés à -20 °C. L'identification, par spectrométrie de masse, des protéines composant les complexes protéiques purifiés a été réalisée par la plateforme de spectrométrie de masse de l'IBMC.

V.1.5 Purification des protéines MBP-MetRS et MBP-MetRS Δ 142 surproduites dans *E. coli*

La souche Rosetta 2 d'*E. coli* contenant le plasmide pMal MBP-MetRS est ensemencée à J-1 dans du milieu LB contenant de l'ampicilline et incubée à 37 °C, puis à J-0 au matin, la culture est diluée au 1/100^{ème} dans du LB contenant de l'ampicilline. 2 h plus tard, la culture atteint $A_{600\text{nm}} = 0,6 - 0,9$. L'induction est faite dans cette fourchette d' $A_{600\text{nm}}$ par l'ajout de 0,3 mM d'IPTG, et la culture est incubée durant 3 h à 30 °C. La récolte se fait par 5 min de centrifugation à 5000 *g*, puis le culot est congelé à -80 °C. Il est ensuite resuspendu dans 1/50^{ème} du volume initial dans un tampon contenant 250 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 0.25 % tween 20 (v/v), 5 % glycerol (v/v), 10 mM β -Mercaptoéthanol, inhibiteur de protéases, et lysé selon le programme de sonication suivant : 1 s on/1 s off, 1 min, 30 % d'amplitude, plusieurs fois selon le volume lysé. Après la lyse, la concentration en NaCl est ajustée à 300 mM, puis le lysat est centrifugé durant 15 min à 10,000 *g* à 4 °C. Le surnageant est ensuite ajouté aux billes d'amylose préalablement équilibrées dans le tampon 250 mM Tris HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 0.25 % tween 20 (v/v), 5 % glycérol (v/v), 10 mM β -Mercaptoéthanol, puis incubé au moins 90 min en chambre froide sous agitation douce et constante. Le surnageant est ensuite éliminé, et les billes sont rincées par 20 volumes d'un tampon contenant 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 % glycerol (v/v), 1 mM β -Mercaptoéthanol. Afin de procéder à l'élution, 1 volume de tampon d'élution contenant 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 % glycérol (v/v), 1 mM β -Mercaptoéthanol et 0,36 % de maltose (p/v) (maltose monohydrate, Sigma) est ajouté, incubé durant 5 min avec les billes, puis récupéré. L'opération est effectuée au total 5 fois, les éluats contenant le plus de protéines étant le second et le troisième.

Le clivage de la protéine MBP est possible grâce à la présence d'un site de clivage par le facteur XA. 1 μ g de facteur XA (NEB) est incubé dans un tampon 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, et 2 mM MgCl_2 , en présence de 30 μ g de protéine MBP-MetRS à cliver durant 16 h à une température de 20 °C. Une gel filtration (Superdex 200

10/300 GL, GE Healthcare) est ensuite réalisée pour récupérer la protéine purifiée, sans l'étiquette MBP ni la protéase.

V.1.6 Préparation d'un anticorps anti-MetRS

La protéine a été purifiée et préparée comme précédemment. A la suite de l'étape de clivage de l'étiquette MBP, un gel SDS-PAGE est réalisé puis la protéine a été découpée sur gel et envoyée à l'entreprise choisie pour la création de l'anticorps, Covalab. 2 lapins différents, présentant une faible immunoréactivité aux protéines de levure, ont été choisis pour les 3 injections de chacune 50 µg de MetRS purifiée, à J-0, J-39 et J-53. L'anticorps obtenu à partir du sérum de lapin, fortement immunogène contre la MetRS, a été purifié sur protéine A et possède une concentration de 2,15 mg/mL.

V.1.7 Purification d'Arc1 recombinant

La souche de bactérie (2) Rosetta 2 d'*E. coli* contenant le vecteur portant le gène codant Arc1 étiqueté 6-His en N-terminal estensemencée à J-1 dans du milieu LB contenant de l'ampicilline et incubée à 37 °C, puis le lendemain matin, la culture est diluée au 1/100^{ème} dans du LB contenant de l'ampicilline. 2 h plus tard, $A_{600\text{ nm}} = 0,6 - 0,9$. L'induction est faite dans cette fourchette d' $A_{600\text{ nm}}$ par l'ajout de 0,3 mM d'IPTG, et la culture est incubée durant 2 h à 30 °C. La récolte se fait par 5 min de centrifugation à 5000 *g*, puis le culot est congelé à -80 °C. Il est ensuite resuspendu dans 1/50^{ème} du volume initial dans un tampon de lyse contenant 50 mM Tris HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % glycerol (v/v), 5 mM β-Mercaptoéthanol, 20 mM Imidazole, 10 mM MgCl₂, inhibiteur de protéases, et lysé selon le programme de sonication suivant : 1 s on/1 s off, durant 1 min à 30 % d'amplitude, plusieurs fois selon le volume lysé. Après la lyse, le lysat est centrifugé durant 15 min à 10,000 *g* à 4 °C. Le surnageant est ensuite ajouté aux billes de matrice NiNTa (Qiagen) préalablement équilibrées par le tampon de lyse, puis incubé au moins 90 min en chambre froide sous agitation douce et constante. Le surnageant est ensuite éliminé, et les billes sont rincées par 20 volumes d'un tampon contenant 50 mM Tris HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM β-Mercaptoéthanol, 20 mM imidazole, 1 mM MgCl₂. Afin de procéder à l'élution, 1 volume de tampon d'élution 50 mM Tris HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % glycerol (v/v), 5 mM β-Mercaptoéthanol,

300 mM Imidazole, 10 mM MgCl₂ est ajouté, incubé à 4 °C durant 5 min avec les billes, puis récupéré. L'opération est effectuée au total 5 fois et permet d'obtenir 10 mg d'Arc1 par litre de culture.

V.2 Analyse de la qualité des protéines obtenues

V.2.1 Mesure des concentrations protéiques

La concentration des protéines purifiées est obtenue par la relation suivante: $C = A_{280\text{nm}} / E_{280\text{nm}} \times l$ où C est la concentration en mg.ml⁻¹, $E_{280\text{nm}}$ (ml/mg)⁻¹.cm⁻¹) le coefficient d'extinction spécifique à 280 nm et l la longueur du trajet optique en cm.

$E_{280\text{nm}}$ est lié à la masse molaire Mr par la relation $E_{280\text{nm}} = \epsilon_{280\text{nm}}/Mr$ où $\epsilon_{280\text{nm}}$ est le coefficient d'extinction molaire (M⁻¹.cm⁻¹).

Le spectrophotomètre utilisé possède également un programme permettant de calculer la concentration en protéine en fonction de la masse molaire de celle-ci et de son absorbance en solution à 0,1 % (p/v).

Les caractéristiques des différentes protéines que nous avons étudiées apparaissent dans le tableau suivant :

Protéine	Coefficient d'extinction molaire	Abs. 0,1 %	Masse moléculaire (kDa)
MetRS	124275	1,451	85,6
MetRSΔ142	115335	1,655	69,7
Arc1	27055	0,643	42
MBP	66350	1,430	46

Tableau 17. Caractéristiques des protéines purifiées. Abs. 0,1% : absorbance à 280 nm de la protéine en solution à 0,1 % (p/v).

V.2.2 Concentration et conservation des solutions de protéines et analyse de leur pureté

Concentration des solutions de protéines

En fin de purification, la protéine est concentrée par centrifugation sur Centricon d'une capacité de 10 mL et une excluant les protéines ayant une taille inférieure à 30 kDa (Amicon, Merck). Le Centricon est rechargé à plusieurs reprises jusqu'à épuisement de la solution à concentrer. Plusieurs cycles de centrifugation à 6000 g de 15 min chacun permettent de ramener la solution de protéines à environ 5 mg/mL.

Conservation des protéines

Pour des expériences biochimiques, la solution de protéines est stockée dans une solution contenant 50 % de glycérol (v/v) puis placée à -20 °C ou -80 °C.

V.2.3 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes et coloration au bleu de Coomassie

L'agent dénaturant est un détergent anionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS) qui altère la structure des protéines (Laemmli, 1970). Il dissocie l'oligomère en sous-unités par rupture des liaisons hydrophobes en interagissant par sa chaîne aliphatique avec les résidus hydrophobes de la chaîne polypeptidique, et les tapisse de charges négatives apportées par le groupe SO_3^- . Il masque la charge propre de la protéine, conférant aux polypeptides un rapport masse/charges négatives constant, puisque des mesures physiques ont montré la fixation d'1 molécule de SDS pour 2 aa. La dénaturation est complétée par l'action du β -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures à une concentration au moins égale à 0,1 M. Les chaînes polypeptidiques acquièrent ainsi la même conformation en ellipsoïde ou en bâtonnet et se déplacent sous l'effet du courant de la cathode vers l'anode dans le réseau des mailles du gel à une vitesse inversement proportionnelle à leur taille.

L'électrophorèse est effectuée dans un système discontinu caractérisé par la discontinuité du pH, de la nature des ions et de la concentration en acrylamide. Le gel comporte deux parties, la partie supérieure ou gel de concentration, composé de 4,5 % d'acrylamide et de 0,1 % de bisacrylamide, dans le tampon Tris-HCl 125 mM pH 6,8 et 0,1 % de SDS, et une partie inférieure ou gel de séparation, composé de 10 % d'acrylamide et de 0,3 % de bisacrylamide dans le tampon Tris-HCl 376 mM pH 8,8 et 0,1 % de SDS. Le tampon d'électrophorèse aux électrodes est constitué de tampon Tris-Glycine 25 mM pH 9,2 renfermant 0,1 % de SDS. La polymérisation est initiée par le persulfate d'ammonium à une concentration de 0,1 % (p/v) et catalysée par le TEMED (0,1 % (v/v)).

Le gel de séparation (environ 4 mL) est coulé entre 2 plaques de verre (Mini-PROTEAN III Electrophoresis Cell, Biorad) et recouvert de 500 μl de butanol saturé d'eau pour aplanir la surface. Après polymérisation (environ 20 min), le butanol est éliminé par adsorption par une bande de papier Whatman 3MM. Ce gel est surmonté du

gel de concentration dans lequel est inséré un peigne permettant de constituer des poches dans lesquelles seront déposés les échantillons.

Les protéines à faire migrer sont ajoutées à un tampon dénaturant renfermant 62 mM de Tris-HCl pH 6,8, 2 % (p/v) de SDS, 2 % (v/v) de β -mercaptoéthanol, 10 % (v/v) de glycérol et 0,0125 % (p/v) de bleu de bromophénol et incubées 5 min à 95 °C.

A la fin de l'électrophorèse, le gel est démoulé et dialysé sous agitation dans une solution d'acide acétique 10 % (v/v) pour éliminer le SDS. Les protéines sont ensuite révélées par coloration durant 30 min dans une solution de 1 g/l de bleu de Coomassie contenant 50 % (v/v) d'éthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique. L'excès de colorant est éliminé par lavage à 50 °C dans la solution de décoloration renfermant 10 % (v/v) d'acide acétique et 10 % (v/v) d'éthanol.

V.2.4 Immunodétection des protéines

De manière standard, 10 μ g de protéines d'un extrait brut ou 10 à 50 ng de protéine pure sont soumis à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en condition dénaturantes. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de PVDF au format mini, 7 x 8,5 cm (Biorad). La membrane est déposée sur le gel puis l'ensemble est entouré de part et d'autre de papier Whatman 3MM imbibé de tampon fourni avec la membrane (Biorad). Le transfert est effectué dans un appareil de transfert semi-sec (Biorad) durant 7 min sous une intensité de 1,3 A et une tension de 25 V. La membrane de PVDF est retirée, activée par 30 s d'incubation dans de l'éthanol absolu. La membrane est ensuite incubée pendant 30 min à température ambiante ou une nuit à 4 °C dans le tampon TBS-Tween 1X renfermant 5 % (p/v) de lait en poudre, rincée par trois lavages de 10 min dans le tampon TBS-T, puis incubée 2 h dans le tampon TBS-T 1X renfermant 5 % (p/v) de lait en poudre, dans lequel est dilué 1000 à 10000 fois le sérum contenant l'anticorps primaire. Après trois lavages avec le tampon TBS-T 1X, la membrane est incubée 1 h dans le tampon TBS-T 1X renfermant 5 % (p/v) de poudre de lait en présence d'anticorps secondaires de souris (dirigés contre les immunoglobulines de lapin et couplés à la peroxydase) dilués 2000 à 10000 fois. Après trois lavages au TBS-T 1X, le complexe ternaire protéine/anticorps primaire/anticorps secondaire est révélé par traitement de la membrane avec le kit de détection ECL (Biorad) durant 5 min suivi d'une autoradiographie ou d'une visualisation avec l'appareil ChemiDoc Biorad.

Anticorps I dirigé contre :	Dilution	Anticorps II dirigé contre :	Dilution
Nop1	1/2500	@Mouse	1/5000
Gfp	1/2500	@Mouse	1/5000
Arc1	1/2000	@Rabbit	1/4000
HA	1/5000	@Rabbit	1/10000
HA	1/5000	@Mouse	1/10000
Cmyc	1/5000	@Mouse	1/10000
Pgk1	1/10000	@Mouse	1/20000
Calmoduline Binding protein	1/2000	@Rabbit	1/4000

Tableau 18. Anticorps et dilutions utilisés lors des immunodétections.

V.3 Mesure de l'activité des protéines

V.3.1 Détermination de l'efficacité d'aminacylation (k_{cat}/K_M) des aaRS

Celles-ci sont réalisées à 30 °C dans un volume final de 50 μ L, dans un tampon contenant 100 mM Hepes-NaOH pH 7,4, 15 mM MgCl₂, 4 mM ATP, 50 μ M methionine, L-[³⁵S] Met (1500 cpm/pmol, Perkin Helmer), ainsi que des quantités appropriées d'ARNt. Les concentrations utilisées vont de 1 à 4 μ M pour la détermination du K_M , et sont de l'ordre de 10 K_M pour la détermination du k_{cat} . La MetRS purifiée (entière ou Δ 142) est ajoutée à une concentration finale de 4 nM au milieu réactionnel après pré-incubation de celui-ci à 30 °C durant 2 min. Aux temps 1 et 2 min, une aliquote de 20 μ L est déposé sur du papier whatman pré-traité (incubation dans 5 % de TCA et 1 mM de méthionine, puis séché), puis est plongé dans 5 % de TCA additionné de 1 mM de méthionine. Les papiers sont lavés deux fois avec ce même mélange puis deux fois avec de l'éthanol absolu. Ils sont ensuite séchés à température ambiante sur la nuit ou 45 min à 37 °C, puis placés dans des fioles contenant du liquide à scintillation (Ultima-gold, Perkin Elmer) afin de procéder au comptage dans le compteur à scintillation 1 min fenêtre S35 (LS6000SC, Beckman)

L'unité enzymatique (U) est la quantité d'enzyme qui catalyse la formation d'une nmole d'aa-ARNt par min à X °C dans les conditions réactionnelles standards sauf précisé autrement.

Le rapport k_{cat}/K_M est déterminé soit à partir des constantes individuelles K_M et k_{cat} si leur détermination est possible ou si le K_M est trop élevé pour être déterminé, dans

les conditions de réaction d'ordre 1 par rapport à l'ARNt. Lorsque la concentration de substrat est très inférieure au K_M , l'équation de vitesse s'écrit: $v = (k_{cat}/K_M) \times [E_0] \times [S_0]$ où $[E_0]$ est la concentration totale d'enzyme et $[S_0]$ la concentration initiale de substrat; la droite $v = f([S_0])$ qui passe par l'origine a pour pente $k_{cat} \times [E_0]/K_M$ qui permet de déterminer k_{cat}/K_M . Ces conditions de détermination du rapport k_{cat}/K_M ont été utilisées lorsque l'affinité de l'enzyme pour l'ARNt est trop faible ($K_M > 10 \mu M$) pour déterminer individuellement les constantes.

V.3.2 Traitement des données cinétiques

Toutes les cinétiques ont été déterminées en vitesse initiale, lorsque le produit s'accumule linéairement en fonction du temps et dans les conditions Michaéliennes (substrats en grand excès par rapport à l'enzyme). Les K_M ont été déterminés par la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk: $1/v = K_M/V_{max} \times 1/[S_0] + 1/V_{max}$ dont l'intersection avec l'axe des abscisses est égale à $-1/K_M$. Les K_M représentent la moyenne d'au moins 3 mesures. Les k_{cat} ont été déterminés indépendamment par des cinétiques effectuées en présence de concentrations saturantes de substrats (10 à 100 K_M). Dans ces conditions, la vitesse initiale (V_{max}) est égale à $k_{cat} \times [E_0]$. k_{cat} est déterminé en ramenant la valeur de la V_{max} à la quantité de moles d'aa-ARNt formés par seconde par mole de site actif d'enzyme.

VI Techniques de bioinformatique

VI.1 Identification d'un NLS putatif

La séquence peptidique à analyser est téléchargée sur le site de la SGD puis entrée sur le site http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS Mapper_form.cgi

VII Article de revue n°3 : Nonconventional localizations of cytosolic aminoacyl-tRNA synthetases in yeast and human cells

Nonconventional localizations of cytosolic aminoacyl-tRNA synthetases in yeast and human cells

Sylvain Debard^{a,*}, Gaétan Bader^{a,*}, Johan-Owen De Craene^a, Ludovic Enkler^b, Séverine Bär^a, Daphné Laporte^a, Evelyne Myslinski^a, Bruno Senger^a, Sylvie Friant^a and Hubert Dominique Becker^{a†}

^a Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, UMR 7156, CNRS, Université de Strasbourg, 4 allée Konrad Röntgen, 67084 Strasbourg Cedex, France

^b IBMC-CNRS, Evolution des ARN non codants chez la levure, Architecture et Réactivité de l'ARN, 15 rue René Descartes, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

* These authors contributed equally to this work

† Correspondence to: h.becker@unistra.fr (Hubert D. Becker)

Abstract

By definition, cytosolic aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) should be restricted to the cytosol of eukaryotic cells where they supply translating ribosomes with their aminoacyl-tRNA substrates. However, it has been shown that other translationally-active compartments like mitochondria and plastids can simultaneously contain the cytosolic aaRS and its corresponding organellar ortholog suggesting that both forms do not share the same organellar function. In addition, a fair number of cytosolic aaRSs have also been found in the nucleus of cells from several species. Hence, these supposedly cytosolic-restricted enzymes have instead the potential to be multi-localized. As expected, in all examples that were studied, when the cytosolic aaRS is imported inside an organelle that already contains the *bona fide* corresponding organellar-restricted aaRSs, the cytosolic form was proven to exert a nonconventional and essential function. Some of these essential functions include homeostasis and protection against various stresses. It thus becomes critical to assess meticulously the subcellular localization of each of these cytosolic aaRSs to unravel their additional roles. With this objective in mind, we provide here a review on what is currently known about cytosolic aaRSs multi-compartmentalization and we describe all commonly used protocols and procedures for identifying the compartment in which cytosolic aaRSs relocate in yeast and human cells.

Key words: aaRS, tRNA, yeast, human, microscopy, fractionation, MTS, NLS

Highlights :

- **Cytosolic aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) can relocate into organelles**
- **Bioinformatic predictions identify putative mitochondrial or nuclear localization sequences in cytosolic aaRS sequences**
- **Experimental approaches strongly support the multi-localization of cytosolic aaRSs**

1. Introduction

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) constitute a family of ubiquitous enzymes present in the three kingdoms of life and essentially known for transfer RNA (tRNA) aminoacylation. Indeed, they are required for the ligation of the 20 standard proteinogenic amino acids (aa) to their cognate tRNAs [1]. tRNA aminoacylation and protein synthesis occur in the cytosol of all organisms but unlike bacteria, eukaryotes have membrane-enclosed structures compartmentalizing their cytosol. Among these compartments, mitochondria in all eukaryotes and also chloroplasts in plants synthesize proteins by translating organellar mRNAs [2]. Hence, a compartmentalized set of the 20 aaRSs is expected in each translationally-active compartment. Since no gene encoding mitochondrial aaRSs was found in any of the mitochondrial DNA sequenced so far, the nuclear genome has to encode both full sets of cytosolic and organellar aaRSs. However, while this is true for the set of 20 cytosolic aaRSs, a full set of 20 additional separate genes encoding organellar aaRSs has never been found in any of the nuclear genomes sequenced so far [3–5]. Both sets of genes can usually be easily distinguished based on phylogenetic analyses. These studies show that a majority of the mitochondrial aaRSs are of bacterial descent but that the α -proteobacterial endosymbiotic origin of the mitochondrial aaRSs has largely been lost because of gene replacements, intranuclear gene duplications and divergence or horizontal gene transfers [6,7].

In plants, the evolution of the different aaRSs seems complicated. Monocot and dicot have either at least 1 gene encoding a given aaRS for each protein-synthesizing compartment or 2 genes with one gene encoding the cytosolic and the second both the mitochondrial and the chloroplastic aaRS [8]. Surprisingly, both have one instance where only one gene could encode all 3 activities: isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS) for monocot and glutaminyl-tRNA synthetase (GlnRS) for dicot [5,8,9]. The same is true for diatoms and brown algae in which a single gene could encode all 3 arginyl-tRNA synthetases (ArgRSs) [5]. In many instances, the coping mechanism is unknown or ill defined [10,11]. For the sake of brevity, from now on we will use the three letters code for each amino acid mentioned.

Mitochondrial aaRSs are also missing in metazoans and fungi and several coping mechanisms have been identified. Many of them are encoded by the same exact gene that encodes the cytosolic form, except that the mRNA that will be translated into the mitochondrial isoform contains additional 5'-extension for the mitochondrial targeting sequences (MTS). The synthesis of these 2 proteins from the same gene is achieved through different mechanisms: (i) alternative transcription start as shown for the yeast ValRS and HisRS mRNAs [12,13]; (ii) alternative translation initiation at two different AUG start codons within the same mRNA such as for the human GlyRS [14]; or (iii) alternative transcription start at a non-canonical start codon such as for the yeast AlaRS [15]. The complete list of cytosolic and organellar aaRSs generated from a single gene is presented in **Table 1**.

A very different mechanism has evolved to cope with the absence of the organellar GlnRS in all metazoans and fungi [41]. In all species studied so far, absence of the organellar GlnRS is compensated by a tRNA-dependent transamidation pathway that requires first glutamylation of mitochondrially-encoded tRNA^{Gln} (mttRNA^{Gln}) by a mitochondrial non-discriminating GluRS and subsequent transamidation of the charged glutamate into glutamine by a mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase (AdT) [9,28,42,43]. However, the two enzymes that sustain this pathway seem to have species-specific features. In human cells, it is the mitochondrial GluRS that charges both the mttRNA^{Glu} and the mttRNA^{Gln} [43], whereas in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* a pool of the cytosolic GluRS is imported into the mitochondria to carry out glutamylation of mttRNA^{Gln} [28]. Despite being belonging to the opisthokonta group, the metazoan and fungal trimeric mitochondrial AdTs differ by one subunit, the classical bacterial-like GatC subunit found in metazoan AdTs is replaced by a fungi-specific GatF subunit [44].

In yeast, the CysRS and ProRS are still unidentified, although for the latter the *AIM10* gene has been proposed to encode this activity. This prompted us to determine the mitoproteome by mass spectrometry on purified *S. cerevisiae* mitochondria (performed as described in section 5; **Fig. 1A**). Analysis of the mass spectrometry data showed that both cytosolic CysRS and ProRS are found in the mitoproteome, suggesting that the 2 missing mitochondrial aaRSs could be compensated by mitochondrial import of their cytosolic orthologs (**Fig. 1C**). In addition, depending on the sample injection time used prior to mass spectrometry, 6-8 additional other cytosolic aaRSs were found in the mitoproteome. Interestingly, each of these mitochondria-imported cytosolic aaRSs has a mitochondrial ortholog encoded by a separate gene. Nonetheless, the deletion of any of these genes encoding

the *bona fide* mitochondrial aaRS leads to a respiratory deficiency (SGD website source). This means that the cytosolic aaRS orthologs, imported into mitochondria, cannot compensate for the loss of the mitochondrial ones and thus suggests that they have other roles than cognate $_{\text{mt}}$ tRNA aminoacylation.

Relocalization of cytosolic aaRSs is not restricted to compartments in which their presence is required to supply protein synthesis with aa-tRNAs. Indeed, some cytosolic aaRSs have been localized in the nucleus both in human and *S. cerevisiae* (**Table 1**). These and other proteins of the translation machinery were first observed while analyzing the protein content of *Xenopus* oocytes and has since also been observed in mammalian and yeast cells [20,29,46–48]. Their proposed function in the nucleus is that by charging only the mature tRNAs, these aaRSs are in charge of a quality-control step of the tRNA maturation process prior to their export to the cytoplasm [46,47]. More recent reports show other functions for these nuclear pools of human and yeast aaRSs that do not require their tRNA-charging capacities. For example, under oxidative stress a portion of the human TyrRS relocates to the nucleus where it activates E2F1, a transcription factor that up-regulates the expression of DNA damage repair genes [26]. Likewise, a pool of the human MetRS relocates into the nucleoli of proliferating cells to regulate rRNA biogenesis [20]. In the yeast *S. cerevisiae*, a pool of MetRS relocates into the nucleus to regulate transcription of genes encoding subunits of respiratory complexes [29]. More broadly, a previous bioinformatics analysis identified 16 yeast cytosolic aaRSs as harboring a putative nuclear localization signal (NLS) suggesting that these enzymes could enter the nucleus to ensure additional functions other than translation [49]. However the MetRS, experimentally shown to relocate into the nucleus was not identified by this bioinformatics study. This highlights the limits of the bioinformatics prediction algorithms to identify targeting sequences, hence the difficulties to predict in which additional compartments these aaRSs could eventually relocate. However, the scientific community that studies these enzymes has come to the consensus that any cytosolic aaRSs could potentially be multi-localized.

Defining what we mean by multi-localized aaRSs is not an easy task given the variety of strategies that organisms use to relocate the same protein in several compartments. In this present review, we will define a multi-localized aaRS as a cytosolic aaRS that is found in at least 2 different compartments. This can be achieved by (i) relocalization of the cytosolic aaRS as is (organellar and cytosolic forms have the same exact sequence), (ii) having 1 aaRS gene transcribed into a single mRNA that will be translated into both the cytosolic and

organellar aaRSs by alternative translation start, or (iii) having 1 aaRS gene that will be transcribed into both a short (for the cytosolic isoform) and a long mRNA (for the organellar isoform) by alternative transcription start or alternative splicing.

The mechanisms regulating these multi-localizations have been mostly studied for aaRSs that belong to multi-synthetase complexes (MSCs) found in all eukaryotic species studied so far. They are composed of 2-9 cytosolic aaRSs interacting with 1-3 cytosolic anchors called aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins (AIMPs) [50–56]. It has been proposed and experimentally verified for some of the MSC-interacting cytosolic aaRSs that these MSCs are reservoirs for releasable aaRSs that can relocalize to other subcellular compartments to exert nonconventional functions [29,57,58].

In this review, we gather various methods and procedures that have been used to address the localization of individual cytosolic aaRSs (**Fig. 2**). Some are biochemical (organelle purification), genetic (isolation of mutations preventing mitochondrial import, not described in this review) and others are from cell biology (immunofluorescence on fixed cells or GFP-tagged proteins on living cells). The localization of each aaRS in various organisms together with the techniques that were used to localize them are described in **Table 1**. We also mention predictions about the presence of organellar import signals (MTS and NLS) that we found in yeast and human aaRSs. All the methods described in this review have their advantages and drawbacks, and the purpose of this review is to help researchers defining which techniques or procedures should be used to localize a given cytosolic aaRSs. We have focused mainly on techniques used on yeast and human cells although we mention work done on other organisms.

2 - Antibodies: a fundamental tool for aaRSs localization

To ascertain the hitherto unreported localization of pools of cytosolic aaRSs pool in a compartment can be done by various methods, but immunodetection will be almost inevitable. Apart from genetics and tagging one's favorite aaRS with a fluorescent protein, all techniques rely on the use of antibodies because of their high degree of specificity and sensitivity. The key step in confirming the localization of a cytosolic aaRS in a compartment with accuracy and reproducibility is to choose the specific antibodies against the marker protein of the compartment of interest. The number of antibodies currently available has expanded in the last years, however published articles often do not report critical parameters (such as the origin of antibodies, the immunogen used to raise the antibodies...), which sometimes

compromises the reproducibility of the results. Hence there is a push to require for at least, minimal reporting standards about the use of antibodies [59,60]. In **Table 2**, we provide an exhaustive list of proteins that were used as compartment markers for both immunofluorescence and Western blot, in studies that report the subcellular localization of an aaRS. More controls used for yeast cells can be found in the *Current Protocols in Cell Biology* paper by Rieder and Emr [61]. Immunodetection of aaRSs, like for any other protein, has so far been done on either native and unmodified aaRS or on tagged enzymes. **Table 3** lists the few antibodies that were raised against native aaRSs and that have been used to determine their subcellular localizations.

Since antibodies directed against native aaRSs can unpredictably cross-react with other proteins and be less sensitive than expected, most of the immunodetections of aaRSs were performed on tagged-proteins using anti-tag antibodies that usually are highly specific and sensitive. The biggest limit of this approach is that adding a tag at one extremity of the aaRS can potentially influence the intracellular localization of the chimeric enzyme [62]. **Table 4** lists all the tags that have been fused so far to specific aaRSs of different organisms, which extremity of the protein was tagged, which antibody and what approach were used to detect the tagged aaRSs.

3 - Prediction and analysis of aaRSs with organellar import signal

There are lots of bioinformatic predictors of protein localizations from among which we chose 3 to predict the presence of an MTS and 3 to predict NLSs [65]. We used these predictors regardless of the organismal origin of the aaRSs analyzed. Moreover, to gather as much information as possible we tried the “Euk-mPloc2.0” website (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) which predicts whether an aaRS might be localized to the mitochondria, the nucleus, the cytosol or extracellularly without predicting any targeting sequence of any kind [66].

3-1 – Mitochondrial targeting sequence prediction

MTS were predicted using TPpred2.0 (<http://tppred2.biocomp.unibo.it/tppred2>) [67], TargetP1.1 (<http://cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) [68,69] and MitoFates (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>) [70]. Query sequences should be given in the FASTA format, and depending on the MTS predictor, between 1 and 20 sequences can be analyzed at once. These predictors give back a mitochondrial probability score, the MTS sequence, the putative cleavage site that follows the MTS and the N-terminal peptide resulting

from the cleavage. Additionally, MitoFates gives the mitochondrial processing enzymes responsible for maturation of the imported proteins. (**Supp. Table 1a and 1b**). The MitoFates predictor was used for fungal, metazoan and plant proteins, while TargetP1.1 was used for non-plant organisms with no cut-off and with cleavage site prediction.

Submitting the yeast cytosolic aaRSs sequences to these predictors resulted in the HisRS having a strong probability of harbouring an MTS, the Cys-, Glu- and Val-RS a good probability and the Arg-, Leu- and Thr-RS only a low probability (**Table 5**). The predictions have been partially validated since the relocalization of cytosolic His-, Glu- and Val-RS has been experimentally described (**Table 1**). The good probability of CysRS of having an MTS suggests that it is the cytosolic CysRS that aminoacylates the mitochondrial-encoded tRNA^{Cys} since there is no gene encoding a mitochondrial CysRS.

For human aaRSs, only the mitochondrial LysRS and GlyRS are encoded by the same gene as the cytosolic form. Mitochondrial LysRS originates from alternative splicing [17], and the mitochondrial GlyRS *via* an alternative start site [14,16]. Analyzing the remaining human aaRSs by the predictors shows that only the CysRS might contain an MTS, however, this cytosolic aaRS has never been described to localize to mitochondria (**Table 5**).

3-2 – Nuclear localization signal prediction

To identify NLS, we used NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>) [71], SeqNLS (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>) [72], and NLS-Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) [73] predictors. For all predictors, we used default settings. We added a 60 amino-acids N- or C-terminal cut-off for the predictions by NLS-Mapper since it is the only one able to predict bipartite NLSs which are usually found in the 60 first or last amino acids of a sequence. We therefore only kept bipartite NLSs of aaRSs fitting this criteria. This program is better suited for prediction purposes since instead of a simple “nuclear or not nuclear” output, it ranks protein localization on a scale from exclusively nuclear (8-10), partially nuclear (7-8), dual-localized cytosol-nucleus (3-5) or exclusively cytosolic (1-2). **Supplemental Tables 1a and -1b** list the results obtained with these 3 predictors for human and yeast aaRSs.

Schimmel and Wang, in their first attempt at identifying NLSs in the 20 yeast cytosolic aaRSs using the program PSORT II, showed that Ala-, Gly-, Pro-, **Asn-**, **Asp-**, **Gln-**, **Glu-**, **His-**, **Ile-**, **Leu-**, **Lys-**, **Pheβ-**, **Ser-**, **Tyr-** and **Val-**RS harbor at least one SV40 T-antigen-like NLS

or bipartite NLS (aaRSs in bold type have been found both in our study and by Schimmel and Wang) [49, 74]. Using the aforementioned websites, we could classify the yeast aaRSs in three parts, those with a strongly probability of having an NLS (**Asn-**, **Asp-**, Cys-, **Gln-**, **Glu-**, **His-**, **Ile-**, **Leu-**, **Lys-**, **Phe β -**, **Ser-**, Trp- and **Tyr-RS**), those likely to have one (Ala-, Met-, Thr- and **Val-RS**) and those unlikely to have one (Arg-, Gly-, Phe α - and Pro-RS) (**Table 5**). We see a high overlap between the published results and our own suggesting the robustness of the methods used. It is noteworthy that the MetRS missing from the original list was predicted by NLS-Mapper and then by SeqNLS. Despite the fact that these bioinformatics studies highlight the presence of NLSs in many cytosolic aaRSs, only 2 have been experimentally confirmed: the MetRS [29] and the TyrRS (3 bioinformatically found NLSs and one confirmed [35]). This emphasizes the need to use different algorithms to identify NLSs and that they are not yet sufficiently accurate to not require experimental confirmation.

Similar NLS prediction analysis has been done on human cells (**Table 5**). Using the aforementioned websites, we could classify the human aaRSs in three groups, those with a strong probability of having an NLS (Cys-, **GluPro-**, **Leu-**, **Lys-**, Met-, **Phe β -**, **Ser-**, Thr- and **Val-RS**), those likely to have one (Ala-, Arg-, **Asn-**, **Asp-**, **Gln-**, Gly-, **Ile-**, Phe α -, Phe β , Trp- and **Tyr-RS**) and the ones unlikely to have an NLS (**HisRS**).

Despite forming the opisthokonta group, NLS predictions in yeast and human aaRS do not converge suggesting that most aaRSs imported into the nucleus fulfil different functions in these two organisms. Nonetheless both organisms have a pool of MetRS and TyrRS localized to the nucleus suggesting that they either share similar functions and could have been present in their common ancestor or different suggesting that the functions were acquire after the opisthokonta splitting (**Table 5**).

4-1 - Subcellular fractionation:

Subcellular fractionation can be divided into 3 different techniques according to the precision of the separation and the organelle that one wants to purify: crude membranes fractionation, nuclear purification and mitochondrial purification.

4-1-1 Crude membranes fractionation from yeast cells

This technique allows the separation of membranes from the cytosol (S100) and yields 2 separate membrane fractions (P13 and P100). To analyze the subcellular distribution of yeast

aaRSs we performed a subcellular fractionation adapted from the protocol published by Bonangelino and collaborators [75].

- Yeast cells are inoculated in the morning or the previous evening depending on the generation time in the appropriate medium (YPD or SC dropout) on a rotary shaker at 200 rpm at 30 °C.
- In the evening, the cells are diluted in 100 mL of the same medium to reach an OD_{600nm} of about 0.5 in the morning. 40 units of OD_{600nm} are transferred to a 50 mL Falcon tube. From here on out, all steps are performed on ice and centrifugations are performed at 4 °C.
- The cell suspension is centrifuged for 5 minutes at 5,250 × g in a centrifuge at 4 °C to pellet the cells. For cells grown on SC dropout medium, add 1 mL of YPD to facilitate the pelleting.
- Cells are washed twice in 20 mL of ice cold fractionation buffer (20 mM Hepes/KOH, pH 6.8, 50 mM Potassium acetate, 10 mM MgCl₂, 250 mM Sorbitol, 10 mM NaN₃).
- Cells are then resuspended in 800 μL of fractionation buffer (with protease inhibitor cocktail cOmplete ULTRA Tablets, EDTA-free from Roche™) and transferred into a 15 mL cold Corex®II centrifuge tube (ref. 1-8441-15) containing 650 μL of glass beads (acid washed 0.25-0.5 mm diameter beads).
- The tube is vortexed 6 times for 30 seconds at full speed to lyse cells.
- The lysat is transferred to a 1.5 mL microfuge tube and centrifuged at 4 °C for 5 minutes at 500 × g in a fixed angle rotor to clarify it.
- The S5 supernatant is carefully transferred to a fresh microfuge tube and centrifuged at 4 °C for 10 minutes at 13,000 × g in a fixed angle rotor.
- The pellet (P13), which mainly contains the plasma membrane, the endoplasmic reticulum, the nucleus, the vacuole and mitochondria, is kept on ice until the end of the experiment.
- The supernatant (S13) is transferred in a 1.5 mL ultracentrifugation microfuge tube (Beckman Coulter® ref. 357448) for further centrifugation at 4 °C for 1 hour at 100,000 × g in an ultracentrifuge using a fixed rotor.
- The supernatant (S100), which contains cytosol and vesicles, is carefully transferred to a fresh 1.5 mL microfuge tube. The pellet (P100) contains Golgi and endosomes.
- P13 and P100 are subsequently resuspended in the same volume as the S100 fraction.

4-2 Purification of nuclei and preparation of nuclear protein extracts

Purification of nuclei needs to be performed quickly to avoid passive diffusion of small proteins through nuclear pores. Moreover, the composition of buffers is critical for maintaining osmotic balance to prevent nuclear proteins from leaving the nucleoplasm fraction.

4-2-1 Purification of nuclei from yeast cells

This method is an adaptation from the original protocol of Stephanie E. Rieder and Scott D. Emr [76].

- Yeast cells from 2 L of culture in rich or synthetic medium, depending on auxotrophic markers or studied conditions, are harvested at 0.7 OD₆₀₀ and washed once with water to ensure that all traces of medium are eliminated.
- The wet pellet is weighed, it should approximately weight 7 g. Pellet was resuspended in 100 mM Tris H₂SO₄, 10 mM DTT in a volume of 2 mL/g of wet cells and incubated 20 minutes at 30 °C with gentle agitation. The purpose of this step is to weaken the membrane.
- The mixture is centrifuged 4 minutes at 3,500 × g and the pellet is washed with 1.1 M sorbitol to keep osmotic pressure, 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.4 using 7 mL of buffer per g of cells and resuspended with the same buffer.
- Zymolase 20T is added to the mixture (5 mg/g of pellet) and incubated during 45 minutes at 30 °C with gentle agitation (80 rpm), to digest the cell wall.

All following steps are performed at 4 °C, to remain proteins intact.

- Approximately 3.5 g of wet cells should be settled by falcon 50 (= Two falcon 50 for 2 L of culture at 0.7 of OD_{600nm}). Consequently, all the following steps are applicable to 1 falcon 50.
- The cells removed from their wall, called spheroplasts, are centrifuged 4 minutes at 3,500 × g, gently washed with 1.1 M sorbitol, 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.4 to remove zymolase and centrifuged again.
- The pellet is resuspended in 20 mL 1.1 M sorbitol, 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.4 and loaded on a 6 mL cushion containing 30 mM sorbitol, 5 % (v/v) ficoll 400, with protease inhibitors. The spheroplasts are centrifuged 10 minutes at 4,000 × g.
- The pellet is resuspended into 15 mL ficoll 20 % (v/v), 20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.4, 1 mM MgCl₂, protease inhibitors, and the spheroplasts are broken by osmotic shock in potter by 20 strokes, in a limited time of 5 minutes maximum. The ficoll

keeps the osmotic pressure between the medium and the nuclei, to avoid nuclear protein to escape from the nucleus.

- The lysate is chilled 10 minutes on ice to let nuclei cool down and subsequently centrifuged 5 minutes at $13,000 \times g$.
- The supernatant is centrifuged again 10 minutes at $13,000 \times g$. At this step, nuclei cannot pellet because of the viscosity of the buffer.
- The supernatant is collected and loaded on a ficoll gradient containing 20 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$, protease inhibitors and ficoll 50 % (v/v), ficoll 40 % (v/v), ficoll 30 % (v/v), 6.5 g each in 25×89 -mm ultracentrifuge tube (Beckman Coulter®, Ultra Clear Tubes, 38.5 mL, ref. 344058). Then, the gradient is ultracentrifuged 1 hour at $58,000 \times g$ (Beckman, SW28 rotor, 18,000 rpm).
- After the centrifugation, the 20 % layer containing all the cellular debris was removed. The 40% layer and the interface 40-50 % containing the nuclei are harvested. Nuclei are also present in the interface 30-40 %, but not harvested because of contaminants.
- To remove ficoll, the samples are diluted 10 times in 20 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.4, 1 mM $MgCl_2$ and centrifuged 10 minutes at $10,000 \times g$ to pellet the nuclei. Since the ficoll is diluted, the nuclei are able to pellet from $3,000 \times g$.
- Nuclei are finally resuspended in 500 μ L of buffer containing 100 mM Tris HCl pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM benzamidine, protease inhibitors, and sonicated for 80 seconds (1 sec on/1 sec off, 30 % amplitude) in order to break the nuclei.
- After a chilling step on ice to avoid foaming, nuclei are re-sonicated for 30 seconds (1 sec on/1 sec off, 30 % amplitude).
- The nuclear extracts are ultra-centrifuged 30 minutes at $100,000 \times g$ to pellet nuclear membranes. The supernatant contains soluble nuclear proteins.

4-2-2 Purification of nuclei from human cells

This protocol is adapted from Jason M. Dahlman and Denis C. Guttridge [77]. Perform all steps at room temperature unless otherwise specified. Volumes are determined for a preparation of 10 samples. All centrifugation was performed in a bench top microfuge. A minimum of 1×10^6 cultured cells are used for this protocol.

- Cell culture media is removed from the plates.
- Cells are gently washed twice with 1 mL of non-sterile PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM).

- Cells are removed from the polystyrene tissue culture dish by adding 1 mL of non-sterile PBS and the cells are scraped gently with a sterile cell scraper.
- Scraped cells (1 mL) are removed with 1 mL pipette and placed in a 1.5 mL microcentrifuge tube.
- Cells are centrifuged at $250 \times g$ for 5 minutes at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- After centrifugation, supernatants are removed and 5 pellet volumes of cytoplasmic extraction buffer (CEB: 10 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 60 mM KCl, 1mM EDTA, 0.25 % (v/v) NP-40, Complete protease inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche)) are added to each sample.
- Cellular pellets are dissolved by flicking the tubes. Try to minimize the amount of bubbles you generate while flicking. You may want to add buffer from cytoplasmic extraction buffer to your samples first and let them stand on ice for 1–3 minutes before resuspending. Make sure cellular pellets are completely dissolved.
- Resuspended pellets are incubated on ice for 5 minutes and then, centrifuged at $650 \times g$ for 4 minutes at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- After centrifugation, supernatants, containing the cytoplasmic proteins, are carefully transferred to new 1.5 mL microcentrifuge tubes. While removing the supernatant, take special care not to disrupt the nuclear pellet, which now should take on an opaque appearance. The cytoplasmic extract can be either disposed of or stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 100 μL of cytoplasmic wash buffer (CWB: 10 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 60 mM KCl, 1mM EDTA, Complete protease inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche)) is added to the nuclear pellets to remove the excess of NP-40. The 1.5 mL microcentrifuge tubes are gently tapped to dislodge the nuclear pellets. There is no need to resuspend the pellets.
- Centrifugation is repeated again at $650 \times g$ for 4 minutes at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Supernatants are carefully discarded, once again taking care not to disturb the nuclear pellets.
- 1 pellet volume of Nuclear Extraction Buffer (NEB: 20 mM Tris HCl pH 8.0, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 25 % (v/v) glycerol, Complete protease inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche)) is added to the 1.5 mL microcentrifuge tubes containing the nuclear pellets and they are resuspended by flicking the tubes until they are completely resuspended. Try to minimize the amount of bubbles you generate while flicking.

- The resuspended nuclear pellets are incubated on ice for 10 minutes and mixed by flicking every 2 minutes.
- After the 10 minutes incubation, the resuspended nuclear pellets are centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 minutes at 4 °C.
- After centrifugation, supernatants, containing the nuclear proteins, are transferred to new pre-chilled 1.5 mL micro centrifuge tubes
- Nuclear extracts are stored at -80 °C.

4-3 Purification of mitochondria and preparation of mitochondrial protein extracts

4-3-1 Purification of mitochondria from yeast cells

To analyze the mitochondrial localization of aaRSs, we perform a mitochondria purification adapted from the protocol published by Meisinger and collaborators [45].

- All steps are performed at 4 °C unless otherwise specified. To get enough mitochondria it is recommended to use at least 2-3 L of yeast cells grown to log-phase.
- Yeast cells are pelleted by centrifugation at $3,000 \times g$ for 5 minutes and resuspended in distilled water.
- Cells are pelleted again as above, the wet weight is measured and the pellet is resuspended at a concentration of 2 mL/g of pellet in prewarmed at 30 °C DTT Buffer (100 mM Tris- H_2SO_4 , pH 9.4, 10 mM dithiothreitol (DTT) added extemporaneously).
- After 20 minutes incubation in a 30 °C shaker at 80 rpm, cells are washed with Zymolyase buffer (1.2 M sorbitol, 20 mM potassium phosphate, pH 7.4) and resuspended at a concentration of 7 mL/g of cells in Zymolyase buffer containing 3 mg Zymolyase 20T (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan) per gram wet weight.
- After incubation for 45 minutes in 30 °C shaker at 80 rpm, cells are washed with fresh Zymolyase buffer and resuspended in ice-cold Homogenization buffer (0.6 M sorbitol, 10 mM Tris HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2 % (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany and extemporaneously 1 mM PMSF from a freshly prepared 100 mM stock in ethanol) at a concentration of 6.5 mL/ g wet weight.
- From now on, it is very important to maintain the lysed material, buffers and rotors at ice cold to prevent proteolysis.
- Samples are poured in a glass Teflon homogenizer and spheroplasts are homogenized with 15 strokes.
- Samples are then 2-fold diluted with ice-cold Homogenization buffer and the lysate is cleared by centrifugation at $1,500 \times g$ for 5 minutes to remove cell debris and nuclei.

- The supernatant is centrifuged at $4,000 \times g$ for 5 minutes, the pellet is discarded and the supernatant is centrifuged again at $12,000 \times g$ for 15 minutes to isolate the mitochondrial fraction.
- The supernatant is discarded and the mitochondrial pellet is resuspended in 0.5 to 1 mL of SEM buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS-KOH, pH 7.2) and the protein concentration is measured using Bradford method and adjusted to 5 mg/mL.

In order to obtain highly purified mitochondria, firstly prepare sucrose step gradients in Beckman centrifuge tubes (Beckman Coulter®, Ultra Clear Tubes, 13.2 mL, ref. 344059):

- 1.5 mL 60 % (w/v) sucrose diluted in EM buffer (1 mM EDTA, 10 mM MOPS-KOH, pH 7.2) is loaded onto the bottom of the centrifuge tube.
- Without disturbing the phases, 4 mL 32 % (w/v), 1.5 mL 23 % (w/v), and 1.5 mL 15 % (w/v) sucrose/EM are carefully pipetted stepwise and the tubes are kept in the fridge.
- Samples are homogenized again in a glass Teflon homogenizer (10-15 strokes) and poured (0.2 to 1 mL) to the sucrose gradient.
- The supernatant is then centrifuged (Beckman, SW41 Ti rotor) at $134,000 \times g$ for 1 hour at 4 °C and the highly purified mitochondria are collected with a Pasteur pipette from the 60-32 % sucrose interface.
- Mitochondrial samples are diluted 2-fold in SEM buffer and centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 minutes. Repeat this step to wash mitochondrial proteins.
- Pellet can be frozen at -80 °C.
- For further study, the mitochondrial pellet is finally resuspended in SEM buffer and the concentration is adjusted as required.

4-3-2 Purification of mitochondrial from human cells

This protocol is adapted from Jason M. Dahlman and Denis C. Guttridge [77]. This protocol is set to extract mitochondria from HeLa cells. Volumes are calculated for 5 flasks of 58 cm². Every steps are performed on ice or at 4 °C.

- Cell culture growth media from desired cells is removed.
- Cells are gently washed twice with 5 mL of non-sterile PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM).
- Cells are removed from the polystyrene tissue culture dish by adding 1 mL of non-sterile PBS and the cells are scraped gently with a sterile cell scraper.

- Cells are centrifuged for 5 minutes at $250 \times g$ at room temperature
- The pellet is resuspended in 1 mL of BSA buffer (0.6 M sorbitol, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 300 mM NaCl, Complete protease inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche) and 0.3 % (v/v) of BSA (1 mg/mL)).
- Cells are then mechanically broken on ice by repeated (at least 80 times) aspiration/backflow using a 1 mL syringe with a G23 needle.
- The lysate is centrifuged twice at $1,200 \times g$ for 6 minutes at 4 °C.
- The supernatant is then centrifuged at $16,000 \times g$ for 40 minutes at 4 °C.
- Pellet (corresponding to mitochondria) is resuspended in 300 μ L of Mito buffer (0.6 M sorbitol, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 300 mM NaCl, Complete protease inhibitor cocktail, EDTA-free (Roche)).
- For mitoplast preparation, 50 μ g of digitonin (1 mg/mL) is added to mitochondria and incubated 15 minutes at room temperature.
- 1 mL of Mito buffer is added and the mixture is centrifuged 20 minutes at $16,000 \times g$ at 4 °C.
- The final pellet is resuspended in 50 μ L of Mito buffer and stored at -80 °C.

5 - Mass spectrometry analysis and identification of cytosolic aaRSs in yeast mitochondrial extracts

We performed yeast mitochondria purification as explained in the section 4-3-1 and recovered pure mitochondria at the 32-60 % interphase from a cushions gradient (**Fig. 1A**). In order to identify mitochondrial proteins, mitochondria were disrupted and soluble proteins were subjected to mass spectrometry (see protocol below). For analysis, we carried out 3 different injections, two of 90 minutes (one regular and one using restricted mass ranges of 400-800 m/z and 800-1250 m/z, termed Frac.) and one of 120 minutes. These features allowed us to identify 905 (90 min.), 982 (90 min. Frac.) and 926 (120. min) mitochondrial proteins (**Fig. 1B**). We describe here the detailed procedure for protein digestion and mass spectrometry analysis as well as data analysis.

5-1-1 Protein digestion solution

- Proteins from mitochondrial extracts are resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate.
- After a reduction-alkylation step (5 mM DTT and 10 mM Iodoacetamide), proteins are digested overnight with 100 ng of sequencing-grade trypsin (Promega).

- After centrifugation at $12,000 \times g$, the supernatants are collected in glass inserts and vacuum dried.

5-1-2 Nano-liquid Chromatography – electrospray Ionization TripleTOF MS/MS Analysis

- Before injection, dried peptides are resuspended in 15 μ L of 0.1 % (v/v) formic acid. One third of each sample was injected on a NanoLC-2DPlus system (nanoFlexChIP module; Eksigent, ABSciex, Concord, Ontario, Canada) coupled to a TripleTOF 5600 mass spectrometer (ABSciex) operating in positive mode.
- Peptides are loaded with a trap and elute configuration on C18 reverse-phase columns (ChIP C-18 precolumn 300 μ m ID \times 5 mm ChromXP and ChIP C-18 analytical column 75 μ m ID \times 15 cm ChromXP; Eksigent).
- Peptides are eluted by using a 5-40 % gradient of 0.1 % (v/v) formic acid in acetonitrile for 90 or 120 minutes at a 300 nL/minute flow rate. The TripleTOF 5600 was operated in high-sensitivity data-dependant acquisition mode with Analyst software (v1.6, ABSciex) on a 400-1250 m/z range.
- To extend the sensitivity, two new injections are carried out using restricted mass ranges, 400-800 m/z and 800-1250 m/z. An external calibration is performed before each sample by monitoring 10 peptides of a beta-galactosidase trypsin digest. A discovery “Top20” method is used: up to 20 of the most intense multiply-charged ions (2+ to 5+) are selected for CID fragmentation, with a cycle time of 3.3 seconds.

5-1-3 Database Search and Data Analysis

Raw data are first converted to Mascot Generic File format (.mgf) and searched against the yeast *S. cerevisiae* database supplemented by a decoy database (reverse sequences). The database search algorithm used is Mascot (version 2.2, Matrix Science, London, UK) through the ProteinScape 3.1 package (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany). Peptide modifications allowed during the search are: N-acetyl (protein), carbamidomethylation(C) and oxidation (M). Mass tolerances in MS and MS/MS is set to 20 ppm and 0.5 Da, respectively. Two trypsin missed cleavages sites is allowed. Peptide identifications obtained from Mascot is validated with a protein FDR < 1%, using the Protein Assessment tool from ProteinScape. Identified proteins are assessed by spectral count.

The aaRSs identified in the mitochondrial extract analysed by three different injections methods are presented in **Fig. 1C and Supp. Table 2**. Excepting the Arg-, Met- and Thr-RS

(note that there are no genes encoding the mitochondrial CysRS and GlnRS in yeast), we found all the mitochondrial aaRSs in our assay. The absence of these three mitochondrial aaRSs could be due to a strong binding to the mitochondrial membrane that resulted in their loss during the protein extract preparation. Indeed, it has previously been shown that a functional aaRS could be membrane-anchored [78]. In addition to the mitochondrial aaRSs, we identified 10 cytosolic ones (Asp-, Glu-, Ile-, Leu-, Lys-, Phe-, Pro, Ser-, Thr- and Tyr-RS) of which only the cytosolic GluRS has been shown experimentally to be dual-localized [28,29]. Since there is no gene identified for the yeast mitochondrial CysRS, we assume that the cytosolic form would also be mitochondrial; and we, indeed, found it in the mitochondrial fraction we analyzed. It is now important to confirm the mitochondrial localization of these cytosolic aaRSs and then determine their function in this other compartment.

6 - Microscopic analysis and single cell localization

Unlike subcellular fractionation, microscopic analysis allows the study of aaRSs localization at the single cell scale. For more precision, a confocal microscope is needed to set only one focal plan and prevent accumulation of cytosolic fluorescence around the organelle. If the aaRS is fused to GFP, analysis can be performed directly on living cells, and aaRSs used with a GFP-tag are listed in **Table 4**. To control the aaRS localization on living cells, the need of compartment markers is essential, like DAPI and Mitotracker for nuclear and mitochondrial compartment, respectively. For yeast cells, some additional fluorescent dyes can also be used for fluorescent microscopy on living cells, as CellTracker Blue CMAC (ThermoFischer Scientific, ref. C2110) that is specific for vacuolar lumen (DAPI filter), or FM4-64 (ThermoFischer Scientific, ref. T3166) used in time lapse experiments to stain the plasma membrane, the endosomes and the vacuolar membrane (RFP filter) [79]. For more precision, protein markers can be targeted by specific antibodies: frequently used markers for mammalian intracellular compartments are listed in **Table 6**. As GFP can possibly perturb the aaRS localization due to its large size, smaller tags (listed in **Table 4**) have been used for immunofluorescence (IF) study. For IF, a fixation step is essential to allow antibodies penetration in the sample. Next sections present immunofluorescence protocols for both yeast and human cells.

6-1 Immunofluorescence on yeast cells

This technique allows the observation by fluorescent microscopy of the aaRSs of interest on fixed yeast cells.

6-1-1 Fixation steps

- Cells are grown overnight in 20 mL of either complete or synthetic medium (YPD or SC dropout medium) to about 1×10^7 cells/mL ($OD_{600nm} = 0.4-0.6$); 10 mL culture gives 6 samples.
- 1.25 mL of 1M KPO_4 , pH 6.5 and 1.25 mL of 37 % (v/v) formaldehyde are added to 10 mL of overnight culture (10×10^7 cells) and incubated for 2 hours at room temperature with gentle shaking every 30 minutes.
- Cells are centrifuged for 5 minutes at $3,000 \times g$, washed 3 times with 10 mL SP buffer (1.2 M sorbitol, 0.1 M KPO_4 , pH 6.5) and resuspended in 1 mL SP/ME (SP, 20 mM β -mercaptoethanol).
- 10 μ L Zymolyase 20T (5 mg/mL) is added and the mixture is incubated 45 minutes at 30 °C (gentle shaking every 10 min); the amount of Zymolyase needed depends on the strain.
- Cells are centrifuged for 5 minutes at $2,000 \times g$, wash 3 times with 3 mL SP buffer and resuspended in 0.1 mL SP; after the digestion of the cell wall, the resuspension have to be very gentle to avoid lysis.
- Cells are stored at 4 °C (can be kept for 1-2 weeks).

6-1-2 Incubation with antibodies

This is done on a slide for immunofluorescence (HTC or epoxy, single use slides, diameter 6 mm) at room temperature.

- Slides are washed with ethanol 96 % (v/v).
- 20 μ L of poly-Lysine (0.1 % (w/v) in H_2O) is added to each well and incubated for 1 minute.
- The liquid is removed, slides are dried and washed 3 times with 20 μ L H_2O ; All wash steps are done by adding one drop (with Pasteur pipette) and removing with vacuum without touching the slide.
- Slides are placed in a humid chamber (petri dish with H_2O soaked paper), 15 μ L of fixed yeast cells are added to each well and incubated for 30 minutes,
- The excess of liquid is removed very gently and slides are washed twice with PBS 1 \times (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM).
- Slides are then incubated for 5 minutes with 15 μ L of PBT (PBS 1 \times , Triton X-100 0.1% (v/v), NaN_3 0.1 % (w/v), BSA 1% (w/v)).

- After removing the excess of liquid, Slides are incubated for 30 minutes at room temperature with 15 μ L of primary antibody diluted in PBT.
- Slides are washed 10 times with PBT, followed by the incubation for 30 minutes in the dark and at room temperature with 15 μ L of secondary antibodies (either Cy-conjugated or Alexa Fluor® (ThermoFischer Scientific) conjugated) diluted in PBT .
- Slides are washed 10 times with PBS.
- Optional: Nucleus can be stained with 15 μ L of DAPI (10 μ g/mL) and incubated 5 minutes in the dark. 5 washes with PBS are needed to remove the background.
- Finally, 3 μ L of Vectashield® (Vector laboratories) are added and slides are covered with coverslip; fix coverslip on all ends with nail polish.
- Slides can be stored at 4 °C in the dark (can be kept for months) or directly observed by fluorescent microscopy.

6-2 Immunofluorescence on human cells

This technique allows observing the subcellular localization of the aaRSs of interest in fixed mammalian cells on a single cell scale with a fluorescence microscope.

- Cells are grown in complete medium, mostly DMEM (D5796 Sigma) or MEM (M2279 Sigma), supplemented with 10 % (v/v) Fetal Calf Serum (FCS).
- On day one of the experiment, the medium of the culture flask is removed, cells are washed with PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM) and detached using trypsin (T4049 Sigma).
- Cells are then spotted on 10-well spotslides (Marienfeld Superior, #1216650) to a 70 % confluency (for most cell types 4,000-5,000 cells per spot) and let to attach and grown overnight in a cell culture incubator at 37 °C, 5 % CO₂.
- After removing the medium, cells are fixed by adding 50 μ L of 4 % (v/v) formaldehyde (F8775 Sigma) in PBS to the spots and incubating for 20 minutes at room temperature.
- If Mitotracker (Thermofisher Scientific, M7512) is used to detect mitochondria, Mitotracker staining has to be done on live cells prior to fixation. Therefore, cells are incubated for 15-45 minutes at 37 °C with Mitotracker diluted in pre-warmed medium (37 °C) to a concentration of 100-500 nM. Cells are then washed once in medium and once in PBS and fixed as described above.
- Cells are then washed once with PBS and permeabilized with 0.2 % (v/v) Triton-X 100 (X100 Sigma-Aldrich) in PBS for 10 minutes at room temperature.

- After one more washing with PBS, unspecific sites are blocked by incubation with 20 % (v/v) FCS in PBS for one hour at RT.
- Cells are then incubated with the antibodies raised against the aaRSs of interest and marker proteins of the different subcellular compartments in PBS-2 % (v/v) FCS for two hours at room temperature or overnight at 4 °C.
- After washing five times with PBS, the fluorophore conjugated secondary antibodies diluted in PBS-2 % (v/v) FCS are added for one hour at room temperature. DAPI can be added to the secondary antibody solution at a concentration of 300 nM.
- Finally, after two final washes in PBS, a drop of pre-warmed (50 °C) elvanol (Poly(vinyl alcohol) - 341584 Aldrich) is added to each spot and the slide sealed with a coverslip. Proteins are detected using a confocal laser scanning microscope and colocalization observed and quantified with the ImageJ software.

7 - Concluding remarks

Localizing multi-compartmental aaRSs cannot be done using a one-for-all technique. For example, using fluorescence microscopy to simultaneously visualize in a single cell, the organellar and cytosolic fractions of the same aaRS (or protein in general) is complicated since the fluorescence of the organellar pool will be masked by the fluorescence of the cytosolic portion which is usually more abundant. So far no tools have been developed to overcome this difficulty and the use of confocal microscopy is usually not sufficient when one wants to ascertain the localization of a minor organellar pool of a cytosolic aaRS. Moreover, like for any other protein putatively organellar, it is currently very difficult to distinguish between a luminal localization of an aaRS and a peripheral localization of the protein on the cytosolic side of the organelle. Being able to make these distinctions is extremely important to be able to study the nonconventional roles of these multi-localized aaRSs and identify the cellular processes to which the organellar pools of these cytosolic aaRSs participate. Also, the possibility that several cytosolic aaRSs could be peripherally associated to membrane compartments other than the mitochondria and the nucleus by interacting either with membrane proteins or directly to lipids has been overlooked so far. For all these reasons, one still has to turn to the isolation of membranes and afterwards to organelle purification to be able to ascertain the relocation inside a given compartment of a fraction of a cytosolic aaRS (summarized in **Table 1**).

Another difficulty to overcome when working with dual-localized aaRSs is that the cytosolic pool of these proteins is always essential for viability, rendering the study of the functions of the organellar pools of the same aaRS very difficult. In this respect, yeast is a very convenient model especially when one wants to analyze the mitochondrial activity of a cytosolic aaRSs. Since these organelles are only essential for the respiratory metabolism and not when yeast is fermenting, mutations of the cytosolic aaRS gene that lead to only a respiratory deficiency (fermentative growth is unaffected) are targeting residues essential for the mitochondrial activity of the dual-localized aaRS without affecting its cytosolic role. This simple phenotypic screen was successfully used to identify the cryptic and nonconventional MTS of yeast cytosolic GluRS which participates to the mitochondrial transamidation pathway upon mitochondrial import [28]. It was also used to show that mitochondrial forms of His-, Val- and GlyRSs are generated through an alternative translational start [13,31,32].

If confirming that a pool of a cytosolic aaRS can relocate inside an organelle is difficult with the current technologies, identifying the import signals to study the dynamics of these proteins is even more arduous. Import signal predictors still have a low consensual predictive accuracy for these dual-localized aaRSs, mainly because they often contain nonconventional import signals. Identifying the organellar roles of dual-localized aaRSs will necessitate the reinterpretation of previous yeast mutant screens as well as establishing new mutant screens. In humans, the systematic sequencing of genes encoding cytosolic aaRSs of patients with mitochondrial-related diseases and in depth analysis of the localization, protein interactants and activity of the mutant aaRS is essential for identifying the organellar functions of dual-localized aaRSs. By doing so, it was recently shown that the mutation in the cytosolic GlyRS gene that causes type 2D Charcot-Marie-Tooth disease changes the protein binding activity of GlyRS that interferes with a signaling pathway essential for motor neuron survival [80].

These findings also raise many questions, the most important being how cells regulate the distribution of multi-compartmental cytosolic aaRS between the cytosol and the different organelles. One mechanism by which cells manage the subcellular distribution of the various pools of a cytosolic aaRS is by forming the MSCs and triggering release of each cytosolically-anchored aaRS by posttranslational modification of the aaRS. Since at maximum, only 9 cytosolic aaRSs were found participating to MSCs, there are probably others posttranslational modifications, or other mechanisms that participate in regulating the dynamic compartmentalization of the remaining 11 potentially multi-localized aaRSs. Another important issue concerning the dynamical relocation of these aaRSs is whether a portion

of an existing pool is redistributed or a fraction of the neosynthesized proteins will specifically be deviated on demand towards the organelle? Finally, while in this review we focused on the relocalization of cytosolic aaRSs within the cell, it has to be noted that several human aaRSs can be secreted in the extracellular medium where they also accomplish nonconventional functions [81,82].

Acknowledgements:

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.D.B, J-O. D. C), the University of Strasbourg (H.D.B, E.M-C), the CNRS (B.S, S.F), the INSERM (S.B), the Minsitère de l'Education Nationale, de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (G.B, S.D), the Association pour la Recherche sur le Cancer (D.L) and the ANR [ANR-10-LABX-0036_NETRNA] (L.E).

References:

- [1] M. Ibba, D. Söll, Aminoacyl-tRNA Synthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 617–650
- [2] D.R. Smith, P.J. Keeling, Mitochondrial and plastid genome architecture: Reoccurring themes, but significant differences at the extremes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 10177–10184
- [3] M. Sissler, J. Pütz, F. Fasiolo, C. Florentz, Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases, *Madame Curie Biosci. Database* [Internet]. Austin Landes Biosci. (2000-2013)
- [4] D. Diodato, D. Ghezzi, V. Tiranti, The Mitochondrial Aminoacyl tRNA Synthetases: Genes and Syndromes., *Int. J. Cell Biol.* 2014 (2014) 787956.
- [5] J.L. Huot, L. Enkler, C. Megel, L. Karim, D. Laporte, H.D. Becker, A.-M. Duchêne, M. Sissler, L. Maréchal-Drouard, Idiosyncrasies in decoding mitochondrial genomes, *Biochimie.* 100 (2014) 95–106
- [6] J.R. Brown, D. Gentry, J.A. Becker, K. Ingraham, D.J. Holmes, M.J. Stanhope, Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and Gram-positive pathogens, *EMBO Rep.* 4 (2003) 692–698
- [7] B. Brindefalk, J. Viklund, D. Larsson, M. Thollesson, S.G.E. Andersson, Origin and evolution of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases., *Mol. Biol. Evol.* 24 (2007) 743–756
- [8] A.-M. Duchêne, A. Giritch, B. Hoffmann, V. Cognat, D. Lancelin, 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
- [9] C. Pujol, M. Bailly, D. Kern, L. Marechal-Drouard, H. Becker, A.-M. Duchene, Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNA^{Gln} synthesis in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 6481–6485
- [10] 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
- [11] G.H. Gile, D. Moog, C.H. Slamovits, U.-G. Maier, J.M. Archibald, Dual Organellar Targeting of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Diatoms and Cryptophytes., *Genome*

- Biol. Evol. 7 (2015) 1728–1742
- [12] 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
- [13] B. Chatton, P. Walter, J.P. Ebel, F. Lacroute, F. Fasiolo, The yeast VAS1 gene encodes both mitochondrial and cytoplasmic valyl-tRNA synthetases., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 52–57
- [14] J. Alexandrova, C. Paulus, J. Rudinger-Thirion, F. Jossinet, M. Frugier, Elaborate uORF/IRES features control expression and localization of human glycyl-tRNA synthetase, *RNA Biol.* 6286 (2015) 1301–1313.
- [15] 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
- [16] C.-I. Chien, Y.-W. Chen, Y.-H. Wu, C.-Y. Chang, T.-L. Wang, C.-C. Wang, Functional substitution of a eukaryotic glycyl-tRNA synthetase with an evolutionarily unrelated bacterial cognate enzyme., *PLoS One*. 9 (2014) e94659.
- [17] 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 alternative splicing of the primary transcript., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35063–35069
- [18] Y. Ofir-Birin, P. Fang, S.P. Bennett, H.-M. Zhang, J. Wang, I. Rachmin, R. Shapiro, J. Song, A. Dagan, J. Pozo, S. Kim, A.G. Marshall, P. Schimmel, X.-L. Yang, H. Nechushtan, E. Razin, M. Guo, Structural Switch of Lysyl-tRNA Synthetase between Translation and Transcription, *Mol. Cell*. 49 (2013) 30–42
- [19] N. Gunasekera, S.W. Lee, S. Kim, K. Musier-Forsyth, E. Arriaga, Nuclear localization of aminoacyl-tRNA synthetases using single-cell capillary electrophoresis laser-induced fluorescence analysis., *Anal. Chem.* 76 (2004) 4741–4746
- [20] Y.G. Ko, Y.S. Kang, E.K. Kim, S.G. Park, S. Kim, Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis., *J. Cell Biol.* 149 (2000) 567–574
- [21] M. Mirande, D. Le Corre, D. Louvard, H. Reggio, J.-P. Pailliez, J.-P. Waller, Association of an aminoacyl-tRNA synthetase complex and of phenylalanyl-tRNA synthetase with the cytoskeletal framework fraction from mammalian cells, *Exp. Cell Res.* 156 (1985) 91–102
- [22] M. Sajish, Q. Zhou, S. Kishi, D.M. Valdez, M. Kapoor, M. Guo, S. Lee, S. Kim, X.-L.

- Yang, P. Schimmel, Trp-tRNA synthetase bridges DNA-PKcs to PARP-1 to link IFN- γ and p53 signaling., *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012) 547–554
- [23] V.I. Popenko, N.E. Cherny, S.F. Beresten, J.L. Ivanova, V. V Filonenko, L.L. Kisselev, Immunoelectron microscopic location of tryptophanyl-tRNA synthetase in mammalian, prokaryotic and archaeobacterial cells., *Eur. J. Cell Biol.* 62 (1993) 248–258
- [24] E.L. Paley, V.N. Baranov, N.M. Alexandrova, L.L. Kisselev, Tryptophanyl-tRNA synthetase in cell lines resistant to tryptophan analogs, *Exp. Cell Res.* 195 (1991) 66–78
- [25] G. Fu, T. Xu, Y. Shi, N. Wei, X.-L. Yang, tRNA-controlled nuclear import of a human tRNA synthetase., *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 9330–9334
- [26] N. Wei, Y. Shi, L.N. Truong, K.M. Fisch, T. Xu, E. Gardiner, G. Fu, Y.-S.O. Hsu, S. Kishi, A.I. Su, X. Wu, X.-L. Yang, Oxidative Stress Diverts tRNA Synthetase to Nucleus for Protection against DNA Damage, *Mol. Cell.* 56 (2014) 323–332
- [27] H.-Y. Huang, H.-L. Tang, H.-Y. Chao, L.-S. Yeh, C.-C. Wang, An unusual pattern of protein expression and localization of yeast alanyl-tRNA synthetase isoforms., *Mol. Microbiol.* 60 (2006) 189–198
- [28] M. Frechin, B. Senger, M. Braye, D. Kern, R.P. Martin, H.D. Becker, Yeast mitochondrial Gln-tRNAGln is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS, *Genes Dev.* 23 (2009) 1119–1130
- [29] M. Frechin, L. Enkler, E. Tetaud, D. Laporte, B. Senger, C. Blancard, P. Hammann, G. Bader, S. Clauder-Münster, L.M. Steinmetz, R.P. Martin, J.-P. di Rago, H.D. Becker, Expression of Nuclear and Mitochondrial Genes Encoding ATP Synthase Is Synchronized by Disassembly of a Multisynthetase Complex, *Mol. Cell.* 56 (2014) 763–776
- [30] K.-J. Chang, C.-C. Wang, Translation initiation from a naturally occurring non-AUG codon in *Saccharomyces cerevisiae*., *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13778–13785
- [31] 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
- [32] M.I. Chiu, T.L. Mason, G.R. Fink, HTS1 encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidyl-tRNA synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*: mutations alter the specificity of compartmentation., *Genetics.* 132 (1992) 987–1001
- [33] C.-C. Wang, K.-J. Chang, H.-L. Tang, C.-J. Hsieh, P. Schimmel, Mitochondrial form

- of a tRNA synthetase can be made bifunctional by manipulating its leader peptide., *Biochemistry*. 42 (2003) 1646–1651
- [34] K. Galani, H. Grosshans, K. Deinert, E.C. Hurt, G. Simos, The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p., *EMBO J.* 20 (2001) 6889–6898
- [35] A.K. Azad, D.R. Stanford, S. Sarkar, A.K. Hopper, Role of nuclear pools of aminoacyl-tRNA synthetases in tRNA nuclear export., *Mol. Biol. Cell.* 12 (2001) 1381–1392
- [36] 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
- [37] I. Cestari, S. Kalidas, S. Monnerat, A. Anupama, M.A. Phillips, K. Stuart, A multiple aminoacyl-tRNA synthetase complex that enhances tRNA-aminoacylation in African trypanosomes., *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 4872–4888
- [38] 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
- [39] K.E. Jackson, J.S. Pham, M. Kwek, N.S. De Silva, S.M. Allen, C.D. Goodman, G.I. McFadden, L. Ribas 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
- [40] J.S. Pham, R. Sakaguchi, L.M. Yeoh, N.S. De Silva, G.I. McFadden, Y.-M. Hou, S.A. Ralph, A dual-targeted aminoacyl-tRNA synthetase in *Plasmodium falciparum* charges cytosolic and apicoplast tRNACys., *Biochem. J.* 458 (2014) 513–523
- [41] M. Frechin, A.-M. Duchêne, H.D. Becker, Translating organellar glutamine codons: a case by case scenario?, *RNA Biol.* 6 (2009) 31–34
- [42] A. Schön, C.G. Kannangara, S. Cough, D. Söll, Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA, *Nature*. 331 (1988) 187–190
- [43] A. Nagao, T. Suzuki, T. Katoh, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, Biogenesis of glutamyl-mt tRNAGln in human mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 16209–16214
- [44] Y. Arais, J.L. Huot, T. Sekiguchi, M. Frechin, F. Fischer, L. Enkler, B. Senger, R. Ishitani, H.D. Becker, O. Nureki, Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial GatFAB reveals a novel subunit assembly in tRNA-dependent amidotransferases., *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 6052–6063

- [45] C. Meisinger, T. Sommer, N. Pfanner, Purification of *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria Devoid of Microsomal and Cytosolic Contaminations, *Anal. Biochem.* 287 (2000) 339–342
- [46] E. Lund, J.E. Dahlberg, Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus., *Science.* 282 (1998) 2082–2085
- [47] S. Sarkar, A.K. Azad, A.K. Hopper, Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 14366–14371
- [48] J. Dostie, F. Lejbkowitz, N. Sonenberg, Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles., *J. Cell Biol.* 148 (2000) 239–247
- [49] P. Schimmel, C.-C. Wang, Getting tRNA synthetases into the nucleus, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 127–128
- [50] A.K. Bandyopadhyay, M.P. Deutscher, Complex of aminoacyl-transfer RNA synthetases, *J. Mol. Biol.* 60 (1971) 113–122
- [51] P. Kerjan, C. Cerini, M. Sémériva, M. Mirande, The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals., *Biochim. Biophys. Acta.* 1199 (1994) 293–297
- [52] G. Simos, A. Segref, F. Fasiolo, K. Hellmuth, A. Shevchenko, M. Mann, E.C. Hurt, The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases., *EMBO J.* 15 (1996) 5437–5448
- [53] S. Quevillon, M. Mirande, The p18 component of the multisynthetase complex shares a protein motif with the β and γ subunits of eukaryotic elongation factor 1, *FEBS Lett.* 395 (1996) 63–67
- [54] S. Quevillon, J.-C. Robinson, E. Berthonneau, M. Siatecka, M. Mirande, Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein, *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 183–195
- [55] S.S. Kim, S.Y. Hur, Y.R. Kim, N.J. Yoo, S.H. Lee, Expression of AIMP1, 2 and 3, the scaffolds for the multi-tRNA synthetase complex, is downregulated in gastric and colorectal cancer, *Tumori J.* 97 (2011) 380–385
- [56] D. Laporte, J.L. Huot, G. Bader, L. Enkler, B. Senger, H.D. Becker, Exploring the evolutionary diversity and assembly modes of multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes: Lessons from unicellular organisms, *FEBS Lett.* 588 (2014) 4268–4278
- [57] B.S. Negrutskii, R. Stapulionis, M.P. Deutscher, Supramolecular organization of the

- mammalian translation system, *Biochemistry*. 91 (1994) 964–968
- [58] P.S. Ray, A. Arif, P.L. Fox, Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins, *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 158–164
- [59] C.B. Saper, A guide to the perplexed on the specificity of antibodies., *J. Histochem. Cytochem.* 57 (2009) 1–5
- [60] J.E. Gilda, R. Ghosh, J.X. Cheah, T.M. West, S.C. Bodine, A. V. Gomes, Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS), *PLoS One*. 10 (2015) e0135392
- [61] S.E. Rieder, S.D. Emr, Overview of subcellular fractionation procedures for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*., *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3 (2001) Unit 3.7
- [62] E. Palmer, T. Freeman, Investigation Into the use of C- and N-terminal GFP Fusion Proteins for Subcellular Localization Studies Using Reverse Transfection Microarrays, *Comp. Funct. Genomics*. 5 (2004) 342–353
- [63] M. Kaminska, S. Havrylenko, P. Decottignies, P. Le Maréchal, B. Negrutskii, M. Mirande, Dynamic Organization of Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes in the Cytoplasm of Human Cells., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13746–13754
- [64] J. Rinehart, B. Krett, M.A.T. Rubio, J.D. Alfonzo, D. Söll, *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion., *Genes Dev.* 19 (2005) 583–592
- [65] P. Dönnes, A. Höglund, Predicting protein subcellular localization: past, present, and future., *Genomics. Proteomics Bioinformatics*. 2 (2004) 209–215
- [66] K.-C. Chou, H.-B. Shen, A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0., *PLoS One*. 5 (2010) e9931
- [67] C. Savojardo, P.L. Martelli, P. Fariselli, R. Casadio, TPpred2: improving the prediction of mitochondrial targeting peptide cleavage sites by exploiting sequence motifs., *Bioinformatics*. 30 (2014) 2973–2974
- [68] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak, G. von Heijne, Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 1005–1016
- [69] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. von Heijne, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites., *Protein Eng.* 10 (1997) 1–6
- [70] Y. Fukasawa, J. Tsuji, S.-C. Fu, K. Tomii, P. Horton, K. Imai, MitoFates: improved

- prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites., *Mol. Cell. Proteomics*. 14 (2015) 1113–1126
- [71] A.N. Nguyen Ba, A. Pogoutse, N. Provard, A.M. Moses, NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction, *BMC Bioinformatics*. 10 (2009) 202
- [72] J. Lin, J. Hu, SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring., *PLoS One*. 8 (2013) e76864
- [73] S. Kosugi, M. Hasebe, M. Tomita, H. Yanagawa, Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 10171–10176
- [74] K. Nakai, P. Horton, PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization., *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 34–36
- [75] C.J. Bonangelino, N.L. Catlett, L.S. Weisman, Vac7p, a novel vacuolar protein, is required for normal vacuole inheritance and morphology., *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 6847–6858
- [76] S.E. Rieder, S.D. Emr, Isolation of subcellular fractions from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*., *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3 (2001) Unit 3.8
- [77] J.M. Dahlman, D.C. Guttridge, Detection of NF- κ B activity in skeletal muscle cells by electrophoretic mobility shift analysis., *Methods Mol. Biol.* 798 (2012) 505–516
- [78] E. Olmedo-Verd, J. Santamaría-Gómez, J.A.G. Ochoa de Alda, L. Ribas de Pouplana, I. Luque, Membrane anchoring of aminoacyl-tRNA synthetases by convergent acquisition of a novel protein domain., *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 41057–41068
- [79] T.A. Vida, S.D. Emr, A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast., *J. Cell Biol.* 128 (1995) 779–792
- [80] W. He, G. Bai, H. Zhou, N. Wei, N.M. White, J. Lauer, H. Liu, Y. Shi, C.D. Dumitru, K. Lettieri, V. Shubayev, A. Jordanova, V. Guerguelcheva, P.R. Griffin, R.W. Burgess, S.L. Pfaff, X.-L. Yang, CMT2D neuropathy is linked to the neomorphic binding activity of glycyl-tRNA synthetase, *Nature*. 526 (2015) 710–714
- [81] M.C. Park, T. Kang, D. Jin, J.M. Han, S.B. Kim, Y.J. Park, K. Cho, Y.W. Park, M. Guo, W. He, X.-L. Yang, P. Schimmel, S. Kim, Secreted human glycyl-tRNA synthetase implicated in defense against ERK-activated tumorigenesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E640–E647
- [82] Z. Wei, Z. Xu, X. Liu, W.-S. Lo, F. Ye, C.-F. Lau, F. Wang, J.J. Zhou, L.A. Nangle, X.-L. Yang, M. Zhang, P. Schimmel, Alternative splicing creates two new architectures

Tables and legends to figures

Figure 1: Mitochondrial localization of cytosolic and mitochondrial aaRSs. A. Schematized representation of yeast mitochondria preparation. The procedure we followed was that described by Meisinger and coworkers [45]. Mitochondria are recovered from the 60 %-32 % interphase. **B. LC MS/MS analysis of the mitoproteome.** After separation, pure yeast mitochondria were subjected to LC MS/MS analysis with 3 different injection gradients (90 min, 120 min and 90 min Frac, see **section 5** for details). Number of total proteins identified in each samples are represented in bold. Proteins found shared between conditions are also showed. **C. Mitochondrial (top) and cytosolic (bottom) forms of aaRSs identified in mitochondrial extract by LC MS/MS analysis.** Colors are corresponding to samples in panel **B**. Cytosolic aaRSs found in mitochondrial extract and predicted to have an MTS by at least 1 predictor (see **Table 5**) are in bold. Yeast cytosolic aaRSs previously shown experimentally as mitochondria dual-localized are underlined (see **Table 1**). No mitochondrial specific CysRS identify in yeast. * indicates putative aaRSs.

Figure 2: Different strategies commonly used for localizing aaRSs in Yeast cells. All techniques can be used on mammalian cells except those specific to yeast genetics.

Table 1. List of dual-localized cytosolic aaRSs identified so far

Organism	Localisation	aaRS	Techniques used	Mechanism	Reference
<i>Hs</i>	Mitochondrial	GlyRS	IF, CF	Alternative transcription start	[14] [16]
		LysRS	FM	Alternative mRNA splicing	[17]
	Nuclear	LysRS	CM, CF, CE	Phosphorylation	[18] [19]
		MetRS	FM, CE, IF, CF	Cell growth signal induced	[19] [20]
		PheRS	IF	n.d.	[21]
		TrpRS	CF, IF, IEM	IFN gamma induced	[22] [23] [24]
		TyrRS	IF, CM, CF	tRNATyr binding	[25]
TyrRS	CF, IF	Oxydative stress induced	[26]		
<i>Sc</i>	Mitochondrial	AlaRS	G, CF	Non-AUG alternative translation start	[15] [27]
		GluRS	FM, G, CF, CM	Arc1p released	[28] [29]
		GlyRS1	G	Non-AUG alternative translation start	[30] [31]
		HisRS	G, CF	Alternative transcription start	[12] [32]
		ValRS	G	Alternative translation start	[13] [33]
	Nuclear	MetRS	FM, CF, CM	Arc1p released	[29] [34]
		TyrRS	FM, CF	NLS characterisation	[25] [35]
<i>Tb</i>	Mitochondrial	IleRS	IF, CF	Trans-splicing	[36] [37]
		GluRS	IF, CF	Trans-splicing	[37] [38]
		GlnRS	IF, CF	Trans-splicing	[37] [38]
		ProRS	IF	Trans-splicing	[37]
<i>Pf</i>	Apicoplast	AlaRS	IF	n.d.	[39]
		CysRS	FM, IF	Alternative mRNA splicing	[40]
		GlyRS	IF	n.d.	[39]
		ThrRS	IF	n.d.	[39]

aaRSs in bold are enzymes that relocalize *stricto sensu* from cytosol to the organellar compartment. *Hs*, *Homo sapiens*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Tb*, *Trypanosoma brucei*; *Pf*, *Plasmodium falciparum*; CM, confocal microscopy; IF, immunofluorescence; CF, cell fractionation; FM, epifluorescence microscopy; CE, capillary electrophoresis; IEM, immuno-electron microscopy; G, genetic; NLS, nuclear localization signal; n.d., not determined

Table 2. Proteins used as controls for compartment staining and for confirming organellar localization of aaRSs

Compartment	Application	Organism	Protein	Antibody source	Reference
Cytosol	WB	<i>Hs</i>	Tubulin beta	n.a.	[18]
			Hsp90 alpha	c.a.	[20]
		<i>Sc</i>	Pgk1	c.a.	[29]
			Gut2	c.a.	[32]
<i>Tb</i>	eEF1A	n.a.	[36]		
Nucleus	WB	<i>Hs</i>	Lamin B1	c.a.	[18] [20]
			YY1	c.a.	[20]
		<i>Sc</i>	Hta2	c.a.	[29]
			Nop1	c.a.	[29]
Nucleolus	IF	<i>Hs</i>	Nucleolin	c.a.	[20]
Mitochondria	WB	<i>Sc</i>	Por1	c.a.	[29]
			Atp2	n.a.	[32]
			Rip1	n.a.	[32]
			Cit1	n.a.	[32]
	IF	<i>Tb</i>	mHSP70	n.a.	[36] [37]
Apicoplast	IF	<i>Pf</i>	ACP	h.	[39] [40]

WB, western blot; IF, immunofluorescence; *Hs*, *Homo sapiens*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Tb*, *Trypanosoma brucei*; *Pf*, *Plasmodium falciparum*; n.a., not available; c.a., commercially available; h., homemade.

Table 3. Antibodies used for localizing untagged aaRSs

Organism	Application	aaRS	Antibody	aaRS antigen	Reference
<i>Hs</i>	IF	ArgRS	h. : rabbit	His-tagged 72 N-terminal residues of <i>Hs</i> ArgRS	[20]
		Glu-ProRS	h. : rabbit	His-tagged peptide from D677 to E884 of <i>Hs</i> EPRS	[20]
		GlnRS	h. : rabbit	His-tagged 236 N-terminal residues of <i>Hs</i> GlnRS	[20]
		LysRS	c.a. ; rabbit	n.d	[18]
		MetRS	h. : rabbit	Full-length denaturated His-tagged <i>Hs</i> MetRS	[20]
		PheRS	h. ; rabbit	Endogenous PheRS from sheep liver	[21]
		TyrRS	h. : rabbit	n.d	[25][26]
<i>Hs</i>	WB	TyrRS	h. : rabbit	n.d	[25] [26]
		TrpRS	h. : rabbit	Full-length <i>Hs</i> TrpRS	[22]
<i>Sc</i>	WB	GluRS	c.a. ; rabbit	His-tagged full-length <i>Sc</i> GluRS	[29]
		HisRS	h. ; mouse	Full-length <i>Sc</i> HisRS	[32]
		MetRS	c.a. ; rabbit	His-tagged full-length <i>Sc</i> MetRS	[29]
<i>Pf</i>	WB, IF	CysRS	h. ; rabbit	KLH conjugate 14 C-terminal residues of <i>Pf</i> CysRS	[40]

WB, Western Blot; IF, Immunofluorescence; *Hs*, *Homo sapiens*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Pf*, *Plasmodium falciparum*; n.d., not described; c.a., commercially available; h., homemade.

Table 4. Protein-tags used for localizing aaRSs

<i>Organism</i>	Tag	Tagged aaRS	Tag position	Application	Antibody	References
<i>Hs</i>	GFP	ArgRS	C-ter	CM		[63]
		AsnRS	C-ter	CM		[63]
		LysRS	C-ter ; N-ter	CM, FM		[19] [63]
		MetRS	C-ter ; N-ter	CM, FM		[19] [63]
	V5 epitope	GlyRS	C-ter	IF, WB	c.a.	[14]
<i>Sc</i>	GFP	MetRS	C-ter ; N-ter	FM, CM		[29] [34]
		Nter-GluRS	C-ter	CM		[28]
		GluRS	N-ter	FM, CM		[34]
		TyrRS	C-ter	FM		[35]
	V5 epitope	GlnRS	C-ter	WB, FM	c.a.	[64]
	6×His	AlaRS	C-ter	WB	c.a.	[27]
c-Myc	TyrRS	C-ter	WB	c.a.	[35]	
<i>Tb</i>	V5 epitope	CysRS	C-ter	IF	c.a.	[37]
		GluRS	C-ter	IF	c.a.	[37]
		GlyRS	C-ter	IF	c.a.	[37]
		IleRS	C-ter	IF	c.a.	[37]
		MetRS	C-ter	IF	c.a.	[37]
		ProRS	C-ter	IF	c.a.	[37]
		SerRS	C-ter	IF	c.a.	[37]
		ValRS	C-ter	IF	c.a.	[37]
	3×HA	IleRS	C-ter	IF, WB	n.d.	[36]
<i>Pf</i>	GFP	AlaRS	C-ter	IF, WB	c.a.	[39]
		CysRS	C-ter	IF, WB	c.a.	[40]
		GlyRS	C-ter	IF, WB	c.a.	[40]
		ThrRS	C-ter	IF, WB	c.a.	[39]
	3×HA	AlaRS	C-ter	IF, WB	c.a.	[39]
		GlyRS	C-ter	IF, WB	c.a.	[39]
ThrRS		C-ter	IF, WB	c.a.	[39]	

Hs, *Homo sapiens*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Tb*, *Trypanosoma brucei*; *Pf*, *Plasmodium falciparum*; IF, immunofluorescence; WB, western blot; c.a., commercially available; n.d., not described.

Table 5. Predictions of mitochondrial targeting and nuclear localization signals among *S. cerevisiae* and human cytosolic aaRSs

		MTS predictors ¹						Localization predictor		NLS predictors ²							
		TPpred2.0		TargetP1.1		MitoFates		Euk-mPloc2.0		NLStradamus		SeqNLS		NLS Mapper (Monopartite)		NLS Mapper (Bipartite)	
		Yeast	Human	Yeast	Human	Yeast	Human	Yeast	Human	Yeast	Human	Yeast	Human	Yeast	Human	Yeast	Human
Class I	ArgRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C/M	C	n.p.	n.p.	n.p.	1	n.p.	n.p.	1	1
	CysRS	0.771	0.776	n.p.	n.p.	0.539	n.p.	C	C	1	1	1	2	n.p.	n.p.	1	4
	GluRS	0.896		0,357		n.p.		C		1		2		n.p.		1	
	GlnRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	1	n.p.	1	2	1	n.p.	n.p.	2
	IleRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	1	n.p.	2	2	1	1	1	2
	LeuRS	n.p.	n.p.	0.538	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	2	1	2	2	n.p.	n.p.	1	2
	LysRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	1	1	2	1	n.p.	n.p.	2	2
	MetRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	n.p.	1	1	1	n.p.	1	1	3
	TrpRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	1	n.p.	1	1	1	n.p.	1	1
	TyrRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C/N	C/E	1	n.p.	2	2	1	1	2	2
	ValRS	0.871	n.p.	n.p.	n.p.	0.996	n.p.	C/M	C	1	1	1	2	n.p.	n.p.	n.p.	1
Class II	AlaRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C/M	C	n.p.	n.p.	2	1	n.p.	n.p.	1	1
	AsnRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	1	n.p.	1	1	n.p.	2	1	2
	AspRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	1	n.p.	2	1	n.p.	n.p.	2	1
	GlyRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	n.p.	n.p.	1	2	n.p.	n.p.	n.p.	1
	HisRS	0.556	n.p.	0.846	n.p.	0.996	n.p.	C/M	C/M	1	n.p.	1	n.p.	1	n.p.	3	2
	PheRS1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	n.p.	n.p.	1	1	n.p.	1	n.p.	2
	PheRS2	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	n.p.	n.p.	1	2	1	n.p.	1	2
	ProRS	n.p.		n.p.		n.p.		C		n.p.		2		n.p.		n.p.	
	SerRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C	C	1	1	1	2	n.p.	1	1	1
	ThrRS	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	C/M	C	n.p.	1	2	2	1	n.p.	2	3
	GluProRS		n.p.		n.p.		n.p.		C		1		2		1		1

n.p. : not predicted; for NLS sequence details see **Supp. Figure 1a**. ¹ MTS scores are probabilities of the considered protein to have an MTS. ² NLS scores are numbers of NLS sequences identified in each aaRS protein. C, cytosolic; M, mitochondrial; N, nuclear; E, extracellular.

Table 6. List of markers for specific compartments in mammalian cells and their respective antibodies

Compartment	Protein marker*	Antibody
Nucleus	Lamin B1	Abcam ab16048
Plasma membrane	Cadherin	Abcam ab6528
Endoplasmic Reticulum	Calnexin	Abcam ab22595
	Calreticulin	Abcam ab2907
	GRP-78	Abcam ab21685
Golgi	GM130	Abcam ab31561
	Giantin	Abcam ab80864
	TGN46	Abcam ab2809
Mitochondria	COX IV-1	Abcam ab14744
	Cytochrom c	Abcam ab13575
Endosomes	Early endosome antigen 1	Abcam ab2900
	Ras related protein Rab-5A	Abcam ab18211
	Ras related protein Rab-7a	Abcam ab126712
Lysosomes	LAMP-1	Abcam ab24170
	LAMP-2	Abcam ab18529
Autophagosomes	MAP1A/MAP1B LC3 A	Abcam ab52768
Peroxisomes	Catalase	Abcam ab16771

*Protein marker names are recommended names or short names from the UniProt database.

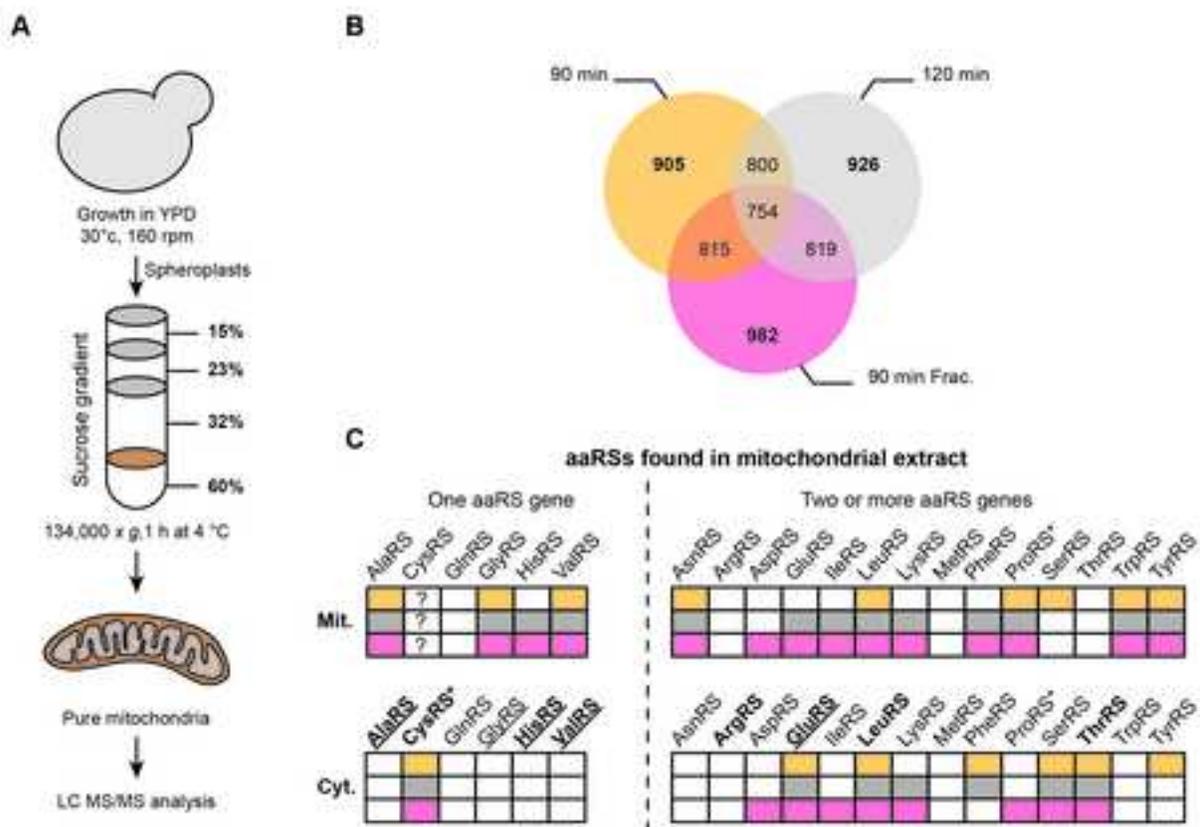


Figure 1

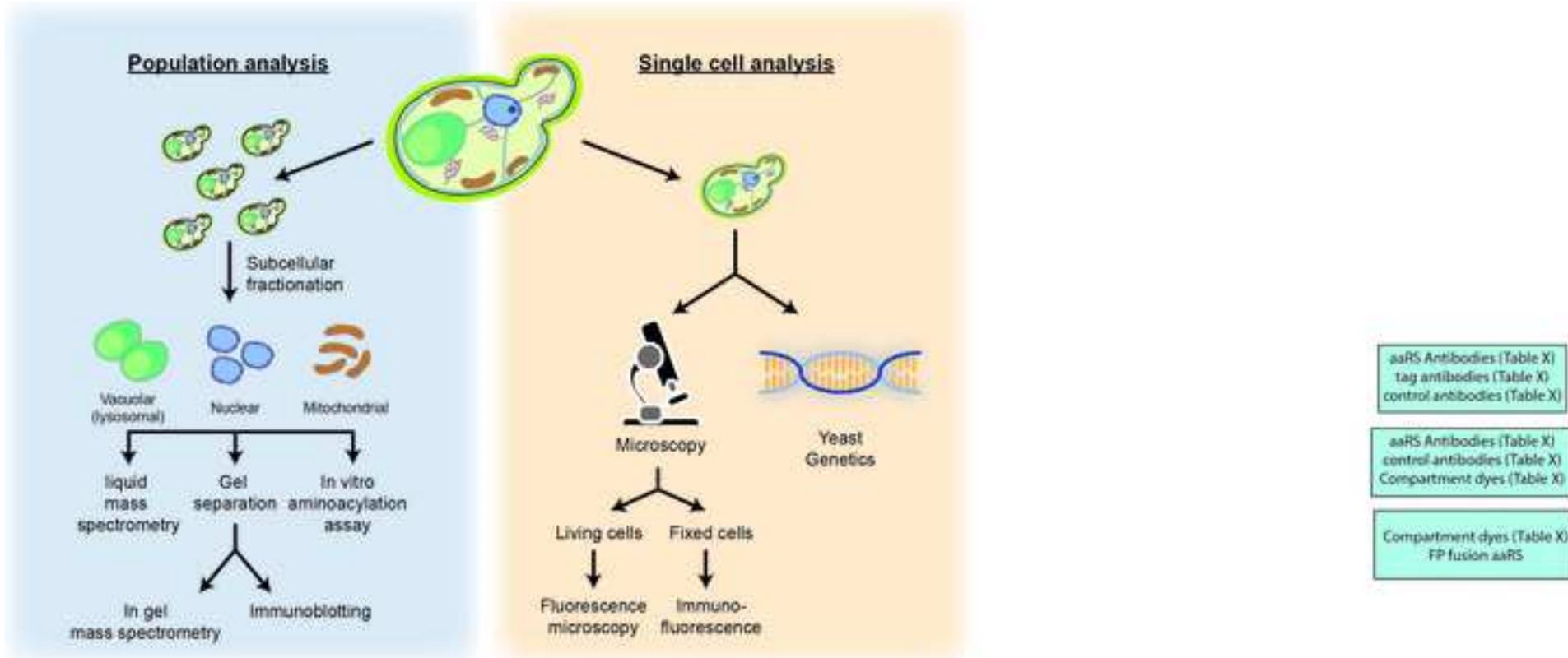


Figure 2

Résultats et discussions

Chapitre I

Le complexe AME synchronise l'expression des sous-unités du complexe V de la chaîne respiratoire d'origines génétiques nucléaires et mitochondriales chez *S. cerevisiae*

I Contexte

Lors de mon arrivée au laboratoire en septembre 2012, Ludovic Enkler et le Dr. Mathieu Frechin, qui ont effectué leurs thèses respectives dans l'équipe, avaient mis en évidence que le complexe AME était impliqué dans le dialogue nucléo-mitochondrial nécessaire à l'expression des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Lors du passage d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire (transition diauxique) la kinase Snf1/4 inhibe la transcription d'*Arc1* conduisant au relargage de la MetRS et de la GluRS du complexe (Frechin et al. 2009). La MetRS et la GluRS libérées se relocalisent alors respectivement dans le noyau et la mitochondrie pour coordonner la transcription du gène nucléaire *ATP1* (par la MetRS) et la traduction de l'ARNm mitochondrial de la sous-unité *Atp9* (par la GluRS). Ce mécanisme permet de produire de manière synchrone la tête catalytique (domaine F₁) et le rotor (domaine F₀) de l'ATP synthase (complexe V de la chaîne respiratoire). Dans cette étude, l'utilisation de souches ne pouvant pas libérer de manière synchrone la GluRS et la MetRS nous a permis de montrer que ce n'était pas le simple relargage des aaRS qui était important mais la synchronicité de cette libération.

I.1 Les souches désynchronisées et resynchronisées

Les souches désynchronisées et resynchronisées ont eu un rôle clé dans la découverte de la synchronicité de la libération des aaRS du complexe AME. La construction de ces souches, réalisée durant la thèse du Dr. Mathieu Fréchin, se base sur trois postulats : i) *Arc1* est l'ancre cytoplasmique de la MetRS et de la GluRS ii) *Arc1* interagit avec la MetRS et la GluRS *via* leurs domaines GST-like. iii) la régulation transcriptionnelle du gène *ARC1* par Snf1 durant la transition diauxique provoque une diminution de la quantité soluble de *Arc1*.

En surproduisant *ARC1* sous contrôle d'un promoteur fort constitutif, la quantité d'*Arc1* soluble ne diminue plus lors de la transition diauxique : il s'agit de la souche **ARC**. Dans cette souche **ARC**, lorsque la partie N-terminale de la MetRS est surproduite, il y a « saturation » du site d'ancrage de la MetRS à *Arc1* ce qui empêche la MetRS entière d'interagir avec *Arc1* : ainsi, la MetRS est relâchée du complexe. Il s'agit de la souche désynchronisée **nM**. Dans la souche **ARC**, lorsque la partie N-terminale de la GluRS est

surproduite, il y a « saturation » du site d'ancrage de la GluRS à Arc1 ce qui empêche la GluRS entière d'interagir avec Arc1 : ainsi, la GluRS est relâchée du complexe. Il s'agit de la souche désynchronisée **nE**. Enfin, lorsque les deux fragments N-terminaux de la MetRS et de la GluRS sont simultanément surexprimés dans la souche **ARC**, alors les deux aaRS sont exclues du complexe. Il s'agit de la souche resynchronisée **nEnM**.

II Apport de mon travail à cette étude

II.1 Découverte du 1^{er} NLS de la MetRS

Ayant été recrutée pour étudier le rôle de régulateur transcriptionnel de la MetRS dans le noyau, j'ai débuté mon travail de thèse par la recherche du NLS au sein de la séquence peptidique de la MetRS.

Les signaux de localisation nucléaires, présentés dans l'introduction générale, sont étudiés par une stratégie identique quel que soit l'organisme étudié. Dans un premier temps, l'identification du NLS putatif est réalisée par l'analyse de la séquence peptidique de la protéine par un programme de bioinformatique ou par comparaison de séquences avec les protéines d'autres organismes, dans lesquels les NLS sont connus. Une protéine de fusion entre la séquence ciblée du NLS putatif et la GFP est construite, puis une étude par microscopie à épifluorescence de la localisation de la protéine de fusion est réalisée. Nous sommes allés jusqu'à cette étape pour la détection du NLS de la MetRS. Celui-ci a été identifié très rapidement, puisque 2 mois après le début de ma thèse, nous étions en possession des images montrant la présence du NLS dans la partie N-terminale de la MetRS. C'est donc tout naturellement que nous avons intégré ces résultats au manuscrit lors de sa re-soumission à l'éditeur du journal *Molecular cell*. Ces résultats sont visibles dans l'article à la fin de cette section.

II.2 Recherche des interactants de la MetRS nucléaire

L'identification d'une fonction alternative d'une protéine n'est pas aisée et une approche couramment utilisée consiste à identifier ses interactants en espérant que certains d'entre eux aient une fonction qui a été établie et qui indiquera à quel processus cellulaire la protéine étudiée participe. En effet, les interactions entre protéines et molécules ont lieu dans le but d'accomplir une fonction et l'interactome d'une protéine

est l'étude de l'ensemble des interactions de cette protéine avec d'autres molécules, permettant la compréhension des réseaux d'interactions protéiques. Cette étude consiste, dans un premier temps, à trouver les partenaires moléculaires de la protéine étudiée. Bien que l'étude des interactants puisse concerner les interactions protéines-protéines, protéines-ADN ou protéines-ARN, nous nous sommes concentrés sur les partenaires protéiques de la MetRS.

Durant ma thèse, j'ai utilisé trois techniques différentes permettant de détecter des interactions physiques entre protéines à l'échelle du protéome entier ou alors de confirmer ces interactions : la technique de purification par affinité en tandem, le double hybride bactérien, et le double hybride levure. Après avoir présenté chacune de ces techniques, j'expliquerai quels ont été les conditions et interactants testés puis les résultats obtenus.

II.2.1 La technique de purification par affinité en tandem

La purification par affinité en tandem, également appelé TAP, est une méthode de purification des complexes protéiques par affinité. Elle consiste en une double purification de la protéine d'intérêt et de ses interactants par des colonnes d'affinités, suivie de l'identification des protéines purifiées par spectrométrie de masse (en collaboration avec la plateforme de protéomique de l'IBMC). L'étiquette de purification, fusionnée à la protéine d'intérêt, se compose de trois éléments différents : la protéine A de *S. aureus*, permettant la première étape de purification par affinité sur colonne d'IgG ; le site de clivage de la protéase TEV (Tobacco Etch Virus), permettant de décrocher les complexes protéiques purifiés de la colonne d'IgG ; et le peptide liant la calmoduline, utilisé lors de la deuxième étape de purification par affinité sur colonne de calmoduline. Les avantages majeurs de cette technique résident en l'étude des partenaires protéiques dans des conditions natives ainsi que l'expression de la protéine à des niveaux physiologiques, si le promoteur utilisé est le promoteur natif. Cependant, les partenaires protéiques transitoires ne sont pas purifiés avec la protéine d'intérêt et il existe environ 20% de faux positifs, en raison d'interactions aspécifiques de protéines avec les matrices utilisées. De plus, même si une adaptation des tampons utilisés rend possible la purification par affinité en tandem des protéines membranaires, les protéines insolubles ne sont malheureusement pas étudiables par cette méthode.

Les résultats des analyses nano LC/MSMS obtenus à partir d'une souche cultivée en fermentation sont présentés dans le Tableau 19, soit 15 protéines différentes. Le nombre de spectres obtenus reflète la quantité de protéine issue de la purification.

Protéine	Masse moléculaire (kDa)	Nombre de spectres obtenus	Fonction biologique reliée
MetRS	85,6	1105	Traduction
GluRS	80,8	503	Traduction
Arc1	42,1	272	Traduction
L4 (ribosome 60S)	39,0	39	Traduction
L3 (ribosome 60S)	43,7	16	Traduction
L8 (ribosome 60S)	28,1	12	Traduction
P0 (ribosome 60S)	33,7	9	Traduction
L1 (ribosome 60S)	24,5	8	Traduction
L2 (ribosome 60S)	27,4	7	Traduction
EF1A	50,0	5	Traduction
S1 (ribosome 40S)	28,8	5	Traduction
Ssa2	69,4	5	Chaperonne
Yra1	24,9	4	Traduction
S6 (ribosome 40S)	27,0	3	Traduction
S1 (ribosome 40S)	28,7	3	Traduction

Tableau 19. Intégralité des protéines identifiées en nano-LC/MSMS après purification TAP réalisée sur l'extrait brut d'une souche cultivée en fermentation.

Les interactants majoritaires obtenus sont ceux reliés à la fonction d'aminoacylation de la MetRS (exemple : complexe AME, composants du ribosome). Or, nous nous intéressons à la fonction transcriptionnelle et nucléaire de la MetRS, et espérons donc obtenir des interactants reliés à cette fonction biologique. La seule protéine n'étant pas directement reliée à la traduction est Ssa2, qui est une protéine chaperon de la famille des Hsp70.

Nous avons par la suite réalisé cette expérience à partir d'une culture de cellules de levure en respiration, condition durant laquelle l'import nucléaire de MetRS augmente de manière significative. Suite à cette expérience, 123 protéines ont été identifiées par nano LC/MSMS, dont 78 appartiennent aux sous-unités ribosomiques

60S ou 40S. Cet interactome était à nouveau le reflet de la fonction biologique canonique associée à la MetRS, en l'occurrence : la traduction cytoplasmique.

A première vue, il est surprenant que nous ayons obtenu huit fois plus de protéines pour l'expérience réalisée en respiration par rapport à celle en fermentation. Cependant, le nombre de spectre obtenu pour la MetRS est plus élevé (1715 en respiration contre 1105 en fermentation) ce qui signifie que la quantité de MetRS purifiée et donc d'interactants était plus importante. Il est également possible que les réglages ou paramètres d'analyses de la plateforme de protéomique aient été modifiés. Les protéines identifiées, excepté les protéines du ribosome cytoplasmique, sont classées dans le Tableau 20.

Protéine	masse moléculaire (kDa)	Nb de spectres obtenus	Fonction biologique reliée
MetRS	85,6	1715	Traduction
GluRS	80,8	675	Traduction
Arc1	42,1	464	Traduction
Ssa1	69,6	35	Chaperonne
Ssa2	69,4	28	Chaperonne
Hsc82	80,8	23	Chaperonne
EF1A	50	27	Traduction
EF3A	115,9	8	Traduction
eIF4A	44,7	9	Traduction
Yra1	24,9	8	Traduction
EF2	93,2	7	Traduction
Por1	30,4	8	Transport mitochondrial
Atp1	58,6	8	ATP synthase mitochondriale
Vma2	57,7	5	ATPase vacuolaire
L3 (mitoribosome 54S)	44	5	Traduction mitochondriale
Tub2	50,9	3	Cytosquelette
Act1	41,7	3	Cytosquelette
L24 (mitoribosome 54S)	30	3	Traduction mitochondriale
Pet9	34,4	3	Transport ADP/ATP mitochondrial
Nop1	34,4	3	Biogénèse du ribosome (nucleolaire)
L40 (mitoribosome 54S)	33,7	3	Traduction mitochondriale
L41 (mitoribosome 54S)	30,5	2	Traduction mitochondriale
Psa1	39,5	2	Biosynthèse de la paroi

Mir1	32,8	3	Transport du phosphate mitochondrial
Rml2 (mitoribosome 54S)	43,8	1	Traduction mitochondriale
Nop56	56,8	1	Biogénèse du ribosome (nucleolaire)
Nog1	74,4	1	Biogénèse du ribosome (nucleolaire)
Ssb1	66,6	1	Chaperonne
L10 (mitoribosome 54S)	36,3	2	Traduction mitochondriale
Trm1	64	1	Modification des ARNt
L4 (mitoribosome 54S)	36,9	2	Traduction mitochondriale
Nsa2	29,7	2	Biogénèse du ribosome (nucleolaire)
L13 (mitoribosome 54S)	30,3	2	Traduction mitochondriale
Pil1	38,3	1	Endocytose
L28 (mitoribosome 54S)	17,3	2	Traduction mitochondriale
Tdh3	35,7	1	Métabolisme
Sro9	48	1	Traduction
Bmh1	30,1	2	Réplication de l'ADN
Adh2	36,7	1	Métabolisme
Nop58	56,9	1	Biogénèse du ribosome (nucleolaire)
L49 (mitoribosome 54S)	18,4	1	Traduction mitochondriale
Ura2	244,9	2	Métabolisme
Mss116	76,2	1	Traduction mitochondriale

Tableau 20. Protéines identifiées par nano-LC/MSMS (exceptées composants du ribosome cytoplasmique) après purification TAP réalisé sur un extrait total d'une souche cultivée en respiration.

Plusieurs protéines du ribosome mitochondrial ont été identifiées, la traduction mitochondriale constitue ainsi la deuxième fonction biologique majoritaire associée à la MetRS. Quelques protéines nucléolaires (Nop1, Nop56, Nop58) ont également été identifiées. L'association de ces deux constats nous suggèrerait que, tout comme la MetRS d'*H. sapiens*, la MetRS de *S. cerevisiae* pourrait être associée à la biogénèse des ribosomes cytoplasmiques qui a lieu dans le nucléole mais également de l'expression des protéines du mitoribosomes, qui a lieu dans le noyau.

Comme la fraction de la MetRS nucléaire qui porte potentiellement la fonction transcriptionnelle ne correspond qu'à 15 % de la totalité de la MetRS de la cellule de

levure qui respire (voir article en fin de ce chapitre) et que l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle est potentiellement transitoire et peu stable nous avons décidé de ne réaliser que la première purification par affinité. Nous avons ensuite retranché les protéines identifiées avec un témoin négatif, contenant l'ensemble des protéines identifiées suite à l'expérience réalisée dans les mêmes conditions dans une souche sauvage ne contenant aucune étiquette TAP.

Après soustraction des protéines obtenues lors du contrôle négatif, 118 protéines différentes ont été identifiées. Néanmoins, cette soustraction conduit probablement à des pertes de candidats intéressants, car par exemple, la GluRS et Arc1, interactants connus de la MetRS, sont présents à la fois dans le contrôle négatif et dans l'expérience avec la souche contenant la MetRS étiquetée. Les deux interactants majoritaires de la MetRS sont donc éliminés par le traitement des résultats. Les interactants que nous avons identifiés en utilisant cette stratégie sont présentés dans le Tableau 21. Toutefois, l'intégralité des protéines identifiées est disponible en annexe à la fin de la thèse. Comme précédemment, des protéines associées à la biogénèse du ribosome ont été identifiées. Trois importines différentes ont également été identifiées : Kap95, spécifique des NLS classiques, Kap108, impliquée dans l'import des sous-unités ribosomiques, et Kap104, spécifique des NLSpy. De manière intéressante, la protéine la plus abondante est Rpb1, la plus grosse sous-unité de l'ARN pol II.

Protéine	masse moléculaire(kDa)	Nb de spectres obtenus	Fonction biologique reliée
Rpb1	191,5	35	Transcription
Nop58	56,9	17	Biogénèse du ribosomes
Snf1	72,0	12	Métabolisme du carbone
Pop1	100,3	11	Biogénèse du ribosome/ARNt
Nsr1	44,5	10	Import nucléaire
MetRS	85	8	Traduction - Protéine étiquetée
Kap95	94,7	7	Import nucléaire
Mpp10	66,9	6	Biogénèse du ribosomes
Lsg1	72,7	6	Biogénèse du ribosomes
Arb1	68,3	5	Biogénèse du ribosomes
Xrn1	175,3	5	Transcription

Spt6	168,2	5	Transcription
Rrb1	57,2	4	Biogénèse du ribosomes
Nop9	77,7	4	Biogénèse du ribosomes
Pob3	63,0	3	Transcription
Nup84	83,6	3	Import nucléaire
Seh1	39,1	2	Import nucléaire
Kap108	108,3	2	Import nucléaire/Biogénèse du ribosome
Kap104	103,6	1	Import nucléaire

Tableau 21. Protéines identifiées par nano-LC/MSMS, dont la fonction biologique est reliée à l'import nucléaire, la transcription ou la biogénèse des ribosomes, après la première étape de la purification TAP réalisé sur un extrait total d'une souche cultivée en respiration.

Ces derniers résultats sont à interpréter avec précaution puisqu'il n'y a que 8 spectres de MetRS, ce qui est très peu par rapport au nombre de spectres de MetRS obtenus lors des expériences précédentes. Les protéines majoritaires identifiées sont toutefois présentes en moindre abondance que précédemment (35 spectres pour la protéine majoritaire, puis 17 pour la seconde), ce qui est proportionnel au peu de spectres obtenus pour la MetRS. Il convient également de noter que dans le gel SDS-PAGE effectué avec les extraits protéiques obtenus après la purification de la MetRS sur matrice d'IgG-Sepharose, la MetRS est la protéine la plus abondante dans la bande ayant la taille attendue de la MetRS.

II.2.2 Le double hybride bactérien

Le double hybride bactérien se base sur l'utilisation de l'adenylate cyclase de *Bordetella pertusi*, dont le domaine catalytique se compose de deux sous-unités différentes T25 et T18, fusionnées aux protéines dont l'interaction est à tester (Karimova, 1998). Pour ce faire, un gène rapporteur (*GLB1*, gène codant la β -galactosidase) est placé sous contrôle d'un promoteur dépendant de l'AMPc. S'il n'y a pas d'interaction entre les deux protéines, le gène rapporteur ne s'exprime pas. Si les deux protéines à tester interagissent, l'adenylate cyclase est reconstituée et synthétise de l'AMPc. Ainsi, le gène rapporteur *GLB1* sous contrôle d'un promoteur AMPc dépendant est exprimé (Figure 27), et la β -galactosidase produite dégrade le X-gal en un produit coloré, qui rend les colonies bleues.

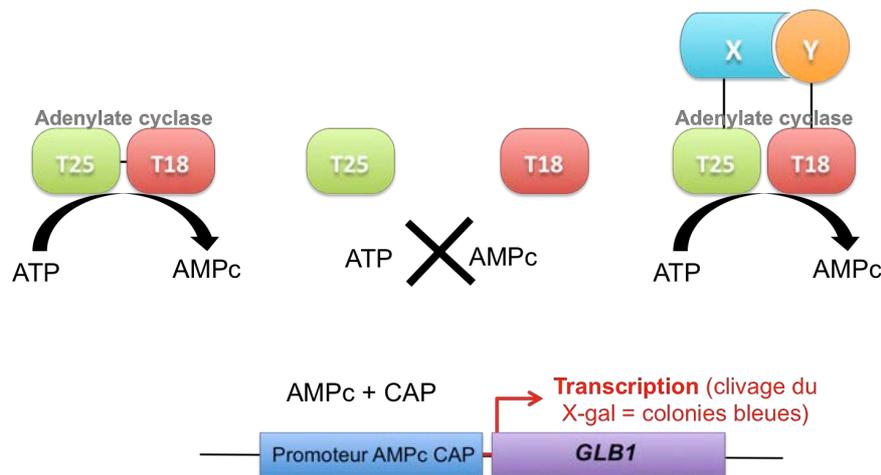


Figure 27. Principe du double hybride bactérien. X : protéine d'intérêt n°1 ; Y : protéine d'intérêt n°2 ; *GLB1* : gène rapporteur codant la β -galactosidase.

L'interaction entre les protéines d'intérêt est ainsi séparée de l'activation transcriptionnelle, ce qui génère moins de faux positifs que lors de l'utilisation d'un double hybride de levure. Un autre avantage inhérent à cette méthode est l'utilisation de la bactérie *E. coli* qui en plus d'être facilement transformable, ne possède pas de compartiments. Les protéines testées ont donc toujours la même localisation, peu importe leurs signaux d'adressages. De plus, la force de l'interaction entre les protéines testées est doublement mesurable : soit par l'activité de la protéine reportrice utilisée soit par l'intensité de la coloration bleue des colonies. Toutefois, les interactions protéiques nécessitant des modifications post-traductionnelles préalables des partenaires n'existant pas chez *E. coli* ne sont pas détectables par cette méthode.

Lorsque l'étude de l'interactome a débuté, il ne m'était pas possible, pour des raisons techniques, de confirmer les interactions entre la MetRS et ses interactants *in vitro* à partir de protéines purifiées. J'ai donc utilisé des systèmes cellulaires de doubles hybrides bactériens et de levures. Le double hybride bactérien a été utilisé dans le but de confirmer des interactions entre la partie N-terminale de la MetRS et des candidats obtenus par la technique de purification par affinité en tandem.

Le choix d'un domaine spécifique à tester, pour obtenir des résultats plus fins, s'est porté sur la partie N-terminale de la MetRS (N-ter), soit les 160 premiers résidus. Ceux-ci contiennent une glissière à leucine, élément typique des facteurs de transcriptions, et utilisée pour l'interaction entre protéines soit par homodimérisation, soit par hétérodimérisation des partenaires. La MetRS de levure ne possédant pas la faculté d'homodimériser, nous avons émis l'hypothèse que cette glissière à leucine

pouvait être utilisée pour une interaction avec une autre protéine. De plus, ce domaine N-terminal contient le NLS de la MetRS, dont nous voulions confirmer l'interaction avec une importine spécifique afin d'identifier précisément la voie d'import nucléaire de la MetRS. Nous avons ajouté la GFP à cette construction, afin de pouvoir détecter son expression par microscopie à épifluorescence. L'ensemble « N-terminal de la MetRS et GFP » a été fusionné à la sous-unité T25 de l'adénylate cyclase.

Nous avons naturellement choisi Arc1 comme témoin positif de l'expérience, puisque la partie N-terminale de la MetRS est celle qui interagit avec Arc1. Le choix des interactants à confirmer s'est porté sur les protéines des interactomes que j'avais établis ou identifiées lors de précédentes expériences de purification de la MetRS par affinité en tandem (Tableau 22). Ces protéines à testées ont été fusionnées au domaine T18 de l'adénylate cyclase.

Protéine à tester	Fonction	Obtenu en TAP-Tag
Arc1	Ancre cytoplasmique du complexe AME	Oui
Kap95	Importine β	Oui
Rpb4	Sous-unité de l'ARN pol II	Oui
Rpb7	Sous-unité de l'ARN pol II	Oui
Gcn4	Facteur de transcription	Non

Tableau 22. Protéines candidates testées en double hybride bactérien et leur fonction principale.

Le plasmide permettant l'expression de T18, co-transformé avec le plasmide permettant l'expression de la construction N-ter, donne des colonies blanches sur milieu LB X-Gal (Tableau 23). T18 et la construction N-ter n'interagissent donc pas ensemble (contrôle négatif). Le plasmide permettant l'expression d'Arc1-T18, co-transformé avec le plasmide permettant l'expression de la construction N-ter, donne des colonies bleues sur boîte LB X-Gal, confirmant qu'Arc1 et la construction N-ter interagissent ensemble (contrôle positif) et suggérant que la partie N-terminal de la MetRS adopte bien une conformation correcte lui permettant d'interagir avec ses partenaires protéiques dans le système de double hybride bactérien.

Lorsque le plasmide permettant l'expression de la construction N-ter est co-transformé avec celui permettant l'expression de Kap95-, Rpb7- ou Rpb4-T18, les colonies obtenues sur milieu LB X-Gal sont bleues. Ce résultat confirme que Kap95, Rpb7

et Rpb4 (précédemment identifiés lors de précédentes expériences de purification en tandem de la MetRS) sont des interactants de la MetRS et qu'ils se lient plus particulièrement à la partie N-terminale de l'enzyme.

Enfin, nous avons testé l'interaction de la construction N-ter avec Gcn4. La co-transformation des plasmides permettant l'expression des deux constructions donne des colonies bleues sur milieu LB X-Gal suggérant que la glissière à leucine de la partie N-terminale de la MetRS interagit avec la glissière à leucine de Gcn4. A l'origine, Gcn4 était un contrôle positif fourni dans le kit du double hybride bactérien et bien que ce facteur de transcription n'aie jamais été identifié dans les expérience de TAP, ce résultat suggère que la partie N-ter interagit bien avec Gcn4. Néanmoins, l'interaction entre la partie N-ter de la MetRS et la glissière à leucine de Gcn4 reste encore à confirmer par d'autres approches complémentaires.

Protéine testée	Résultat	Photographie	Force de l'interaction	Contrôle négatif pour la protéine testée	Photographie
T18 seule	Négatif		Nulle	-	-
Arc1	Positif		Moyenne	Valide	-
Rpb7	Positif		Moyenne	Valide	
Rpb4	Positif		Moyenne	Valide	
Kap95	Positif		Moyenne	Valide	-
Gcn4	Positif		Robuste	Valide	

Tableau 23. Résultats des tests de double hybride bactérien. Les vecteurs permettant l'expression des différents variants des protéines à tester ont été co-transformés avec le vecteur permettant l'expression de la construction N-ter de la MetRS.

II.2.3 Le double hybride levure

Le double hybride de levure permet le criblage d'interactions physiques à l'échelle du protéome entier ou la confirmation d'interactants potentiels identifiés, ce pour quoi nous l'avons utilisé. L'une des protéines à tester est fusionnée au domaine d'activation du facteur de transcription Gal4 (Gal4AD), tandis que l'autre protéine à tester est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4BD). Si les protéines interagissent, alors le facteur de transcription Gal4 est reconstitué, ce qui permet la transcription d'un gène rapporteur sous contrôle du promoteur *GAL1*, dans notre cas *HIS3*, conférant ainsi la prototrophie de la levure vis-à-vis de l'histidine (Figure 28). Techniquement, chaque souche haploïde est transformée avec un vecteur contenant le gène permettant l'expression de la protéine à tester, puis les différentes souches haploïdes de signes opposés sont croisées. La croissance des souches diploïdes obtenues est ensuite testée sur milieu synthétique dépourvu d'histidine.

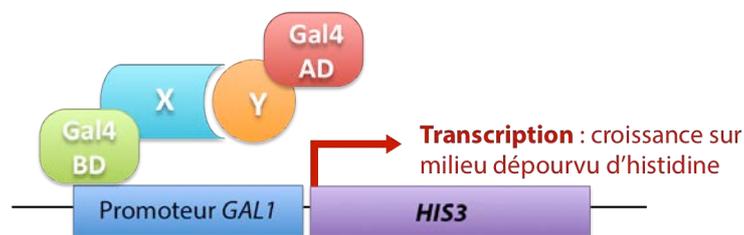


Figure 28 Principe de la technique du double hybride levure. X : protéine d'intérêt n°1 ; Y : protéine d'intérêt n°2 ; *HIS3* : gène conférant la prototrophie vis-à-vis de l'histidine ; Gal4AD : Domaine d'activation de Gal4 ; Gal4BD : Domaine de liaison de Gal4 à l'ADN.

L'avantage majeur de cette technique réside en sa réalisation dans des conditions quasi-physiologiques, puisque notre protéine est issue de *S. cerevisiae*, et contiendra ainsi les modifications post-traductionnelles potentiellement nécessaires à l'interaction entre les protéines étudiées. D'autre part, le système de double hybride de levure permet de mesurer des liaisons entre des protéines qui habituellement sont artificiellement adressées dans le noyau, or comme nous recherchons les interactants nucléaires de la MetRS, dans notre cas, cette technique est parfaitement appropriée. Néanmoins, bien que largement utilisée, la méthode présente des limites puisqu'il existe un fort taux de faux négatif (de 70 à 90%), imputables à des défauts de localisations, de

stabilité, ou de toxicité. Les taux de faux positifs sont également très élevés puisqu'ils se situent entre 40 et 70%. Le double hybride de levure, bien qu'intéressant, génère donc des données qu'il convient d'interpréter avec précaution. Le talon d'Achille de cette technique réside, dans notre cas, par la capacité de la MetRS de réguler la transcription, elle pourrait donc à elle seule recruter la machinerie transcriptionnelle en se liant à l'ADN de façon Gal4BD-indépendante.

Nous avons utilisé le double hybride levure, afin de tester les interactions de la MetRS entière et éventuellement modifiée post-traductionnellement avec d'éventuels partenaires protéiques précédemment identifiés par TAP. La MetRS est exprimée en fusion avec le domaine Gal4AD en N-terminal ainsi que l'étiquette HA en C-terminal. Ce choix a été fait dans le but de voir si cette construction seule permettait la croissance sur milieu sans histidine, témoignant d'une interaction de la MetRS avec l'ADN.

Une fois encore, nous avons choisi d'utiliser Arc1 comme témoin positif de l'interaction avec la MetRS (Tableau 24). Le choix d'un témoin négatif s'est porté sur la Pgc (Phospho-Glycérate Kinase), enzyme clé de la glycolyse, n'ayant a priori pas d'interaction avec la MetRS. Nous avons choisi de tester à nouveau Rpb7, ainsi que deux importines, Kap60 et Kap104, identifiées par Nano-LC/MSMS à la suite d'expériences de TAP. Les protéines testées sont exprimées en fusion avec le domaine Gal4BD en N-terminal et avec l'étiquette c-myc en C-terminal.

Protéine à tester	Fonction	Obtenu en TAP-Tag
Arc1	Ancre cytoplasmique du complexe AME	Oui
Pgc1	Enzyme métabolique	Non
Rpb7	Sous-unité de l'ARN pol II	Oui
Kap60	Importine α	Non
Kap104	Importine β	Oui

Tableau 24. Protéines candidates testées en double hybride levure et leur fonction principale.

L'immunodétection réalisée sur des extraits protéiques issus des levures diploïdes contenant les plasmides permettant l'expression de la MetRS et des protéines

à tester montre que toutes les protéines de fusions étiquetée HA ou c-Myc sont exprimées (Figure 29).

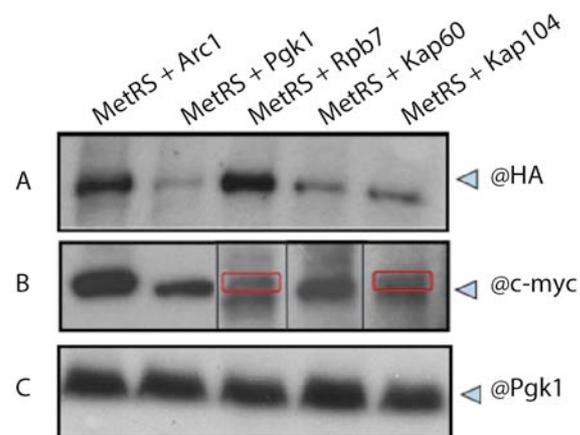


Figure 29. Immunodétection de l'étiquette HA ou C-Myc sur des extraits bruts de souches exprimant les différentes constructions testées en double hybride levure. A : immunodétection de l'étiquette HA ; **B :** immunodétection de l'étiquette c-myc ; **C :** immunodétection de la Pgk, contrôle de dépôt.

Le test en gouttes réalisé sur milieu SCGlu-Leu-Trp permet de tester la validité des souches diploïdes utilisées dans le test de double hybride (Figure 30). Sur cette boîte contrôle supplémentée en histidine, l'ensemble des diploïdes montre une croissance similaire après deux jours d'incubation à 30°C.

Nous avons envisagé la possibilité qu'une modification post traductionnelle ayant lieu en respiration puisse jouer un rôle important dans l'import nucléaire. C'est pourquoi l'expérience de double hybride levure a été menée en fermentation (SCGlu), où la croissance est optimale, et en respiration (SCGly), où la croissance est plus lente, afin de pouvoir se placer dans les conditions physiologiques similaires à l'import nucléaire de la MetRS chez la levure. La supplémentation du milieu en 3AT, toxique pour les levures ne disposant pas de leur propre voie de biosynthèse de l'histidine, n'a pas été réalisée pour la condition fermentation car aucune croissance n'était observée, même pour le témoin positif. Le témoin positif utilisé exprime la nucléoplasmine et nufip (nuclear FRMP interacting protein) en fusion avec les domaines Gal4AD et Gal4BD respectivement, et nous a été fourni par le prof Bruno Charpentier comme l'intégralité du matériel biologique. L'interaction entre ces deux protéines est normalement robuste, mais leur expression dans le diploïde n'a pas été testée.

Que ce soit en conditions de fermentation (en absence de 3AT) ou de respiration (en présence de 3AT), nous pouvons constater que les profils de croissance sont

similaires. La souche diploïde exprimant les constructions Gal4BD-Nufip et Gal4AD-Nucléoplasmine **(1)** correspond au témoin positif d'interaction du test et montre une croissance similaire à celle observée sur milieu SCGlu-Leu-Trp. Le diploïde exprimant le domaine Gal4BD et la construction Gal4AD-Nucléoplasmine **(2)** montre une croissance très limitée, voire nulle, après cinq jours d'incubation. Ce témoin correspond quant à lui au témoin négatif d'interaction. Le diploïde exprimant le domaine Gal4BD et la construction Gal4AD-MetRS **((3), (6), (9), (12), (15))** ne montre aucune croissance significative en comparaison des deux témoins. Le test de double hybride pour cette construction est donc négatif.

Le diploïde exprimant la construction Gal4BD-Arc1 et Gal4AD-MetRS **(5)** constitue un témoin positif car l'interaction entre ces deux protéines a été démontrée par diverses approches et différentes équipes de recherche. Toutefois, l'activation reste faible comparé à la construction **(1)**. Ceci peut s'expliquer par le fait que la protéine Arc1 possède un NES intrinsèque, entraînant donc un ré-export cytoplasmique d'une partie de la protéine produite. Cette hypothèse est appuyée par la publication de *Galani et al.* 2001 montrant que la fusion NLS SV40-Arc1 n'entraîne pas l'accumulation nucléaire de la protéine étiquetée à la GFP. Concernant Pgc1 **(6) (7) et (8)**, on peut constater que le test est négatif, comme attendu, Pgc1 étant une protéine n'ayant jamais été rapportée comme interagissant avec la MetRS.

Les importines Kap60 et Kap104 montrent une croissance correspondant à une autoactivation **(13) et (16)**. Une activation de la voie de biosynthèse de l'histidine est en effet observée lorsque les protéines sont testées seules. Ces deux importines étant fusionnées au domaine de liaison à l'ADN (BD), il est possible que l'activation observée soit tout simplement due à la capacité de ces protéines de reconnaître et de lier spécifiquement d'autres protéines possédant des NLS, puisque ce sont des karyophérines. Ainsi, si Kap60 et Kap104, fixées au promoteur *GAL1* capturent des protéines comme des facteurs/co-facteurs de la transcription ou même des sous-unités de l'ARN pol II, l'activation du gène en amont est possible. Ces tests révèlent toutefois un changement physiologique intéressant. En effet, les diploïdes exprimant Gal4BD-Kap60 x Gal4AD-MetRS **(14)** et Gal4BD-Kap104 x Gal4AD-MetRS **(17)** ne montrent plus aucune activation. Cette observation suggère que la présence de la MetRS inhibe l'autoactivation observée précédemment, révélant donc une possible interaction entre ces importines et la MetRS. Notre hypothèse est qu'il est possible que l'interaction de

Kap60 ou Kap104 avec la MetRS induise un changement conformationnel, ne permettant alors plus à Kap60 ou Kap104 de recruter spécifiquement les facteurs de transcription qui permettaient précédemment l'activation du gène rapporteur HIS3. *In vivo*, la MetRS est transportée jusqu'au noyau par le biais d'importines. Cette protéine possédant deux NLS intrinsèques dont un potentiel NLSpy spécifique de Kap104, il est donc possible qu'elle interagisse spécifiquement avec Kap60 et Kap104.

L'interaction entre Rpb7 et la MetRS n'est pas confirmable ici, car le test du double hybride levure pour ces deux protéines fonctionne « à l'envers » comme expliqué précédemment **((9), (10), (11))**.

La relocalisation de la MetRS dans le noyau induit une régulation de l'expression de certains gènes codant pour les sous-unités des complexes III et V de la chaîne respiratoire, accordant ainsi à la MetRS un possible rôle de facteur ou co-facteur de la transcription. Cette hypothèse est appuyée par l'autoactivation observable pour la MetRS uniquement en condition de respiration (Figure 30 **(3),(6),(9),(12)(15))**). Il est donc envisageable que la transition diauxique chez *Saccharomyce cerevisiae* induise une modification post traductionnelle de la MetRS, lui permettant ainsi de jouer son rôle de facteur ou co-facteur de la transcription.

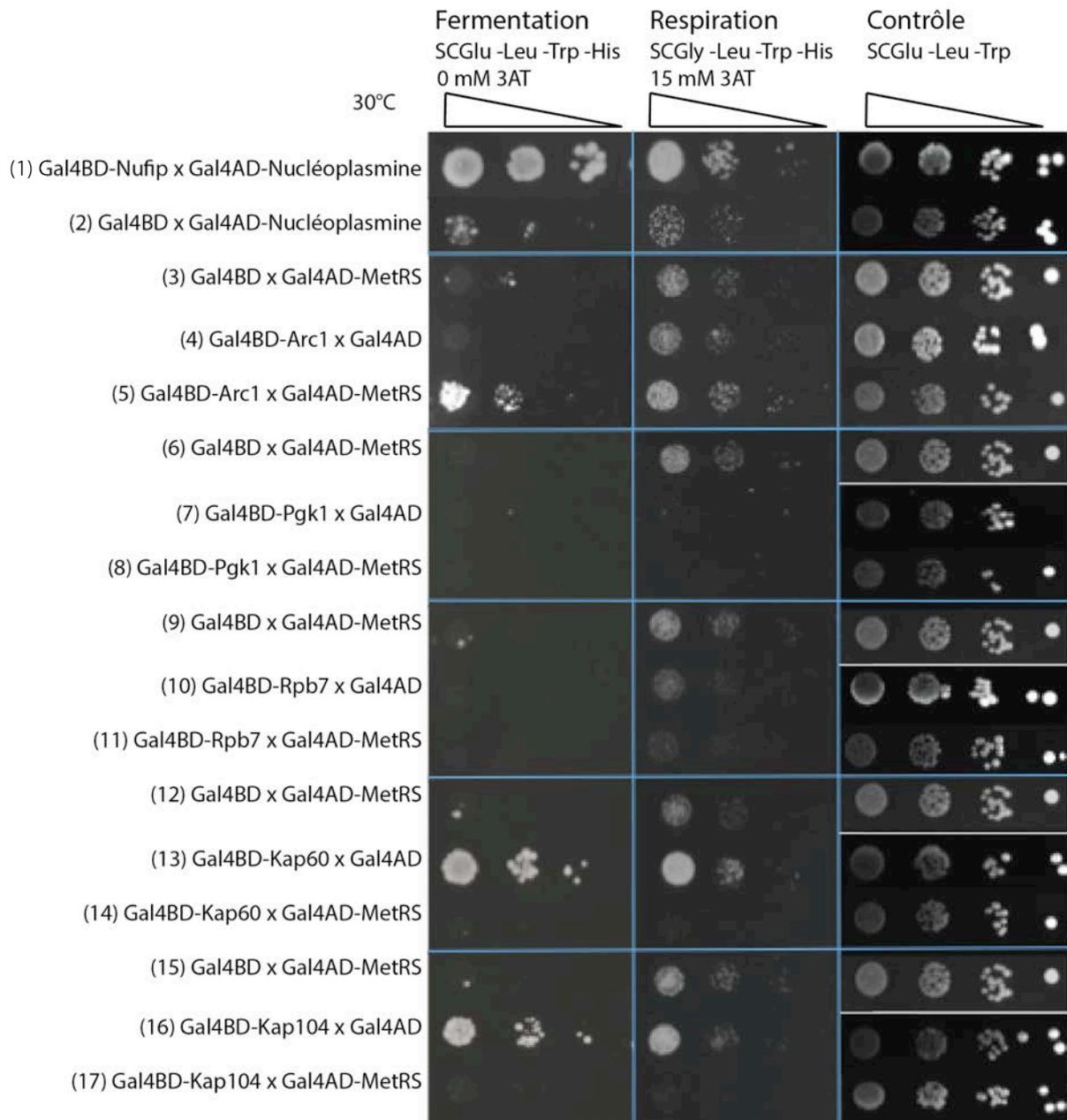


Figure 30. Analyse phénotypique des diploïdes du double hybride par test en gouttes. Les tests ont été réalisés à 30°C, sur milieu contenant du glycérol (SCGly) ou du Glucose (SCGlu) comme source de carbone, et supplémenté ou non en 3 aminotriazol (3AT) analogue toxique de l'histidine. Les photos des expériences en fermentation et respiration ont été prises au cinquième jour d'incubation, et celle du contrôle au deuxième jour d'incubation.

II.3 La MetRS possède un 2nd NLS

Suite à la publication de l'article dans *Molecular Cell*, nous avons entrepris de confirmer et de caractériser le NLS de la MetRS précédemment identifié : la première expérience que j'ai effectuée a consisté à supprimer le NLS que j'avais identifié de la MetRS et de vérifier, par microscopie, l'absence de relocalisation nucléaire de cette MetRS fusionnée à la GFP. Ensuite, afin de procéder à la caractérisation moléculaire du

NLS, la séquence a été mutée dans le gène codant la protéine entière. Généralement, les résidus basiques des NLS sont connus pour être à la base de la reconnaissance entre NLS et importine et ce sont les codons codant ces aa que j'ai mutés en priorité. J'ai également muté le codon codant une sérine, phosphorylable, qui se trouvait la plus à proximité du NLS, afin d'évaluer l'importance d'une phosphorylation pour l'import nucléaire. Les résidus qui ont été mutés sont les suivants : K9 en alanine (K9A), K11A, K12A, K34A, K37A, S10D (mutant phospho-mimétique), S10A (mutant non-phospho-mimétique).

Cependant, les résultats de la délétion de la partie du gène codant le NLS (contenu dans les 55 premiers aa) n'ont pas donné le résultat attendu. La protéine MetRS^{Δ2-55}-GFP, présente une localisation cytoplasmique et nucléaire (Figure 31), ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse qu'il devait donc exister au moins un deuxième NLS entre le 55^{ème} et le 750^{ème} résidu de la MetRS.

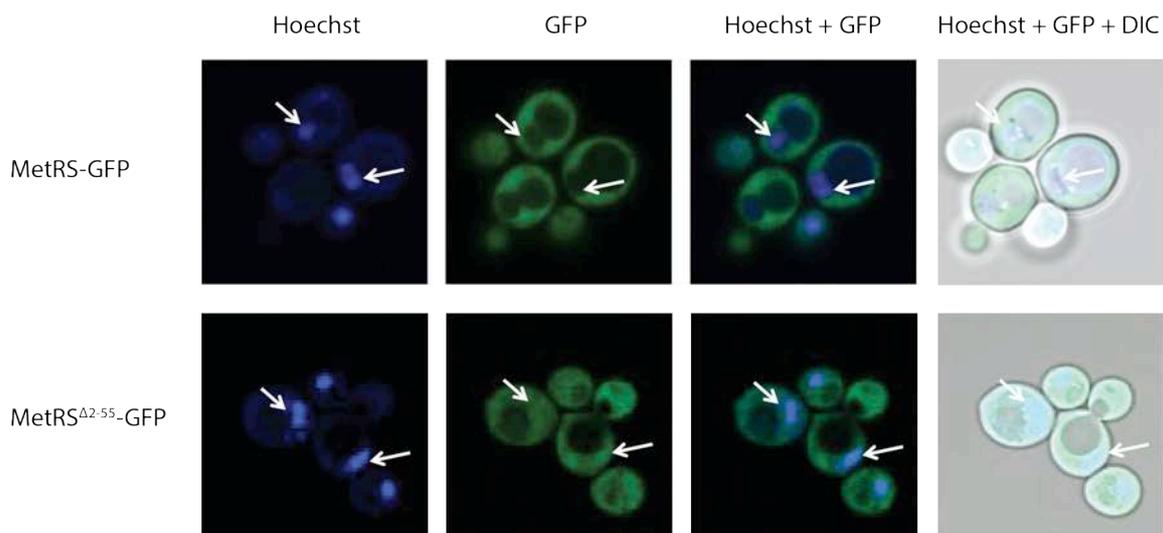


Figure 31. Microscopie confocale des souches exprimant la MetRS étiquetée GFP en C-terminal (en haut) ou la MetRS dont les aa 2 à 55 sont supprimés, étiquetée GFP en C-terminal. Les souches ont été cultivées en fermentation.

Afin d'identifier ce deuxième NLS putatif, nous avons poursuivi la délétion récurrente de l'extension N-terminale de la MetRS. J'ai délété la partie du gène codant du 2^{ème} au 160^{ème} aa (extension N-terminale complète). La protéine exprimée possède toujours une localisation nucléaire, montrant que le deuxième NLS n'est pas contenu dans la partie N-terminale de la MetRS (Figure 32).

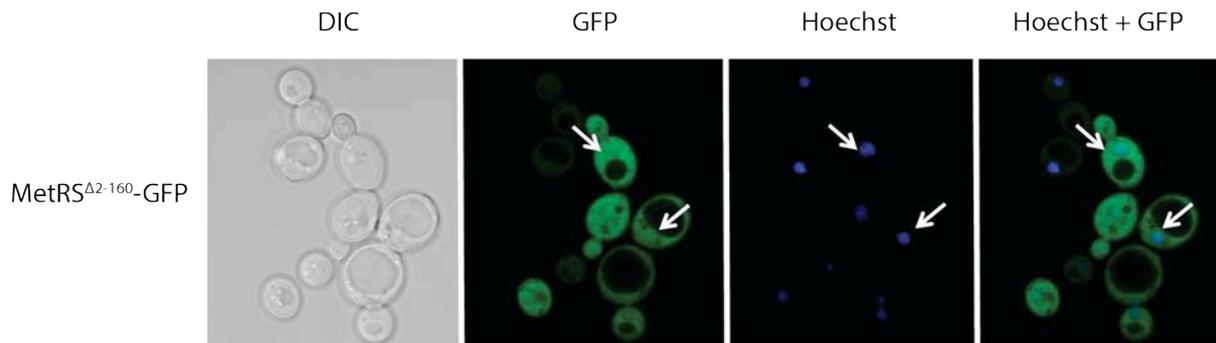


Figure 32. Microscopie confocale de la souche exprimant le variant de la MetRS dont les aa 2 à 160 sont supprimés, étiquetée GFP en C-terminal. La souche a été cultivée en fermentation.

A l'heure actuelle, nous possédons une hypothèse concernant ce deuxième NLS. Lors des expériences de TAP, nous avons obtenu deux importines différentes : Kap95, dont la présence était cohérente avec l'existence du 1^{er} NLS de la MetRS, et Kap104, importine spécifique des NLSpy. Lorsque Kap104 avait été identifié suite à la purification TAP, sa présence parmi les interactants de la MetRS ne nous avait pas paru justifiée, puisque nous ne savions pas que la MetRS devait posséder un deuxième NLS. Cependant, ce résultat prenait maintenant tout son sens, et nous a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle le deuxième NLS de la MetRS pouvait être un NLSpy. Les NLSpy, présentés en introduction (§ III.1.2), possèdent le consensus suivant : aa hydrophobes ou basiques (dispensables) - R/K/HX₍₂₋₅₎PY.

Il existe, au sein de la séquence peptidique de la MetRS, deux segments différents présentant le dipeptide proline-tyrosine (Figure 33)



Figure 33. Séquences peptidiques se trouvant en N-terminal des résidus PY de la MetRS. **A** : séquence allant du 189^{ème} au 206^{ème} aa de la MetRS. **B** : séquence allant du 674^{ème} au 691^{ème} aa de la MetRS. Les aa sur fonds colorés sont conservés chez les levures. Les aa sur fond blanc ne sont pas conservés et leurs propriétés chimiques non plus. Bleu clair : aa hydrophobe ; bleu turquoise : aa aromatique ; en jaune : aa cyclique ; en rose : aa basique ; en violet : aa acide et en vert : aa hydroxylé/soufré.

Pour la première des deux possibilités (Figure 33A), le consensus n'est pas totalement respecté car les deux aa basiques sont éloignés de huit positions par rapport

aux résidus PY. En amont du deuxième PY (Figure 33B), il n'y a pas d'aa basique à proximité immédiate. Cependant, cette deuxième séquence possède de nombreux aa hydrophobes, caractéristiques des NLSpy.

Il paraît plus probable, d'après les caractéristiques énumérées précédemment, que le NLSpy soit contenu dans la séquence **A**. Ainsi, j'ai réalisé des mutagénèses par PCR des triplets de nucléotides codants les résidus PY de cette séquence, dans un contexte du gène MES1 entier ou alors délété de la séquence codant le 1^{er} NLS (55 premiers aa). A présent, des expériences de génétiques vont être réalisées sur des souches contenant ces gènes mutés.

III Discussion

Le couplage des techniques de purification par affinité en tandem et de double hybride bactérien nous a permis de confirmer que la MetRS, et plus particulièrement sa partie N-terminale, interagit avec des composants la machinerie transcriptionnelle, et notamment Rpb7 et Rpb4, sous-unités de l'ARN pol II. Rpb1 a également été identifié par TAP, mais nous n'avons pas pu confirmer ce résultat en double hybride bactérien en raison de la taille importante de cette protéine, inadaptée pour une bactérie. Il semblerait que l'activité de facteur de transcription de la MetRS soit en majeure partie portée par son extension N-terminale, qui contiendrait le domaine d'activation. Il existe plusieurs cas référencés de protéines possédant un domaine d'activation transcriptionnel en N-terminal. P53, suppresseur de tumeur chez l'Humain, est un régulateur transcriptionnel dont la partie activatrice se situe en N-terminal (Laptenko et al, 2006).

De façon inattendue, j'ai mis en évidence une interaction entre le domaine N-terminal de la MetRS et Gcn4, facteur de transcription, qui pourrait être médiée par leucines zippers présent dans ces deux protéines. Gcn4 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes requis pour la biosynthèse des aa et des purines. Elle possède un domaine d'activation spécifique en N-terminal (Hope and Struhl, 1986), et tout comme la MetRS, possède la capacité d'interagir avec des sous-unités de l'ARN pol II (Brandl and Struhl, 1989). La MetRS humaine est phosphorylée par la kinase Gcn2, issu de la même voie de régulation que Gcn4 (Magazinnik et al, 2005 ; Kwon et al, 2011), ce qui renforce le fait que la MetRS de *S. cerevisiae* puisse effectivement interagir avec

Gcn4. A présent, il faudrait confirmer ce résultat dans la levure, et d'après la fonction de Gcn4, une expérience de TAP en conditions de carences en aa serait plus adaptée que les conditions que nous avons jusqu'à présent utilisées.

En double hybride levure, aucune interaction physique entre Rpb7 et la MetRS ne semble avoir lieu dans les conditions testées. Cela signifie peut-être que le domaine d'interaction situé en N-terminal de la MetRS n'est pas accessible par Rpb7 dans les conditions testées, ou que ce domaine est rendu inaccessible par le domaine Gal4AD fusionné à la partie N-terminale de la MetRS. Les résultats des tests d'interaction entre la MetRS et les importines semblent quant à eux inversés, ce qui n'exclue pas une interaction mais ne permet pas non plus de la confirmer.

Les nombreuses protéines du ribosome mitochondrial et du nucléole qui ont été purifiées par TAP, nous permettent de supposer que tout comme son homologue humain (Ko et al, 2000), la MetRS de *S. cerevisiae* pourrait être impliquée dans la biogénèse des ribosomes. Chez les procaryotes, il a été montré que la biogénèse des ribosomes était régulée par les ARNt non-aminoacylés, comme un moyen de ressentir la concentration intra-cellulaire en ARNt (Cozzone et al, 1980). Ce mécanisme n'est pas employé chez les eucaryotes, mais il serait cohérent qu'une protéine telle que la MetRS, impliquée dans l'aminoacylation des ARNt, soit utilisée comme régulatrice de la biogénèse des ribosomes. En effet, une telle régulation permettrait de faire le lien entre deux mécanismes ayant lieu dans des compartiments différents, cytosol et nucléole.

Enfin, le NLS contenu dans les 55 premiers aa de la MetRS est reconnu par l'importine Kap95, classiquement dédiée à ce mécanisme. Cependant, nos expériences de microscopie nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'au moins un ou deux NLS supplémentaires, se situant au-delà de l'extension N-terminale et/ou dans la partie C-terminale de la MetRS. Il s'agit là d'un deuxième point commun avec la MetRS d'*H. sapiens*, qui possède également 2 NLS (Ko et al, 2000). Une de nos expériences de TAP de la MetRS nous a permis d'identifier Kap104, nous amenant à émettre l'hypothèse selon laquelle ce(s) NLS supplémentaire(s) pourrai(en)t être du type NLSpy, répertorié chez *H. sapiens* mais également *S. cerevisiae* de manière très limitée (Lange, 2008 ; Suel and Chook, 2009). L'existence de ces NLS situés hors de la partie N-terminale modulatrice de la transcription, a éveillé nos soupçons quant à son rôle. Effectivement, quel est le rationnel pour justifier une telle redondance de NLS, si ce n'est de garantir à tout prix l'import nucléaire de la MetRS ?

IV Article : « Expression of Nuclear and Mitochondrial Genes Encoding ATP Synthase Is Synchronized by Disassembly of a Multisynthetase Complex. »

Expression of Nuclear and Mitochondrial Genes Encoding ATP Synthase Is Synchronized by Disassembly of a Multisynthetase Complex

Mathieu Frechin,^{1,7,8,9,*} Ludovic Enkler,^{1,8} Emmanuel Tetaud,^{2,3,8} Daphné Laporte,¹ Bruno Senger,¹ Corinne Blancard,^{2,3} Philippe Hammann,⁴ Gaétan Bader,¹ Sandra Clauder-Münster,⁵ Lars M. Steinmetz,^{5,6} Robert Pierre Martin,¹ Jean-Paul di Rago,^{2,3,*} and Hubert Dominique Becker^{1,*}

¹Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, UMR 7156, CNRS, Université de Strasbourg, 21 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, 1 Rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France

³Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, Université Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

⁴Plateforme Protéomique de l'Esplanade, Université de Strasbourg, CNRS- FRC1589, IBMC, 15 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

⁵European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Genome Biology Unit, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany

⁶Stanford Genome Technology Center, Stanford University, Palo Alto, CA 94304, USA and Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA

⁷UPR Architecture et Réactivité de l'ARN, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, CNRS, 15 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

⁸Co-first author

⁹Present address: Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zurich, Switzerland

*Correspondence: mathieu.frechin@uzh.ch (M.F.), jp.dirago@ibgc.cnrs.fr (J.-P.d.R.), h.becker@unistra.fr (H.D.B.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.015>

SUMMARY

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 F_1F_0 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.

INTRODUCTION

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) constitute a family of ubiquitous enzymes essentially known for their primary function in pro-

tein 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 (aa) or cell wall synthesis (Roy et al., 2003; Stewart et al., 1971). Other unconventional functions have been associated with an additional distinctive feature of aaRSs in higher eukaryotes: their capacity to assemble into large multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes (MSCs) (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 glutamyl-tRNA^{Gln} (Q-_mtRNA^Q) by the GatFAB, the mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase (AdT) (Frechin et al., 2009, 2010).

As there is no other source of Q_mtRNA^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 available online).

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 F₁ sector of this enzyme where the ATP is synthesized, this will 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 mtDNA-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 F_O 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 Downregulation and Relocation of cERS and cMRS to the Mitochondria and the Nucleus, Respectively

S. 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 remodeling program called diauxic shift (DS) allowing cells to metabolize nonfermentable carbon sources like ethanol, glycerol, and lactate through OXPHOS (second growth phase, Figure 1A) (Zaman et al., 2008). Quantitative real-time PCR shows that

amounts of *ARC1* 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; Figures S1A–S1F). To know how *ARC1* expression is modulated, we analyzed *ARC1* 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 quantitative real-time PCR quantification showed that the Snf1p kinase, the nuclear-import factor Gal83p, and the Mig1p·Hxk2p transcription factor complex are required to repress *ARC1* transcription upon switch to respiration (Figures 1D and S1G; Table S2; Hedbacker and Carlson, 2008). Fitting our data into the well-established Snf1/4 network (Figure S1G; McCartney and Schmidt, 2001; Zaman et al., 2008) suggests that transcription of *ARC1* is activated by Mig1·Hxk2 (Santangelo, 2006; Schüller, 2003; Figure 1E), whereas repression results from activation of the Snf1/4 complex and nuclear exclusion of Mig1p·Hxk2p (Figure 1F).

Out of the three AME complex components, only Arc1p is subjected to a major downregulation at the DS (Figures 1B–1D and 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 colocalized 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 versus fermenting cells (Figure 2C). The first 55 aa of cMRS harbor a bipartite 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 Rpb1p and -7p coeluted with cMRS in tandem affinity purification of nuclear extracts (Figures 2E, 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 Experimental Procedures). 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

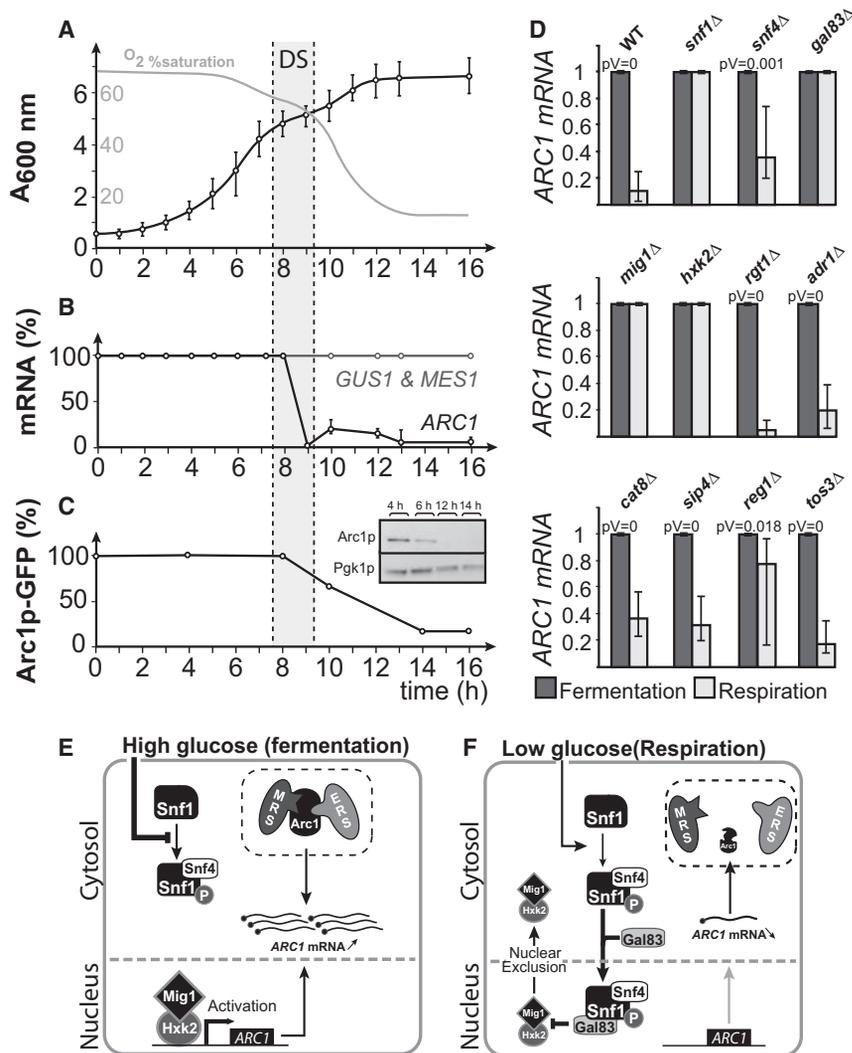


Figure 1. AME Complex Disassembly Is Induced by Snf1/4 Kinase-Mediated Transcription Inhibition of ARC1 at the Diauxic Shift

(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) Quantitative real-time PCR quantification of *ARC1*, *GUS1* (cERS), and *MES1* (cMRS) mRNAs (n = 3). Before the DS the p values of each mRNA quantification compared to their quantifications 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) Quantitative real-time PCR quantification of *ARC1* mRNA in fermentation (dark gray) and respiration (light gray) in strains deleted from genes of the Snf1/4 pathway components (SEM, p values, see Table S2, n = 4). (E and F) Implementation of our data in (D) into the well-documented Snf1/4 pathway (Zaman et al., 2008).

inability to consume ethanol produced during growth on galactose (Figures 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

(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 from binding to Arc1p (see Experimental Procedures). The expected distribution of cMRS and cERS in cells of these strains was confirmed by the following: (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, 2I, and 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; Figures 3A and 3B, left). 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 (Figures 3A and 3B, right; Figures S3B and S3C). The respiratory deficiency of the nM strain was further confirmed by its

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

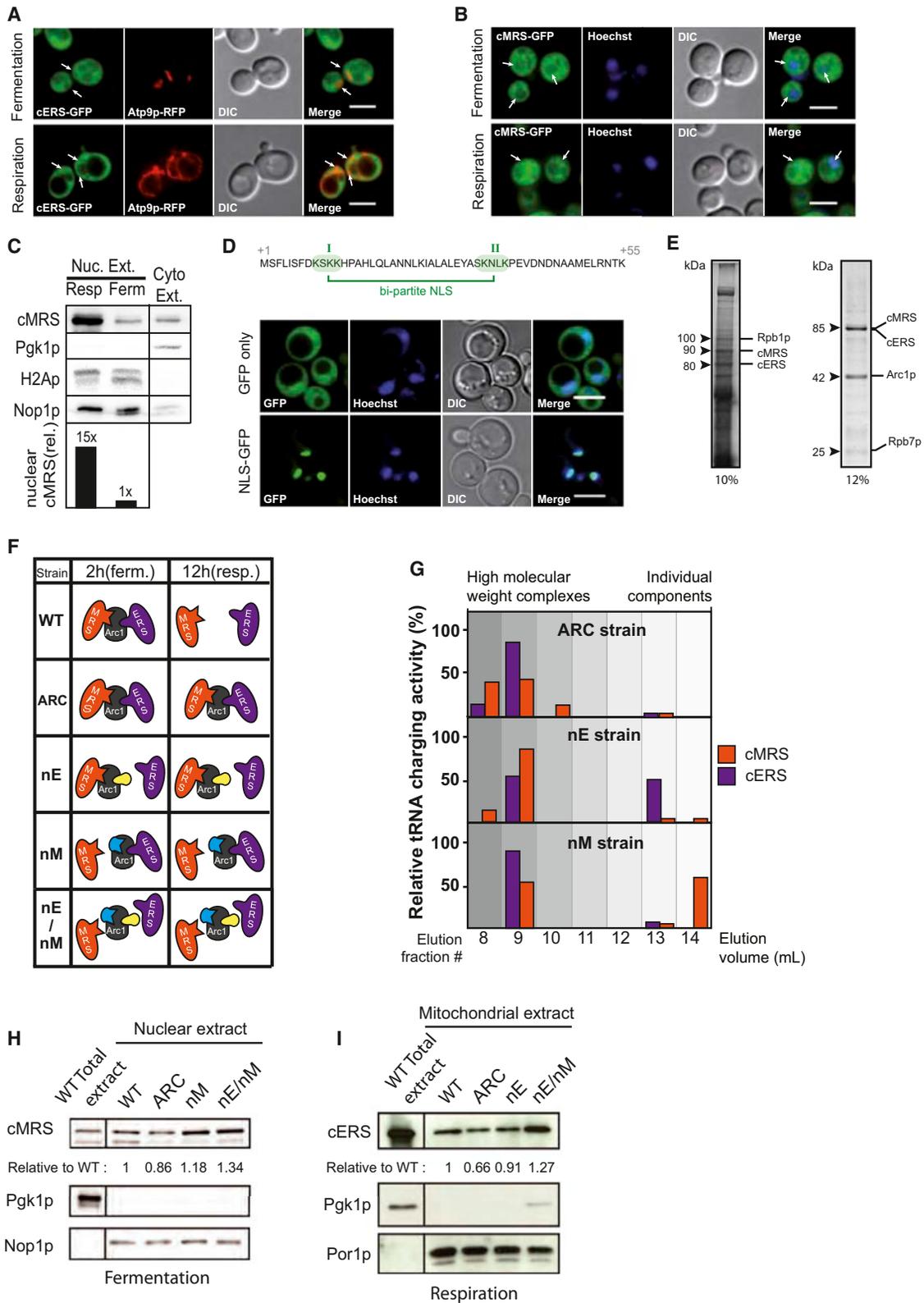


Figure 2. Reprogramming Disassembly of the AME Complex and Subcellular Relocation of cMRS and cERS by Expressing Competing Arc1p-Binding Domains

(A) Colocalization (arrowheads) of GFP-tagged cERS with Atp9p-RFP.

(legend continued on next page)

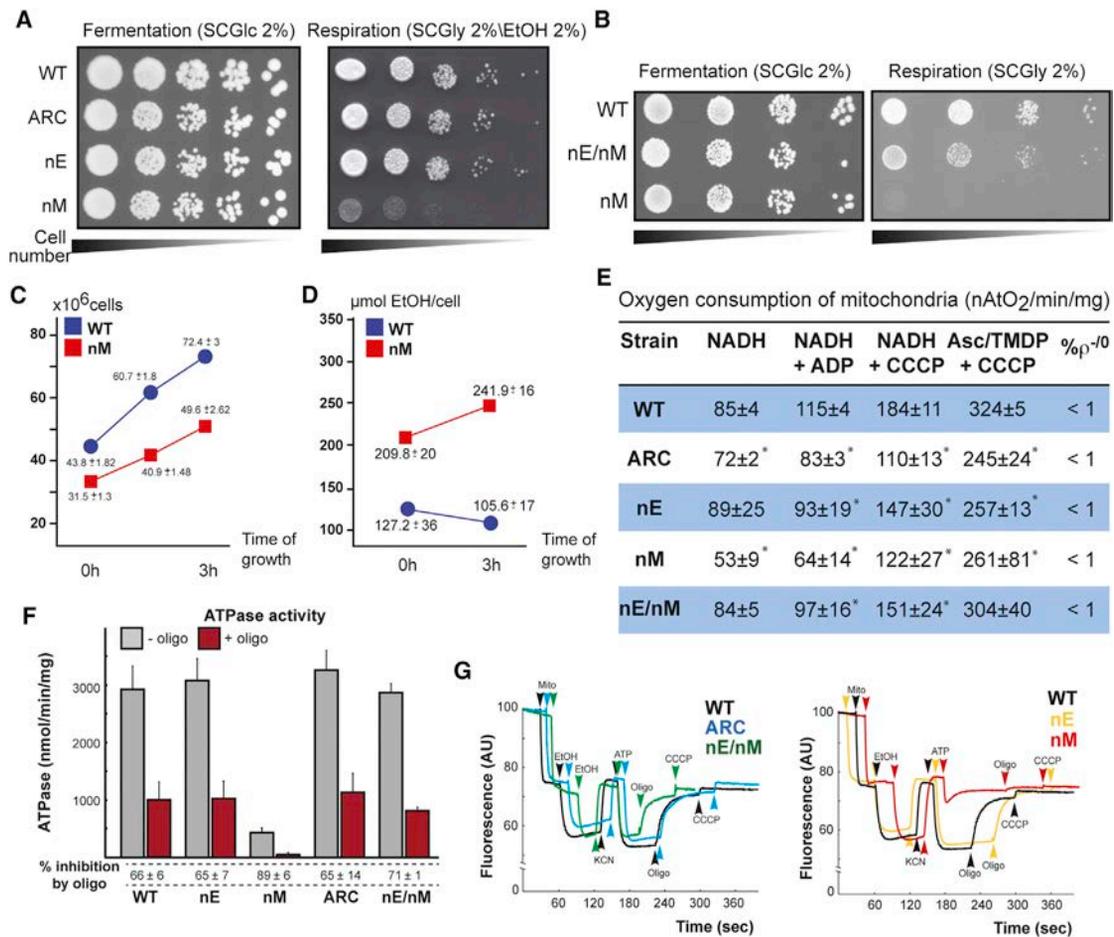


Figure 3. Desynchronized Disassembly of the AME Complex Impairs Growth on Respiratory Media Due to a Severely Diminished ATPase Activity

(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 and D) (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 *petite* cells (% ρ^{-0}) in cultures is shown ($n = 3$). p values were calculated with a Student's z test, * $p < 0.001$.

(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%.

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 and increased by 5%–10% in the nE and nE/nM strains, whereas a 40%–50% deficit was measured in the nM strain (Figure 3E). In all strains, respiration was efficiently (3- to 4-fold) stimulated by CCCP, indicating a normal

(B) Colocalization (arrowheads) of GFP-tagged cMRS with Hoechst-stained nuclei; 24% of yeast cells in respiration conditions show this relocation ($n = 200$).

(C) Immunoblot quantification of cMRS levels in normalized (Nop1p, H2Ap) purified (Pgk1p) nuclear extracts from fermenting (ferm) and respiring (resp) cells.

(D) Confocal colocalization 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.

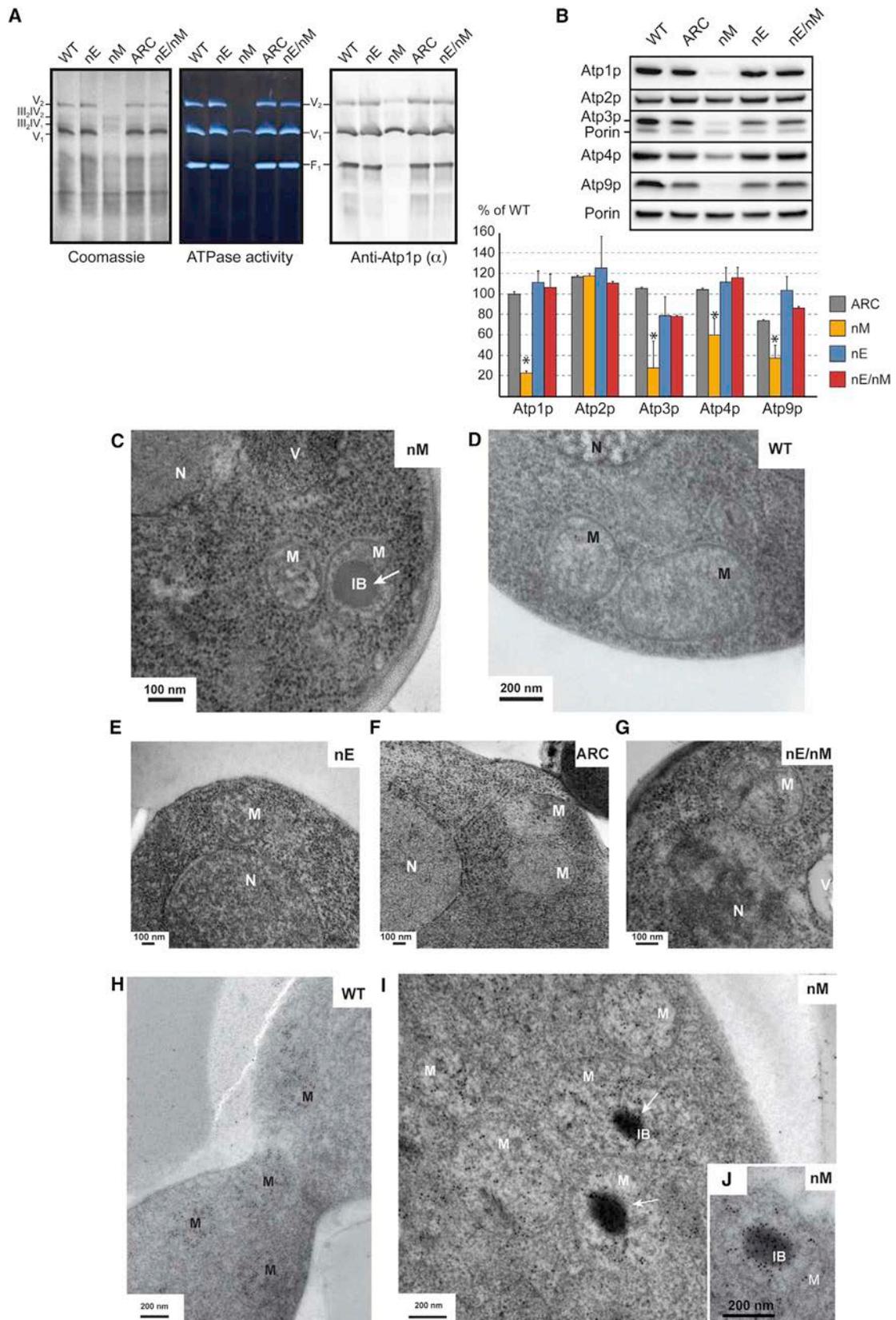
(E) 10% (right) and 12% (left) PAGE of cMRS-TAP interactants pulled down using tandem affinity purification on nuclear protein extracts and identified using mass spectrometry. For spectrum count see Figure S2.

(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 relocation in the mitochondria in nE and nE/nM strains in respiration (SCGly 2%). Scale bars in (A), (B), and (D), 5 μm .



(legend on next page)

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 F_1 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 F_1 and F_0 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 F_1 -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 F_1 -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 (Figures 4B and S4A). The protein partner of Atp1p, the β - F_1 subunit of ATP synthase (Atp2p), showed a normal accumulation. Since unassembled Atp2p has a strong propensity to aggregate (Lefebvre-Legendre et al., 2005), 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 (Figures 4C–4J and S4B, right and left) 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

[35 S]-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 (Fig-

ure 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, 6 hr after switching the cells in a glycerol/ethanol medium (Figures 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 OXPHOS (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 F_1 (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 F_1 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 (*fmc1* Δ), 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 upregulated in the nM strain compared to the ARC strain (up to 10-fold, see Figure 5D), while they are downregulated in the nE or ARC strains as compared to WT (Figure 5E), and those of complex IV subunits were not affected (Figure S5C; Tables S4–S6). These data may explain why the nM strain retains a good content in respiratory enzymes despite its major defect in F_1 .

Ectopic Expression of ATP1 Alleviates the Respiratory Phenotype of the nM Strain

Since the most striking effects in the nM strain were 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

Figure 4. Desynchronized AME Complex Disassembly Impairs Expression of Nuclear- and Mitochondrial-Encoded ATP Synthase Subunits and 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 (V_1 , monomers; V_2 , dimers) and free F_1 were monitored by ATPase activity. The complexes III and IV (III_2 – IV_2 ; III_2 – IV_1) were monitored by BN-PAGE (Coomassie). Cells were grown on SCGal 2%.

(B) Immunoblot and related quantifications (SEM, * $p < 10^{-4}$ 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%.

(C–G) Electron microscopy images of WT and desynchronized strains grown in SCGal 2%. M, mitochondria; N, nucleus; V, vacuole; arrow indicates presence of inclusion bodies (IB).

(H–J) Immunogold detection of Atp2p (β - F_1 subunit) carried out on electron microscopy slides of the WT (H) and nM (I and J) cells grown in SCGal 2% shows that inclusion bodies (IB, arrows) within nM mitochondria (M) contain aggregated Atp2p subunits.

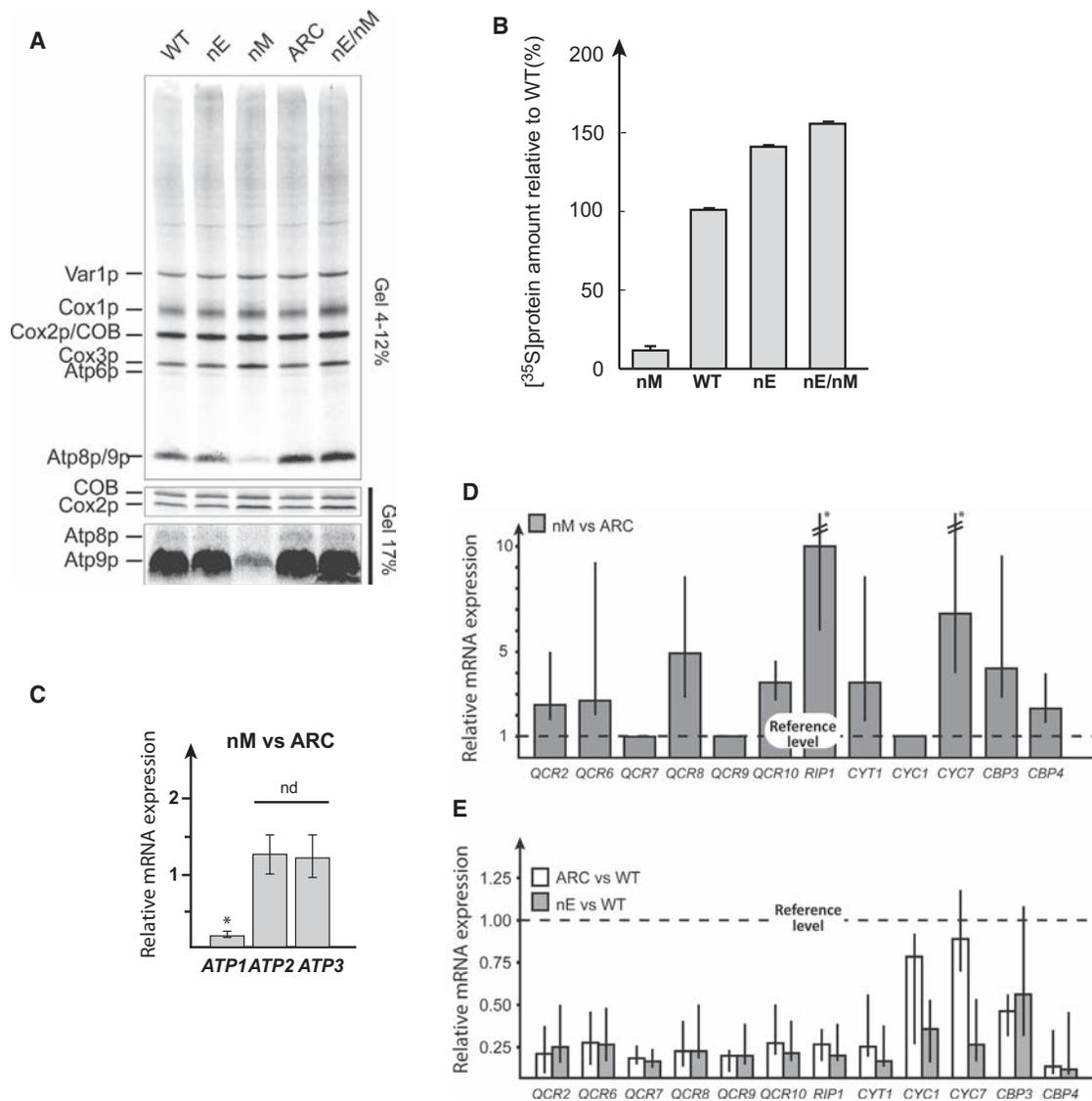


Figure 5. Influence of a Defective Disassembly of the AME Complex on the Transcription of *ATP1* and Nuclear-Encoded Complex III Genes and Mitochondrial Translation Rate

(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 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 20 min of incubation (SEM, $p < 10^{-3}$ compared to WT, $n = 3$).

(C) Quantitative real-time PCR comparative quantification of *ATP1*, -2, and -3 mRNAs in the nM compared to ARC strain grown in SCGal 2% ($*p < 10^{-3}$; nd, not different, $p > 0.05$; SEM, $n = 6$).

(D and E) (D) Quantitative real-time PCR quantification of mRNAs of complex III components when cMRS is artificially released (nM strain) versus confined in the cytoplasm (ARC strain) or (E) when cMRS is artificially confined in the cytoplasm (ARC or nE strain) versus naturally released (WT) in respiration (normal release of cMRS) (SEM, $*p$ value, see Table S3, $n = 4$).

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 un-

able to do so (Figures 6A and S6A). 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 (Figures 6D and 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 (WT) 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 WT 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, resynchronizing 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 (Figures 4B, 4G, and 3B–3G) and restores global mitochondrial translation of the nM strain (Figures 5A, 5B, and S5B). A recent study demonstrated that F₁ promotes F₀ mitochondrial translation (Rak and Tzagoloff, 2009). Thus, the very low mitochondrial translation rate originating from cytoplasmic confinement of cERS and decreased levels of Arc1p results in insufficient synthesis of F₀ to allow adequate 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

MSCs 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, and although the rationale for their existence is still unclear, they seem to be dynamical edifices releasing aaRSs able to exert functions other 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 aaRS components (cERS and cMRS) are released due to a strong downregulation of the anchor protein Arc1p by the glucose-sensing Snf1/4 pathway (Figures 1B–1F). We show that released cERS and cMRS partially relocate into mitochondria and the nucleus, respectively (Figures 2A–2D). 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 an example of a synchronized

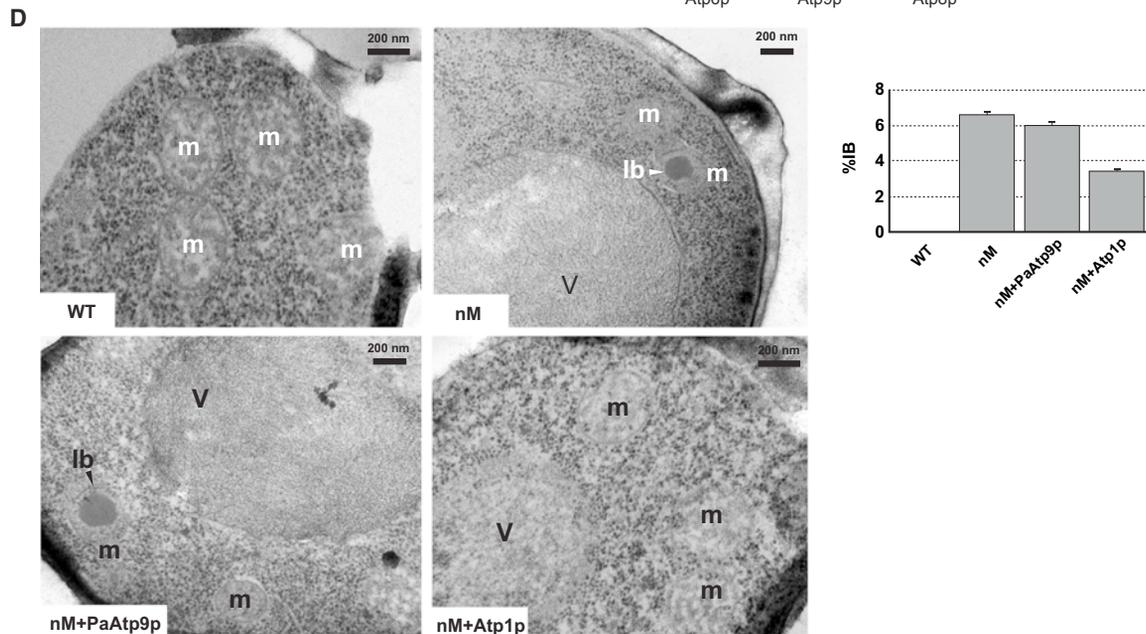
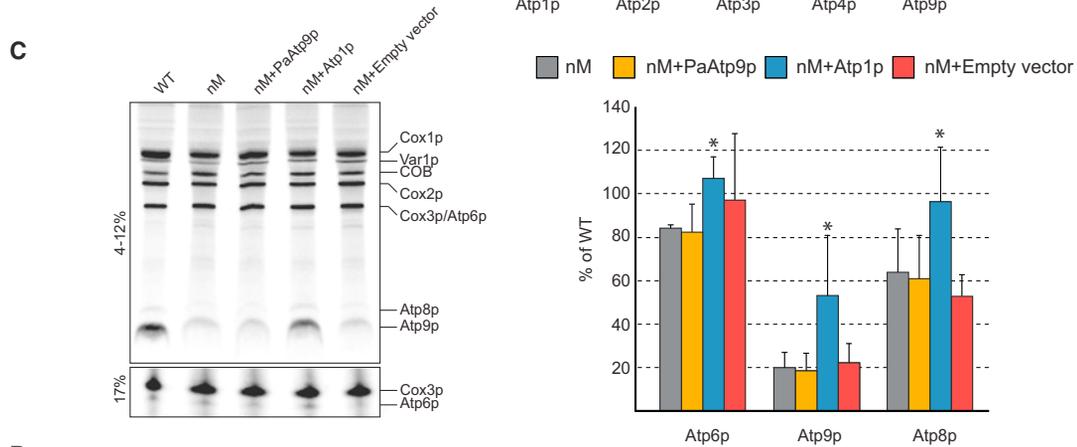
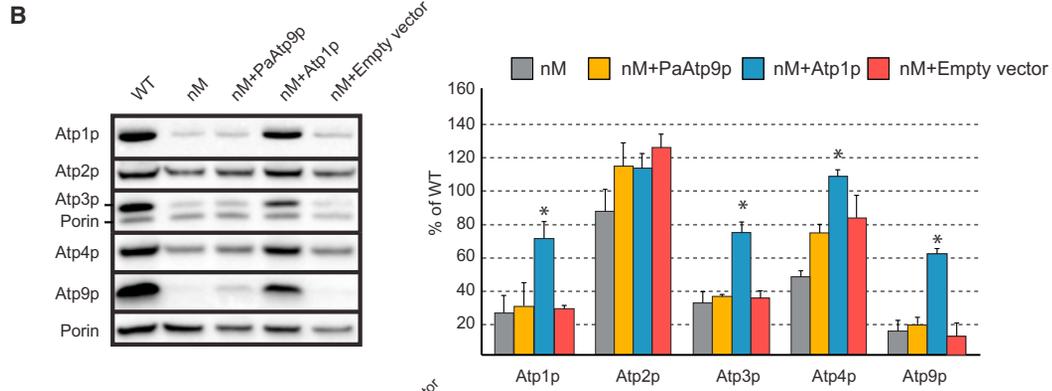
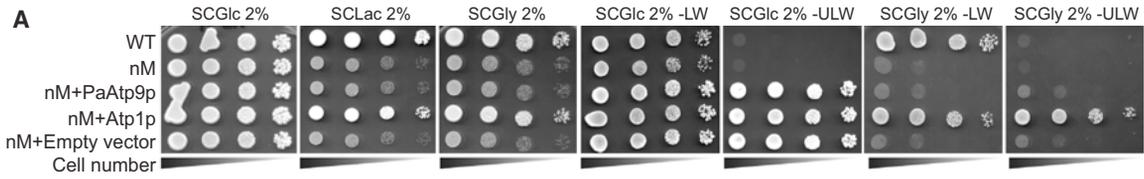
release of multiple aaRSs from an MSC and subsequent relocation to two distinct cellular compartments, nucleus and mitochondria.

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, which is, with Mig1p, one of the two transcription factors also inhibiting *ARC1* transcription (Ashe et al., 2000). This suggests that the AME complex dynamics participate in the intimate connection existing between the metabolic state of the yeast cell and its translational activity.

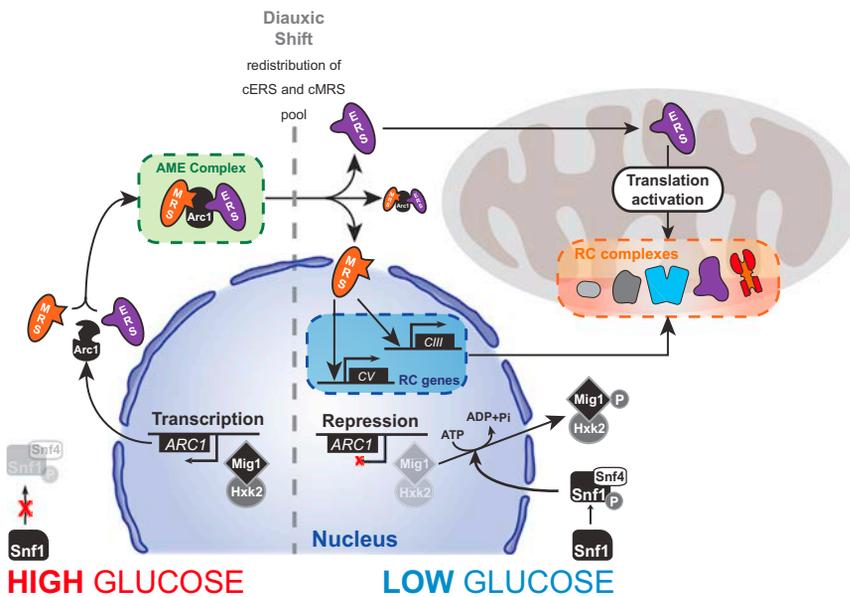
A key feature of the DS is the induction of a profound remodeling of the cellular proteome with a strong enrichment in hundreds of mitochondrial proteins that become essential to provide energy (Haurie et al., 2003). We hypothesized that the AME complex might be involved in this cellular reprogramming. Indeed, upon release from Arc1p, cERS is partly imported into mitochondria where, together with the GatFAB AdT, it generates the mitochondrial Q_m-tRNA^Q necessary for mitochondrial protein synthesis (Frechin et al., 2009). Given that Q_m-tRNA^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 from interacting 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 are notably mediated by the yeast HAP transcriptional factor that modulates the expression of dozens of mitochondrial proteins encoded in the nuclear genome (Buschlen et al., 2003). 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 (Figures 2F–2I) and determined how such modifications impact mitochondrial function (Figures 3–5). When release of both aaRSs was blocked by rendering Arc1p's expression



(legend on next page)



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 from interacting 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 (Figures 3A–3G, 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 (Figures 3A and 3B).

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, Lac) media.

(B) Immunoblot and related quantifications (SEM, * $p < 10^{-3}$ compared to WT, $n = 3$) 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) [35 S] methionine pulse labeling of proteins translated in mitochondria (30,000 cpm per lane) and related quantifications (SEM, * $p < 10^{-3}$ compared to WT, $n = 4$) 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 + allotypic expression of Atp9p or expression of Atp1p compared to WT.

Figure 7. Schematic of AME Regulation and Disassembly upon Shift to Respiration and Its Link with OXPHOS Expression and Assembly

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

The ATP synthase defect in strain nM apparently resulted from a concomitant failure to express two of its subunits, Atp9p (Figures 4B and 5A) and Atp1p (Figure 4B), which belong, respectively, to the F_0 proton-translocating domain and the F_1 catalytic sector of the enzyme. Atp9p is mitochondrially encoded (Figure S3A) and is present in ten copies (eight in mammals) per F_0 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 F_1 . Atp1p is nuclear encoded (Figure S3A) and is present in three copies that together with three Atp2 subunits form the catalytic core of F_1 . 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 (Figures 6A–6C). These results, together with our transcriptomic data (Figure 5C; Table S6), indicate that *ATP1* is a main and quite specific target controlled by AME. The restoration of Atp9p synthesis indicates that the downregulation 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* (*atp1Δ*) are able to synthesize Atp9p. Instead, *atp1Δ* strains fail to express the two other mitochondrial ATP synthase genes, *ATP8* and *ATP6*, due to a translational block (Rak et al., 2009). The proteins encoded by *ATP6* (Atp6p) and *ATP8* (Atp8p), like Atp9p, are essential for the proton-translocating function of F_0 (Rak et al., 2009). It has been proposed that their F_1 -mediated translational control provides a means to avoid accumulation of free F_0 particles, which could otherwise have dramatic consequences by dissipating the mitochondrial membrane potential (Rak et al., 2009). 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 toward 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 ten 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; Table S6). Like yeast cMRS, human cMRS is sequestered within an 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 from reaching 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 F_O 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 means to expand the diversity of the response repertoire to stimuli.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

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. An *arc1*Δ 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 the 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 an nE strain. The control WT strain was WT cotransformed with the p425GPD and p424GPD empty plasmids. For more detailed experimental procedures see Supplemental Experimental Procedures.

Freezing and Freeze Substitution for Ultrastructural Studies

The yeast pellets were placed on the surface of a copper EM grid (400 mesh) coated with formvar. Each grid was very quickly submerged in liquid propane precooled and held at −180°C using liquid nitrogen. Loops were transferred in a precooled solution of 4% osmium tetroxide in dry acetone in a 1.8 ml polypropylene vial at −82°C for 72 hr (substitution), warmed gradually to room temperature, and 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 150–460 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 (pH 7.8). After rinsing, the grids were incubated with antibodies against the ATP synthase α or β subunit (1:2,500) for 1 hr 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%, rinsed and contrasted for 5 min with 2% uranyl acetate in water, followed by 1% lead citrate for 1 min. Specimens were observed with a Hitachi 7650 electron microscope (Electronic Imaging Pole of Bordeaux Imaging Center).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures, seven tables, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.015>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.F., L.E., E.T., B.S., and D.L. performed cloning experiments, complementation studies, growth curves, and genetics. L.E. and D.L. performed the fluorescence microscopy analyses. M.F., L.E., E.T., D.L., and G.B. performed the subcellular fractionations and immunoblot analyses. M.F. performed the aminoacylation activity measurements and FACS experiments. L.E. made the ethanol consumption analyses. E.T. and M.F. made the mitochondrial de novo protein synthesis analyses. E.T. performed the BN/PAGE and the measurements of OXPHOS activities. M.F., D.L., L.E., B.S., and P.H. performed the TAP experiments and mass spectrometry studies. M.F., L.E., S.C.-M., and L.M.S. performed the transcriptomic analyses. C.B. and E.T. performed the electron microscopy studies. M.F., L.E., E.T., B.S., J.-P.d.R., and H.D.B. designed the study. M.F., L.E., E.T., B.S., R.P.M., L.M.S., J.-P.d.R., and

H.D.B. analyzed the data. R.P.M. and L.M.S. edited the manuscript. M.F., L.E., E.T., J.-P.d.R., and H.D.B. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by the French National Program Investissement d'Avenir administered by the "Agence Nationale 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.), 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'Éducation 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'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. D.L. is supported by the ANR-10-IDEX-0002-02 "Investissements d'Avenir" program.

Received: December 2, 2013
 Revised: September 4, 2014
 Accepted: October 16, 2014
 Published: November 20, 2014

REFERENCES

- Ackerman, S.H., and Tzagoloff, A. (2005). Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **80**, 95–133.
- 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.
- Bandyopadhyay, A.K., and Deutscher, M.P. (1971). Complex of aminoacyl-transfer RNA synthetases. *J. Mol. Biol.* **60**, 113–122.
- 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.
- Bietenhader, M., Martos, A., Tetaud, E., Aiyar, R.S., Sellem, C.H., Kucharczyk, R., Clauder-Münster, S., Giraud, M.F., Godard, F., Salin, B., et al. (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. *Vascul. Pharmacol.* **52**, 21–26.
- 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. *Comp. Funct. Genomics* **4**, 37–46.
- Cannarozzi, G., Schraudolph, N.N., Faty, M., von Rohr, P., Friberg, M.T., Roth, A.C., Gonnet, P., Gonnet, G., and Barral, Y. (2010). A role for codon order in translation dynamics. *Cell* **141**, 355–367.
- 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. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4872–4888.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 11989–11994.
- 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. USA* **100**, 13235–13240.
- Fox, T.D. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics* **192**, 1203–1234.
- 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.
- Frechin, M., Kern, D., Martin, R.P., Becker, H.D., and Senger, B. (2010). Arc1p: anchoring, routing, coordinating. *FEBS Lett.* **584**, 427–433.
- Graindorge, J.S., Senger, B., Tritsch, D., Simos, G., and Fasiolo, F. (2005). Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* **44**, 1344–1352.
- 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. Mol. Cell Biol.* **11**, 668–674.
- Haurie, V., Boucherie, H., and Sagliocco, F. (2003). The Snf1 protein kinase controls the induction of genes of the iron uptake pathway at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 45391–45396.
- Hausmann, C.D., and Ibba, M. (2008). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 705–721.
- Havrylenko, S., Legouis, R., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2011). *Caenorhabditis elegans* evolves a new architecture for the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **286**, 28476–28487.
- Hedbacker, K., and Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci.* **13**, 2408–2420.
- Ibba, M., and Söll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 617–650.
- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Le Maréchal, P., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2009). Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **284**, 6053–6060.
- 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., 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. *J. Biol. Chem.* **276**, 6789–6796.
- Lefebvre-Legendre, L., Salin, B., Schaeffer, 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 alpha and beta subunits within inclusion bodies and the loss of mitochondrial cristae in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 18386–18392.
- 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. USA* **91**, 964–968.
- 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**, 1283–1286.
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Ståhlberg, 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. USA* **105**, 11043–11049.
- Polakis, E.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**, 298–302.
- Rak, M., and Tzagoloff, A. (2009). F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 18509–18514.

- Rak, M., Zeng, X., Brière, J.J., and Tzagoloff, A. (2009). Assembly of F₀ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. 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.
- Roy, H., Becker, H.D., Reinbolt, J., and Kern, D. (2003). When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9837–9842.
- 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.
- Schüller, H.J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43, 139–160.
- Simader, H., Hothorn, M., Köhler, 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, 5437–5448.
- Söll, D., and Schimmel, P.R. (1974). Aminoacyl-tRNA synthetases. *Enzyme* 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., and Pilpel, Y. (2010). An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* 141, 344–354.
- 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. (2014). 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.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42, 27–81.

Chapitre II

Découverte d'une forme clivée nucléaire de MetRS chez *S. cerevisiae*

I Contexte de la découverte

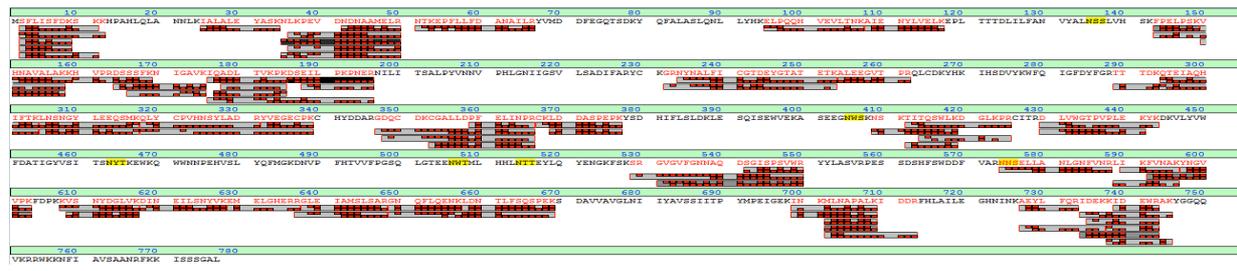
Etudier une protéine implique de pouvoir la détecter, et c'est en ce point que l'immunodétection de la MetRS a joué un rôle majeur dans cette étude.

Lors de la précédente étude, nous utilisions un anticorps dirigé contre la MetRS pour son immunodétection dans les noyaux de levure. Or, cet anticorps produit à partir de la MetRS purifiée de cellules de levure provoquait beaucoup de bruit de fond. A ce stade, il nous était impossible de faire fabriquer un nouvel anticorps dirigé contre la MetRS, car nous étions dans l'incapacité technique de surproduire et de purifier la protéine en système hétérologue bactérien.

Nous avons donc décidé d'utiliser une étiquette HA ou GFP en C-terminal de la MetRS afin de détecter ces constructions par des anticorps anti-étiquette, beaucoup plus spécifiques, que nous possédons au laboratoire. Il est à noter que les souches produisant ces MetRS étiquetées sont toutes capables de croître dans un contexte génétique où le gène de la MetRS native a été délété. Une immunodétection de la GFP, réalisée sur les extraits protéiques nucléaires purifiés d'une souche dans laquelle la MetRS est fusionnée à la GFP, a révélé deux bandes et donc deux protéines, de taille proche. L'expérience a été répétée à partir d'une souche dans laquelle la MetRS est étiquetée HA, immunodétectée par un anticorps anti-HA et a donné le même résultat. Ce résultat était fort intéressant puisque la forme la plus courte se trouvait en proportions égales à la forme entière dans le noyau des levures, alors que dans le cytoplasme, elle représentait moins de 10%. Il est à garder en mémoire qu'en fonction des expériences d'immunodétection que j'ai effectuées, les proportions entre la MetRS de taille attendue et tronquée varient entre un quart et parts égales.

Après avoir testé l'hypothèse selon laquelle la forme la plus courte de MetRS était générée par un site alternatif d'initiation de la traduction (**Figure 2B** de l'article), le site de clivage a été identifié en Juin 2015, soit 1 an et demi après sa découverte, par le Dr. P. Hamman, ingénieur de la plateforme de protéomique de l'IBMC (**Figure 2C-D** de l'article). L'identification par spectrométrie de masse du site de clivage a été compliquée en raison de la quantité faible de MetRS clivée, et ainsi du faible pourcentage de recouvrement de séquence de celle-ci (Figure 34, Figure 35)

A



B

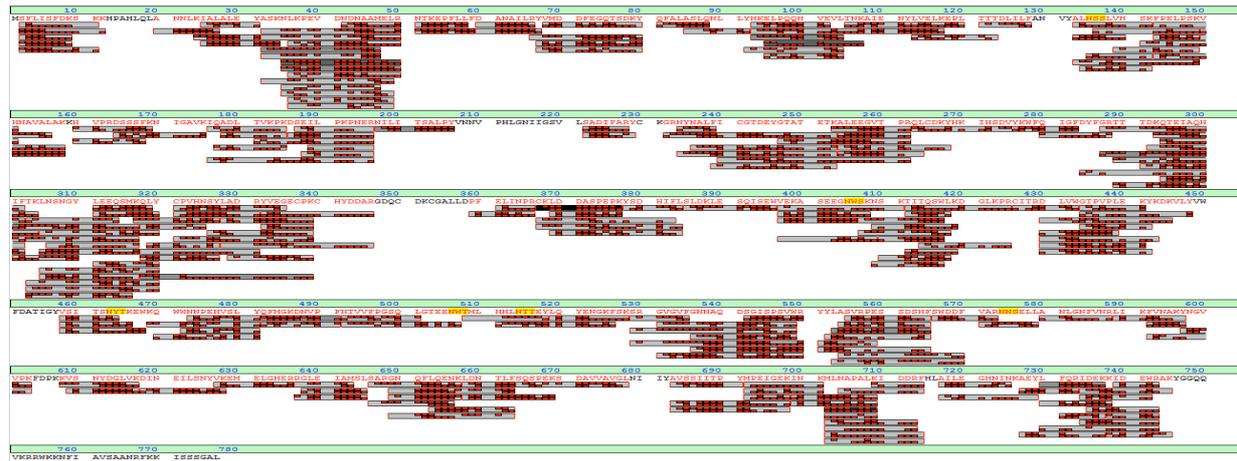
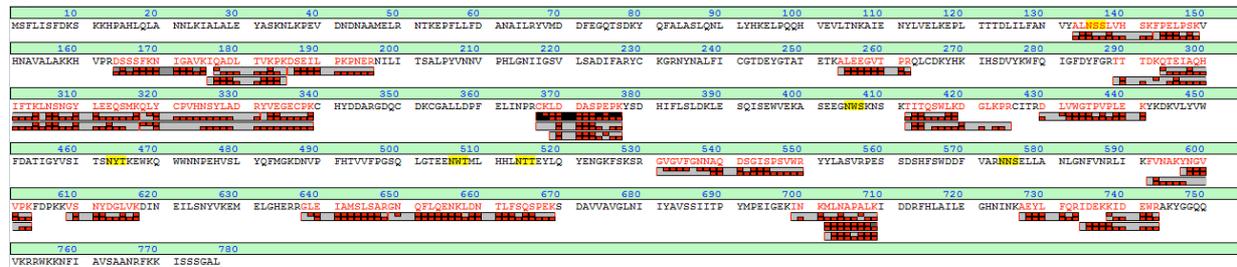


Figure 34. Couvertures de séquence de la MetRS entière purifiée par IP puis digérée à la trypsine (A) ou à la trypsine puis chymotrypsine (B). Les séquences en rouge correspondent aux peptides identifiés par spectrométrie de masse. Digestion à la trypsine: 54.3% de couverture de séquence (79 peptides, 997 spectres). Double-digestion à la trypsine puis à la chymotrypsine: 88.0% de couverture (247 peptides, 1864 spectres)

A



B

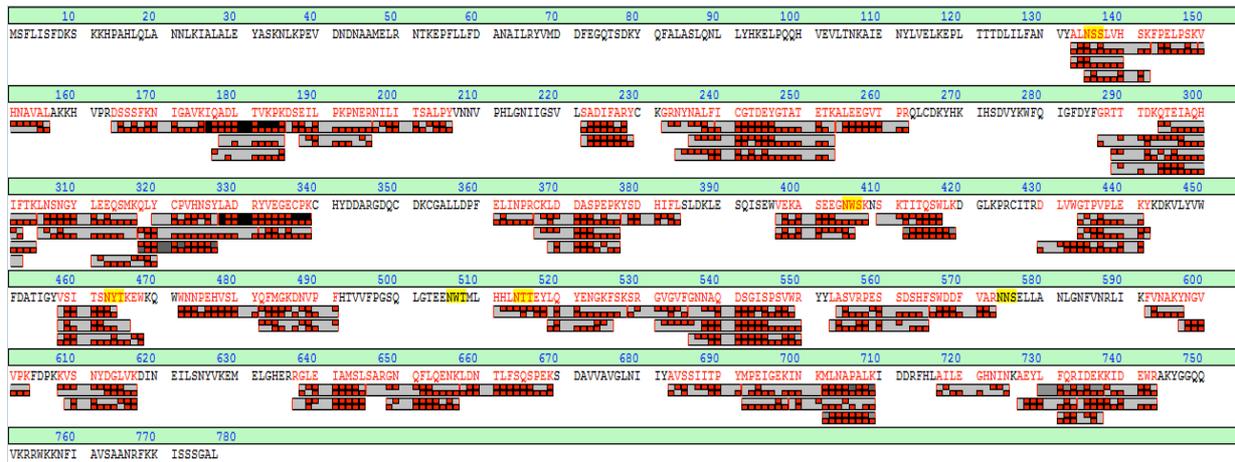


Figure 35. Couvertures de séquence de la MetRS clivée, purifiée par IP puis digérée à la trypsine (A) ou à la trypsine puis chymotrypsine (B). Les séquences en rouge correspondent aux peptides identifiés par spectrométrie de masse. Digestion à la trypsine: 31.9% de couverture de séquence (33 peptides, 199 spectres). Double-digestion à la trypsine puis à la chymotrypsine: 53.8% de couverture de séquence (80 peptides, 363 spectres)

J’ai ensuite pu entreprendre l’étude fonctionnelle de cette nouvelle forme de MetRS qui fait l’objet d’un article, qui sera bientôt soumis, dont le manuscrit est disponible à la fin de ce chapitre. Les expériences réalisées *in vitro* et les expériences de génétiques et de microscopie ont été effectuées avec un variant « artificiel » correspondant à la forme clivée. Pour ce faire, le gène MES1 a été délété des triplets de nucléotides codants les 141 premiers aa. Cette forme est appelée « MetRS^{Δ142} » et est étiquetée HA ou Gfp en sa partie C-terminale.

Cette découverte montre à bien des égards à quel point nous sommes tributaires du matériel biologique que nous utilisons. Depuis, nous avons réussi à purifier la MetRS et avons ainsi fait fabriqué un nouvel anticorps, qui détecte de façon très spécifique la MetRS ainsi que sa forme clivée.

La protéase impliquée de ce clivage n’a pour le moment pas été identifiée, mais quelques pistes concernant cet aspect de l’étude sont présentées dans le § IV.

II Purification de la MetRS de *S. cerevisiae*

La découverte de la forme clivée a intensifié la nécessité d’obtenir de grandes quantités de MetRS ainsi que du variant MetRS^{Δ142} (équivalent à la forme clivée) purifiés dans le but de réaliser un certain nombre d’expériences *in vitro* telles que des aminoacylations. Le Dr Bruno Senger, chercheur dans l’équipe, nous a fourni une souche

d'*E. coli* BL21 contenant un vecteur permettant la surproduction de la MetRS de *S. cerevisiae*, étiquetée en N-terminal par la protéine MBP (**M**altose **B**inding **P**rotein). Entre l'étiquette MBP et la MetRS se trouve le site de clivage du facteur XA puis un espaceur composé de 10 résidus sérines. J'ai ensuite optimisé les conditions de surexpression de la protéine ainsi que le protocole de purification et réalisé la purification sur résine d'amylose (Matériel et Méthode § V.1.5). Nous avons réalisé l'induction de la surproduction à 30°C ; précédée ou non d'un choc thermique sur glace de 15 min. Nous avons également fait varier la composition du tampon de lyse, en ajoutant ou non 10 mM d'EDTA. Dès le premier essai, la purification a été concluante puisqu'une grande quantité de protéines se trouvait dans l'éluat (Figure 36). Nous avons sélectionné la condition : induction à 30°C sans choc thermique préalable, et sans EDTA dans le tampon de lyse.

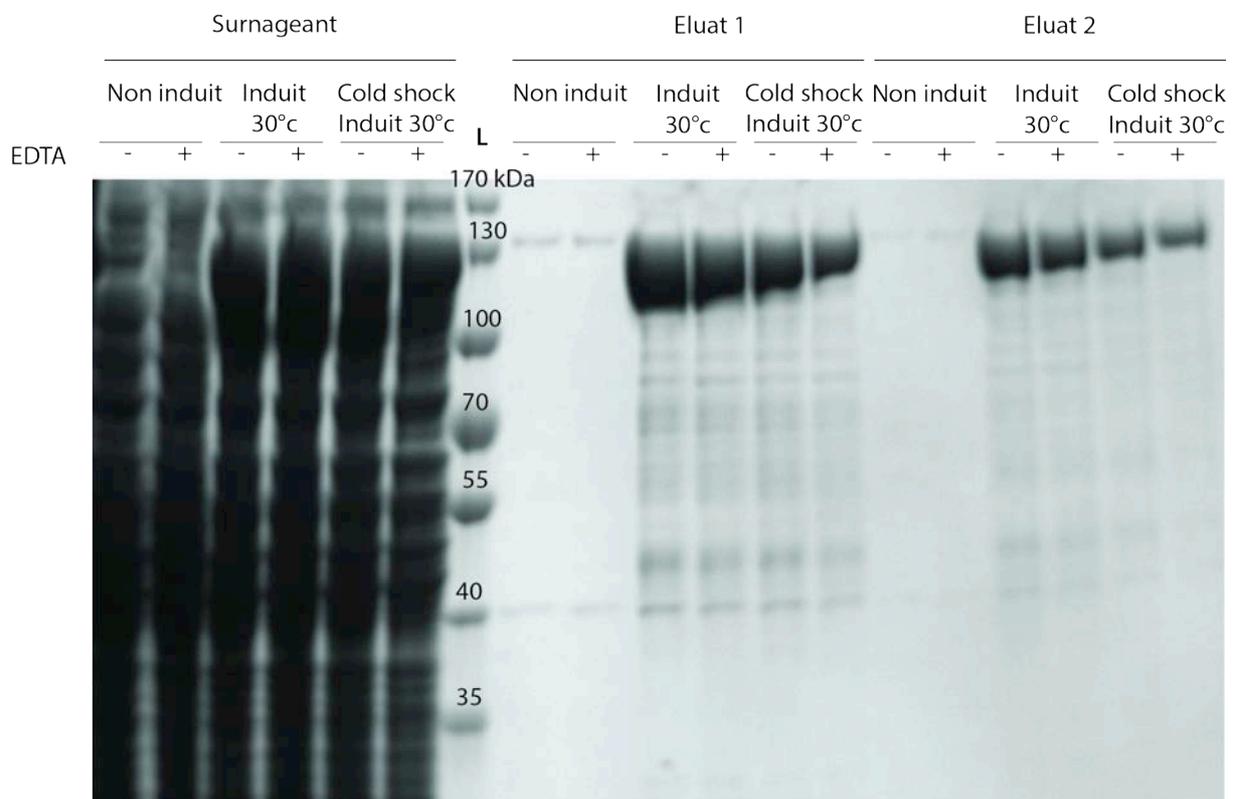


Figure 36. Analyse par SDS-PAGE des différents extraits protéiques obtenus à partir de la souche d'*E. coli* surexprimant MBP-MetRS dans différentes conditions. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. L : Ladder, marqueur de masse moléculaire (Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained 10-180kDa Protein Ladder). 10 µL de chaque fraction ont été déposés dans chaque piste du gel.

Nous avons ensuite retiré l'étiquette MBP par clivage avec le facteur XA. Pour ce faire, nous avons incubé 10 µg de MBP-MetRS en présence de concentrations croissantes de facteur XA, à deux températures différentes. Nous avons déduit de cette expérience que le temps optimal de digestion de 10 µg de MBP-MetRS par 0,2 U de facteur XA était de 16h à 23°C (Figure 37).

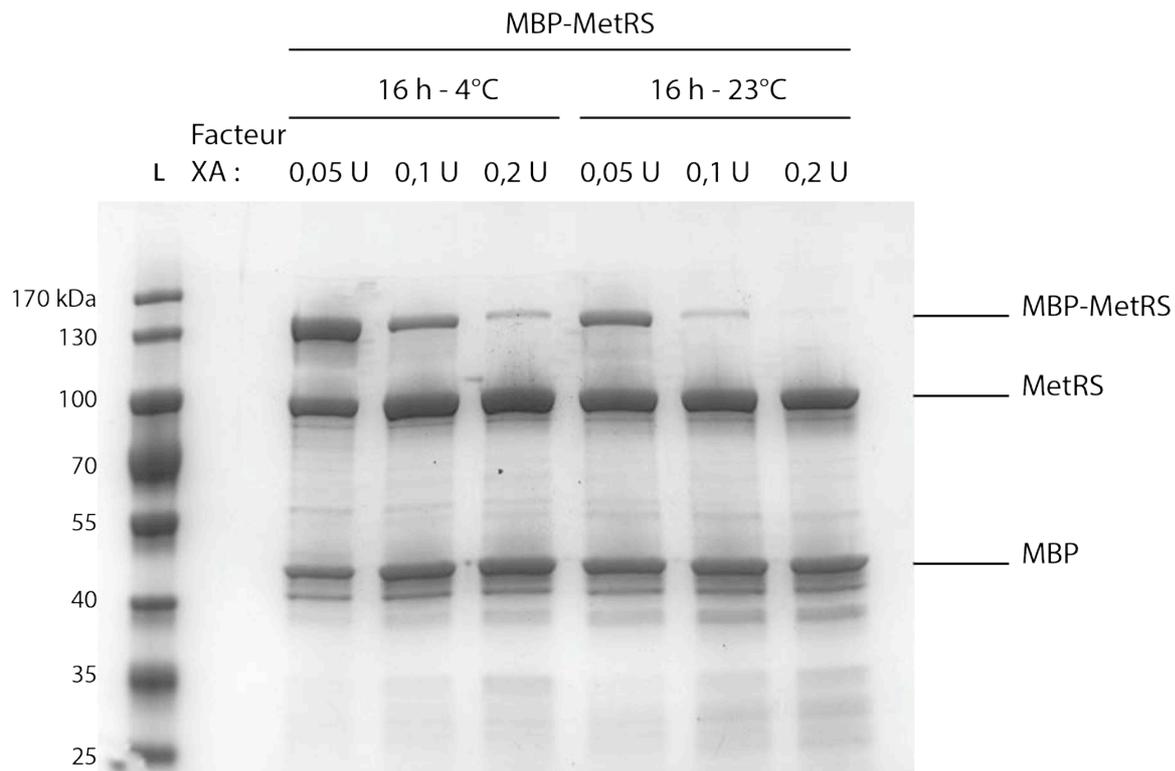


Figure 37 Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, contenant la MBP-MetRS précédemment incubée avec des concentrations croissantes de facteur XA durant 16 h à 23°C ou 4°C. U : unité ; MBP : maltose binding protein ; kDa : Kilodalton. L : Ladder, marqueur de masse moléculaire (Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained 10-180kDa Protein Ladder). L'intégralité des échantillons a été déposée.

Nous avons ensuite effectué une gel filtration afin de séparer la MetRS des protéines contaminantes d'*E. coli* qui ont coélué avec la MBP-MetRS lors de la chromatographie d'affinité sur résine d'amylose. La colonne de gel-filtration que j'ai

utilisée est une Superdex 200 de GE Healthcare, sur laquelle j'ai déposé 2 mL à 2 mg/mL de MBP-MetRS précédemment purifiée et récolté des fractions de 500 µL. Pour l'échantillon MBP-MetRS, les fractions 24 à 31 ont été déposées sur gel SDS-PAGE. Pour l'échantillon MBP-MetRS^{Δ142}, les fractions 26 à 33 ont été déposées (Figure 38).

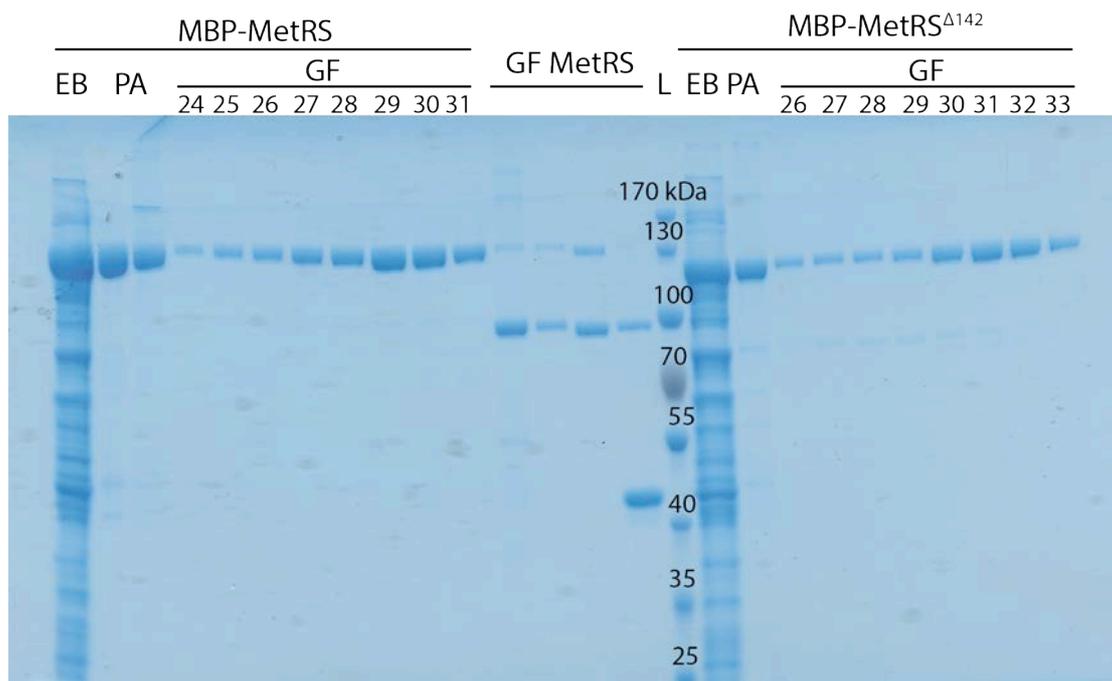


Figure 38. Analyse du degré de pureté de la MetRS et de la MetRS^{Δ142} après gel-filtration. Le gel SDS-PAGE présenté a été coloré au bleu de Coomassie. EB : extrait brut ; PA : purification par résine d'amylose ; GF : Gel filtration ; L : Ladder, marqueur de masse moléculaire (Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained 10-180kDa Protein Ladder). 10 μ L de chaque fraction ont été déposés.

Pour la protéine MetRS, les fractions de gel filtration de 500 μ L n°26-27-28-29 et 30 ont été rassemblées et concentrées et nous ont permis d'obtenir 1,67 mg d'enzyme pure à partir de 4 g de bactéries. Pour la protéine MetRS^{Δ142}, les fractions de gel filtration de 500 μ L n°28-29-30-31 et 32 ont été rassemblées et concentrées et nous ont permis d'obtenir 1,36 mg d'enzyme pure à partir de 4 g de bactéries.

III Interaction de la forme clivée avec Arc1

D'après les travaux de Simader et de ses collègues (Simader et al, 2006), qui ont résolu la structure du domaine N-terminal de la MetRS en interaction avec Arc1, les résidus de la MetRS importants pour l'interaction avec Arc1 se trouvent dans les 100 premiers aa de sa séquence. Ainsi, la forme clivée de la MetRS ne posséderait plus les résidus importants pour son interaction avec Arc1. Nous avons voulu confirmer *in vitro* que le mutant MetRS^{Δ142}, mimant la forme clivée, n'interagissait plus avec Arc1. Nous avons donc réalisé en parallèle, deux purifications de MBP-MetRS et MBP-MetRS^{Δ142} à partir de 50 mL de culture de Rosetta 2, sur résine d'amylose ainsi qu'un contrôle négatif. Lorsque les lavages habituels ont été effectués, nous avons ajouté 32 μ g de la

protéine Arc1 purifiée (§ V.1.7 de la partie « matériel et méthodes ») dans un volume final de 500 μ L. L'incubation a duré 5h à 4°C, puis nous avons élué dans un volume final de 200 μ L.

Nous constatons, dans les surnageants non retenus sur résine d'amylose, une grande quantité d'Arc1, y compris dans le surnageant de l'échantillon non-induit (Figure 39, **pistes 4, 5, 6**). Dans les éluats, Arc1 n'est détecté et immunodétecté que dans l'échantillon 2, contenant MBP-MetRS. Arc1 n'est en revanche, pas détecté lorsque la MBP-MetRS est absente (1, témoin non induit) ou lorsque la forme purifiée est MBP-MetRS Δ 142. Nous pouvons donc en conclure qu'Arc1 n'est pas retenu de manière aspécifique sur la résine d'amylose et que la forme MBP-MetRS Δ 142 et Arc1 ne coéluent pas suggérant que la forme clivée de MetRS n'interagit plus avec Arc1. Normalement, la stoechiométrie de l'assemblage entre Arc1 et la MetRS est de 1-1, ce qui n'est pas le cas dans notre expérience, puisque peu de MBP-MetRS semble avoir fixé Arc1 (**piste 2**). Ceci est cependant expliqué par la présence de l'étiquette MBP en N-terminal de la MetRS, qui a pu gêner une fixation optimale d'Arc1. De plus, nous aurions pu ajouter Arc1 en concentration plus importante.

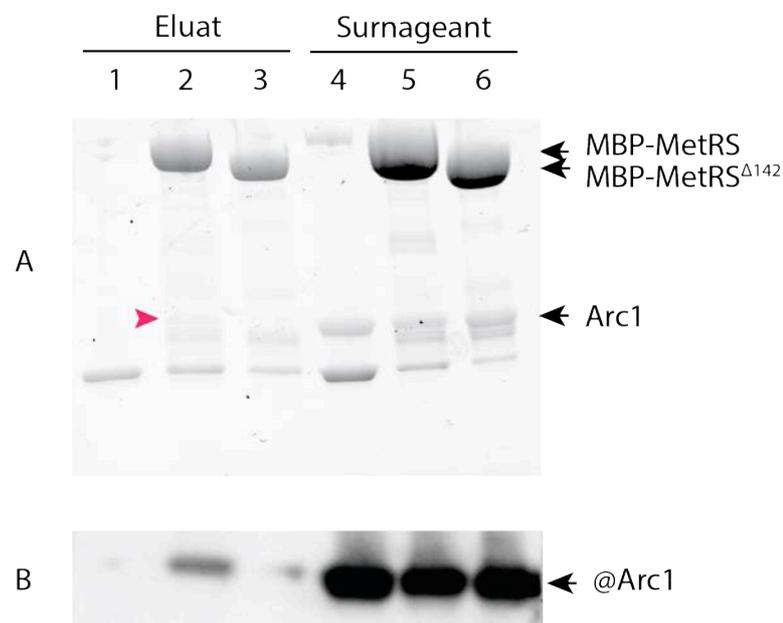


Figure 39. Gel SDS-PAGE (A) et immunodétection (B) du test d'interaction entre les formes de MBP-MetRS purifiées et Arc1 purifié. Conditions : 1 : MBP-MetRS non induite + Arc1, 2 : MBP-MetRS + Arc1, 3 : MBP-MetRS Δ 142 + Arc1. 10 % de l'éluat a été déposée, ainsi que 10 % du surnageant. La flèche rose montre l'emplacement d'Arc1 dans l'éluat de MBP-MetRS.

IV Recherche de la protéase impliquée dans le mécanisme de protéolyse partielle de la MetRS

IV.1 Le clivage des protéines

Nous avons découvert durant cette étude que le mécanisme par lequel était produite cette nouvelle forme de MetRS est un clivage protéolytique. Le clivage est le processus au cours duquel une protéase reconnaît, au sein d'une protéine, une ou plusieurs séquence(s) particulière(s) qu'elle « coupe », afin de dégrader ou de maturer la protéine. Il est parfois nécessaire de dégrader les protéines, dans le but de conserver une homéostasie particulière, en raison d'une mauvaise conformation, ou lors de stress cellulaire. Concernant la maturation de certaines protéines par protéolyse, le mécanisme de clivage est parfois nécessaire à l'activité de la protéine, à la libération d'un domaine, ou encore pour lui permet de rejoindre une localisation différente de celle observée avant le clivage. C'est le cas de la protéine « receptor protein tyrosine phosphatase μ » (PTP μ), un récepteur membranaire impliqué dans l'adhésion des cellules et étant sous-réglée dans glioblastomes, afin que ceux-ci puissent migrer (Burgoyne et al, 2009). Cette répression est en partie due à un clivage de PTP μ , et l'un des fragments résultants de la protéolyse présente une localisation nucléaire. Les aaRS sont également sujettes à la protéolyse partielle, comme celles du complexe MARS maturées par Rim13 (Lei et al, 2015). Comme nous l'avons vu dans l'introduction § VI.4.3 et VI.4.4, d'autres sont également clivées afin d'accomplir leur rôle de cytokine. Les modifications post-traductionnelles, masquant ou rendant accessible le site de reconnaissance de la protéase, peuvent réguler le clivage, ou encore la régulation de l'expression de la protéase qui effectue le mécanisme.

IV.2 Localisation intracellulaire et diversité des protéases de *S. cerevisiae*

Le compartiment généralement associé à la localisation des protéases est la vacuole, compartiment acide (pH 6,2) par comparaison au cytosol (pH 7,2) occupant environ 20 % de la cellule (Hecht et al, 2014). La vacuole est nécessaire à de nombreux mécanismes cellulaires tels que le maintien de l'homéostasie des molécules, le stockage

des aa, la dégradation des protéines, puisqu'elle contient au moins 7 protéases différentes.

Le protéasome 26S est un autre compartiment majoritairement dédié à la dégradation des protéines (Finley et al, 2012). Il s'agit d'un complexe protéique de plus de 2,5 MDa, composé de la partie 20S et de la partie 19S, chacune résultant d'un assemblage de respectivement 28 et 17 sous-unités. Notamment constitué de protéases, il permet la digestion des protéines en fragments peptidiques de 2 à 22 acides aminés par consommation d'ATP. Il s'agit donc d'un puissant hachoir, qu'il est toutefois possible d'inhiber pour de courtes périodes par une molécule, le MG132.

Enfin, il existe également une grande variété de protéases aux localisations subcellulaires variées, dédiées à la maturation de diverses protéines et ayant parfois un site consensus de clivage identifié. Une base de donnée regroupant toutes les protéases identifiées est disponible sur le site internet suivant <http://merops.sanger.ac.uk/>. Actuellement, 112 protéases et 60 protéines homologues de ces protéases sont listées, toutes catégories confondues, telles que les calpaines, les protéases ubiquitine-spécifiques, les amido- phosphoribosyltransferases, les ptilysine-like metalloproteases, les aminopeptidase Ys, les subtilisines et les endoprotéases de la famille S59 associées aux nucléopores.

Il existe sur ce site un programme permettant de rechercher quelle protéase clive une séquence spécifique, mais cela n'a pas donné de protéase correspondante dans le cas de la MetRS (Tableau 25).

Séquences générées par le clivage	Résultat
ASN-TYR-LEU-VAL + GLU-LEU-LYS-GLU	Pas de correspondance
TYR-LEU-VAL-GLU + LEU-LYS-GLU-LEU	Pas de correspondance
LEU-VAL-GLU-LEU + LYS-GLU-PRO-LEU	Pas de correspondance
VAL-GLU-LEU-LYS + GLU-PRO-LEU-THR	Pas de correspondance
GLU-LEU-LYS-GLU + PRO-LEU-THR-THR	Pas de correspondance
LEU-LYS-GLU-PRO + LEU-THR-THR-THR	Pas de correspondance
LYS-GLU-PRO-LEU + THR-THR-THR-ASP	Pas de correspondance
GLU-PRO-LEU-THR + THR-THR-ASP-LEU	Pas de correspondance
PRO-LEU-THR-THR + THR-ASP-LEU-ILE	Pas de correspondance
LEU-THR-THR-THR + ASP-LEU-ILE-LEU	Pas de correspondance

THR-THR-THR-ASP + LEU-ILE-LEU-PHE	Pas de correspondance
THR-THR-ASP-LEU + ILE-LEU-PHE-ALA	Pas de correspondance
THR-ASP-LEU-ILE + LEU-PHE-ALA-ASN	Pas de correspondance
ASP-LEU-ILE-LEU + PHE-ALA-ASN-VAL	Pas de correspondance
LEU-ILE-LEU-PHE + ALA-ASN-VAL-TYR	Pas de correspondance
ILE-LEU-PHE-ALA + ASN-VAL-TYR-ALA	Pas de correspondance
LEU-PHE-ALA-ASNVAL-TYR-ALA-LEU	Pas de correspondance

Tableau 25. Résultat de la recherche d'une protéase spécifique à la séquence de la MetRS dans la base de donnée Merops.

IV.3 Identification des voies de clivages potentielles de la MetRS

IV.3.1 Confirmation de l'existence d'un clivage de la MetRS *in vitro*

Nous avons tout d'abord souhaité confirmer *in vitro* que la MetRS était bien maturée par clivage proéolytique. Pour ce faire, j'ai utilisé la MBP-MetRS précédemment purifiée à partir d'une surproduction hétérologue chez *E. coli* dans le but de l'incuber avec des extraits de *S. cerevisiae* puis des protéases purifiées. Dans un premier temps utiliser un simple extrait cellulaire, contenant notamment les protéases vacuolaires, me paraissait risqué puisque ces protéases allaient tout dégrader de manière très rapide et potentiellement dégrader la MetRS clivée précédemment générée. De plus, nous ne savions pas si la MetRS était clivée avant ou après son entrée dans le noyau. J'ai donc décidé d'utiliser un extrait nucléaire partiellement purifié, et de l'incuber avec la MetRS purifiée.

Il semblerait qu'*in vitro*, le clivage ait également lieu, puisqu'une bande ayant une masse moléculaire de 70 kDa, correspondant à la masse moléculaire attendu de la forme clivée (Figure 40), apparaît au court du temps (Figure 41). Cependant, cela ne nous donne pas vraiment d'indication concernant la protéase puisque l'extrait nucléaire n'est pas totalement pur. Après avoir réalisé une seconde fois l'expérience, nous avons réalisé une immunodétection de la MetRS avec l'anticorps peu spécifique dirigé contre la MetRS, qui nous montre effectivement une augmentation de la quantité de signal au cours du temps d'une bande pouvant correspondre à la forme clivée (Figure 42). Dans ce cas, un anticorps dirigé contre la MBP aurait été plus adéquat. Maintenant que nous

sommes en possession d'un anticorps plus spécifique, nous pourrions refaire cette expérience.

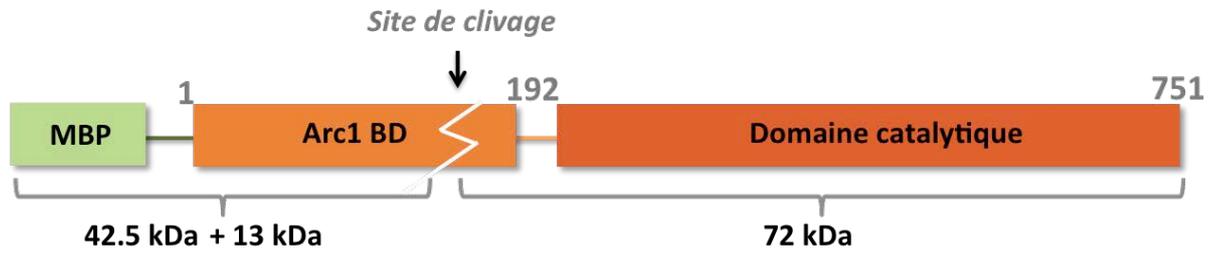


Figure 40. Poids moléculaires attendus pour une protéine MBP-MetRS clivée *in vitro*. MBP : maltose binding protein. Arc1 BD : Domaine GST-like de liaison à Arc1.

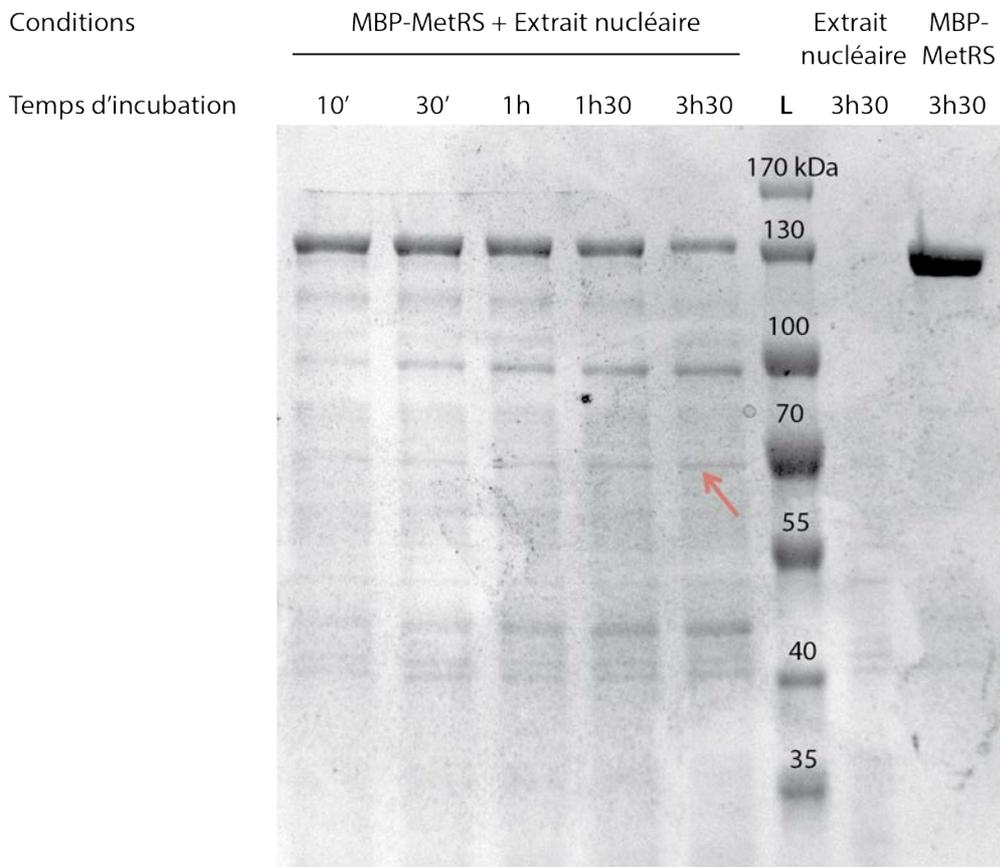


Figure 41. Gel SDS-PAGE de l'expérience d'incubation de la MBP-MetRS purifiée avec un extrait nucléaire partiellement purifié. Les temps d'incubations varient de 10 à 210 min. La flèche rose pointe la forme de MetRS apparaissant au court du temps correspondant à la taille de la MetRS clivée. L : Ladder, marqueur de masse moléculaire (Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained 10-180kDa Protein Ladder).

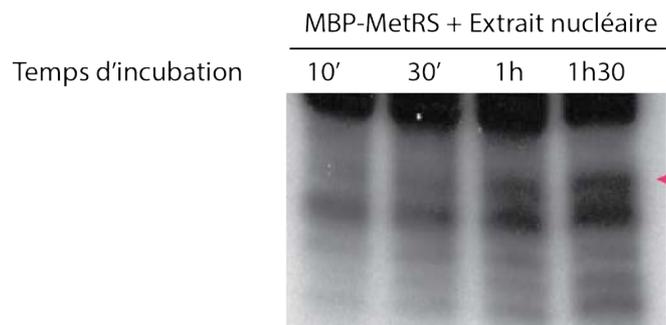


Figure 42. Immunodétection de la MetRS après incubation de la MBP-MetRS purifiée avec un extrait nucléaire partiellement purifié. La flèche rose pointe le signal d'immunodétection de la forme de MetRS apparaissant au court du temps correspondant à la taille de la MetRS clivée.

IV.3.2 La voie Rim13-dépendante

Le phénomène de clivage a été observé pour des aaRS humaines, clivées par la calpaïne (Lei et al, 2015). Il existe un homologue de cette protéase chez *S. cerevisiae*, qui est Rim13, protéase à cystéine. La voie de signalisation à laquelle Rim13 appartient est fortement conservée chez les Champignons (Zaman et al, 2008). En réponse à l'alcalinisation du milieu, Rim13, présent à la surface des endosomes, clive le domaine C-terminal du facteur de transcription Rim101, qui est ainsi activé. Au niveau métabolique, l'alcalinisation du milieu est provoquée par l'accumulation de CO₂ lors de la respiration. Nos résultats, montrant que le clivage de la MetRS est plus important en fermentation qu'en respiration (**Figure 2A** de l'article), ne semblaient pas être en cohérence avec ces données, mais nous avons tout de même vérifié si Rim13 pouvait maturer la MetRS.

Analyse du clivage par Rim13

Au laboratoire, nous possédons une collection de mutants de délétion haploïdes viables, de fond génétique BY. Pour déterminer si la MetRS est clivée par la protéase Rim13, nous avons utilisé la souche dont le gène *RIM13*, non essentiel, est disrupté. Nous avons transformé cette souche, ainsi que la souche sauvage correspondante BY4741, avec un vecteur centromérique contenant le gène codant la MetRS étiquetée HA sous dépendance de son propre promoteur, afin d'être le plus proche possible des conditions physiologiques. Deux sources de carbone différentes ont été utilisées, le glucose et le glycérol, permettant la croissance des levures en fermentation ou en respiration respectivement. La croissance a eu lieu en milieu synthétique permettant le maintien, par pression de sélection auxotrophique, du vecteur MetRS-HA. Un extrait brut des protéines a ensuite été réalisé sur ces souches. La même unité d'A_{600nm} a été prélevée

pour chaque condition, afin d'assurer une quantité relative de protéines identique entre chaque échantillon. L'immunodétection de l'étiquette HA, après électrophorèse sur gel SDS-page et transfert des protéines sur membrane PVDF, ne montre pas de différence de signal entre les deux souches testées (Figure 43). La délétion du gène *rim13* a été confirmée dans la souche *rim13Δ* par PCR puis séquençage du fragment généré mais cependant, l'absence de maturation d'une des protéines cibles de Rim13 n'a pas été vérifié.

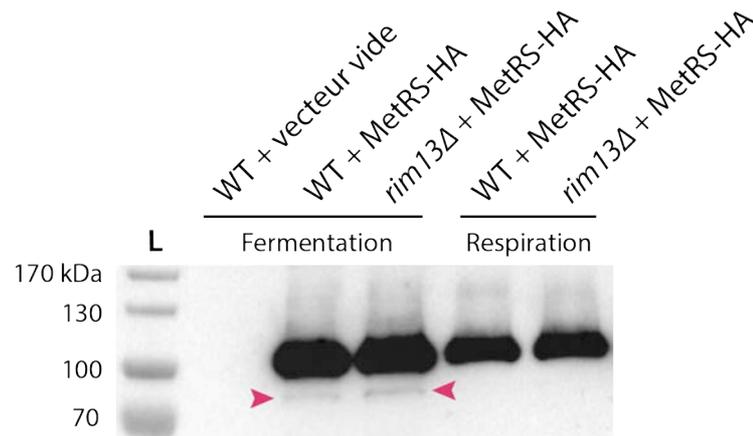


Figure 43. Immunodétection de l'étiquette HA dans différentes souches sauvages (WT) ou délétées pour le gène codant la protéase Rim13 (*rim13Δ*) contenant le vecteur pRS315 exprimant la protéine fusion MetRS-HA (MetRS-HA). WT : souche sauvage. MetRS : Methionyl-ARNt synthétase. kDa : kilo-dalton. HA : Human influenza hemagglutinin. L : Ladder, marqueur de masse moléculaire (Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained 10-180kDa Protein Ladder). 5 % de l'extrait brut de chaque échantillon a été déposé (Matériel et méthodes § V.1.1). Les flèches roses pointent la forme clivée de la MetRS.

IV.3.3 La voie ubiquitine-dépendante

Lors de l'étude du premier NLS de la MetRS, j'avais généré une série de mutants ponctuels des triplets de nucléotides codants des aa situés en N-terminal de la protéine (§ II.3 du chapitre I des résultats). J'ai voulu tester ces mutants afin de voir si les résidus impactés avaient une influence sur le clivage de la MetRS. L'analyse des mutants ponctuels faux sens d'aa situés dans la partie N-terminale de la MetRS a mis en évidence que certains résidus et leur modification post-traductionnelle pouvaient avoir une importance dans la régulation du mécanisme de clivage. En effet, la mutation de la sérine 10 en aspartate ainsi que la mutation de la lysine 11 en alanine, provoquent une diminution accrue du clivage (**Figure 5A** de l'article). La mutation d'une sérine en aspartate est le mimétisme d'une sérine toujours phosphorylée, ce qui ne nous indique pas un mécanisme particulier d'une protéase. Les lysines sont modifiables par ubiquitination, ce qui nous a donné quelques indices. L'ubiquitination consiste en l'ajout

de chaînes d'ubiquitines, protéine de 76 aa, reliées entre elles par une ubiquitine ligase, selon différentes topologies. Il existe en effet différentes topologies pour l'accrochage d'une ubiquitine sur une autre, la plus fréquente étant le branchement de la nouvelle ubiquitine par la lysine 48, concernant 30% des chaînes d'ubiquitines (Finley, 2012).

La poly-ubiquitination des lysines est la modification par laquelle la protéine ciblée est adressée au protéasome, considéré comme un « hachoir à protéines ». Cependant, il existe quelques cas référencés de protéines « échappant au protéasome » et n'étant donc que partiellement dégradées. Le cas le plus documenté est celui de la maturation par le protéasome de p105, précurseur de la sous-unité p50 du facteur de transcription NF-KB (Cohen et al, 2003). Ce précurseur est ubiquitinylé en conditions basales par KPC1, ubiquitine ligase E3, provoquant sa redirection au protéasome qui commence à le dégrader (Kravtsova-Ivantsiv et al, 2015). Cependant, une séquence contenant 15 glycines sur 23 aa constitue une séquence signal stop pour le protéasome, permettant à p50 ainsi généré de s'en échapper (Lin and Gosh, 1996). D'autres dégradations partielles par le protéasome sont recensées dans la littérature, comme celle du précurseur p100 de NF-KB2, ou encore le précurseur du facteur transcriptionnel Spt23 de *S. cerevisiae* (Piwko and Jentsh, 2006). Selon l'étude de la maturation de Spt23, cette dégradation incomplète pourrait être due à des domaines très stables et très structurés de la protéine, qui bloquent le protéasome. Un autre cas intéressant est celui de YBX1, protéine des cellules humaines et possédant trois NLS, qui est sujet à une protéolyse limitée par le protéasome, libérant sa partie C-terminale de 100 aa (van Roeyen et al., 2013). La forme clivée ainsi générée rejoint le noyau, indiquant qu'un NLS est actif, alors que la forme entière se localise dans le cytoplasme des cellules.

Analyse du clivage par le protéasome

Etude de mutants de l'ubiquitine

Une potentielle modification post-traductionnelle de la lysine 11 de la MetRS nous a amené à émettre l'hypothèse selon laquelle le protéasome pourrait dégrader de manière partielle la MetRS. Nous avons donc décidé de vérifier cette hypothèse par des techniques de microbiologie, génétique et immunodétection.

Le Dr Sylvie Friant nous a procuré un plasmide permettant la surexpression, inductible par le cuivre, d'une ubiquitine sauvage (contrôle) ou mutée au niveau de la

lysine 48 (mutation K48R) ne pouvant plus former de longues chaînes d'ubiquitine par la liaison à K48. Nous avons transformé ces vecteurs dans une souche de levure contenant un vecteur d'expression de la MetRS étiquetée GFP. En conditions d'expression de l'ubiquitine mutante, la machinerie d'ubiquitination sera saturée par l'ubiquitine mutante, donc majoritairement utilisée pour l'ubiquitination des protéines, alors que l'ubiquitine endogène de la souche sera proportionnellement moins abondante et donc, moins utilisée. Ainsi, le taux de poly-ubiquitination par une chaîne d'ubiquitines reliées par les lysines 48 sera diminué.

Nous avons cultivé plusieurs clones de nos souches ainsi générées en milieu synthétique permettant le maintien des différents vecteurs, en présence ou non de cuivre. Nous avons également ajouté ou non du MG132, connu pour être un inhibiteur du protéasome, afin d'accentuer un éventuel effet sur le clivage de la MetRS. Nous avons ensuite récolté les différentes conditions, effectué des extraits protéiques bruts, puis réalisé une électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10% et transféré les protéines sur membrane de PVDF afin de réaliser l'immunodétection de la MetRS avec un anticorps anti-GFP.

Les résultats de l'immunodétection montrent que les clones d'une même souche ne présentent pas des signaux identiques (Figure 44). D'une manière générale, l'intensité du signal GFP est plus important pour les souches possédant le vecteur pCUP1-UBI K48R (Figure 44 **pistes 13 à 24**) que celles qui surexpriment l'ubiquitine native (Figure 44 **pistes 1 à 12**), même lorsque la surexpression de l'ubiquitine n'est pas induite. Nous en avons conclu qu'il y avait probablement une fuite de l'expression de ce vecteur.

Certains clones présentent une diminution du signal GFP en présence de l'inhibiteur du protéasome MG132 (Figure 44 **pistes 7, 8, 11, 12, 23, 24**), ce qui est contraire à l'effet attendu, alors que d'autres clones n'y semblent absolument pas sensibles (Figure 44 **pistes 15 et 16**). Par la suite, j'ai été informée que l'utilisation du MG132 se fait en milieu riche, et qu'il n'a pas d'effet en milieu synthétique expliquant ainsi, pourquoi les résultats le concernant n'étaient pas interprétables. De plus, l'absence de maturation d'une des protéines cibles de la dégradation par le protéasome, avec une chaîne de poly-ubiquitine K48, n'a pas été vérifiée.

En l'état, les résultats que j'ai obtenus sont trop disparates pour me permettre de conclure à une dégradation partielle de la MetRS par le protéasome ou non.

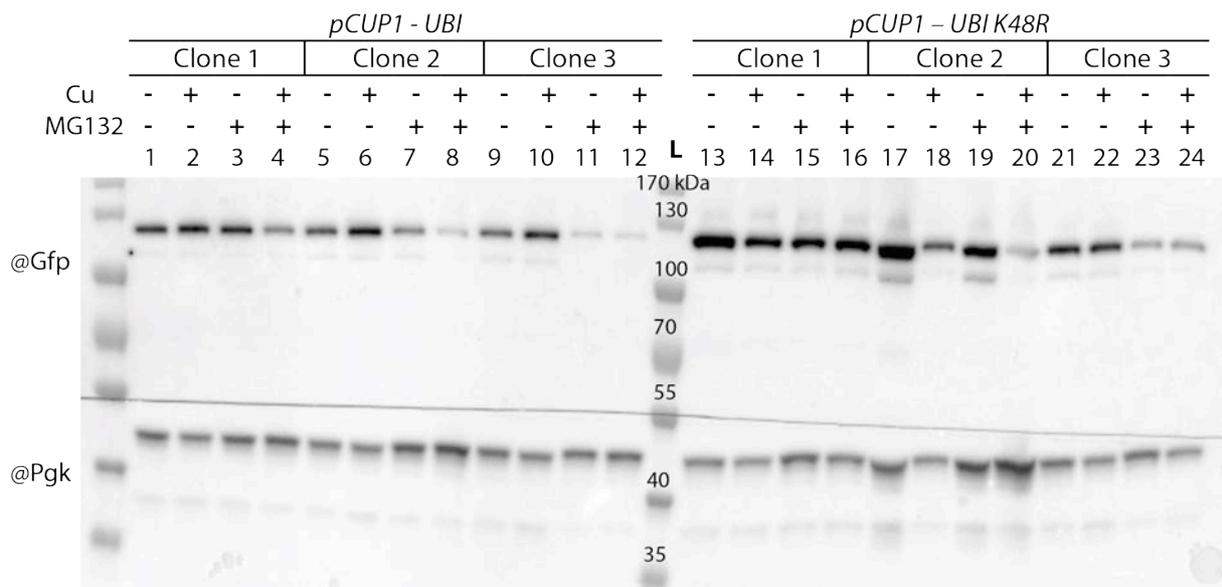


Figure 44. Immunodétection de la MetRS-GFP, sur des extraits protéiques issus de souches surexprimant une version sauvage (UBI) ou mutée (UBI K48R) de l'ubiquitine. + : présence du composé. - : absence du composé. Cu : Cuivre. @Gfp : utilisation de l'anticorps dirigé contre la Gfp. @Pgk : utilisation de l'anticorps dirigé contre la Pgk, contrôle de charge. *pCUP1-UBI* : souche contenant le vecteur d'expression inductible au cuivre de l'ubiquitine sauvage, ainsi qu'un vecteur permettant l'expression de la MetRS-Gfp. *pCUP1-UBI K48R* : souche contenant le vecteur d'expression inductible au cuivre de l'ubiquitine mutée de la lysine 48 en arginine, ainsi qu'un vecteur permettant l'expression de la MetRS-Gfp. L : Ladder, marqueur de masse moléculaire (Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained 10-180kDa Protein Ladder). 5 % de l'extrait brut de chaque échantillon a été déposé (Matériel et méthodes § V.1.1).

Etude d'un mutant du protéasome

Le Dr Sylvie Friant nous a fourni un mutant « *pre1 pre2* » thermosensible du protéasome, c'est-à-dire qu'à une température permmissible de 25°C le protéasome fonctionne, alors qu'à la température non-permissive de 37°C le protéasome ne fonctionne pas (Gerlinger et al, 1997). Nous avons transformé le mutant *pre1 pre2* avec un vecteur permettant l'expression de la MetRS étiquetée HA en C-terminal. Une souche sauvage BY4741 a été utilisée en tant que contrôle et également transformée avec le vecteur MetRS-HA. Nous avons cultivé les deux souches obtenues en conditions permissives, puis incubées ces souches 1 h en conditions non-permissives ou non avant de récolter les protéines par fractionnement subcellulaire et de réaliser une électrophorèse sur SDS-PAGE 10% puis une immunodétection de la protéine HA. La même unité d' A_{600nm} a été prélevée pour chaque condition, afin d'assurer une quantité relative de protéines identique entre chaque échantillon issu des différentes fractions subcellulaires. L'échantillon P13 correspond au culot d'un extrait brut préalablement débarrassé des débris cellulaires et centrifugé à 13,000 *g*, et contient ainsi les

membranes lourdes de la cellule. Le P100 correspond au culot issu d'une centrifugation à 100,000 *g* du surnageant de la centrifugation précédente, et contient les membranes légères de la cellule. Le S100 correspond au surnageant de la centrifugation effectuée à 100,000 *g*, et correspond aux protéines solubles.

D'une manière générale, les souches sauvages (WT) (Figure 45, **pistes 1, 2, 5, 6, 9, 10**) et *pre1 pre2* (Figure 45, **pistes 3, 4, 7, 8, 11, 12**) ne montrent pas les mêmes répartitions et quantités de MetRS-HA. En effet, dans la fraction P13, le signal d'immunodétection de l'étiquette HA est intense pour la souche « WT + MetRS-HA » (Figure 45, **pistes 1 et 2**) en comparaison avec la souche « *pre1 pre2* + MetRS-HA » (Figure 45, **pistes 3 et 4**). Il en va de même dans la fraction P100 (Figure 45, **pistes 5, 6, 7, 8**). La majorité du signal dirigé contre l'étiquette HA correspondant à la souche « WT + MetRS-HA » se situe dans le P13 (Figure 45, **pistes 1 et 2**), alors que pour la souche « *pre1 pre2* + MetRS-HA », elle se situe dans le P100 (Figure 45, **pistes 7 et 8**). Une des raisons pouvant expliquer ces discordances pourrait être une différence de fond génétique entre les souches sauvages et *pre1 pre2*.

Le signal d'immunodétection de l'étiquette HA des protéines du P100 de la souche *pre1 pre2* pouvant correspondre à la MetRS-HA entière (*) ainsi qu'à la forme clivée (*) est fortement augmenté dans la condition à 37 °C (Figure 45, **piste 8**) non-permissive par rapport à la condition à 25°C permissive (Figure 45, **piste 7**). De plus, la bande (*) correspondant à une dégradation ou à un signal aspécifique, émet un signal d'intensité semblable entre les deux conditions ce qui nous informe qu'il n'y a pas de différence majeure dans les quantités de protéines déposées pour ces deux échantillons. Il pourrait donc être possible que la MetRS-HA soit protéolysée par le protéasome, et que cette modification soit interrompue lorsque la souche thermosensible *pre1 pre2* est incubée à 37 °C, c'est à dire lorsque le protéasome ne fonctionne pas.

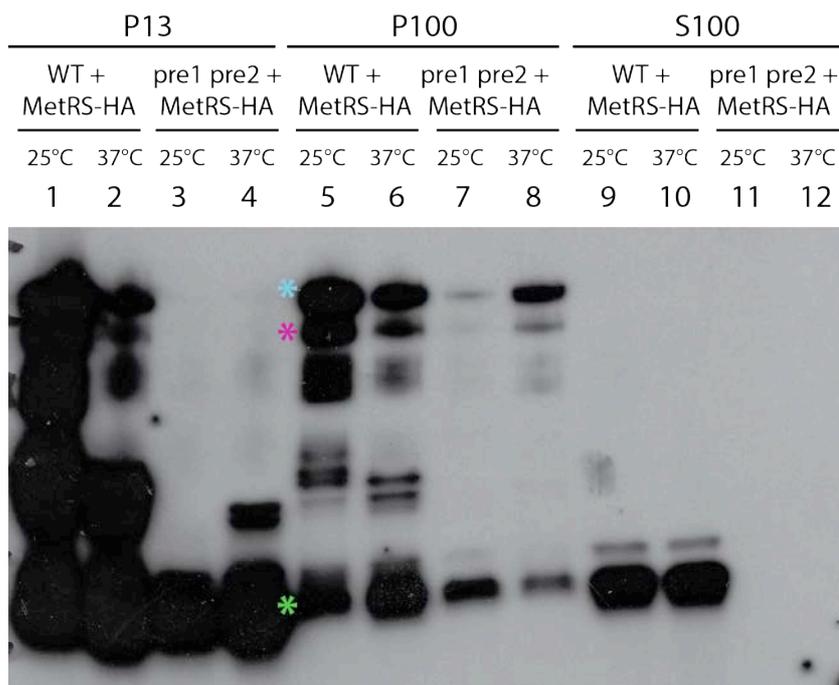


Figure 45. Immunodétection de la MetRS-HA dans des souches sauvage (WT) ou *pre1 pre2* contenant le vecteur permettant l'expression de la MetRS étiquetée HA en C-terminal. *: emplacement attendu du signal de la MetRS-HA entière ; * : emplacement attendu du signal de la MetRS-HA clivée ; * : produit de dégradation servant d'étalon dans les protéines du P100 issues d'une même souche. 10 µL déposés par piste.

Recherche bioinformatique d'un domaine bloquant le protéasome

Dans les quelques cas de la littérature montrant que la protéine étudiée échappe à la dégradation par le protéasome, il est montré que cette inhibition est due soit à la présence de 15 résidus glycines fortement rapprochées (Lin, 1996) soit à la présence de domaines très stables qui bloquent le protéasome (Piwko, 2006). La MetRS ne contient pas de séquence enrichie en glycine, mais cependant, une région fortement conservée située à proximité du site de clivage déterminé entre le 114^{ème} et le 132^{ème} aa, contient de nombreux aa hydrophobes, entre le 121^{ème} et le 133^{ème} aa (Figure 46).

	121	.	.133
<i>K. Lactis</i> MetRS	SVEEP	--LSATRIVIFANTY	--ALDP--
<i>A. gossypii</i> MetRS	SMEEP	--LSATRLITFANTY	--ALDA--
<i>S. cerevisiae</i> MetRS	ELKEP	--LTTTDLILFANVY	--ALNS--
<i>C. glabrata</i> MetRS	LDKDSK	--LDAVTLISFANAY	--ALRP--
<i>C. albicans</i> MetRS	KFAKEE	--LTPSQIIVFASLY	--PAFK--
<i>D. hansenii</i> MetRS	KLEKAE	--TSTSQIILFAAVY	--GALSG--
<i>Y. lipolytica</i> MetRS	KLSTITSGSAEEIIVFGSLF	--ALNEKS	
<i>S. pombe</i> MetRS	ENEILNEFTPVEVALASDIYFCV	LNAGAP	
<i>U. maydis</i> MetRS	PSDVASGAKELAYDIMASPPF	----	

Figure 46. Alignement de séquences de la région du site de clivage de la MetRS de *S. cerevisiae* avec d'autres MetRS de levures. Alignement réalisé avec ClustalX. En bleu : aa hydrophobes ; en jaune : aa cycliques ; en rose : aa acides ; en vert : aa hydroxylés et en bleu foncé : aa aromatiques.

V Existence du mécanisme de clivage dans la MetRS humaine

V.1 Pourquoi s'intéresser à un potentiel clivage de la MetRS humaine

La MetRS humaine, nous l'avons vu, présente des similitudes structurales et fonctionnelles avec la MetRS de levure. (i) Toutes deux possèdent au moins deux NLS au sein de leur séquence peptidique, (ii) la MetRS humaine est impliquée dans la biogénèse des ribosomes et la MetRS de levure pourrait l'être également selon nos expériences de TAP, et (iii) elles régulent toutes les deux la transcription de gènes. Il nous paraissait donc logique de rechercher l'existence d'un clivage de la partie N-terminale de la MetRS humaine, qui constituerait un point commun de plus.

V.2 Résultats

V.2.1 Clonage et expression de la MetRS humaine dans *S. cerevisiae*

Nous avons utilisé deux constructions différentes contenant la MetRS humaine (MetRSHsa). La première permet l'expression d'une protéine de fusion contenant la partie N-terminale de la MetRS de levure, la MetRSHsa et la GFP en C-terminal. La seconde permet l'expression d'une protéine de fusion entre la MetRSHsa et la GFP en C-terminal. Les plasmides centromériques pRS315 contenant ces constructions ont été transformées dans la souche « MetRS shuffle », dont le gène *MES1* est disrupté au génome par le gène *HIS5*, mais dont la délétion, létale, est complétée par un plasmide URA contenant *MES1* dont la perte sera sélectionnable sur milieu synthétique contenant du 5FOA. Cette souche a été transformée avec les différents vecteurs mentionnés précédemment, ainsi que le vecteur permettant l'expression de la MetRS étiquetée GFP en C-terminal. Nous avons également transformé une souche MetRS shuffle *arc1Δ* avec le vecteur permettant l'expression de la MetRSHsa fusionnée à la GFP. Nous avons ensuite vérifié que les souches sélectionnées permettaient l'expression de

nos constructions (Figure 47). Le signal émis par l'immunodétection de l'étiquette GFP nous montre que les protéines sont exprimées.

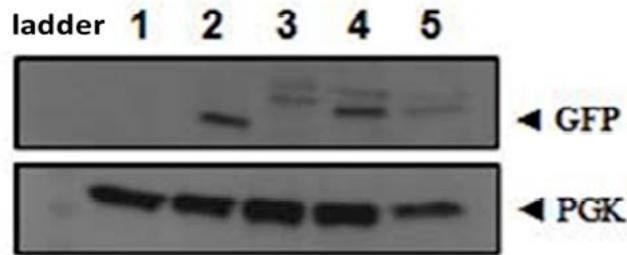


Figure 47. Immunodétection de l'étiquette GFP sur des extraits bruts issus des souches montrant l'expression des différents variants de la MetRSHsa étiquetés GFP. 1 : souche MetRS shuffle. 2 : souche exprimant la construction MetRS-GFP. 3 : souche exprimant la construction N-ter MetRS Sce – MetRS Hsa-GFP. 4 : souche exprimant la construction MetRS Hsa – GFP. 5 : souche $\Delta arc1$ exprimant la construction MetRS Hsa-GFP. 5 % de l'extrait brut de chaque échantillon a été déposé (Matériel et méthodes § V.1.1).

V.2.2 Test de viabilité des souches obtenues

Après avoir sélectionné sur milieu supplémenté en 5FOA les clones ayant perdu le plasmide contenant le gène sauvage *MES1*, nous avons réalisé des tests en goutte pour chacune des souches obtenues (Figure 48). Les milieux ne contenant pas de leucine ont été utilisés pour maintenir la pression de sélection sur nos vecteurs d'intérêt. Les milieux ne contenant pas d'uracile ont été utilisés pour démontrer la perte du plasmide URA qui contenait le gène *MES1* sauvage. Ainsi, la croissance sur le milieu dépourvu de leucine est due au remplacement de *MES1* sauvage par les gènes permettant l'expression des différents variants de MetRSHsa, qui complètent tous la perte de ce gène essentiel.

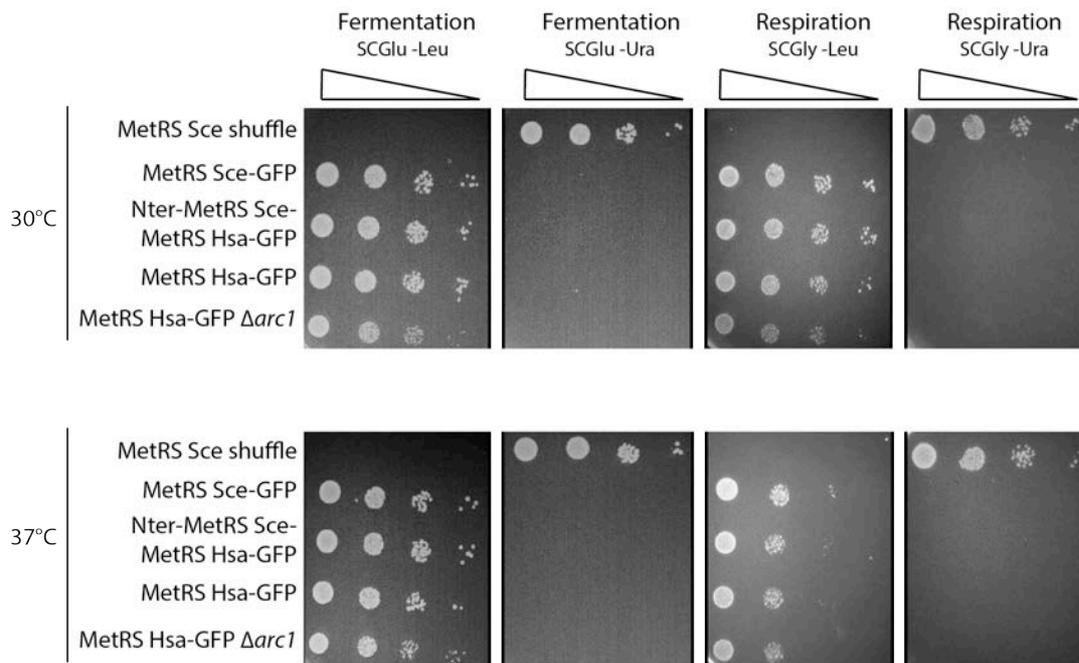


Figure 48. Tests en goutte des différentes souches transformées avec le plasmide pRS315 porteur des constructions d'intérêt. Les tests ont été effectués sur milieu SCGlu-Leu et SCGly-Leu, ainsi que SCGlu-Ura et SCGly-Ura. Les témoins sont constitués d'une souche MetRSSce shuffle, contenant le plasmide pRS316 avec le gène sauvage *MES1* (témoin négatif) et d'une souche «MetRSSce-GFP», qui contient le gène permettant l'expression de la MetRS de *S. cerevisiae* fusionnée à la GFP en C-terminal (témoin positif). Les gouttes de 8 μ L vont de 0,05 d' A_{600nm} puis sont diluées successivement au 1/10^{ème}. Les boîtes sont incubées à 30 °C ou 37 °C pendant 4 jours et les photos ci-dessus sont prises à J2 pour les milieux SCGlu et J4 pour les milieux SCGly

V.2.3 Localisation subcellulaire de la MetRS humaine dans la levure

Nous avons ensuite analysé, par microscopie, la localisation subcellulaire des variants contenant la MetRS humaine dans les cellules de levure dont les noyaux ont été préalablement marqués au Hoechst (Figure 49). La construction Nter-MetRSSce-MetRSHsa-GFP se localise à la fois dans le cytoplasme et le noyau des levures, que ce soit en condition de fermentation ou de respiration (Figure 49A).

De même, la construction MetRS Hsa-GFP se localise dans le cytoplasme et le noyau des levures en fermentation (Figure 49B), et une localisation vacuolaire s'ajoute en respiration. Les NLS de la MetRS humaines sont donc reconnus par le système d'import nucléaire de la levure.

Enfin, dans une souche *arc1Δ* en fermentation (Figure 49C), la localisation de la MetRS Hsa-GFP est toujours nucléo-cytoplasmique. Cependant, l'intégralité du signal GFP et Hoechst est vacuolaire dans de telles souches en respiration, ce qui signifie que ces levures sont moribondes.

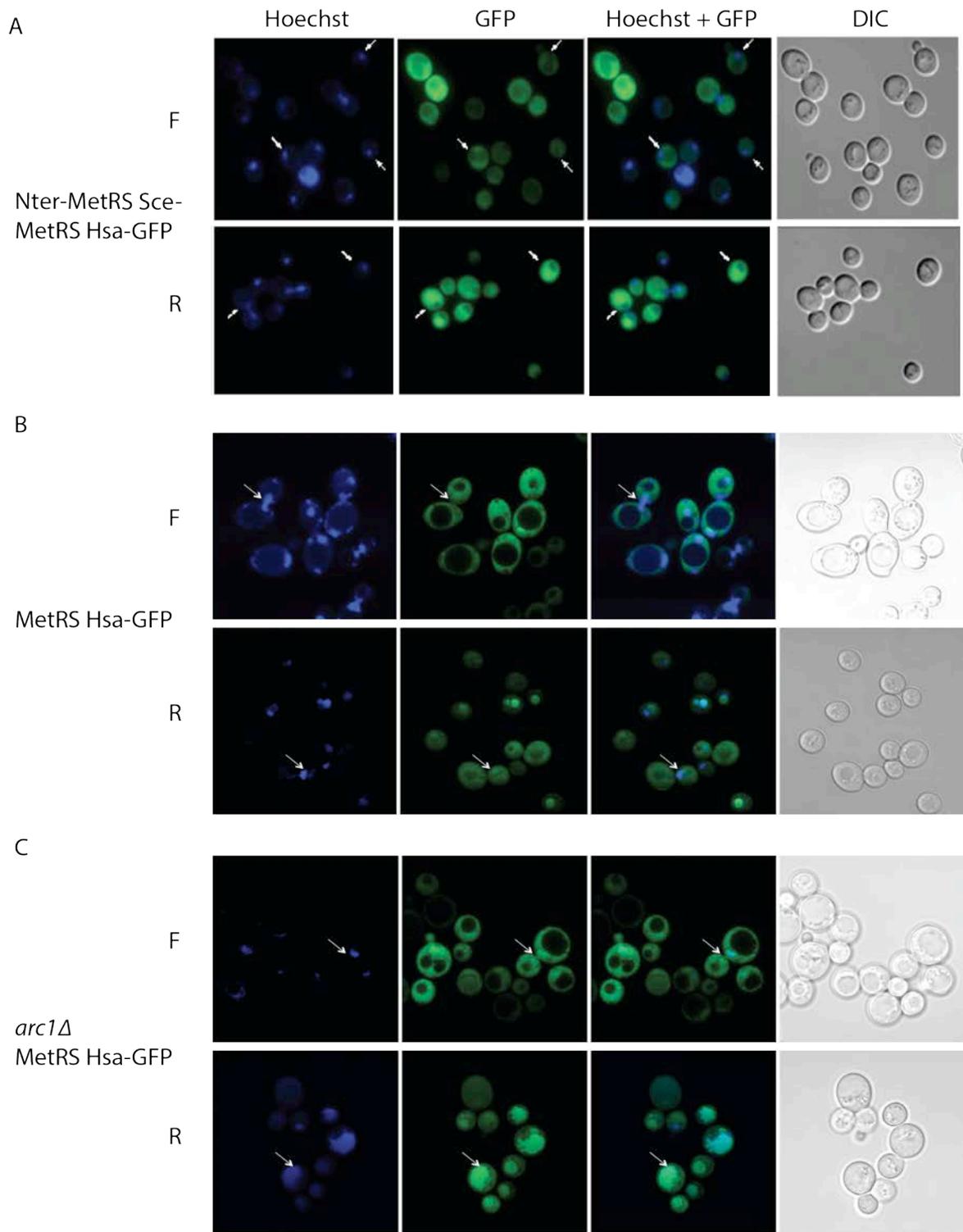


Figure 49. Localisation subcellulaire des variants de la MetRS Hsa dans les souches de levure transformées par les plasmides contenant les constructions d'intérêt. Les cultures ont été observées au microscope à épifluorescence (A) ou confocal (B et C) après coloration des noyaux des cellules au DAPI. (A) Observation au microscope à épifluorescence de la souche exprimant le domaine Nter de la MetRS Sce fusionné à la MetRS Hsa étiquetée par la GFP en C-terminal, en fermentation (F) et en respiration (R). (B) Observation au microscope confocal de la souche exprimant la MetRS Hsa étiquetée par la GFP en C-terminal, en fermentation (F) et en respiration (R). (C) Observation au microscope confocal de la souche *arc1Δ* exprimant la MetRS Hsa étiquetée par la GFP en C-terminal, en fermentation (F) et en respiration (R).

Ainsi, nous avons pu montrer que la MetRS Hsa est exprimée dans les cellules de levures et qu'elle permet la viabilité des souches *mes1Δ*, avec néanmoins une différence entre le métabolisme fermentaire et respiratoire. En effet, en fermentation, les cellules ont une croissance optimale, alors qu'en respiration, elles semblent moribondes. Enfin, les NLS de la MetRS Hsa sont reconnus par la machinerie d'import nucléaire de *S. cerevisiae*, car comme le montrent nos images de microscopie, la MetRS Hsa possède une localisation nucléaire.

VI Discussion

Comme décrit dans l'introduction, il existe, dans la littérature, quelques exemples de protéines échappant au protéasome. A l'heure actuelle, nous ne savons toujours pas si c'est le cas de la MetRS clivée, mais toutefois, le protéasome semble être une piste qu'il faut continuer d'explorer. En effet, dans les extraits protéiques du P100 des souches thermosensibles *pre1 pre2* cultivées en condition non-permissive, nous constatons une accumulation de la quantité de MetRS-HA, alors que les produits de dégradation n'augmentent pas, prouvant qu'il ne s'agit pas d'une différence de quantité de protéines déposées. Cependant, de manière perturbante, les souches contrôles utilisées ne se comportent pas de la même façon et présentent une distribution différente de la MetRS dans les différentes fractions analysées. Il faudrait répéter les expériences d'inhibition du protéasome par le MG132 dans les conditions adéquates (milieu riche), ce qui pourrait nous permettre d'avoir une réponse plus précise quant à l'utilisation de cette voie de protéolyse pour générer la forme clivée de la MetRS. De plus, il semblerait que l'utilisation d'une souche déficiente pour la pompe à efflux de différentes drogues Pdr5 serait également adéquate, afin de limiter l'efflux de MG132 durant l'expérience et ainsi d'obtenir un résultat optimal (Leppert et al, 1990 ; Pascual et al, 2014).

L'un des aspects qui n'est pas été abordé dans la discussion de l'article concerne la **figure 5B** de celui-ci (voir article), dans laquelle nous avons constaté, par immunodétection, une forte quantité de MetRS entière dans la souche « K11A Δ142 » par comparaison avec la souche « FL », alors que le gène *MES1* est sous contrôle du même promoteur *MES1* dans ces deux souches. La différence majeure entre ces deux souches réside en l'expression de la forme clivée sous contrôle du promoteur *MES1*, ce qui rend cette forme clivée plus abondante dans la souche « K11A Δ142 » que dans la

souche FL. Une des hypothèses qui permettrait d'expliquer cette observation serait que la forme clivée induise l'expression de *MES1*, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif. Chez la levure, de tels mécanismes existent et ont notamment été démontrés pour les facteurs de transcription Hxk2 et Ino2, qui induisent l'expression de leurs propres gènes lors de leur relocalisation nucléaire (Rodriguez et al, 2001, Ashburner et al, 1995). Nous avons démontré que la MetRS clivée possédait toujours la capacité d'être importé dans le noyau, ce qui rendrait le mécanisme de rétrocontrôle possible. L'augmentation de l'expression de la forme entière de MetRS semble corrélée à la quantité de MetRS clivée, le mécanisme aurait ainsi pour but de maintenir une homéostasie entre les deux formes de MetRS.

VII Article 2 « Existence of two essential and functionally distinct nuclear methionyl-tRNA synthetases in *Saccharomyces cerevisiae* »

Dans l'article présenté ci-après, nous rapportons la découverte de cette nouvelle forme clivée ainsi que l'identification du site de clivage. Cette forme, essentielle à la levure et libérée du complexe AME, se relocalise principalement dans le noyau et possède une activité catalytique intacte. Des études précédentes ont montré que la MetRS du complexe AME aminoacyle principalement l'ARN_t^{Met} et que Arc1 ne possède que peu d'affinité pour ARN_t^{Met} (Deinert et al, 2000 ; Wiltrout et al, 2012). Nous proposons donc que la MetRS clivée nucléaire puisse être dédiée à l'aminoacylation de ARN_t^{Met} et que d'une manière plus générale, la compartimentalisation des MetRS entière et clivée est le mécanisme permettant l'aminoacylation en quantité adéquate des ARN_t^{Met} et ARN_t^{Met}.

Existence of two essential and functionally distinct nuclear methionyl-tRNA synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*

Daphné Laporte^a, Johann-Owen De Craena^a, Bruno Sengera^a, Ludovic Enkler^b, Philippe Hammann^c and Hubert Dominique Becker^a

^a Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, UMR 7156, CNRS, Université de Strasbourg, 4 allée Konrad Röntgen, 67084 Strasbourg Cedex, France

^b IBMC-CNRS, Evolution des ARN non codants chez la levure, Architecture et Réactivité de l'ARN, 15 rue René Descartes, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Plateforme Protéomique de l'Esplanade, Université de Strasbourg, CNRS- FRC1589, IBMC, 15 Rue René Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex, France.

Correspondence: h.becker@unistra.fr (Hubert. D. Becker)

Abstract

tRNA aminoacylation is a cornerstone cellular function linked to all compartments in which protein synthesis occurs. It has become more and more evident that the cytosolic enzymes performing the charging of cytosolic tRNAs do not remain necessarily in this compartment and do not only charge tRNAs. One of the most intriguing among these proteins is the methionyl-tRNA synthetase (MetRS) responsible for aminoacylation of both the initiator and the elongator tRNA^{Met}. Recently it was also shown that this enzyme is also involved in the transcription of genes encoding Complex V respiratory chain proteins. All these functions imply that MetRS is tightly regulated to be able to perform all its different functions. In the present work, we bring evidences that *Saccharomyces cerevisiae* contains at least three forms of the cytosolic MetRS: the full length present both in the cytosol and the nucleus and a N-terminally truncated form mainly located into the nucleus. Genetic and biochemical experiments demonstrate that the cytosolic full-length and the nuclear truncated isoforms of MetRS are essential for cell viability and suggest that the former is responsible for only cytosolic charging of tRNA^{eMet} while the latter would only charge tRNA^{iMet} inside the nucleus.

Introduction

The cell is surrounded by a lipid bilayer delimiting the intracellular environment that contains the genetic information encoding all the elements needed for its survival and division from the extracellular medium. Prokaryotes are single cell organisms composed of a unique compartment therefore requiring only one translational apparatus. Eukaryotes on the other hand are composed of multiple intracellular compartments among which two, the nucleus and the mitochondria, contains genomes that require specialized translational apparatuses for their expressions. While nuclear genes are transcribed inside the nucleus and translated in the cytosol, mitochondrial genes are transcribed but also translated inside the organelle. Most of the proteins, protein complexes and RNAs necessary for translation are transported from the cytosol to the mitochondria and have to be specifically addressed (Sickmann et al, 2003). Thus,

cells have had to evolve strategies to spatio-temporally organize their translational apparatuses in order to optimize cell growth.

Accurate and efficient production of aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs) is required not only in translationally active compartments but also in the nucleus in which tRNA proofreading occurs prior to protein synthesis (Azad et al, 2001). Generally organisms have several sets of aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs), one for the cytosol and one for each organelle that needs aa-tRNA for translation of mRNAs (Schneller et al, 1976). One would thus expect that each eukaryotic species encode a complete and specific set of twenty aaRSs for each compartment in which translation of a genome is a necessity. This also led to the overall idea that cytosolic aaRSs are soluble enzymes that have to remain in the cytoplasm and that organellar aaRSs would only transit in the cytosol and be sequestered inside the organelle after their import. This simplified view completely changed when translationally-active organelles were discovered missing one or several of the twenty aaRSs required to produce the complete set of aa-tRNAs necessary for mRNA translation. This was resolved with the discovery that some cytosolic aaRSs can be addressed to various other intracellular compartments (Turner et al, 2000; Tang et al, 2004). For example, synthesis of the yeast mitochondrial Gln-tRNA^{Gln} by the mitochondrial transamidation pathway requires import of the cytosolic glutamyl-tRNA synthetase (cGluRS) (Frechin et al, 2009) that generates the organellar glutamyl-tRNA^{Gln} substrate of the tRNA dependent amidotransferase (Araiso et al, 2014).

In the last decades, our views about aaRSs as housekeeping enzymes sequestered in the cytosol has changed (Guo and Schimmel, 2013). They were initially involved solely in one of the last steps in the tRNA channeling pathway leading to ribosomal translation of mRNAs (Negrutskii and Deutscher, 1991). However, unravelling mechanisms of nucleo-cytoplasmic exchanges, especially tRNA transport, showed that a fraction of some aaRSs can be found in the nucleus to aminoacylate tRNAs prior to their export ensuring, thus, some sort of quality control step of the tRNA integrity (Lund et al, 1998, Sarkar et al, 1999). Most yeast aaRSs possess a putative nuclear localization sequence (NLS) (Schimmel, 1999) without confirmed localization or function in the nucleus. Likewise, several Human aaRSs are also imported into the nucleus to exert nonconventional functions. For example, Human tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS) displays a classical NLS (Fu, 2012) and in response to oxidative stress, relocates to the

nucleus and activates transcription factor E2F1 to upregulate transcription of DNA repair genes (Wei, 2014). Similarly, zebrafish seryl-tRNA synthetase (SerRS) displays a UNE-S domain at its C-terminus that targets the enzyme to the nucleus in order to repress *VEGF-A* mRNA transcription thereby allowing normal vascular development (Xu et al, 2012). Human MetRS is also imported to the nucleolus under proliferative conditions to regulate rRNA synthesis and possesses two different NLSs in its C-terminus necessary for nuclear import (Ko et al, 2000). Overall, nuclear aaRSs not only exert their canonical functions inside the nucleus but are also involved in a large variety of roles, many of which have still to be identified (Guo et al, 2010).

Saccharomyces cerevisiae cGluRS mitochondrial relocation is due to its release from the cytosolic anchoring protein Arc1 (Frechin et al, 2014). Concomitantly, the second Arc1-bound aaRS, namely cytosolic methionyl-tRNA synthetase (cMetRS), is also released from Arc1 and relocates to the nucleus to regulate transcription of genes encoding subunits of the respiratory chain (Frechin et al, 2014). Together, the two aaRS and Arc1 form the cytosolic AME complex (Simos et al, 1996). cMetRS has a N-terminal GST-like extension dispensable for its aminoacylation activity (Walter et al, 1989) that is involved in the interaction with Arc1 (Galani et al, 2001). Complex formation increases the overall catalytic efficiency of the enzyme by lowering the K_M for purified $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ and increasing the enzyme's turnover. However, Arc1 has a general tRNA-binding capacity which surprisingly, *in vitro*, only has affinity for $\text{tRNA}_e^{\text{Met}}$ and not for $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ (Deinert et al, 2000). Moreover, recombinant purified AME complex aminoacylates preferentially $\text{tRNA}_e^{\text{Met}}$ *in vitro* whereas $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ is only poorly aminoacylated (Wiltrout et al, 2012). We therefore wondered whether free cMetRS shows various aminoacylation efficiencies with respect to initiator or elongator tRNA^{Met} *in vivo*.

We have previously identified a nuclear targeting signal in the N-terminal extension of cMetRS, consistent with its transcriptional role, required for its presence in this compartment. Moreover, this N-terminal part of cMetRS also displays motifs such as a zinc finger binding domain and a leucine zipper, generally harboured by transcription factors (Walter, 1989, Senger, 2001, Hahn, 2011). In this study we identified a truncated form of cMetRS that is almost exclusively found in the nucleus. Nuclear enrichment of cMetRS followed by mass spectrometry analyses shows that this nuclear truncated cMetRS is deprived of its 114-132 first residues. By a combination of biochemical and

genetic experiments we show that this truncated cMRS is generated through proteolytic cleavage of the full-length MetRS and not by alternative initiation of the *MES1* mRNA translation. Furthermore, genetic experiment unambiguously show that both full-length and the truncated cMRS display non overlapping essential functions. Finally, preliminary aminoacylation data suggest that the full-length cMRS embedded in the AME complex would only charge $\text{tRNA}_e^{\text{Met}}$ while the nuclear restricted truncated cMRS would preferentially aminoacylates $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$.

Results

MetRS contains at least two nuclear localization signals

Our previous study highlighted a classical nuclear localization signal (NLS) within the 55 first amino acids (aa) of cMetRS (Fig. 1A). To further characterize this NLS and cMetRS nuclear import, we deleted the corresponding nucleotide sequence, and the C-terminally fused GFP to the protein (MetRS Δ^{2-55} -GFP). Comparison by confocal microscopy of the wild type RS453 yeast strain and the strain expressing MetRS Δ^{2-55} -GFP shows that the latter is located in both the cytosol and the nucleus (Fig. 1B), showing that despite NLS removal the protein is still able to relocate to the nuclei. We thus hypothesized that cMetRS contains a second NLS.

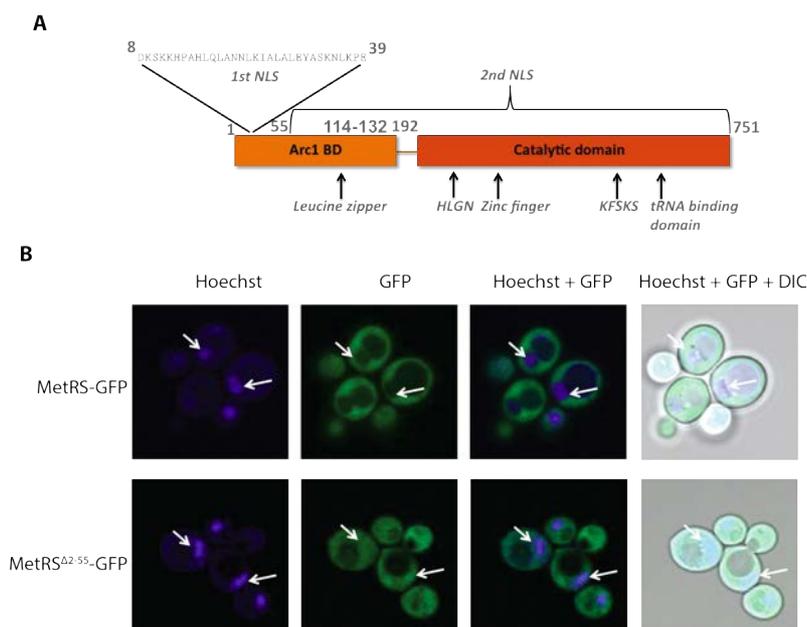


Figure 1. A second NLS exists within the sequence of MetRS (A) Location of NLS and specific features in the peptidic sequence of MetRS. **(B)** The deletion of the sequence coding for the 55 first aminoacid of MetRS does not avoid the nuclear localization of the C-terminus Gfp-fused protein as seen by confocal microscopy of a strain expressing a MetRS full length or Δ 2-55 GFP tagged in C-ter.

***Saccharomyces cerevisiae* contains two forms of methionyl-tRNA synthetase**

To set up the immunoblotting conditions we would use to further dissect how cMetRS relocates to the nucleus, we first prepared whole cell extracts from cells expressing MetRS-GFP and standardized the immunodetection conditions. Extracts originated from cells grown under respiratory or fermenting conditions. Figure 2A shows that under respiratory conditions, MetRS-GFP yields a single band (Fig. 2A, right lane) while in fermenting cells a smaller form of MetRS can be detected (Fig. 2A, left lane, arrowhead) A brief analysis of the size of the bands suggests that the cleaved form of MetRS is about 10-12 kDa smaller than the full length form. Since MetRS is C-terminally GFP-tagged, detection using anti-GFP antibodies suggests this cleavage probably occurs in the N-terminal GST-like extension of yeast MetRS that contains the Arc1 binding domain and only when yeast cells are grown under fermentative conditions.

MetRS is cleaved between the 114 and the 132nd amino acids

In order to determine the mechanism by which MetRS is truncated, we first analysed the MetRS sequence to search for an alternative start codon that could lead to the expression of a smaller protein. We found two candidate ATG codons encoding a Met at position 46 and 70. Although neither translation initiation at Met₄₆ nor Met₇₀ would not lead to a 10-12 kDa truncation of the protein we verified whether translation initiation could start at these downstream ATG codons. We mutated the first ATG codon into AGT or TTG and checked whether the smaller MetRS is still synthesized in the haploid *mes1* Δ mutant containing a URA3 plasmid bearing the wild type gene encoding MetRS and expressing a LEU2 plasmid bearing the gene encoding MetRS-GFP with the mutated first ATG. As shown in Figure 2B (upper panel (a), lanes 4 and 5), PCR mutagenesis of the original translational start codon of MetRS-GFP under control of its endogenous promoter did not allow expression of a truncated MetRS (even when up to 3 times more extract was used for immunoblotting; figure 2B, lanes 8 and 9). Moreover, expression of these ATG mutants in a *MES1* shuffle strain does not allow growth on 5-

FOA (Figure 2B, lower panel (b)) strongly suggesting that there is no alternative translational start site in the *MES1* open reading frame. It is therefore highly probable that a proteolytic cleavage or truncation of MetRS takes place to produce the shorter form.

To identify the cleavage site of MetRS, we performed an immunoprecipitation (IP) experiment using a C-terminally HA-tagged MetRS on whole cell extracts from a yeast strain expressing MetRS-HA under fermentative conditions. As shown in figure 2C, this purification procedure yielded a fraction containing the expected components of the AME complexes: Arc1, full-length cMRS and cGluRS but also a protein relatively abundant and whose size corresponded to that of the truncated MetRS. Nano LC MS/MS analyses of the IP fraction (Fig 2D) revealed that this band corresponds indeed to a N-terminally truncated MetRS and that the position of truncation occurs between residues 114 and 132 (Fig 2E). Given that mass spectrometry did not precisely identify the N-terminal residue of the truncated MetRS, to further study the functionality of this truncated form we generated truncation mutants of MetRS. Analysis of the 3D structure of the N-terminal GST-like domain of MetRS shows that residues 114 and 132 are inside two alpha helices (Fig 2F). We decided to create two variants mimicking the natural shorter MetRS: MetRS Δ 121 and MetRS Δ 142 that are not cleaved within the alpha helix that spans from residues 122 to 141 to prevent potential misfolding of the recombinant truncated MetRS (Fig 2F).

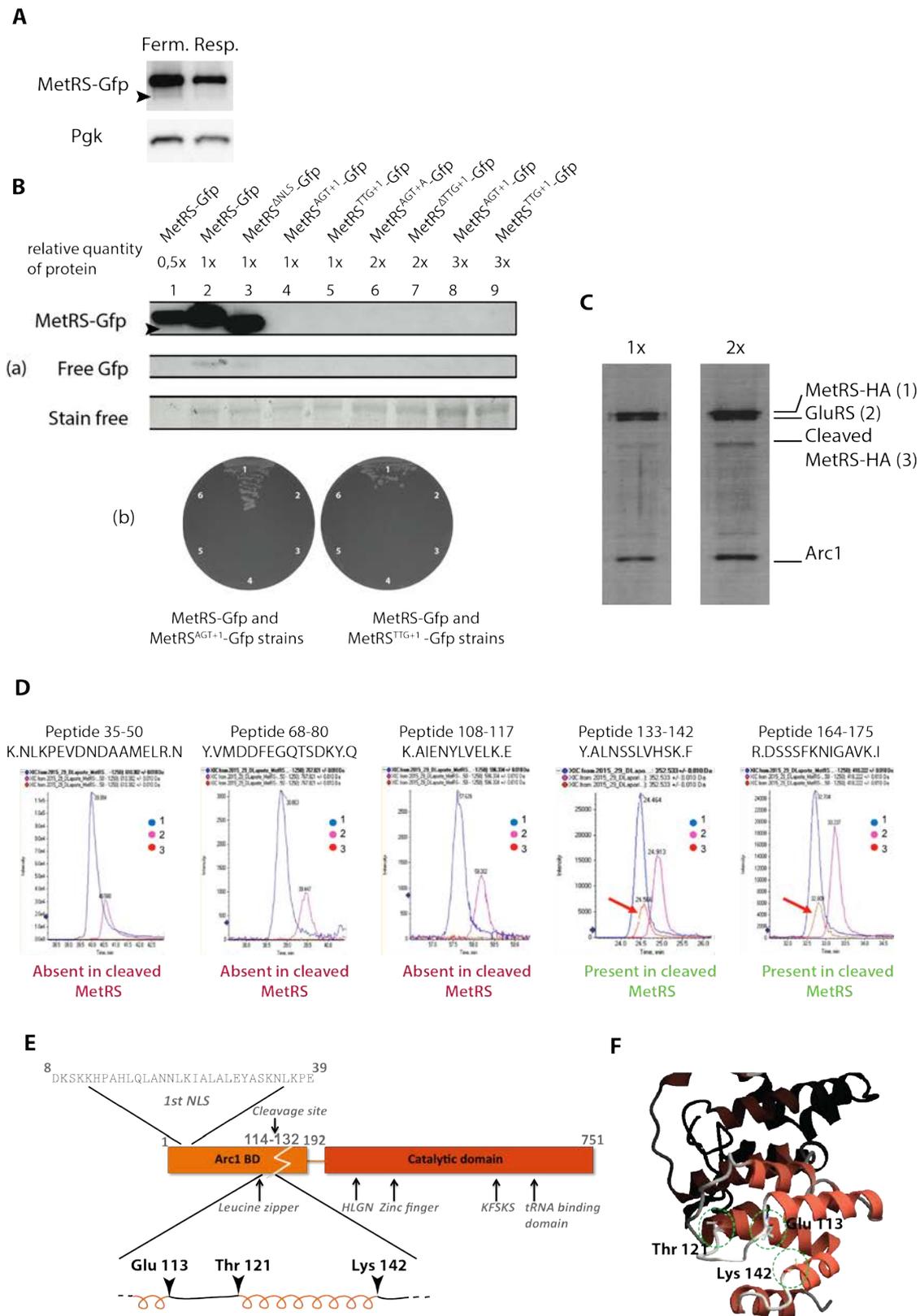


Figure 2. MetRS is cleaved between the 114th and the 132nd aminoacid in fermentation. (A) A C-terminus Gfp tagged MetRS exhibits a truncated form in fermentation, according to immunodetection of Gfp. **(B)** (a) The truncated form is not due to an alternative start of translation since nothing is expressed from a mutated gene of the ATG codon, and (b) do not allows the growth of a strain carrying this gene. **(C)** An immunoprecipitation has been performed on a strain expressing MetRS tagged with HA in C-terminus. The 3 lanes corresponding to (1) MetRS full length, (2) GluRS, (3) MetRS cleaved **(D)** have been injected in nano-LCMS/MS. According to the

profiles of the mass spectrometry analyze, MetRS is cleaved between the 114th and the 132nd aminoacid. **(E)** Schematic location of the specific features of MetRS. **(F)** MetRS contains an alpha helix between the 122nd and the 141st aa, that is why we decided to select residues (surrounded in green) before or after this alpha helix to generate mutants of the cleaved form. The black arrow points the cleaved form of MetRS.

Truncated MetRSs accumulate in the nucleus

Since the truncated MetRSs (natural and both MetRS Δ 121 and MetRS Δ 142) are deprived of the first NLS but shorter than the MetRS Δ 2-55 we checked whether these forms are able or not to relocate to the nucleus. We thus compared nuclear and whole cell extract of a strain expressing MetRS-GFP under the dependence of its own promoter. Although MetRS-GFP yields a single band when analyzing the whole cell extract by western blot with anti-GFP antibodies (Fig. 3A lanes “tot.”), the lower molecular weight MetRS is significantly enriched in nuclear extracts (Fig. 3A lanes “nuc”) that also contain a small amount of full length MetRS. We then generated yeast strains bearing plasmids expressing HA- and GFP-tagged MetRS Δ 121 and MetRS Δ 142 under the dependence of the natural *MES1* promoter. Figure 3B shows that in whole cell extracts MetRS Δ 142-HA accumulates 12 fold more than MetRS Δ 121-HA and was selected for the next experiments. To check whether MetRS Δ 142 is still able to relocate to the nucleus we analysed the MetRS Δ 142-GFP localization by fluorescence microscopy. Figure 3C shows that both MetRS Δ 121-GFP and MetRS Δ 142-GFP are localized both in the nucleus and in the cytosol as well while the naturally truncated MetRS is predominantly located inside the nucleus (Figure 3A). This discrepancy could be due to the fact that in comparison to the endogenous cMetRS, MetRS Δ 121-GFP and MetRS Δ 142-GFP genes are plasmid-borne. However, this clearly shows that variants MetRS Δ 121 and MetRS Δ 142 can enter the nucleus despite the absence of the first NLS and shows that the cleaved MetRS possesses at least two different nuclear localisation signals. Also, given that the maturation of the shorter form of MetRS could take place in the nucleus, depriving MetRS from its first NLS (which is the case of MetRS Δ 121 and MetRS Δ 142) could decrease the import efficiency of the MetRS and increase the proportion of the cytosolic pools of MetRS Δ 121 and MetRS Δ 142.

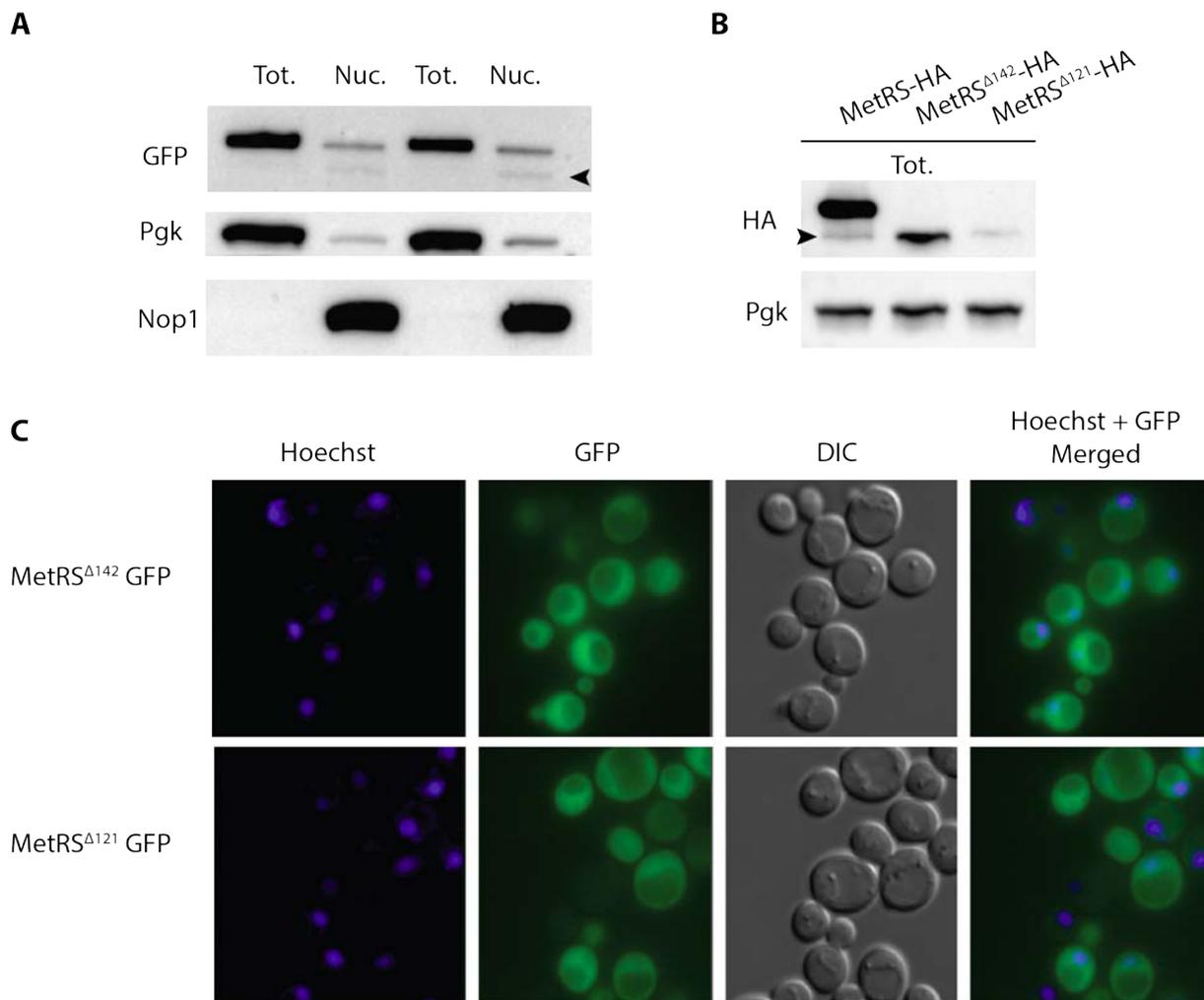


Figure 3. The cleaved form of MetRS is located in the nucleus. (A) Immunodetection of the GFP on purified nuclei (Nuc.) of a strain in which MetRS is Gfp tagged in C-terminus exhibits a more important ratio of cleaved MetRS than the total extract (tot.) The black arrow points the cleaved form of MetRS. **(B)** MetRS-HA shows the cleaved form by immunodetection on total extracts of haploid strain expressing the different variants of MetRS-HA. The mutant MetRS^{Δ142} is better expressed than the MetRS^{Δ121}. **(C)** The mutants MetRS Gfp signals are located in both nucleus and cytosol as seen by epifluorescence microscopy.

The truncated MetRS is generated by a proteolytic cleavage

To further confirm that the truncated MetRS is generated by proteolytic cleavage of the full-length form of MetRS that takes place in the nucleus, we purified full-length recombinant MetRS (Fig 4A) and incubated the protein with a nuclear enriched extract of fermenting yeast cells. Figure 4B shows that over time the amount of full-length MetRS decreases and, proportionally, a band corresponding to the size of the truncated MetRS increases, strongly suggesting that full-length MetRS is truncated by a proteolytic cleavage or degradation of its N-terminus by a nuclear protease or protein maturation

apparatus. To further identify the pathway responsible for the removal of this N-terminal part of MetRS we verified whether Rim 13, a calpain protease homologue responsible for the proteolytic cleavage of some Human aaRS, or the proteasome were involved in this process (Supplemental Figure 1). These lines of experiments show that Rim 13 is not responsible for the removal of the N-terminus of MetRS. However, our experiments with ubiquitin and proteasome subunits mutants did not yield results that allow us to conclude as to the involvement or not of the proteasome in this process. Further experiments are needed to identify the maturation pathway generating this truncated form of MetRS.

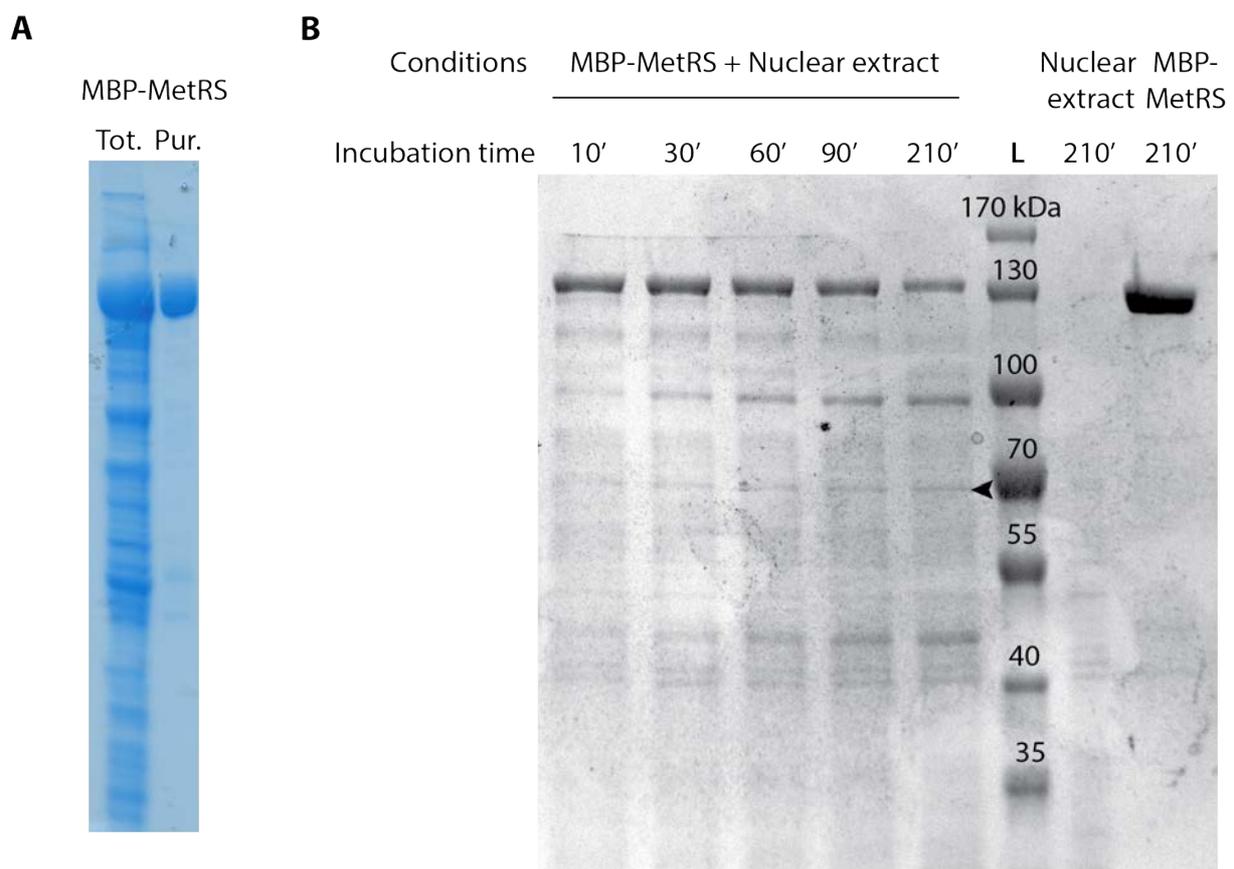


Figure 4. MBP-MetRS is cleaved *in vitro*. (A) We overexpressed MBP-MetRS in *E. coli* Rosetta 2 strain (tot : total extract) and purified the recombinant protein on amylose resin (pur : purified). (B) The recombinant protein were incubated at different times with nuclear extract of *S. cerevisiae* L : ladder. The black arrow points the cleaved form of MetRS.

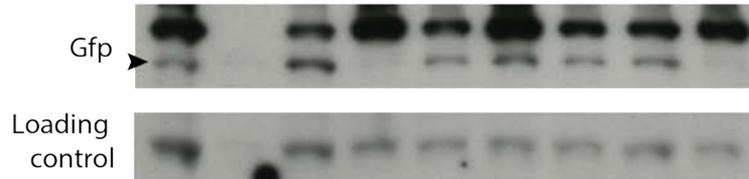
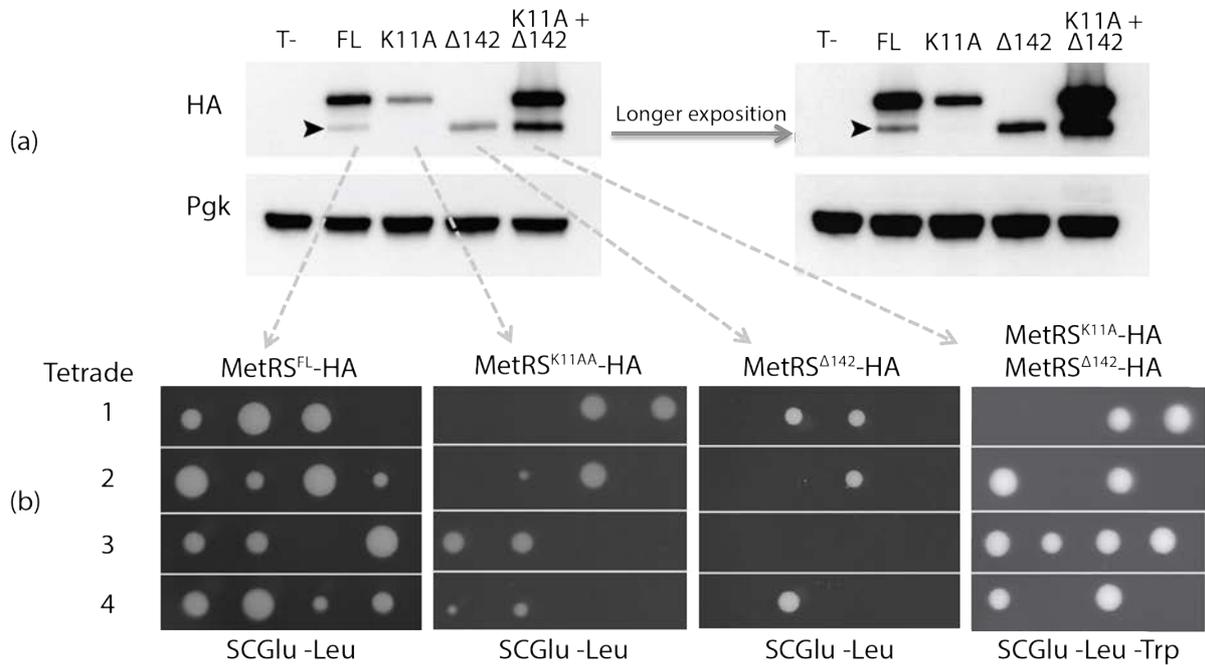
The two forms of MetRS are essential for cell growth

Since the cleaved MetRS lacks a part of its N-terminal Arc1 binding domain, this enzyme is very likely severely impaired in its Arc1-binding capacity. Knowing that Arc1 is drastically enhancing the tRNA aminoacylation efficiency of MetRS (Simos, 1996), we wondered whether this truncated MetRS is still functional enough to ensure cell viability. Moreover, this truncated form of MetRS despite the lack of its first NLS preferentially relocates to the nucleus which is not the compartment in which one would expect that tRNA aminoacylation is essential.

Thus, to check whether the truncated MetRS fulfils its essential functions we used yeast genetics to rule out this issue. We performed PCR mutagenesis on the *MES1* coding sequence placed under control of its own promoter. The aim of this experiment was to generate non-conservative missense point mutations in the N-terminal part of MetRS that may influence the MetRS cleavage phenotype. Figure 5A shows a western blot on total extracts of strains expressing selected mutants. Two of them, namely K11A and S10D, were shown to dramatically decrease the amount of cleaved MetRS. Using the MetRS^{K11A} mutant (also named “never cleaved”) and the MetRS^{Δ142} mutant (also named “always cleaved”) we performed genetic experiments as described below. A diploid heterozygous strain for *MES1* (*mes1::HIS5/MES1*) was either transformed with a plasmid expressing the MetRS^{K11A} or MetRS^{Δ142} mutant or with both. As a control, the starting heterozygote was also transformed with a plasmid expressing the native full length MetRS. Strangely, the double mutant MetRS^{K11A} + MetRS^{Δ142} exhibits higher levels of HA tagged protein, suggesting the existence of a retro-control mechanism. Following sporulation and tetrad dissection, the resulting spores were analysed for viability as shown in Figure 5B (lower panel). When transformed with a plasmid expressing the full-length enzyme, maximum viability was observed. In spores having a wild type plasmidic copy of *MES1* 100% of viability was observed (Fig. 5C). On the other hand, only 50% of the spores were viable when the strain carried plasmidic “cleaved” or “never cleaved” MetRS, and all of viable spores were *MES1* positive, indicating that the cleaved or never cleaved MetRS plasmids alone did not allow the viability. The maximum of viability was recovered when the strains carried both plasmids. Thus, both the truncated and full-length MetRS appear to be essential for yeast viability suggesting that they carry two different non-overlapping essential functions.

A

MetRS-Gfp full length : No mut. K9A K11A K12A K34A K37A S10A S10D

**B****C**

	MetRS ^{FL}	MetRS ^{Δ142}
Number of dissected tetrads	36	36
Tetrads with at least 1 viable spore	21	10
Maximal percentage of viability	100%	50%
Maximal percentage of <i>MES1</i> +	50%	100%
Medium	SCGlu -Leu	SCGlu -Leu

Figure 5. The cleaved form of MetRS is essential for viability. (A) Immunodetection on total extract of haploid strains expressing different mutants of MetRS. MetRS^{K11A} and MetRS^{S10D} exhibits very low levels of cleavage. **(B)** **(a)** Immunodetection on total extract of diploid strains shows that the different mutants are expressed, and **(b)**

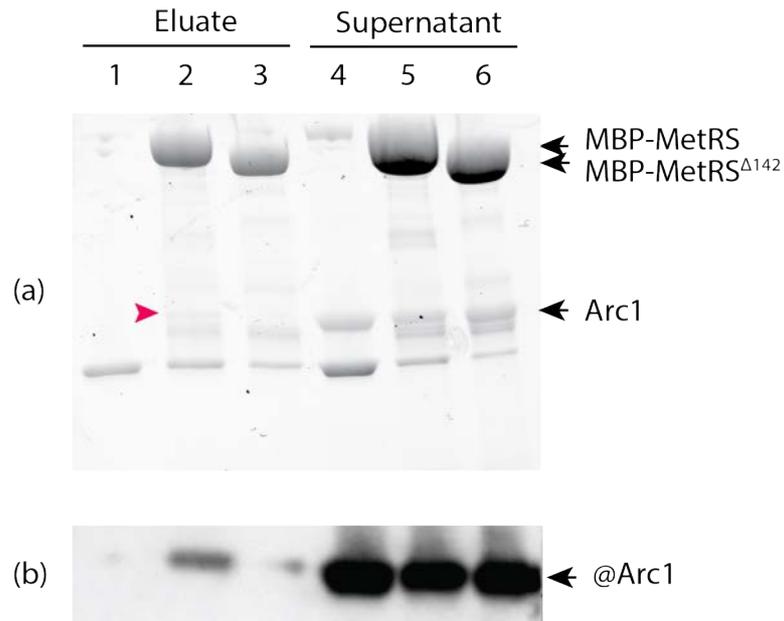
dissection spores on media allowing the selection of the vectors shows essentiality of the cleavage since the MetRS mutants containing strains are unviable, but both together, the MetRS^{K11A} and MetRS^{Δ142} allow the growth of the strain. **(C)** Statistics of tetrads dissection. FL : Full length. The black arrow points the cleaved form of MetRS.

The cleaved MetRS aminoacylates tRNA_i^{Met} more efficiently than the full length

To get more insights into the role of the truncated MetRS we first verified that as expected this form is unable to bind Arc1. To do so we used purified recombinant full-length MetRS and MetRS^{Δ142} as Maltose Binding Protein (MBP) fusions (Supplemental Figure 2). We also purified recombinant MBP-MetRS and MBP-MetRS^{Δ142} in the presence of purified recombinant Arc1. Figure 6A (a, b) shows that Arc1 is retained on the amylose column in the extract that contains full-length MBP-MetRS (lane 2) but not in extracts that contains MBP-MetRS^{Δ142} (lane 3). Binding of Arc1 only to full-length MBP-MetRS is specific since extracts corresponding to the strain that overexpresses full-length MBP-MetRS in which the expression of protein was not induced (1), do not retain Arc1 meaning Arc1 alone was also not aspecifically retained on the amylose matrix. These data confirm that, as expected, MetRS^{Δ142} is unable to bind to Arc1. The next question we asked was whether this truncated MetRS was able to aminoacylate tRNA^{Met}. As a first trial, we used an 80 % pure yeast tRNA_i^{Met} (gift from Dr. G. Keith) to check the aminoacylation capacity of both forms of MetRS. Figure 6B shows that both enzymes are able to charge fully postranscriptionally-modified tRNA_i^{Met}. However, MetRS^{Δ142} seems to be a more efficient enzyme than full-length MetRS since, using the same concentration of enzymes and tRNA_i^{Met}, the apparent V_i obtained with MetRS^{Δ142} is 1.5 fold higher than that obtained with full-length MetRS. This shows that not only MetRS^{Δ142} is able to charge, at least tRNA_i^{Met}, but that the enzyme seems to be more efficient than the full-length MetRS. However, one has to keep in mind that Arc1 will drastically enhance the aminoacylation efficiency of full-length MetRS which has retained the capacity to bind to Arc1 contrary to MetRS^{Δ142}. Moreover, this enhancement of the aminoacylation efficiency of full-length MetRS by Arc1 will only concern charging of tRNA_e^{Met} which is efficiently bound by Arc1 contrary to tRNA_i^{Met} which is not (Deinert, 2001). We thus hypothesized that both enzymes: full-length MetRS and to MetRS^{Δ142}, might be restricted to charging of only one of the two tRNA^{Met} species in the cellular context. To verify this hypothesis, we produced *in vitro* transcribed tRNA_e^{Met} and tRNA_i^{Met} and determined the

kinetic constants of both MetRS variants for aminoacylation of these two tRNA species. Table 1 shows that MetRS Δ 142 is 1.6 fold more efficient than full-length MetRS for charging of tRNA $_i^{\text{Met}}$, essentially due to a higher catalytic speed than full-length MetRS for tRNA $_i^{\text{Met}}$ (0.3 compared to 0.52 s $^{-1}$ for tRNA $_i^{\text{Met}}$). If as reported previously the affinity of full-length MetRS for tRNA $_e^{\text{Met}}$ will be drastically increased (Simos, 1996) upon Arc1 binding but not for charging of tRNA $_i^{\text{Met}}$, than our results suggest that tRNA $_e^{\text{Met}}$ is very likely preferentially charged by full-length MetRS in the cytosol, while tRNA $_i^{\text{Met}}$ would be preferentially charged by MetRS Δ 142 most probably in the nucleus. Kinetic constants for full-length MetRS and MetRS Δ 142 in the presence of Arc1 have to be determined to confirm this hypothesis.

A



B

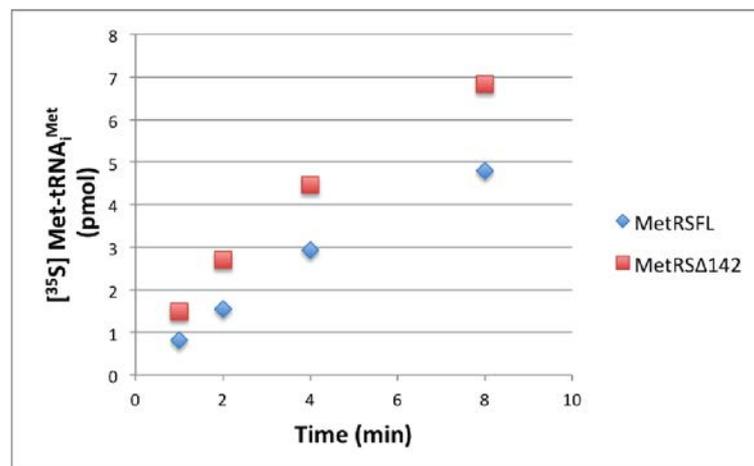


Figure 6. Despite the MetRS Δ 142 binding to Arc1 is dramatically decreased, the MetRS Δ 142 shows aminoacylation activity. (A) Purified Arc1 does not bind to MBP-MetRS Δ 142 whereas it binds MBP-MetRS (B) Aminoacylation of tRNA_i^{Met} by MetRS Δ 142 is faster than with MetRS^{FL}. tRNA : 6.6 μM . Enzyme : 0.1 μM . Methionine : 100 μM

	MetRS + tRNA _i ^{Met}	MetRS + tRNA _e ^{Met}	MetRS Δ 142 + tRNA _i ^{Met}	MetRS Δ 142 + tRNA _e ^{Met}
K_M (μM)	3,6	0,6	4,1	1,4
k_{Cat} (s^{-1})	0,30	0,29	0,52	0,5
k_{Cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	0,08	0,48	0,13	0,36

Table 1. Kinetic constants of full-length MetRS and MetRS Δ 142 for methionylation of cognate tRNA_i^{Met} and tRNA_e^{Met} transcripts.

Discussion

Aminoacyl-tRNA synthetases are ubiquitous enzymes that were discovered more than half a century ago for their role in fuelling the protein synthesis machinery with aa-tRNAs. Their propensity to assemble into so-called multisynthetase complexes (MSCs) was also discovered more than 4 decades ago albeit the exact reason for this assembly is still not completely elucidated (Mirande et al, 1983). More recent studies suggest that aaRSs are moonlighting proteins with multiple functions and that MSCs act a depot for these releasable regulatory proteins (Hausmann and Ibba, 2008, Lee et al, 2004, Ray et al, 2007). Thus, the study of aaRSs is far from having reached its endpoint and they are an example of how deep a fundamental process like protein synthesis is interconnected with other cellular pathways.

The present study is based on a previous result showing that *S. cerevisiae* MetRS can reach the nucleus to promote respiratory complex gene transcription. Here we show that there are two forms of nuclear MetRS, a full-length enzyme and a N-t truncated form, both essential for yeast growth. Although nuclear aminoacylation has been described in the late 1990's, the presence of aaRSs in the nucleus or their localization in this subcellular compartment is not well documented (Lund, 1998, Sarkar, 1994). We bring experimental evidences that there are two NLSs recognized by two different importins in yeast MetRS and mutations within these signal still allows MetRS to enter the nucleus suggesting the importance for cleaved MetRS to be nuclear. However, the presence of multiple NLSs within MetRS suggests that fragments and cleaved enzyme may have an important role inside the nucleus and leave the question open whether cleavage occurs in the cytosol or the nucleus. Human MetRS also possesses at least two NLSs (Ko, 2000) in the C-terminal part of the protein. The presence of multiple NLSs seems not to be an exception since it was also the case for other proteins like drosophila G9a histone H3 methyltransferase (4 NLSs) (Kato, 2011).

As mentioned, the existence of a retrocontrol mechanism of the cleaved MetRS for the expression of the full-length MetRS should be considered. This type of mechanism has been reported in yeast such as Hxk2 and Ino2, promoting the expression of their

own genes (Rodriguez, 2001, Ashburner, 1995). It would be possible, since the cleaved MetRS harbors a NLS within its sequence.

The cleavage of aaRSs has already been observed for other aaRSs like human cytoplasmic TyrRS that, under apoptotic conditions, is secreted in the extracellular matrix and cleaved into two distinct domains by leukocyte elastase (Wakasugi, 1999) to confer the protein cytokine properties. In the same vein, p43 is also cleaved under the same conditions thus releasing its EMAP-II like domain (Park, 2005). Human TrpRS consists in a catalytic core linked to a WHEP domain via a disordered loop. Similarly to TyrRS, leukocyte elastase recognizes a cleavage site within this loop, which releases the WHEP domain from the core enzyme, thus promoting its angiostatic activity (Wakasugi, 2002). Thus, aaRS cleavage appears to be a strategy used to modulate the aminoacylation activity of an aaRS and reveal its additional non-canonical function(s).

This cleavage/maturation mechanism of aaRSs also has been reported in *Toxoplasma gondii*. While purifying MSC components, degradation product of MetRS is observed in the eluate of an immunoprecipitation (Van Rooyen, 2014). In this experiment, MetRS is HA-tagged in C-terminus, indicating a N-terminus degradation, such as in our study. N-terminus part of *T. gondii* MetRS also contains a GST-like domain, allowing its incorporation in the MSC. In our study, MetRS was cleaved between the 114 and the 132nd amino acids, releasing a part of the GST-like domain as in *T. gondii*.

Recently, calpain has been identified as the protease that cleaves aaRSs from the mammalian MSC (Lei, 2015). Among them, MetRS, is also cleaved in its N-terminal part. However, Rim13, a pH response regulator and also the calpain homologue in yeast (Subramanian, 2013), is not involved in MetRS cleavage (Supplemental figure 1). This cleavage seems to decrease the catalytic efficiency of the enzymes, a fact that contrasts with our results where cleaved MetRS seems to be fully active but it is rather the tRNA specificity of the enzyme that seems to be affected. Indeed, in our case the cleavage of MetRS seems to modulate the distinction of the enzyme between the initiator and elongator tRNA^{Met}. It is somewhat striking to notice that the MetRS cleavage is more abundant when yeast cells ferment rather than when using a respiratory metabolism. A possible explanation may be that there is more free MetRS in respiration due to Arc1 reduced expression (Frechin, 2009). Moreover, it has been shown that Arc1 can shuttle between the nucleus and the cytoplasm but due to a strong nuclear export signal on

Arc1, its nuclear reminiscence is very low (Galani, 2001, Galani, 2005). If MetRS has to play an essential role in the nucleus when yeast ferments, the sole alternative is to deprive it from its Arc1 binding domain by a proteolytic cleavage and which is exactly what we observe. The small fragment resulting from MetRS cleavage has also the capacity to reach the nucleus since it harbours the first NLS we identified but we have so far performed no experiments to assess its presence in the nucleus. There are examples where a cleaved portion of an enzyme relocates to organelles and exert a function. For example, the cleavage of eIF3g by a caspase releases an N-terminal fragment that is imported in the nucleus and that has a DNase activity (Kim, 2013).

In our work, we demonstrated that MetRS^{Δ142} is still active for aminoacylation and seems more efficient for aminoacylation of the tRNA_i^{Met} than the wild type enzyme. This is consistent with the fact that Arc1 has lower affinity for tRNA_i^{Met} than for tRNA_e^{Met} (Deinert, 2001) and would ensure high levels of production of tRNA_i^{Met} preferentially in the nucleus where truncated MetRS is mainly located. Met-tRNA_i^{Met} would then be subsequently exported from the nucleus to enter protein synthesis. In two previous studies, nuclear tRNA_e^{Met} and unspecified tRNA^{Met} was detected in its aminoacylated form (Sarkar, 1999, Steiner, 2004). Moreover, human tRNA_i^{Met} has been found previously in its aminoacylated form in the nucleus, suggesting the existence of a comparable mechanism in metazoans (Lund, 1998). Thus, compartmentalisation compensates for the bias introduced by the preferential binding of tRNA_e^{Met} by Arc1 (and therefore for Met-tRNA_e^{Met} production). These results are consistent with the essential character of both the truncated and full-length MetRSs for the cell viability. With respect to the results we present herein, there are important issues that still remain to be cleared out. If as suggested Met-tRNA_i^{Met} is preferentially generated in the nucleus by the truncated MetRS, the pathway and the factors involved in its export to the cytoplasm for translation initiation has to be elucidated. Alternatively, one might wonder whether translation initiation might to a certain extent start in the nucleus. Indeed, nuclear protein synthesis has been reported in several studies (Allfrey, 1954, Iborra, 2001, McLeod, 2014) and 43S assembled ribosomal particles have been found in yeast nuclei (Moy, 1999). However, two of the three subunits that assemble into eIF2 which is necessary for the recruitment of Met-tRNA_i^{Met} in the P-site of the 40S ribosomal subunit have been shown to be solely located in the cytosol and the localization of the third one has not been checked thus far (sgd). Finally, if tRNA_i^{Met} is preferentially

methionylated inside the nucleus, there must be a mechanism and pathway, yet unidentified, that will actively shuttle tRNA_i^{Met} back to the nucleus after its release by the translating ribosomes.

Materials and methods

Strains and plasmids

Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Sequence files are provided as supplementary data as “ape” files. The yeast strain *mes1::HIS5* correspond to a RS453 background in which *MES1* has been disrupted by *HIS5* of *S. pombe* which the homologue of the *S. cerevisiae HIS3* gene (Wach, Philippsen, 1997).

RS453 genotype is *Mat α ade2-1 his3-11,15 ura3-52 leu2-3,112 trp1-1*.

Destination organism	Strain	Vector	Promoter	Product	Tag
<i>E. coli</i>	Rosetta 2	pMal	<i>TAC</i>	MetRS	MBP N-ter
<i>E. coli</i>	Rosetta 2	pMal	<i>TAC</i>	MetRS ^{Δ142}	MBP N-ter
<i>E. coli</i>	Rosetta 2	pHIS	<i>T7</i>	Arc1	6 His N-ter
<i>E. coli</i>	XL1 Blue	pUC18	<i>T7</i>	tRNA _i ^{Met} gene for <i>in vitro</i> transcription	-
<i>E. coli</i>	XL1 Blue	pUC18	<i>T7</i>	tRNA _e ^{Met} gene for <i>in vitro</i> transcription	-
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>mes1::HIS5</i>	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{Δ142}	GFP C-

<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{Δ121}	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{K11A}	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{K9A}	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{K12A}	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{S10A}	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{S10D}	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{K34A}	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{K37A}	GFP C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>mes1::HIS5</i>	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{Δ142}	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{Δ121}	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	RS453	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{K11A}	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MES1/mes1::HIS5</i>	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MES1/mes1::HIS5</i>	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{Δ142}	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MES1/mes1::HIS5</i>	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{Δ121}	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MES1//mes1::HIS5</i>	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{K11A}	HA C-ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MES1//mes1::HIS5</i>	pRS315+	<i>MES1</i>	MetRS ^{Δ142+}	HA C-ter

		pRS314		MetRS ^{K11A}	ter
					HA C- ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>mes1::HIS5 shuffle</i>	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{AGT+1}	GFP C- ter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>mes1::HIS5 shuffle</i>	pRS315	<i>MES1</i>	MetRS ^{TTG+1}	GFP C- ter

Table 2. Plasmids used during the study.

Whole cell extracts

2 mL of cells were harvested by centrifugation when $A_{600\text{ nm}}$ reached a value of 1. Pellets were resuspended in 100 μL of NaOH 1.85 M and incubated 10 min on ice. Then, 100 μL of TCA were added to the mixture, softly homogenised and incubated 10 min on ice. Then the mixture was centrifuged 10 min at 4 °C 12,000 g , and the supernatant removed. The pellet was resuspended into 2 volumes (*e. g.*: 50 μL) of Tris HCl pH 8.0 and 1 volume (*e. g.*: 25 μL) of loading buffer. The sample was incubated at 37 °C during 10 min and subsequently used for SDS-PAGE analysis.

Genetics

Strains RS453 and *mes1::HIS5 shuffle* were crossed on YPD, and diploids yeast cells were selected on the appropriate synthetic medium during 48h. Diploids without the vector URA containing the wild type *MES1* gene were selected on 5-FOA medium, and transformed with the pRS315 allowing the expression of MetRS mutated or not. They were subjected to sporulation on YPD solid medium and after 5 days, tetrads were gently digested with zymolyase 20T (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 5 min at room temperature in water and dissected on the appropriate selective medium using a MSM200 Singer micromanipulator. After 48h of growth at 30 °C, cell viability was analyzed.

Spheroplast preparation and nuclei purification

Yeast cells from 2 L of culture in the appropriate medium were harvested at 0.7 $A_{600\text{ nm}}$ and washed once with water. Pellet was resuspended in 100 mM Tris H_2SO_4 , 10 mM DTT in a volume of 2 mL/g of wet cells and incubated 20 min at 30 °C with gentle agitation. The mixture was centrifuged 4 min at 3500 g and the pellet was washed with 1.1 M sorbitol, 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4 using 7 mL buffer per g of cells and resuspended with the same buffer. Zymolase 20T was added to the mixture (5 mg/g of cells) and incubated during 45 min at 30 °C with gentle agitation.

All next steps are performed at 4 °C.

The spheroplasts are centrifuged 4 min at 3500 g , gently washed with 1.1 M sorbitol, 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4 and centrifuged again. The pellet was resuspended in 20 mL 1.1 M sorbitol, 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4 and loaded on a 6 mL cushion containing 30 mM sorbitol, 5 % (v/v) ficoll 400, with protease inhibitors. The spheroplasts were centrifuged 10 min at 4000 g . Cells were resuspended into 15 mL ficoll 20 % (v/v), 20 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4, 1 mM MgCl_2 , and the spheroplasts were broken in potter by 20 strokes. The lysate was chilled 10 min on ice and subsequently centrifuged 5 min at 13000 g . The supernatant was centrifuged 10 min at 13000 g . The supernatant was collected and loaded on a ficoll 400 gradient containing 20 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4, 1 mM MgCl_2 , protease inhibitors and ficoll 400 50 % (v/v), ficoll 400 40 % (v/v), ficoll 400 30 % (v/v), 6.5 g each in 25 × 89–mm ultracentrifuge tube. Then, the gradients were ultracentrifuged 1 h at 58000 g (Beckman, SW28 rotor, 18000 rpm). The 40 % layer and the interface 40 - 50 % containing the nuclei were harvested. To remove ficoll, the samples were diluted 10 times in 20 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4, 1 mM MgCl_2 and centrifuged 10 min at 10000 g to pellet the nuclei.

Nuclei were finally resuspended in 100 mM Tris HCl pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM benzamidine, protease inhibitors, 500 μL and sonicated for 1 min 20 s (1 s on/1 s off, 30 % amplitude). After a chilling step on ice, nuclei were re-sonicated for 30 s (1 s on/1 s off, 30 % amplitude). The nuclear extracts were ultracentrifuged 30 min at 100,000 g to pellet nuclear membranes. The supernatant containing nuclear proteins was analyzed on SDS-PAGE.

Protein expression and purification

E. coli rosetta 2 containing pMal MES1 were cultured at 30 °C until $A_{600\text{ nm}}$ reached 0.7 and IPTG was added to a final concentration of 0.3 mM. Cells were harvested after 3 h of induction. The pellet was frozen at -80 °C. The pellet was resuspended in 1/50 of the initial volume with 250 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.25 % tween 20, 5% glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, protease inhibitors, and sonicated 1 min (1 s on/1 s off, 30 % amplitude). The sonication step was repeated several times depending on the volume of cells to lyse. The NaCl concentration was subsequently adjusted to 300 mM. The mixture was centrifuged 15 min at 10000 *g* and 4 °C. The supernatant was added to previously equilibrated amylose resin, and batched at least 90 min in cold room. The flowthrough was eliminated and the resin washed with 20 volumes of buffer containing 50 mM Tris HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 % (v/v) glycerol, 1 mM β -Mercaptoethanol. The MBP protein was eluted with the same wash buffer containing 0.36 % of maltose. The concentration of the sample was determined using NanoDrop and the extinction coefficient of the MBP tagged protein.

In vitro transcription

Saccharomyces tRNA_i^{Met} and tRNA_e^{Met} sequences were obtained from the Leipzig tRNA database (<http://trna.bioinf.uni-leipzig.de>). tRNA_e^{Met} gene was created using overlapping primers containing the T7 promoter, the tRNA sequence and the 3' CCA end. The whole construct was subcloned into *HindIII* *BamHI* restrictions sites of a pUC18 vector.

Forward:

5'AGCTTAATACGACTCACTataGCTTGAGTAGCTCAGTAGGAAGAGCGTCAGTCTCATAATCTG
AAGGtCGAGAGTTCGAACCTCTCCTCGAGCAccaG 3'

Reverse:

5'GATCCtggTGCTCGAGGAGAGGTTTCTCGaCCTTCAGATTATGAGACTGACGCTCTTC
CTACTGAGCTACTCAAGCtataGTGAGTCGTATTA 3'

According to Fechter *et al.*, a ribozyme was added upstream of the tRNA_i^{Met} gene. This sequence was obtained by gene synthesis from Eurofins Genomics, and as for tRNA_e^{Met}, subcloned into a pUC18 vector.

5'

AAGCTTAATACGACTCACtataggagataCGGCGCTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGGTAC
CCGGTACCGTCAGCGCCGTGGCGCAGTGAAGCGCGCAGGGCTCATAACCCTGATGtCCTCGGA
TCGAAACCGAGCGGCGCTAccaGGATCC 3'

Transcripts were obtained by incubation for 3 h at 37 °C of 500 µL mixtures containing 40 mM Tris HCl pH 8.1, 30 mM MgCl₂, 1 mM spermidine, 5 mM DTE, 0.01 % (v/v) Triton X-100, 4 mM of ATP, CTP, GTP and UTP, 16 mM of GMP, 250 U T7 RNA polymerase and 50 µg of MvaI linearized plasmid.

After transcription of tRNA_i^{Met}, reaction mixtures were diluted 5 times in 40 mM Tris HCl pH 8.1 and 30 mM MgCl₂, incubated 1 h at 60 °C in order to enhance ribozyme autocatalytic cleavage.

Reactions were stopped by phenol/chloroforme extraction followed by ethanol precipitation. Transcripts were purified on a 12 % preparative denaturing polyacrylamide gel (40x30x0.2 cm). After sample loading with formamide Xylene-Cyanol buffer, gel was run overnight, 650 V and 55 mA. Transcripts were revealed by UV-shadowing and eluted using a Biotrap (Schleicher & Schuell) electroelution system. Concentrations of transcripts were determined on a Nanodrop.

tRNA_i^{Met} was renatured using the following procedure: transcript was incubated 4 minutes at 95 °C followed by 4 minutes on ice (repeated twice) then 15 mM MgCl₂ was added and the mixture incubated 5 min at 65 °C, and slowly cooled down to room temperature.

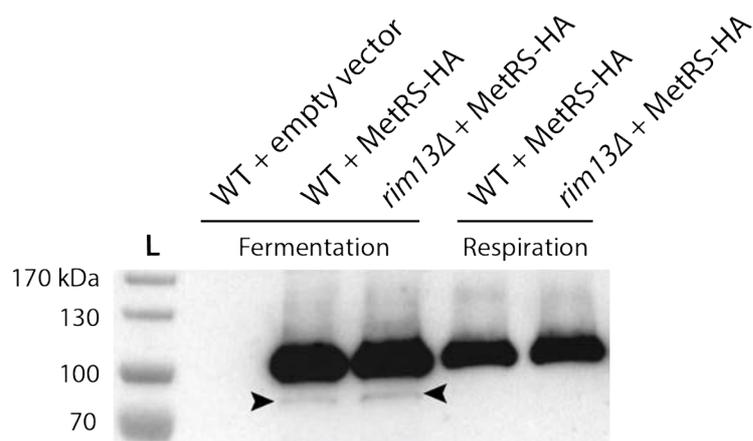
tRNA_e^{Met} was renatured by heating 2 min at 60 °C and slowly cooling to room temperature.

***In vitro* aminoacylation assay**

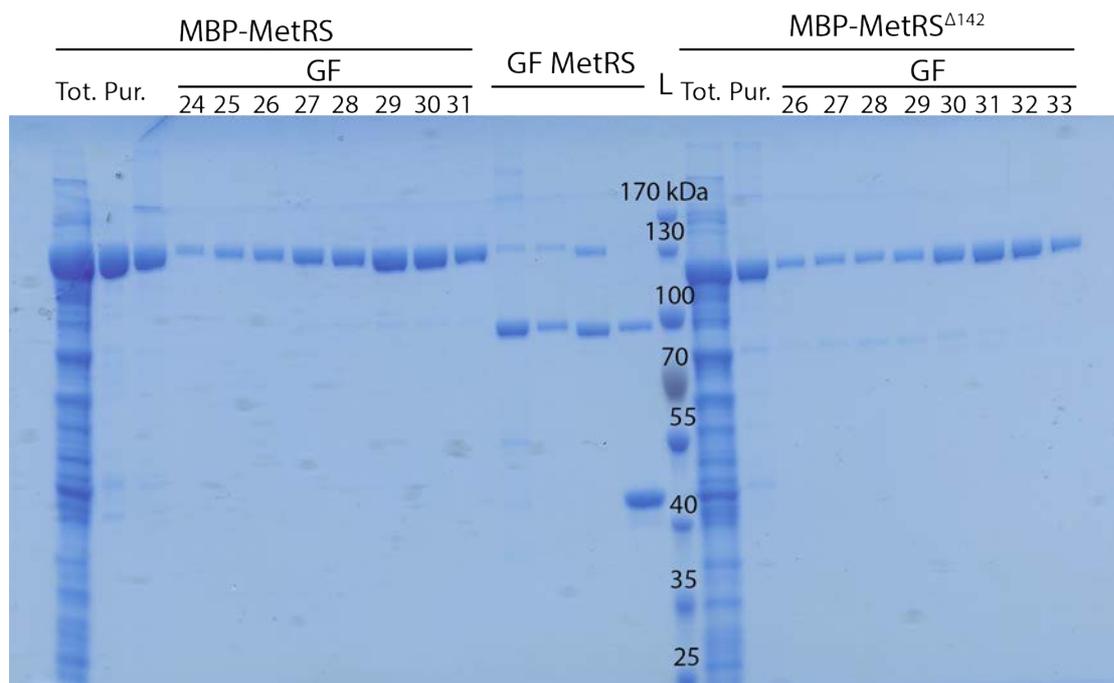
Aminoacylations reactions were performed at 30 °C in a final volume of 50 μ L: 100 mM Hepes-NaOH pH 7.4, 15 mM $MgCl_2$, 4 mM ATP, 50 μ M methionine, L-[^{35}S]methionine (1500 cpm/pmol) and appropriate amounts of $tRNA^{Met}$: 6.6 μ M for initial rates, from 1 to 4 μ M for K_M determination, and 10 times the K_M value for k_{cat} determination. MetRS (full-length or $\Delta 142$) was added to a final concentration of 100 nM for initial rates and 4 nM for K_M and k_{cat} determinations. At intervals 1 and 2 min, 20 μ L aliquots were spotted on 3MM Whatman papers pre-soaked with 5 % TCA and 1 mM L-methionine, and TCA precipitated. WhatmanTM papers were washed twice with 5 % TCA and 1 mM methionine, washed twice with absolute ethanol (10 min each wash), dried and processed for liquid scintillation counting (Ultima-gold, Perkin Elmer).

Aknowledgments

This 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.D.B, J-O. D. C), the Association pour la Recherche sur le Cancer (D.L) the University of Strasbourg (H.D.B), the CNRS (B.S.), and the ANR [ANR-10-LABX-0036_NETRNA] (L.E).



Supplemental 1. Immunodetection of the HA tag in C-ter of the MetRS, on total extract of Wild type (WT) or *rim13* deleted yeast strains expressing MetRS-HA. L : ladder.



Supplemental 2. Purification of MBP-MetRS and MBP-MetRS^{Δ142}. MBP-MetRS were expressed in *E. coli* Rosetta 2 with the pMALC1 vector. Tot. : total extract from *E. coli*. Pur : MBP-MetRS purified on amylose resin. GF : Gel filtration fractions. L : ladder.

Conclusion générale et perspectives

Comme nous l'avons exposé au cours des deux chapitres de résultats de mon manuscrit, mon travail de thèse a mis en lumière un réseau de régulation complexe des multiples fonctions de la MetRS de *S. cerevisiae*. Le Chapitre I a permis de montrer le rôle de facteur transcriptionnel de la MetRS et ses déterminants d'imports nucléaires. Le Chapitre II, quant à lui, a rapporté la découverte d'une forme clivée de MetRS et ses caractéristiques.

La fonction transcriptionnelle d'une protéine implique l'existence d'un domaine d'activation, recrutant la machinerie transcriptionnelle ainsi que d'un domaine de liaison à l'ADN. C'est le cas de la MetRS, dont le domaine N-terminal possède la capacité de recruter des éléments de l'ARN pol II comme nous l'avons démontré dans le Chapitre I. La MetRS possède également un domaine en doigts de zinc dans sa séquence, qui pourrait lier l'ADN.

A présent, il serait intéressant de déterminer si la partie N-terminale seule ou la protéine entière est responsable, *in vivo*, de la régulation transcriptionnelle. Nous pouvons fortement supposer que la protéine entière accompli ce rôle puisque (i) le domaine en doigt de zinc, pouvant potentiellement lier l'ADN, se trouve au-delà de la partie N-terminale et (ii) la régulation transcriptionnelle par la MetRS a lieu en respiration, condition dans laquelle la MetRS entière se localise abondamment dans le noyau, comme nous l'avons montré dans l'article présenté dans le Chapitre I.

Le domaine N-terminal de la MetRS interagit également avec un facteur de transcription, Gcn4, dont la structure cristallographique a montré qu'il formait un homodimère *via* ses glissières à leucines, dans le but de réaliser son rôle d'activateur transcriptionnel. Le domaine N-terminal de la MetRS possède également une glissière à leucine, qui pourrait permettre à la MetRS de former un hétérodimère avec Gcn4. Si tel est le cas, une structure cristallographique de la MetRS en interaction avec Gcn4 et l'ADN nous permettrait d'identifier les domaines de la MetRS spécifiquement impliqués dans

ce rôle, et donc de confirmer le point évoqué précédemment, à savoir la réalisation de ce rôle par le domaine N-terminal de la MetRS ou par la protéine entière.

Il serait également intéressant de déterminer si la forme clivée de la MetRS possède la capacité d'inhiber la transcription en se liant à l'ADN. En effet, la forme clivée est dépourvue d'une partie de son domaine N-terminal recrutant la machinerie transcriptionnelle, mais possède toujours son domaine en doigt de zinc, lui permettant potentiellement de se lier l'ADN. Cette forme pourrait lier l'ADN sans recruter la machinerie transcriptionnelle et elle bloquerait donc l'accès au promoteur du gène cible, provoquant un phénomène d'inhibition.

Dans l'article présenté dans le Chapitre II, nous avons démontré que la forme clivée de MetRS était essentielle et active pour l'aminocyclation.

Nous savons que la MetRS clivée est incapable d'interagir avec Arc1, qui lui-même n'interagit pas avec l'ARN_t^{Met}. D'après la littérature, cet ARN_t est très peu aminocyclé par le complexe AME, ce qui soulève la question du mécanisme employé par la cellule pour aminocycler l'ARN_t^{Met} en quantité suffisante lors d'une croissance rapide. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la forme clivée de la MetRS est responsable de l'aminocyclation de l'ARN_t^{Met}. Cette supposition est cohérente avec la présence de la forme clivée de la MetRS en fermentation, métabolisme durant lequel la traduction se doit d'être rapide, et donc ayant un besoin accru en ARN_t^{Met}. Il conviendra néanmoins de déterminer si en présence d'Arc1, les constantes cinétiques de la MetRS clivée sont inchangées ou non.

Si cette hypothèse devait se confirmer, il serait alors nécessaire de redéfinir les déterminants d'identité pour l'ARN_t^{Met} et l'ARN_{t_e}^{Met}, incomplets. L'obtention de structures tridimensionnelles de la MetRS entière et de la MetRS clivée avec leurs ARN_t substrats préférentiels permettrait de savoir s'il existe, en plus de la compartimentalisation et de l'exclusion d'Arc1 du noyau, des mécanismes de reconnaissance spécifiques de ces deux protéines pour leur ARN_t^{Met} substrat.

Nous savons que la MetRS clivée possède un second NLS lui permettant de rejoindre le noyau, et qu'elle est toujours active pour l'aminocyclation, mais cela ne démontre pas l'essentialité d'une MetRS clivée présente dans le noyau. Nous avons initié

un projet d'ancrage de la MetRS à la membrane plasmique, dans le but de séquestrer la MetRS entière ou clivée dans le cytoplasme. Pour ce faire, une protéine de fusion entre la MetRS et Sso1, protéine de la membrane plasmique, sera générée. En fonction des résultats que nous obtiendrons, nous pourrions démontrer si la fonction essentielle de la forme clivée de la MetRS est nucléaire ou non. S'il est avéré que la forme nucléaire de MetRS clivée est essentielle, alors nous introduirons une forme clivée de la MetRS déficiente pour l'aminocyclation afin de montrer si cette fonction essentielle nucléaire est enzymatique ou non. A terme, nous pourrions ainsi vérifier ou réfuter l'hypothèse de l'existence d'une MetRS clivée réalisant de l'aminocyclation nucléaire. L'un des points auquel notre équipe s'intéresse également est de savoir si dans ce cas, l'initiation de la traduction se fait également dans le noyau ou non. Si oui, alors il serait intéressant d'étudier le mécanisme de recyclage de l'ARNt^{Met} après son utilisation par le ribosome.

La question de l'existence de ce mécanisme de clivage dans la MetRS d'*H. sapiens* se pose à juste titre en raison des nombreux points communs qu'elle possède avec la MetRS de *S. cerevisiae*. En plus d'être deux régulateurs transcriptionnels, elles semblent toutes deux impliquées dans la biogénèse des ribosomes et possèdent au moins deux NLS, d'après les résultats obtenus dans le Chapitre I.

A terme, ces analyses nous permettront de vérifier le modèle selon lequel (i) la MetRS entière cytoplasmique, en complexe avec Arc1, est dédiée à l'aminocyclation de l'ARNt^{eMet}, (ii) la MetRS entière nucléaire est responsable de la régulation transcriptionnelle en respiration, (iii) la MetRS est clivée dans le but de perdre son rôle de facteur transcriptionnel (iv) et cette MetRS clivée est dédiée à l'aminocyclation nucléaire de l'ARNt^{iMet}. Plus globalement, ce modèle révélerait que la compartimentalisation des formes de MetRS de la cellule est le mécanisme par lequel les deux espèces d'ARNt^{Met} sont aminocyclées en quantités adéquates. Il s'agirait alors d'un cas supplémentaire de l'utilisation de la compartimentalisation comme moyen de discrimination de l'ARNt. Le clivage de la MetRS serait alors crucial pour l'homéostasie entre la fonction canonique d'aminocyclation et la fonction non-conventionnelle de régulation transcriptionnelle.

Bibliographie

Ackerman, S.H., and Tzagoloff, A. (2005). Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 80, 95–133. Adam, S.A. (1999). Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 402–406.

Aebi, M., Kirchner, G., Chen, J.Y., Vijayraghavan, U., Jacobson, A., Martin, N.C., and Abelson, J. (1990). Isolation of a temperature-sensitive mutant with an altered tRNA nucleotidyltransferase and cloning of the gene encoding tRNA nucleotidyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265, 16216–16220.

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. *J. Biol. Chem.* 279, 14440–14446.

Aitchison, J.D., and Rout, M.P. (2012). The yeast nuclear pore complex and transport through it. *Genetics* 190, 855–883.

Akins, R. a, and Lambowitz, a M. (1987). A protein required for splicing group I introns in *Neurospora* mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. *Cell* 50, 331–345.

Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprapto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., et al. (2007a). Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature* 450, 683–694.

Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprapto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., et al. (2007b). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450, 695–701.

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.

Allfrey, V.G. (1954). AMINO ACID INCORPORATION BY ISOLATED THYMUS NUCLEI. I. THE ROLE OF DESOXYRIBONUCLEIC ACID IN PROTEIN SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 40, 881–885.

Amodeo, G. a, Rudolph, M.J., and Tong, L. (2007). Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* 449, 492–495.

Amsterdam, A., Nissen, R.M., Sun, Z., Swindell, E.C., Farrington, S., and Hopkins, N. (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12792–12797.

Amunts, A., Brown, A., Bai, X., Ll acer, J.L., Hussain, T., Emsley, P., Long, F., Murshudov, G., Scheres, S.H.W., and Ramakrishnan, V. (2014). Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science* 343, 1485–1489.

An, S., and Musier-Forsyth, K. (2004). Trans-editing of Cys-tRNA^{Pro} by Haemophilus influenzae YbaK protein. *J. Biol. Chem.* 279, 42359–42362.

Anderson, J., Phan, L., Cuesta, R., Carlson, B.A., Pak, M., Asano, K., Bjork, 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 Dev.* 12, 3650–3662.

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 Res.* 42, 6052–6063.

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. *Mol. Cell* 35, 164–180.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1415–1420.

Arts, G.J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B., and Mattaj, I.W. (1998). The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J.* 17, 7430–7441.

Ashburner, B.P., and Lopes, J.M. (1995). Autoregulated expression of the yeast INO2 and INO4 helix-loop-helix activator genes effects cooperative regulation on their target genes. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1709–1715.

Astr om, S.U., and Bystr om, A.S. (1994). Rit1, a tRNA backbone-modifying enzyme that mediates initiator and elongator tRNA discrimination. *Cell* 79, 535–546.

Azad, A.K., Stanford, D.R., Sarkar, S., and Hopper, A.K. (2001). Role of nuclear pools of aminoacyl-tRNA synthetases in tRNA nuclear export. *Mol. Biol. Cell* 12, 1381–1392.

Bailly, M., Blaise, M., Lorber, B., Becker, H.D., and Kern, D. (2007). The transamidosome: a dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Mol. Cell* 28, 228–239.

Baker, S.P., and Grant, P.A. (2007). The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* 26, 5329–5340.

Bandyopadhyay, A.K., and Deutscher, M.P. (1971). Complex of aminoacyl-transfer RNA synthetases. *J. Mol. Biol.* 60, 113–122.

Barrick, D., Villanueva, K., Childs, J., Kalil, R., Schneider, T.D., Lawrence, C.E., Gold, L., and Stormo, G.D. (1994). Quantitative analysis of ribosome binding sites in E.coli. *Nucleic Acids Res.* 22, 1287–1295.

- Basavappa, R., and Sigler, P.B. (1991). The 3 Å crystal structure of yeast initiator tRNA: functional implications in initiator/elongator discrimination. *EMBO J.* *10*, 3105–3111.
- Baumstark, B.R., Spremulli, L.L., RajBhandary, U.L., and Brown, G.M. (1977). Initiation of protein synthesis without formylation in a mutant of *Escherichia coli* that grows in the absence of tetrahydrofolate. *J. Bacteriol.* *129*, 457–471.
- 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.
- Biddick, R., and Young, E.T. (2005). Yeast mediator and its role in transcriptional regulation. *C. R. Biol.* *328*, 773–782.
- Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., and Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J.* *14*, 705–715.
- Bogerd, H.P., Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J., and Cullen, B.R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4207–4214.
- Bogerd, H.P., Benson, R.E., Truant, R., Herold, A., Phingbodhipakkiya, M., and Cullen, B.R. (1999). Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal. *J. Biol. Chem.* *274*, 9771–9777.
- 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. *EMBO J.* *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. *Mol. Cell* *46*, 105–110.
- Bour, T., Mahmoudi, N., Kapps, D., Thiberge, S., Bargieri, D., Ménard, R., and Frugier, M. (2016). Apicomplexa-specific tRip facilitates import of exogenous tRNAs into malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Bradatsch, B., Katahira, J., Kowalinski, E., Bange, G., Yao, W., Sekimoto, T., Baumgärtel, V., Boese, G., Bassler, J., Wild, K., et al. (2007). Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit. *Mol. Cell* *27*, 767–779.
- Brandl, C.J., and Struhl, K. (1989). Yeast GCN4 transcriptional activator protein interacts with RNA polymerase II in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 2652–2656.
- Brown, A., Amunts, A., Bai, X., Sugimoto, Y., Edwards, P.C., Murshudov, G., Scheres, S.H.W., and Ramakrishnan, V. (2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science* *346*, 718–722.
- Burbaum, J.J., Starzyk, R.M., and Schimmel, P. (1990). Understanding structural relationships in proteins of unsolved three-dimensional structure. *Proteins* *7*, 99–111.
- Burgoyne, A.M., Phillips-Mason, P.J., Burden-Gulley, S.M., Robinson, S., Sloan, A.E., Miller, R.H., and Brady-Kalnay, S.M. (2009). Proteolytic cleavage of protein tyrosine phosphatase mu regulates glioblastoma cell migration. *Cancer Res.* *69*, 6960–6968.

- Cahuzac, B., Berthonneau, E., Birlirakis, N., Guittet, E., and Mirande, M. (2000). A recurrent RNA-binding domain is appended to eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* *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. *EMBO J.* *21*, 6216–6224.
- Canaday, J., Dirheimer, G., and Martin, R.P. (1980). Yeast mitochondrial methionine initiator tRNA: characterization and nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res.* *8*, 1445–1457.
- Caprara, M.G., Lehnert, V., Lambowitz, a M., and Westhof, E. (1996a). A tyrosyl-tRNA synthetase recognizes a conserved tRNA-like structural motif in the group I intron catalytic core. *Cell* *87*, 1135–1145.
- Caprara, M.G., Mohr, G., and Lambowitz, a M. (1996b). A tyrosyl-tRNA synthetase protein induces tertiary folding of the group I intron catalytic core. *J. Mol. Biol.* *257*, 512–531.
- Carmi-Levy, I., Yannay-Cohen, N., Kay, G., Razin, E., and Nechushtan, H. (2008). Diadenosine tetraphosphate hydrolase is part of the transcriptional regulation network in immunologically activated mast cells. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5777–5784.
- Carmi-Levy, I., Motzik, A., Ofir-Birin, Y., Yagil, Z., Yang, C.M., Kemeny, D.M., Han, J.M., Kim, S., Kay, G., Nechushtan, H., et al. (2011). Importin beta plays an essential role in the regulation of the LysRS-Ap(4)A pathway in immunologically activated mast cells. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 2111–2121.
- Cassio, D., and Waller, J.P. (1971). Modification of methionyl-tRNA synthetase by proteolytic cleavage and properties of the trypsin-modified enzyme. *Eur. J. Biochem.* *20*, 283–300.
- Cen, S., Khorchid, A., Javanbakht, H., Gabor, J., Stello, T., Shiba, K., Musier-Forsyth, K., and Kleiman, L. (2001). Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *75*, 5043–5048.
- Cen, S., Javanbakht, H., Kim, S., Shiba, K., Craven, R., Rein, A., Ewalt, K., Schimmel, P., Musier-Forsyth, K., and Kleiman, L. (2002). Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J. Virol.* *76*, 13111–13115.
- 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. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 4872–4888.
- Chatton, B., Walter, P., Ebel, J.P., Lacroute, F., and Fasiolo, F. (1988). The yeast VAS1 gene encodes both mitochondrial and cytoplasmic valyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* *263*, 52–57.
- Chen, S.-J., Wu, Y.-H., Huang, H.-Y., and Wang, C.-C. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* possesses a stress-inducible glycyl-tRNA synthetase gene. *PLoS One* *7*, e33363.
- Cherkasova, V., Qiu, H., and Hinnebusch, A.G. (2010). Snf1 promotes phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 by activating Gcn2 and inhibiting phosphatases Glc7 and Sit4. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2862–2873.
- Cherniack, A.D., Garriga, G., Kittle, J.D., Akins, R.A., and Lambowitz, A.M. (1990). Function of *Neurospora* mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing requires an idiosyncratic domain not found in other synthetases. *Cell* *62*, 745–755.

- Cherry, J.R., Johnson, T.R., Dollard, C., Shuster, J.R., and Denis, C.L. (1989). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. *Cell* 56, 409–419.
- Cho, H.Y., Maeng, S.J., Cho, H.J., Choi, Y.S., Chung, J.M., Lee, S., Kim, H.K., Kim, J.H., Eom, C.-Y., Kim, Y.-G., et al. (2015). Assembly of Multi-tRNA Synthetase Complex via Heterotetrameric Glutathione Transferase-homology Domains. *J. Biol. Chem.* 290, 29313–29328.
- Chow, C.M., and RajBhandary, U.L. (1993). *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, 12855–12863.
- Christie, M., Chang, C.-W., Róna, G., Smith, K.M., Stewart, A.G., Takeda, A. a S., Fontes, M.R.M., Stewart, M., Vértessy, B.G., Forwood, J.K., et al. (2016). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J. Mol. Biol.* 428, 2060–2090.
- Chu, H.-Y., and Hopper, A.K. (2013). Genome-wide investigation of the role of the tRNA nuclear-cytoplasmic trafficking pathway in regulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome and proteome. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4241–4254.
- Cigan, A.M., Bushman, J.L., Boal, T.R., and Hinnebusch, A.G. (1993). A protein complex of translational regulators of GCN4 mRNA is the guanine nucleotide-exchange factor for translation initiation factor 2 in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5350–5354.
- Clark, B.F., and Marcker, K.A. (1966). The role of N-formyl-methionyl-sRNA in protein biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 17, 394–406.
- Cler, E., Papai, G., Schultz, P., and Davidson, I. (2009). Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2123–2134.
- Cohen, S., Achbert-Weiner, H., and Ciechanover, A. (2003). Dual Effects of I B Kinase -Mediated Phosphorylation on p105 Fate: SCF -TrCP-Dependent Degradation and SCF -TrCP-Independent Processing. *Mol. Cell. Biol.* 24, 475–486.
- Cone, J.E., Del Río, R.M., Davis, J.N., and Stadtman, T.C. (1976). Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2659–2663.
- Conti, E., and Kuriyan, J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α . *Structure* 8, 329–338.
- Cook, A.G., Fukuhara, N., Jinek, M., and Conti, E. (2009). Structures of the tRNA export factor in the nuclear and cytosolic states. *Nature* 461, 60–65.
- Crepin, T., Schmitt, E., Blanquet, S., and Mechulam, Y. (2002). Structure and function of the C-terminal domain of methionyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 41, 13003–13011.
- Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T., and Matunis, M.J. (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158, 915–927.
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Härtle, 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 Microbiol. Lett.* *200*, 53–58.
- Dahlberg, J., and Lund, E. (2005). tRNA turnaround. *Mol. Cell* *19*, 292–294.
- Dang, C. V (1985). Intranuclear location of the myositis-specific Jo-1 antigen: hopping histidyl-tRNA synthetase? *Arthritis Rheum.* *28*, 839–840.
- Dang, Y.L., and Martin, N.C. (1993). Yeast mitochondrial RNase P. Sequence of the RPM2 gene and demonstration that its product is a protein subunit of the enzyme. *J. Biol. Chem.* *268*, 19791–19796.
- Dang, C. V, Yang, D.C., and Pollard, T.D. (1983). Association of methionyl-tRNA synthetase with detergent-insoluble components of the rough endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *96*, 1138–1147.
- DeGrasse, J. a, DuBois, K.N., Devos, D., Siegel, T.N., Sali, A., Field, M.C., Rout, M.P., and Chait, B.T. (2009). Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. *Mol. Cell. Proteomics* *8*, 2119–2130.
- 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. *J. Biol. Chem.* *276*, 6000–6008.
- De Deken, R.H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* *44*, 149–156.
- Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L., and Rexach, M. (2003). Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2450–2455.
- Despons, L., Walter, P., Senger, B., Ebel, J.P., and Fasiolo, F. (1991). Identification of potential amino acid residues supporting anticodon recognition in yeast methionyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett.* *289*, 217–220.
- Despons, L., Senger, B., Fasiolo, F., and Walter, P. (1992). Binding of the yeast tRNA(Met) anticodon by the cognate methionyl-tRNA synthetase involves at least two independent peptide regions. *J. Mol. Biol.* *225*, 897–907.
- Dever, T.E., Kinzy, T.G., and Pavitt, G.D. (2016). Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *203*, 65–107.
- 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. *J. Biol. Chem.*
- Dieci, G., Preti, M., and Montanini, B. (2009). Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics* *94*, 83–88.
- Dong, J., Munoz, A., Kolitz, S.E., Saini, A.K., Chiu, W., Rahman, H., Lorsch, J.R., and Hinnebusch, A.G. (2014). Conserved residues in yeast initiator tRNA calibrate initiation accuracy by regulating preinitiation complex stability at the start codon. *Genes Dev.* *28*, 502–520.

- Dontsova, O.A., and Dinman, J.D. (2005). 5S rRNA: Structure and Function from Head to Toe. *Int. J. Biomed. Sci.* *1*, 1–7.
- Drabkin, H.J., Estrella, M., and Rajbhandary, U.L. (1998). Initiator-elongator discrimination in vertebrate tRNAs for protein synthesis. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 1459–1466.
- Dreher, T.W., Uhlenbeck, O.C., and Browning, K.S. (1999). Quantitative assessment of EF-1 α .GTP binding to aminoacyl-tRNAs, aminoacyl-viral RNA, and tRNA shows close correspondence to the RNA binding properties of EF-Tu. *J. Biol. Chem.* *274*, 666–672.
- Duchêne, A.-M., Pujol, C., and Maréchal-Drouard, L. (2009). Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria. *Curr. Genet.* *55*, 1–18.
- Dunkle, J.A., Wang, L., Feldman, M.B., Pulk, A., Chen, V.B., Kapral, G.J., Noeske, J., Richardson, J.S., Blanchard, S.C., and Cate, J.H.D. (2011). Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. *Science* *332*, 981–984.
- Elbing, K., McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2006). Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *393*, 797–805.
- Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2006). A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *20*, 1609–1620.
- Epler, J.L., Shugart, L.R., and Barnett, W.E. (1970). N-formylmethionyl transfer ribonucleic acid in mitochondria from *Neurospora*. *Biochemistry* *9*, 3575–3579.
- 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.
- Esakova, O., and Krasilnikov, A.S. (2010). Of proteins and RNA: the RNase P/MRP family. *RNA* *16*, 1725–1747.
- Farruggio, D., Chaudhuri, J., Maitra, U., and RajBhandary, U.L. (1996). The A1 x U72 base pair conserved in eukaryotic initiator tRNAs is important specifically for binding to the eukaryotic translation initiation factor eIF2. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4248–4256.
- Fasiolo, F., Gibson, B.W., Walter, P., Chatton, B., Biemann, K., and Boulanger, Y. (1985). Cytoplasmic methionyl-tRNA synthetase from Bakers' yeast. A monomer with a post-translationally modified N terminus. *J. Biol. Chem.* *260*, 15571–15576.
- Fassati, A., Görlich, D., Harrison, I., Zaytseva, L., and Mingot, J.-M. (2003). Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin β . *EMBO J.* *22*, 3675–3685.
- Feng, W., and Hopper, A.K. (2002). A Los1p-independent pathway for nuclear export of intronless tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 5412–5417.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., and Silver, P.A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin β homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* *17*, 5606–5614.
- Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T., and Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *192*, 319–360.

- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., and Lührmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* *82*, 475–483.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* *90*, 1051–1060.
- 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.
- Francis, M. a, and Rajbhandary, U.L. (1990). Expression and function of a human initiator tRNA gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 4486–4494.
- Frantz, J.D., and Gilbert, W. (1995). A Novel Yeast Gene Product, G4p1, with a Specific Affinity for Quadruplex Nucleic Acids. *J. Biol. Chem.* *270*, 20692–20697.
- Frechin, M., Senger, B., Brayé, M., Kern, D., Martin, R.P., and Becker, H.D. (2009a). 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.
- Frechin, M., Senger, B., Brayé, M., Kern, D., Martin, R.P., and Becker, H.D. (2009b). 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.
- 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., Enkler, L., Tetaud, E., Laporte, D., Senger, B., Blancard, C., Hammann, P., Bader, G., Clauder-Münster, S., Steinmetz, L.M., et al. (2014). Expression of Nuclear and Mitochondrial Genes Encoding ATP Synthase Is Synchronized by Disassembly of a Multisynthetase Complex. *Mol. Cell* *763–776*.
- Fried, H., and Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell. Mol. Life Sci.* *60*, 1659–1688.
- Fu, G., Xu, T., Shi, Y., Wei, N., and Yang, X.-L. (2012). tRNA-controlled nuclear import of a human tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* *287*, 9330–9334.
- Gabor, J., Cen, S., Javanbakht, H., Niu, M., and Kleiman, L. (2002). Effect of altering the tRNA(Lys)(3) concentration in human immunodeficiency virus type 1 upon its annealing to viral RNA, GagPol incorporation, and viral infectivity. *J. Virol.* *76*, 9096–9102.
- Gadal, O., Strauss, D., Kessler, J., Trumpower, B., Tollervey, D., and Hurt, E. (2001). Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3405–3415.
- 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.
- Galani, K., Hurt, E., and Simos, G. (2005). The tRNA aminoacylation co-factor Arc1p is excluded from the nucleus by an Xpo1p-dependent mechanism. *FEBS Lett.* *579*, 969–975.

- Galper, J.B. (1974). Mitochondrial protein synthesis in HeLa cells. *J. Cell Biol.* *60*, 755–763.
- Galper, J.B., and Darnell, J.E. (1969). The presence of N-formyl-methionyl-tRNA in HeLa cell mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *34*, 205–214.
- Gancedo, J.M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 673–704.
- Gatti, D.L., and Tzagoloff, A. (1991). Structure and evolution of a group of related aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol.* *218*, 557–568.
- Gerber, A.P., and Keller, W. (1999). An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. *Science* *286*, 1146–1149.
- Gerlinger, U.M., Gückel, R., Hoffmann, M., Wolf, D.H., and Hilt, W. (1997). Yeast cycloheximide-resistant *crl* mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. *Mol. Biol. Cell* *8*, 2487–2499.
- Ghosh, A., and Vishveshwara, S. (2007). A study of communication pathways in methionyl-tRNA synthetase by molecular dynamics simulations and structure network analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15711–15716.
- Gite, S., Li, Y., Ramesh, V., and RajBhandary, U.L. (2000). Escherichia coli methionyl-tRNA formyltransferase: role of amino acids conserved in the linker region and in the C-terminal domain on the specific recognition of the initiator tRNA. *Biochemistry* *39*, 2218–2226.
- Glasser, A.L., Desgres, J., Heitzler, J., Gehrke, C.W., and Keith, G. (1991). O-ribosyl-phosphate purine as a constant modified nucleotide located at position 64 in cytoplasmic initiator tRNAs(Met) of yeasts. *Nucleic Acids Res.* *19*, 5199–5203.
- 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. *J. Biol. Chem.* *286*, 3396–3404.
- Godinic-Mikulcic, V., Jaric, J., Greber, B.J., Franke, V., Hodnik, V., Anderluh, G., Ban, N., and Weygand-Durasevic, I. (2014). Archaeal aminoacyl-tRNA synthetases interact with the ribosome to recycle tRNAs. *Nucleic Acids Res.* *42*, 5191–5201.
- Goidl, J.A., Canaani, D., Boublik, M., Weissbach, H., and Dickerman, H. (1975). Polyanion-induced release of polyribosomes from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.* *250*, 9198–9205.
- Golinelli-Cohen, M.-P., and Mirande, M. (2007). Arc1p is required for cytoplasmic confinement of synthetases and tRNA. *Mol. Cell. Biochem.* *300*, 47–59.
- Golinelli-Cohen, M.-P., Zakrzewska, A., and Mirande, M. (2004). Complementation of yeast Arc1p by the p43 component of the human multisynthetase complex does not require its association with yeast MetRS and GluRS. *J. Mol. Biol.* *340*, 15–27.
- Gonzalez-Flores, J.N., Shetty, S.P., Dubey, A., and Copeland, P.R. (2013). The molecular biology of selenocysteine. *Biomol. Concepts* *4*, 349–365.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., and Izaurralde, E. (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.* *138*, 65–80.

- Graindorge, J.-S., Senger, B., Tritsch, D., Simos, G., and Fasiolo, F. (2005). Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* *44*, 1344–1352.
- Greber, B.J., and Ban, N. (2016). Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annu. Rev. Biochem.* *85*, 103–132.
- Greber, B.J., Boehringer, D., Leibundgut, M., Bieri, P., Leitner, A., Schmitz, N., Aebersold, R., and Ban, N. (2014). The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature* *515*, 283–286.
- Greber, B.J., Bieri, P., Leibundgut, M., Leitner, A., Aebersold, R., Boehringer, D., and Ban, N. (2015). Ribosome. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science* *348*, 303–308.
- Grosshans, H., Simos, G., and Hurt, E. (2000a). Review: transport of tRNA out of the nucleus—direct channeling to the ribosome? *J. Struct. Biol.* *129*, 288–294.
- Grosshans, H., Hurt, E., and Simos, G. (2000b). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev.* *14*, 830–840.
- Gu, W., Jackman, J.E., Lohan, A.J., Gray, M.W., and Phizicky, E.M. (2003). tRNA^{His} maturation: an essential yeast protein catalyzes addition of a guanine nucleotide to the 5' end of tRNA^{His}. *Genes Dev.* *17*, 2889–2901.
- Gu, W., Hurto, R.L., Hopper, A.K., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. (2005). Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA(His) guanylyltransferase Thg1p leads to uncharged tRNA^{His} with additional m(5)C. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 8191–8201.
- Guillon, J.M., Mechulam, Y., Schmitter, J.M., Blanquet, S., and Fayat, G. (1992). Disruption of the gene for Met-tRNA(fMet) formyltransferase severely impairs growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *174*, 4294–4301.
- Guo, M., and Schimmel, P. (2013). Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 145–153.
- Guo, M., and Yang, X. (2014). Architecture and metamorphosis. *Top. Curr. Chem.* *344*, 89–118.
- Guo, M., Yang, X.-L., and Schimmel, P. (2010). New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 668–674.
- Güttler, T., and Görlich, D. (2011). Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *EMBO J.* *30*, 3457–3474.
- Hahn, J.-S., and Thiele, D.J. (2004). Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* *279*, 5169–5176.
- Hahn, S., and Young, E.T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* *189*, 705–736.
- Hahn, S., Maurer, P., Caesar, S., and Schlenstedt, G. (2008). Classical NLS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* *379*, 678–694.

- Halbreich, A., and Rabinowitz, M. (1971). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial formyltetrahydrofolic acid:methionyl-tRNA transformylase and the hybridization of mitochondrial fMet-tRNA with mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 294–298.
- Halwani, R., Cen, S., Javanbakht, H., Saadatmand, J., Kim, S., Shiba, K., and Kleiman, L. (2004). Cellular distribution of Lysyl-tRNA synthetase and its interaction with Gag during human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J. Virol.* *78*, 7553–7564.
- Han, J.M., Park, S.G., Lee, Y., and Kim, S. (2006). Structural separation of different extracellular activities in aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional protein, p43/AIMP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *342*, 113–118.
- Han, J.M., Park, S.G., Liu, B., Park, B.-J., Kim, J.Y., Jin, C.H., Song, Y.W., Li, Z., and Kim, S. (2007). Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein 1/p43 controls endoplasmic reticulum retention of heat shock protein gp96: its pathological implications in lupus-like autoimmune diseases. *Am. J. Pathol.* *170*, 2042–2054.
- Han, J.M., Park, B.-J., Park, S.G., Oh, Y.S., Choi, S.J., Lee, S.W., Hwang, S., Chang, S., Cho, M., and Kim, S. (2008). AIMP2/p38, the scaffold for the multi-tRNA synthetase complex, responds to genotoxic stresses via p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11206–11211.
- 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.
- Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J.A., and Chan, M.K. (2002). A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science* *296*, 1462–1466.
- Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14866–14870.
- Harris, C.L. (1987). An aminoacyl-tRNA synthetase complex in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *169*, 2718–2723.
- Hausmann, C.D., Praetorius-Ibba, M., and Ibba, M. (2007). An aminoacyl-tRNA synthetase:elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic Acids Res.* *35*, 6094–6102.
- 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 Sci.* *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. *J. Biol. Chem.* *286*, 28476–28487.
- Hecht, K.A., O'Donnell, A.F., and Brodsky, J.L. (2014). The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cell. Logist.* *4*, e28023.
- Hellmuth, K., Lau, D.M., Bischoff, F.R., Künzler, M., Hurt, E., and Simos, G. (1998). Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6374–6386.

- 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., Martínez-Campa, C., and Moreno, F. (1998). The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 434, 71–76.
- Herring, S., Ambrogelly, A., Polycarpo, C.R., and Söll, D. (2007). Recognition of pyrrolysine tRNA by the *Desulfitobacterium hafniense* pyrrolysyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.* 35, 1270–1278.
- Hilger, F., and Fink, G.R. (1986). The HTS7 Gene Encodes Both the Cytoplasmic and Mitochondrial Histidine tRNA Synthetases of. 46, 235–243.
- Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 407–450.
- Hinttala, R., Sasarman, F., Nishimura, T., Antonicka, H., Brunel-Guitton, C., Schwartzentruber, J., Fahiminiya, S., Majewski, J., Faubert, D., Ostergaard, E., et al. (2015). An N-terminal formyl methionine on COX 1 is required for the assembly of cytochrome c oxidase. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4103–4113.
- Hodel, M.R., Corbett, a H., and Hodel, a E. (2001). Dissection of a nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* 276, 1317–1325.
- Hope, I.A., and Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46, 885–894.
- 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., and Shaheen, H.H. (2008). A decade of surprises for tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics. *Trends Cell Biol.* 18, 98–104.
- Hopper, A.K., Schultz, L.D., and Shapiro, R.A. (1980). Processing of intervening sequences: a new yeast mutant which fails to excise intervening sequences from precursor tRNAs. *Cell* 19, 741–751.
- Hopper, A.K., Pai, D.A., and Engelke, D.R. (2010). Cellular dynamics of tRNAs and their genes. *FEBS Lett.* 584, 310–317.
- Houman, F., Rho, S.B., Zhang, J., Shen, X., Wang, C.C., Schimmel, P., and Martinis, S.A. (2000). A prokaryote and human tRNA synthetase provide an essential RNA splicing function in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13743–13748.
- Huang, H.-Y., Tang, H.-L., Chao, H.-Y., Yeh, L.-S., and Wang, C.-C. (2006). An unusual pattern of protein expression and localization of yeast alanyl-tRNA synthetase isoforms. *Mol. Microbiol.* 60, 189–198.
- Huot, J.L., Enkler, L., Megel, C., Karim, L., Laporte, D., Becker, H.D., Duchêne, A.-M., Sissler, M., and Maréchal-Drouard, L. (2014). Idiosyncrasies in decoding mitochondrial genomes. *Biochimie* 100, 95–106.

- Hurt, E.C. (1988). A novel nucleoskeletal-like protein located at the nuclear periphery is required for the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 7, 4323–4334.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A., and Cook, P.R. (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* 293, 1139–1142.
- Ingvarsson, H., and Unge, T. (2010). Flexibility and communication within the structure of the *Mycobacterium smegmatis* methionyl-tRNA synthetase. *FEBS J.* 277, 3947–3962.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T. V (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. (Elsevier Inc.).
- Jakubowski, H. (1991). Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 10, 593–598.
- Jakubowski, H. (2011). Quality control in tRNA charging -- editing of homocysteine. *Acta Biochim. Pol.* 58, 149–163.
- Jakubowski, H. (2012). Quality control in tRNA charging. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3, 295–310.
- Javanbakht, H., Halwani, R., Cen, S., Saadatmand, J., Musier-Forsyth, K., Gottlinger, H., and Kleiman, L. (2003). The interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase during viral assembly. *J. Biol. Chem.* 278, 27644–27651.
- 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.
- 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. *J. Virol.* 67, 3246–3253.
- Jones, T.E., Alexander, R.W., and Pan, T. (2011). Misacylation of specific nonmethionyl tRNAs by a bacterial methionyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6933–6938.
- Kadosh, D., and Struhl, K. (1998). Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5121–5127.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499–509.
- Kamenski, P., Kolesnikova, O., Jubenot, V., Entelis, N., Krashennnikov, I. a, Martin, R.P., and Tarassov, I. (2007). Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Mol. Cell* 26, 625–637.
- Kaminska, M., Deniziak, M., Kerjan, P., Barciszewski, J., and Mirande, M. (2000). A recurrent general RNA binding domain appended to plant methionyl-tRNA synthetase acts as a cis-acting cofactor for aminoacylation. *EMBO J.* 19, 6908–6917.

- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Le Maréchal, P., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2009a). Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* *284*, 6053–6060.
- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Le Maréchal, P., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2009b). Dynamic Organization of Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes in the Cytoplasm of Human Cells. *J. Biol. Chem.* *284*, 13746–13754.
- 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. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 499–511.
- Kapp, L.D., Koltz, S.E., and Lorsch, J.R. (2006). Yeast initiator tRNA identity elements cooperate to influence multiple steps of translation initiation. *RNA* *12*, 751–764.
- 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.
- Karanasios, E., Simader, H., Panayotou, G., Suck, D., and Simos, G. (2007). Molecular determinants of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly. *J. Mol. Biol.* *374*, 1077–1090.
- Karanasios, E., Boleti, H., and Simos, G. (2008). Incorporation of the Arc1p tRNA-binding domain to the catalytic core of MetRS can functionally replace the yeast Arc1p-MetRS complex. *J. Mol. Biol.* *381*, 763–771.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, a, and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 5752–5756.
- Katahira, J., Strässer, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.U., and Hurt, E. (1999). The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J.* *18*, 2593–2609.
- Kawamata, H., Magrané, J., Kunst, C., King, M.P., and Manfredi, G. (2008). Lysyl-tRNA synthetase is a target for mutant SOD1 toxicity in mitochondria. *J. Biol. Chem.* *283*, 28321–28328.
- Kehlenbach, R.H., Dickmanns, A., and Gerace, L. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *J. Cell Biol.* *141*, 863–874.
- Kim, D.G., Choi, J.W., Lee, J.Y., Kim, H., Oh, Y.S., Lee, J.W., Tak, Y.K., Song, J.M., Razin, E., Yun, S.-H., et al. (2012). Interaction of two translational components, lysyl-tRNA synthetase and p40/37LRP, in plasma membrane promotes laminin-dependent cell migration. *FASEB J.* *26*, 4142–4159.
- Kim, G., Han, J.M., and Kim, S. (2010). Toll-like receptor 4-mediated c-Jun N-terminal kinase activation induces gp96 cell surface expression via AIMP1 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *397*, 100–105.
- 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*. *J. Biol. Chem.* *279*, 42445–42452.
- Kim, K., Park, S.-J., Na, S., Kim, J.S., Choi, H., Kim, Y.K., Paek, E., and Lee, C. (2013). Reinvestigation of aminoacyl-tRNA synthetase core complex by affinity purification-mass spectrometry reveals TARSL2 as a potential member of the complex. *PLoS One* *8*, e81734.

- Kim, S., Jo, Y.J., Lee, S.H., Motegi, H., Shiba, K., Sassanfar, M., and Martinis, S.A. (1998). Biochemical and phylogenetic analyses of methionyl-tRNA synthetase isolated from a pathogenic microorganism, *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett.* *427*, 259–262.
- Klein, C.J., Olsson, L., and Nielsen, J. (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology* *144* (Pt 1), 13–24.
- Knapp, G., Beckmann, J.S., Johnson, P.F., Fuhrman, S.A., and Abelson, J. (1978). Transcription and processing of intervening sequences in yeast tRNA genes. *Cell* *14*, 221–236.
- 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.
- Ko, Y.G., Park, H., Kim, T., Lee, J.W., Park, S.G., Seol, W., Kim, J.E., Lee, W.H., Kim, S.H., Park, J.E., et al. (2001). A cofactor of tRNA synthetase, p43, is secreted to up-regulate proinflammatory genes. *J. Biol. Chem.* *276*, 23028–23033.
- 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. *J. Mol. Biol.* *410*, 875–886.
- Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat. Struct. Biol.* *6*, 388–397.
- 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 Res.* *41*, 667–676.
- Koerner, T.J., Myers, a M., Lee, S., and Tzagoloff, a (1987). Isolation and characterization of the yeast gene coding for the alpha subunit of mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* *262*, 3690–3696.
- Kolitz, S.E., and Lorsch, J.R. (2010). Eukaryotic initiator tRNA: finely tuned and ready for action. *FEBS Lett.* *584*, 396–404.
- Komeili, A., and O’Shea, E.K. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* *284*, 977–980.
- Komeili, A., and O’Shea, E.K. (2000). Nuclear transport and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 355–360.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* *234*, 187–208.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W., Donaton, M.C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J.H., and Thevelein, J.M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* *32*, 1002–1012.
- Kramer, E.B., and Hopper, A.K. (2013). Retrograde transfer RNA nuclear import provides a new level of tRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 21042–21047.

- Kravtsova-Ivantsiv, Y., Shomer, I., Cohen-Kaplan, V., Snijder, B., Superti-Furga, G., Gonen, H., Sommer, T., Ziv, T., Admon, A., Naroditsky, I., et al. (2015). KPC1-mediated ubiquitination and proteasomal processing of NF- κ B1 p105 to p50 restricts tumor growth. *Cell* *161*, 333–347.
- Krishna, S.S. (2003). Structural classification of zinc fingers: SURVEY AND SUMMARY. *Nucleic Acids Res.* *31*, 532–550.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19635–19640.
- Labouesse, M., Dujardin, G., and Slonimski, P.P. (1985). The yeast nuclear gene NAM2 is essential for mitochondrial DNA integrity and can cure a mitochondrial RNA-maturase deficiency. *Cell* *41*, 133–143.
- Landrieu, I., Vandenbol, M., Härtlein, M., and Portetelle, D. (1997). Mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase is encoded by the yeast nuclear gene YCR24c. *Eur. J. Biochem.* *243*, 268–273.
- Lange, A., Mills, R.E., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2008). A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1. *J. Biol. Chem.* *283*, 12926–12934.
- Laporte, D., Huot, J.L., Bader, G., Enkler, L., Senger, B., and Becker, H.D. (2014). Exploring the evolutionary diversity and assembly modes of multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes: lessons from unicellular organisms. *FEBS Lett.* *588*, 4268–4278.
- Laptenko, O., and Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* *13*, 951–961.
- Laten, H., Gorman, J., and Bock, R.M. (1978). Isopentenyladenosine deficient tRNA from an antisuppressor mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *5*, 4329–4342.
- Leder, P., and Bursztyn, H. (1966). Initiation of protein synthesis II. A convenient assay for the ribosome-dependent synthesis of N-formyl-C14-methionylpuromycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *25*, 233–238.
- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Süel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., and Chook, Y.M. (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* *126*, 543–558.
- Lee, J.Y., Kim, D.G., Kim, B.-G., Yang, W.S., Hong, J., Kang, T., Oh, Y.S., Kim, K.R., Han, B.W., Hwang, B.J., et al. (2014). Promiscuous methionyl-tRNA synthetase mediates adaptive mistranslation to protect cells against oxidative stress. *J. Cell Sci.* *127*, 4234–4245.
- Lee, S.J., Matsuura, Y., Liu, S.M., and Stewart, M. (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* *435*, 693–696.
- 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.
- Lei, H.-Y., Zhou, X.-L., Ruan, Z.-R., Sun, W.-C., Eriani, G., and Wang, E.-D. (2015). Calpain Cleaves Most Components in the Multiple Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex and Affects Their Functions. *J. Biol. Chem.* *290*, 26314–26327.

- Leppert, G., McDevitt, R., Falco, S.C., Van Dyk, T.K., Ficke, M.B., and Golin, J. (1990). Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* *125*, 13–20.
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 15036–15040.
- Levine, R.L., Moskovitz, J., and Stadtman, E.R. (2001). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* *50*, 301–307.
- Li, S., and Smerdon, M.J. (2002). Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *21*, 5921–5929.
- Li, Y., Holmes, W.B., Appling, D.R., and RajBhandary, U.L. (2000). Initiation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria without formylation of the initiator tRNA. *J. Bacteriol.* *182*, 2886–2892.
- Lin, L., and Ghosh, S. (1996). A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2248–2254.
- Lipman, R.S.A., Chen, J., Evilia, C., Vitseva, O., and Hou, Y. (2003). Association of an aminoacyl-tRNA synthetase with a putative metabolic protein in archaea. *Biochemistry* *42*, 7487–7496.
- Liu, J., Shue, E., Ewalt, K.L., and Schimmel, P. (2004). A new gamma-interferon-inducible promoter and splice variants of an anti-angiogenic human tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.* *32*, 719–727.
- Ljungdahl, P.O., and Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *190*, 885–929.
- López-García, P., and Moreira, D. (1999). Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 88–93.
- Lowther, W.T., and Matthews, B.W. (2000). Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta* *1477*, 157–167.
- Lu, J., Marygold, S.J., Gharib, W.H., and Suter, B. (2015). The aminoacyl-tRNA synthetases of *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)*. *9*, 53–61.
- Lund, E. (1998). Proofreading and Aminoacylation of tRNAs Before Export from the Nucleus. *Science (80-.)*. *282*, 2082–2085.
- Lund, E., and Dahlberg, J.E. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* *282*, 2082–2085.
- Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M., and Thornton, J.M. (2000). An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* *1*, REVIEWS001.
- Mader, D., Liebeke, M., Winstel, V., Methling, K., Leibig, M., Götz, F., Lalk, M., and Peschel, A. (2013). Role of N-terminal protein formylation in central metabolic processes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* *13*, 7.

- Magalhães, P.J., Andreu, A.L., and Schon, E.A. (1998). Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 9, 2375–2382.
- Magazinnik, T., Anand, M., Sattlegger, E., Hinnebusch, A.G., and Kinzy, T.G. (2005). Interplay between GCN2 and GCN4 expression, translation elongation factor 1 mutations and translational fidelity in yeast. *Nucleic Acids Res.* 33, 4584–4592.
- 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.
- Mahler, M., Miller, F.W., and Fritzler, M.J. (2015). Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* 13, 367–371.
- Mangroo, D., Limbach, P.A., McCloskey, J.A., and RajBhandary, U.L. (1995). An anticodon sequence mutant of *Escherichia coli* initiator tRNA: possible importance of a newly acquired base modification next to the anticodon on its activity in initiation. *J. Bacteriol.* 177, 2858–2862.
- Marck, C., and Grosjean, H. (2002). tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA* 8, 1189–1232.
- Martin, N.C., and Hopper, A.K. (1994). How single genes provide tRNA processing enzymes to mitochondria, nuclei and the cytosol. *Biochimie* 76, 1161–1167.
- Martinis, S.A., and Boniecki, M.T. (2010). The balance between pre- and post-transfer editing in tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 584, 455–459.
- Martzen, M.R., McCraith, S.M., Spinelli, S.L., Torres, F.M., Fields, S., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. (1999). A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* 286, 1153–1155.
- Maurer, P., Redd, M., Solsbacher, J., Bischoff, F.R., Greiner, M., Podtelejnikov, a V, Mann, M., Stade, K., Weis, K., and Schlenstedt, G. (2001). The nuclear export receptor Xpo1p forms distinct complexes with NES transport substrates and the yeast Ran binding protein 1 (Yrb1p). *Mol. Biol. Cell* 12, 539–549.
- Mayordomo, I., Estruch, F., and Sanz, P. (2002). Convergence of the target of rapamycin and the Snf1 protein kinase pathways in the regulation of the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of STRE (Stress Response Element)-regulated genes. *J. Biol. Chem.* 277, 35650–35656.
- 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.
- McLeod, T., Abdullahi, A., Li, M., and Brogna, S. (2014). Recent studies implicate the nucleolus as the major site of nuclear translation. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1224–1228.
- Mechulam, Y., Schmitt, E., Maveyraud, L., Zelwer, C., Nureki, O., Yokoyama, S., Konno, M., and Blanquet, S. (1999). Crystal structure of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase highlights species-specific features. *J. Mol. Biol.* 294, 1287–1297.

- Van Meel, E., Wegner, D.J., Cliften, P., Willing, M.C., White, F. V, Kornfeld, S., and Cole, F.S. (2013). Rare recessive loss-of-function methionyl-tRNA synthetase mutations presenting as a multi-organ phenotype. *BMC Med. Genet.* *14*, 106.
- Meinzel, T., Mechulam, Y., Le Corre, D., Panvert, M., Blanquet, S., and Fayat, G. (1991). Selection of suppressor methionyl-tRNA synthetases: mapping the tRNA anticodon binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 291–295.
- Melton, D.A., De Robertis, E.M., and Cortese, R. (1980). Order and intracellular location of the events involved in the maturation of a spliced tRNA. *Nature* *284*, 143–148.
- Mirande, M., and Waller, J.P. (1988). The yeast lysyl-tRNA synthetase gene. Evidence for general amino acid control of its expression and domain structure of the encoded protein. *J. Biol. Chem.* *263*, 18443–18451.
- 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.
- Monroy, V.S., Flores, M.O.M., Villalba-Magdaleno, J.D., Garcia, C.G., and Ishiwara, D.G.P. (2010). *Entamoeba histolytica*: differential gene expression during programmed cell death and identification of early pro- and anti-apoptotic signals. *Exp. Parasitol.* *126*, 497–505.
- Morales, A.J., Swairjo, M.A., and Schimmel, P. (1999). Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J.* *18*, 3475–3483.
- Motorin YuA, Wolfson, A.D., Orlovsky, A.F., and Gladilin, K.L. (1988). Mammalian valyl-tRNA synthetase forms a complex with the first elongation factor. *FEBS Lett.* *238*, 262–264.
- Moy, T.I., and Silver, P.A. (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev.* *13*, 2118–2133.
- Murguía, J.R., and Serrano, R. (2012). New functions of protein kinase Gcn2 in yeast and mammals. *IUBMB Life* *64*, 971–974.
- Murthi, A., Shaheen, H.H., Huang, H., Preston, M.A., Lai, T., Phizicky, E.M., and Hopper, A.K. (2010). Regulation of tRNA bidirectional nuclear-cytoplasmic trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *21*, 639–649.
- Murzin, A.G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* *12*, 861–867.
- Myers, a M., and Tzagoloff, a (1985). MSW, a yeast gene coding for mitochondrial tryptophanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* *260*, 15371–15377.
- Nakanishi, K., Ogiso, Y., Nakama, T., Fukai, S., and Nureki, O. (2005). Structural basis for anticodon recognition by methionyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 931–932.
- NATHANSON, L. (2003). Nuclear protein synthesis: A re-evaluation. *RNA* *9*, 9–13.
- Neugeborn, L., Schwartzberg, P., Reid, R., and Carlson, M. (1986). Null mutations in the SNF3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 3569–3574.

- 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.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L.I., and Rosbash, M. (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr. Biol.* 7, 767–775.
- Newton, D.T., Creuzenet, C., and Mangroo, D. (1999). Formylation is not essential for initiation of protein synthesis in all eubacteria. *J. Biol. Chem.* 274, 22143–22146.
- Niño, C.A., Hérisant, L., Babour, A., and Dargemont, C. (2013). mRNA nuclear export in yeast. *Chem. Rev.* 113, 8523–8545.
- Norcum, M.T. (1999). Ultrastructure of the eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex derived from two dimensional averaging and classification of negatively stained electron microscopic images. *FEBS Lett.* 447, 217–222.
- Norcum, M.T., and Boisset, N. (2002). Three-dimensional architecture of the eukaryotic multisynthetase complex determined from negatively stained and cryoelectron micrographs. *FEBS Lett.* 512, 298–302.
- O'Connor, J.P., and Peebles, C.L. (1991). In vivo pre-tRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 425–439.
- Ohira, T., and Suzuki, T. (2011). Retrograde nuclear import of tRNA precursors is required for modified base biogenesis in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10502–10507.
- Otani, A., Slike, B.M., Dorrell, M.I., Hood, J., Kinder, K., Ewalt, K.L., Cheresch, D., Schimmel, P., and Friedlander, M. (2002). A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 178–183.
- Ott, M., and Herrmann, J.M. (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 767–775.
- Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N., and Herrmann, J.M. (2006). Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J.* 25, 1603–1610.
- Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wöfl, S., and Johnston, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12428–12432.
- Palomino, a, Herrero, P., and Moreno, F. (2006). Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. *Nucleic Acids Res.* 34, 1427–1438.
- Pang, Y.L.J., Poruri, K., and Martinis, S.A. (2015). tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 461–480.
- Pape, L.K., Koerner, T.J., and Tzagoloff, A. (1985). Characterization of a yeast nuclear gene (MST1) coding for the mitochondrial threonyl-tRNA1 synthetase. *J. Biol. Chem.* 260, 15362–15370.

- Park, B.-J., Oh, Y.S., Park, S.Y., Choi, S.J., Rudolph, C., Schlegelberger, B., and Kim, S. (2006). AIMP3 haploinsufficiency disrupts oncogene-induced p53 activation and genomic stability. *Cancer Res.* *66*, 6913–6918.
- Park, S.G., Kang, Y.-S., Ahn, Y.H., Lee, S.H., Kim, K.-R., Kim, K.-W., Koh, G.Y., Ko, Y.-G., and Kim, S. (2002). Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-associating factor, p43, in angiogenesis. *J. Biol. Chem.* *277*, 45243–45248.
- Park, S.G., Kim, H.J., Min, Y.H., Choi, E., Shin, Y.K., Park, B., Lee, S.W., and Kim, S. (2005). Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 6356–6361.
- Pascual, F., Hsieh, L.-S., Soto-Cardalda, A., and Carman, G.M. (2014). Yeast Pah1p phosphatidate phosphatase is regulated by proteasome-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* *289*, 9811–9822.
- Paukstelis, P.J., and Lambowitz, A.M. (2008). Identification and evolution of fungal mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetases with group I intron splicing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 6010–6015.
- Paukstelis, P.J., Coon, R., Madabusi, L., Nowakowski, J., Monzingo, A., Robertus, J., and Lambowitz, A.M. (2005). A tyrosyl-tRNA synthetase adapted to function in group I intron splicing by acquiring a new RNA binding surface. *Mol. Cell* *17*, 417–428.
- Paule, M.R., and White, R.J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1283–1298.
- Von Pawel-Rammingen, U., Aström, S., and Byström, A.S. (1992). Mutational analysis of conserved positions potentially important for initiator tRNA function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 1432–1442.
- Perona, J.J., and Hadd, A. (2012). Structural diversity and protein engineering of the aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* *51*, 8705–8729.
- Phillips, J.H., and Kjellin-Stråby, K. (1967). Studies on microbial ribonucleic acid. IV. Two mutants of *Saccharomyces cerevisiae* lacking N-2-dimethylguanine in soluble ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.* *26*, 509–518.
- Phizicky, E.M., and Hopper, A.K. (2010). tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* *24*, 1832–1860.
- Phizicky, E.M., Schwartz, R.C., and Abelson, J. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* tRNA ligase. Purification of the protein and isolation of the structural gene. *J. Biol. Chem.* *261*, 2978–2986.
- Pierce, J.B., Eswara, M.B., and Mangroo, D. (2010). The ins and outs of nuclear re-export of retrogradely transported tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleus* *1*, 224–230.
- Piwko, W., and Jentsch, S. (2006). Proteasome-mediated protein processing by bidirectional degradation initiated from an internal site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 691–697.
- Polycarpo, C., Ambrogelly, A., Ruan, B., Tumbula-Hansen, D., Ataide, S.F., Ishitani, R., Yokoyama, S., Nureki, O., Ibba, M., and Söll, D. (2003). Activation of the pyrrolysine suppressor tRNA requires formation of a ternary complex with class I and class II lysyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell* *12*, 287–294.

- Praetorius-Ibba, M., Rogers, T.E., Samson, R., Kelman, Z., and Ibba, M. (2005). Association between Archaeal prolyl- and leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA(Pro) aminoacylation. *J. Biol. Chem.* *280*, 26099–26104.
- Praetorius-Ibba, M., Hausmann, C.D., Paras, M., Rogers, T.E., and Ibba, M. (2007a). Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* *282*, 3680–3687.
- Praetorius-Ibba, M., Hausmann, C.D., Paras, M., Rogers, T.E., and Ibba, M. (2007b). Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* *282*, 3680–3687.
- Prat, L., Heinemann, I.U., Aerni, H.R., Rinehart, J., O'Donoghue, P., and Söll, D. (2012). Carbon source-dependent expansion of the genetic code in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 21070–21075.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* *335*, 683–689.
- Pujol, C., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.-M. (2007). How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J. Mol. Biol.* *369*, 356–367.
- Putney, S.D., and Schimmel, P. (1981). An aminoacyl tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. *Nature* *291*, 632–635.
- Qin, X., Deng, X., Chen, L., and Xie, W. (2016). Crystal Structure of the Wild-Type Human GlyRS Bound with tRNA(Gly) in a Productive Conformation. *J. Mol. Biol.*
- Qiu, H., Hu, C., Anderson, J., Björk, G.R., Sarkar, S., Hopper, A.K., and Hinnebusch, A.G. (2000). Defects in tRNA processing and nuclear export induce GCN4 translation independently of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2505–2516.
- Quevillon, S., Agou, F., Robinson, J.C., and Mirande, M. (1997). The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J. Biol. Chem.* *272*, 32573–32579.
- 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.
- Ramesh, V., Köhrer, C., and RajBhandary, U.L. (2002). Expression of *Escherichia coli* methionyl-tRNA formyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* leads to formylation of the cytoplasmic initiator tRNA and possibly to initiation of protein synthesis with formylmethionine. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5434–5442.
- Ranade, R.M., Gillespie, J.R., Shibata, S., Verlinde, C.L.M.J., Fan, E., Hol, W.G.J., and Buckner, F.S. (2013). Induced resistance to methionyl-tRNA synthetase inhibitors in *Trypanosoma brucei* is due to overexpression of the target. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 3021–3028.
- Randerath, K., Janeway, C.M., Stephenson, M.L., and Zamecnik, P.C. (1966). Isolation and characterization of dinucleoside tetra- and tri-phosphates formed in the presence of lysyl-sRNA synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *24*, 98–105.

- Ratnakumar, S., Kacherovsky, N., Arms, E., and Young, E.T. (2009). Snf1 controls the activity of *adr1* through dephosphorylation of Ser230. *Genetics* 182, 735–745.
- Ray, P.S., and Fox, P.L. (2014). Origin and evolution of glutamyl-prolyl tRNA synthetase WHEP domains reveal evolutionary relationships within Holozoa. *PLoS One* 9, e98493.
- Renault, L., Kerjan, P., Pasqualato, S., Ménétrey, J., Robinson, J.C., Kawaguchi, S., Vassylyev, D.G., Yokoyama, S., Mirande, M., and Cherfils, J. (2001). Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry. *EMBO J.* 20, 570–578.
- 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. *J. Biol. Chem.* 273, 11267–11273.
- 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. *EMBO J.* 21, 6874–6881.
- Rinehart, J., Horn, E.K., Wei, D., Soll, 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.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A.T., Alfonzo, J.D., and Söll, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev.* 19, 583–592.
- Rodríguez, 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*. *Biochem. J.* 355, 625–631.
- Romby, P., Caillet, J., Ebel, C., Sacerdot, C., Graffe, M., Eyermann, F., Brunel, C., Moine, H., Ehresmann, C., Ehresmann, B., et al. (1996). The expression of *E.coli* threonyl-tRNA synthetase is regulated at the translational level by symmetrical operator-repressor interactions. *EMBO J.* 15, 5976–5987.
- 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. (2014). 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.
- Roth, S., and Schüller, H.J. (2001). *Cat8* and *Sip4* mediate regulated transcriptional activation of the yeast malate dehydrogenase gene *MDH2* by three carbon source-responsive promoter elements. *Yeast* 18, 151–162.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B.T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148, 635–651.
- Ruan, B., and Söll, D. (2005). The bacterial *YbaK* protein is a Cys-tRNA^{Pro} and Cys-tRNA^{Cys} deacylase. *J. Biol. Chem.* 280, 25887–25891.
- Rubio, M.A.T., and Hopper, A.K. (2012). Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 802–817.

- Sajish, M., and Schimmel, P. (2015). A human tRNA synthetase is a potent PARP1-activating effector target for resveratrol. *Nature* 519, 370–373.
- 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.
- Santangelo, G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Panté, N., and Hurt, E. (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6826–6838.
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A., and Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1321–1328.
- Sarkar, S., and Hopper, A.K. (1998). tRNA nuclear export in *saccharomyces cerevisiae*: in situ hybridization analysis. *Mol. Biol. Cell* 9, 3041–3055.
- Sarkar, J., Poruri, K., Boniecki, M.T., McTavish, K.K., and Martinis, S. a (2012). Yeast mitochondrial leucyl-tRNA synthetase CP1 domain has functionally diverged to accommodate RNA splicing at expense of hydrolytic editing. *J. Biol. Chem.* 287, 14772–14781.
- 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14366–14371.
- Schimmel, P., and Wang, C.C. (1999). Getting tRNA synthetases into the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* 24, 127–128.
- Schmitt, E., Guillon, J.M., Meinel, T., Mechulam, Y., Dardel, F., and Blanquet, S. (1996a). Molecular recognition governing the initiation of translation in *Escherichia coli*. A review. *Biochimie* 78, 543–554.
- Schmitt, E., Blanquet, S., and Mechulam, Y. (1996b). Structure of crystalline *Escherichia coli* methionyl-tRNA(f)Met formyltransferase: comparison with glycinamide ribonucleotide formyltransferase. *EMBO J.* 15, 4749–4758.
- Schneider, A. (2011). Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1033–1053.
- Schneller, J.M., Schneller, C., Martin, R., and Stahl, A.J. (1976). Nuclear origin of specific yeast mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* 3, 1151–1165.
- Schulman, L.H., and Pelka, H. (1983). Anticodon loop size and sequence requirements for recognition of formylmethionine tRNA by methionyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6755–6759.
- Segev, N., and Hay, N. (2012). Hijacking leucyl-tRNA synthetase for amino acid-dependent regulation of TORC1. *Mol. Cell* 46, 4–6.

- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Lührmann, R., and Hurt, E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J.* *16*, 3256–3271.
- Sekinger, E. a, Moqtaderi, Z., and Struhl, K. (2005). Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Mol. Cell* *18*, 735–748.
- Senger, B., and Fasiolo, F. (1996). Yeast tRNA(Met) recognition by methionyl-tRNA synthetase requires determinants from the primary, secondary and tertiary structure: a review. *Biochimie* *78*, 597–604.
- Senger, B., Despons, L., Walter, P., Jakubowski, H., and Fasiolo, F. (2001). Yeast cytoplasmic and mitochondrial methionyl-tRNA synthetases: two structural frameworks for identical functions. *J. Mol. Biol.* *311*, 205–216.
- Shaheen, H.H., and Hopper, A.K. (2005). Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11290–11295.
- Shen, W.C., Selvakumar, D., Stanford, D.R., and Hopper, A.K. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* LOS1 gene involved in pre-tRNA splicing encodes a nuclear protein that behaves as a component of the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* *268*, 19436–19444.
- Shi, Y., Xu, X., Zhang, Q., Fu, G., Mo, Z., Wang, G.S., Kishi, S., and Yang, X. (2014). tRNA synthetase counteracts c-Myc to develop functional vasculature. *Elife* *3*, e02349.
- Shibata, S., Sasaki, M., Miki, T., Shimamoto, A., Furuichi, Y., Katahira, J., and Yoneda, Y. (2006). Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4711–4721.
- Shin, B., Kim, J., Walker, S.E., Dong, J., Lorsch, J.R., and Dever, T.E. (2011). Initiation factor eIF2 γ promotes eIF2-GTP-Met-tRNAⁱ(Met) ternary complex binding to the 40S ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1227–1234.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., et al. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13207–13212.
- Simader, H., Hothorn, M., Köhler, C., Basquin, J., Simos, G., and Suck, D. (2006). Structural basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed by crystal structures of two binary sub-complexes. *Nucleic Acids Res.* *34*, 3968–3979.
- Simos, G., and Hurt, E. (1999). Transfer RNA biogenesis: A visa to leave the nucleus. *Curr. Biol.* *9*, R238–41.
- Simos, G., Segref, a, Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, a, Mann, M., and Hurt, E.C. (1996). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* *15*, 5437–5448.
- Smirnov, A., Entelis, N., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2011). Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18. *Genes Dev.* *25*, 1289–1305.

- 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.
- Spinelli, S.L., Consaul, S.A., and Phizicky, E.M. (1997). A conditional lethal yeast phosphotransferase (*tpt1*) mutant accumulates tRNAs with a 2'-phosphate and an undermodified base at the splice junction. *RNA* *3*, 1388–1400.
- Springer, M., Graffe, M., Butler, J.S., and Grunberg-Manago, M. (1986). Genetic definition of the translational operator of the threonine-tRNA ligase gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 4384–4388.
- Srinivasan, G., James, C.M., and Krzycki, J.A. (2002). Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* *296*, 1459–1462.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C., and Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* *90*, 1041–1050.
- Steiner-Mosonyi, M., and Mangroo, D. (2004). The nuclear tRNA aminoacylation-dependent pathway may be the principal route used to export tRNA from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *378*, 809–816.
- 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*. *J. Biol. Chem.* *278*, 32236–32245.
- Strub, B.R., Eswara, M.B.K., Pierce, J.B., and Mangroo, D. (2007). Utp8p is a nucleolar tRNA-binding protein that forms a complex with components of the nuclear tRNA export machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3845–3859.
- Süel, K.E., and Chook, Y.M. (2009). Kap104p imports the PY-NLS-containing transcription factor Tfg2p into the nucleus. *J. Biol. Chem.* *284*, 15416–15424.
- Sugiura, I., Nureki, O., Ugaji-Yoshikawa, Y., Kuwabara, S., Shimada, A., Tateno, M., Lorber, B., Giegé, R., Moras, D., Yokoyama, S., et al. (2000). The 2.0 Å crystal structure of *Thermophilus thermophilus* methionyl-tRNA synthetase reveals two RNA-binding modules. *Structure* *8*, 197–208.
- Takano, A., Endo, T., and Yoshihisa, T. (2005). tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science* *309*, 140–142.
- Tang, H.-L., Yeh, L.-S., Chen, N.-K., Ripmaster, T., Schimmel, P., and Wang, C.-C. (2004). Translation of a yeast mitochondrial tRNA synthetase initiated at redundant non-AUG codons. *J. Biol. Chem.* *279*, 49656–49663.
- Tarassov, I., Entelis, N., and Martin, R.P. (1995). Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* *14*, 3461–3471.
- Tibbetts, A.S., Oesterlin, L., Chan, S.Y., Kramer, G., Hardesty, B., and Appling, D.R. (2003). Mammalian mitochondrial initiation factor 2 supports yeast mitochondrial translation without formylated initiator tRNA. *J. Biol. Chem.* *278*, 31774–31780.

- Tobian, J.A., Drinkard, L., and Zasloff, M. (1985). tRNA nuclear transport: defining the critical regions of human tRNA^{met} by point mutagenesis. *Cell* *43*, 415–422.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* *50*, 277–287.
- Tran, E.J., Bolger, T. a, and Wenthe, S.R. (2007). SnapShot: nuclear transport. *Cell* *131*, 420.
- Treitel, M.A., Kuchin, S., and Carlson, M. (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6273–6280.
- Trotta, C.R., Miao, F., Arn, E.A., Stevens, S.W., Ho, C.K., Rauhut, R., and Abelson, J.N. (1997). The yeast tRNA splicing endonuclease: a tetrameric enzyme with two active site subunits homologous to the archaeal tRNA endonucleases. *Cell* *89*, 849–858.
- Tucker, E.J., Hershman, S.G., Köhrer, C., Belcher-Timme, C. a, Patel, J., Goldberger, O. a, Christodoulou, J., Silberstein, J.M., McKenzie, M., Ryan, M.T., et al. (2011). Mutations in MTFMT underlie a human disorder of formylation causing impaired mitochondrial translation. *Cell Metab.* *14*, 428–434.
- Turner, R.J., Lovato, M., and Schimmel, P. (2000). One of two genes encoding glycyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* provides mitochondrial and cytoplasmic functions. *J. Biol. Chem.* *275*, 27681–27688.
- Tzagoloff, A., and Shtanko, A. (1995). Mitochondrial and cytoplasmic isoleucyl-, glutamyl- and arginyl-tRNA synthetases of yeast are encoded by separate genes. *Eur. J. Biochem.* *230*, 582–586.
- Tzagoloff, A., Vambutas, A., and Akai, A. (1989). Characterization of MSM1, the structural gene for yeast mitochondrial methionyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.* *179*, 365–371.
- Unger, M.W., and Hartwell, L.H. (1976). Control of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* by methionyl-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 1664–1668.
- Varshney, U., and RajBhandary, U.L. (1992). Role of methionine and formylation of initiator tRNA in initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *174*, 7819–7826.
- Verheggen, C., Lafontaine, D.L.J., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J.-M., Bordonné, R., and Bertrand, E. (2002). Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J.* *21*, 2736–2745.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* *15*, 1104–1114.
- Wahab, S.Z., and Yang, D.C. (1985). Synthesis of diadenosine 5',5''' -P₁P₄-tetraphosphate by lysyl-tRNA synthetase and a multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases from rat liver. *J. Biol. Chem.* *260*, 5286–5289.
- Wakasugi, K., and Schimmel, P. (1999). Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* *284*, 147–151.

- Wakasugi, K., Slike, B.M., Hood, J., Otani, A., Ewalt, K.L., Friedlander, M., Cheresch, D.A., and Schimmel, P. (2002a). A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 173–177.
- Wakasugi, K., Slike, B.M., Hood, J., Ewalt, K.L., Cheresch, D. a., and Schimmel, P. (2002b). Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* *277*, 20124–20126.
- Walter, P., Gangloff, J., Bonnet, J., Boulanger, Y., Ebel, J.P., and Fasiolo, F. (1983). Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for methionyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 2437–2441.
- Walter, P., Weygand-Durasevic, I., Sanni, A., Ebel, J.P., and Fasiolo, F. (1989). Deletion analysis in the amino-terminal extension of methionyl-tRNA synthetase from *Saccharomyces cerevisiae* shows that a small region is important for the activity and stability of the enzyme. *J. Biol. Chem.* *264*, 17126–17130.
- Walther, K., and Schüller, H.J. (2001). Adr1 and Cat8 synergistically activate the glucose-regulated alcohol dehydrogenase gene ADH2 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* *147*, 2037–2044.
- Walther, T.C., Fornerod, M., Pickersgill, H., Goldberg, M., Allen, T.D., and Mattaj, I.W. (2001). The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins. *EMBO J.* *20*, 5703–5714.
- Watanabe, K., Miyagawa, R., Tomikawa, C., Mizuno, R., Takahashi, A., Hori, H., and Ijiri, K. (2013). Degradation of initiator tRNAMet by Xrn1/2 via its accumulation in the nucleus of heat-treated HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4671–4685.
- Wei, N., Shi, Y., Truong, L.N., Fisch, K.M., Xu, T., Gardiner, E., Fu, G., Hsu, Y.-S.O., Kishi, S., Su, A.I., et al. (2014). Oxidative stress diverts tRNA synthetase to nucleus for protection against DNA damage. *Mol. Cell* *56*, 323–332.
- Whitney, M.L., Hurto, R.L., Shaheen, H.H., and Hopper, A.K. (2007). Rapid and reversible nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in response to nutrient availability. *Mol. Biol. Cell* *18*, 2678–2686.
- Wilcox, A.J., Choy, J., Bustamante, C., and Matouschek, A. (2005). Effect of protein structure on mitochondrial import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15435–15440.
- Willis, I.M. (1993). RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur. J. Biochem.* *212*, 1–11.
- Wiltrout, E., Goodenbour, J.M., Fréchin, M., and Pan, T. (2012). Misacylation of tRNA with methionine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *40*, 10494–10506.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* *285*, 901–906.
- Wolff, B., Sanglier, J.J., and Wang, Y. (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* *4*, 139–147.

- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* *14*, 1105–1116.
- Xu, X., Shi, Y., Zhang, H.-M., Swindell, E.C., Marshall, A.G., Guo, M., Kishi, S., and Yang, X.-L. (2012). Unique domain appended to vertebrate tRNA synthetase is essential for vascular development. *Nat. Commun.* *3*, 681.
- El Yacoubi, B., Bailly, M., and de Crécy-Lagard, V. (2012). Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 69–95.
- Yang, Q., Rout, M.P., and Akey, C.W. (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell* *1*, 223–234.
- Yang, X., Otero, F.J., Skene, R.J., McRee, D.E., Schimmel, P., and Ribas de Pouplana, L. (2003). Crystal structures that suggest late development of genetic code components for differentiating aromatic side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15376–15380.
- 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. *Mol. Cell* *34*, 603–611.
- Yao, P., Poruri, K., Martinis, S.A., and Fox, P.L. (2014). Non-catalytic regulation of gene expression by aminoacyl-tRNA synthetases. *Top. Curr. Chem.* *344*, 167–187.
- Yao, W., Roser, D., Köhler, A., Bradatsch, B., Bassler, J., and Hurt, E. (2007). Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol. Cell* *26*, 51–62.
- Yoneda, Y., Hieda, M., Nagoshi, E., and Miyamoto, Y. (1999). Nucleocytoplasmic Protein Transport and Recycling of Ran. *Cell Struct. Funct.* *24*, 425–433.
- Yoshida, K., and Blobel, G. (2001). The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J. Cell Biol.* *152*, 729–740.
- Yoshihisa, T. (2015). Nucleocytoplasmic shuttling of tRNAs and implication of the cytosolic Hsp70 system in tRNA import. *Nucleus* *6*, 339–343.
- 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. *Mol. Biol. Cell* *14*, 3266–3279.
- Yoshihisa, T., Ohshima, C., Yunoki-Esaki, K., and Endo, T. (2007). Cytoplasmic splicing of tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* *12*, 285–297.
- Yun, C.W., Tamaki, H., Nakayama, R., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (1998). Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *252*, 29–33.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* *292*, 883–896.

Zaitseva, L., Myers, R., and Fassati, A. (2006). tRNAs promote nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes. *PLoS Biol.* 4, 1689–1706.

Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42, 27–81.

Zemp, I., and Kutay, U. (2007). Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett.* 581, 2783–2793.

Zhu, L., and Deutscher, M.P. (1987). tRNA nucleotidyltransferase is not essential for *Escherichia coli* viability. *EMBO J.* 6, 2473–2477.

Annexe

**Protéines identifiées par TAP
(partie Résultats et Discussions, § II.2.1)**

sample name	Accession	Name	MW [kDa]	pI	Meta Score	# peptides	SC [%]
Bande 1	P04050	RPB1_YEAST DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 OS=Sacc	191.5	5.3	2016.4	35	18.6
Bande 5	Q12499	NOP58_YEAST Nucleolar protein 58 OS=Saccharomyces cerevisiae (str	56.9	9.4	928.1	17	37.8
Bande 5	P32074	COPG_YEAST Coatomer subunit gamma OS=Saccharomyces cerevisia	104.8	4.9	864.4	15	17.5
Bande 5	P16862	K6PF2_YEAST 6-phosphofructokinase subunit beta OS=Saccharomyce	104.6	6.2	841.8	15	17.9
Bande 5	P38688	SRP72_YEAST Signal recognition particle subunit SRP72 OS=Saccharon	73.5	10.0	824.3	15	23.1
Bande 6	P04050	RPB1_YEAST DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 OS=Sacc	191.5	5.3	747.8	13	7.7
Bande 6	P47037	SMC3_YEAST Structural maintenance of chromosomes protein 3 OS=!	141.2	5.5	563.4	13	10.8
Bande 6	P22336	RFA1_YEAST Replication factor A protein 1 OS=Saccharomyces cerevi	70.3	5.8	476.3	12	22.7
Bande 6	P30771	NAM7_YEAST ATP-dependent helicase NAM7 OS=Saccharomyces cere	109.4	6.0	554.5	11	13.4
Bande 6	P41812	POP1_YEAST Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1 OS=Sacchar	100.3	10.5	538.5	11	12.2
Bande 6	Q08968	FMP40_YEAST UPF0061 protein FMP40 OS=Saccharomyces cerevisiae	78.3	5.1	467.4	11	12.8
Bande 6	P22147	XRN1_YEAST 5'-3' exoribonuclease 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (s	175.3	7.1	393.2	10	6.8
Bande 6	P53622	COPA_YEAST Coatomer subunit alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (135.5	5.6	441.5	10	7.1
Bande 7	P27476	NSR1_YEAST Nuclear localization sequence-binding protein OS=Saccl	44.5	4.7	482.0	10	25.1
Bande 7	P40850	MKT1_YEAST Protein MKT1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATC	94.4	5.3	438.3	9	11.3
Bande 7	P06782	SNF1_YEAST Carbon catabolite-derepressing protein kinase OS=Saccl	72.0	6.2	412.1	9	10.6
Bande 7	P07264	LEUC_YEAST 3-isopropylmalate dehydratase OS=Saccharomyces cere	85.7	5.5	355.2	7	9.2
Bande 7	P32497	EIF3C_YEAST Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=S	93.1	4.7	449.0	7	7.8
Bande 7		IMB1_YEAST Importin subunit beta-1 OS=Saccharomyces cerevisiae (94.7	4.4	334.5	7	6.6
Bande 7		SYEC_YEAST Glutamyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Saccharomy	80.8	7.8	270.6	7	10.3
Bande 7	P30771	NAM7_YEAST ATP-dependent helicase NAM7 OS=Saccharomyces cere	109.4	6.0	247.5	6	8.0
Bande 7	P12945	NAT1_YEAST N-terminal acetyltransferase A complex subunit NAT1 C	98.8	9.4	321.0	6	8.3
Bande 7	P47083	MPP10_YEAST U3 small nucleolar RNA-associated protein MPP10 OS=!	66.9	4.4	208.4	6	9.4
Bande 7	P53145	LSG1_YEAST Large subunit GTPase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (s	72.7	9.4	258.0	6	13.0
Bande 7	P23615	SPT6_YEAST Transcription elongation factor SPT6 OS=Saccharomyce	168.2	4.7	177.3	5	2.5
Bande 8	P22147	XRN1_YEAST 5'-3' exoribonuclease 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (s	175.3	7.1	245.0	5	3.5
Bande 8	P33202	UFD4_YEAST Ubiquitin fusion degradation protein 4 OS=Saccharomy	167.7	4.6	300.8	5	3.5
Bande 8	P08566	ARO1_YEAST Pentafunctional AROM polypeptide OS=Saccharomyces	174.6	5.9	211.3	5	3.1
Bande 8	P36775	LONM_YEAST Lon protease homolog, mitochondrial OS=Saccharomyc	127.0	5.3	185.1	5	4.5
Bande 8	P30665	MCM4_YEAST DNA replication licensing factor MCM4 OS=Saccharomy	104.9	5.8	212.4	5	5.5
Bande 8	P40024	ARB1_YEAST ABC transporter ATP-binding protein ARB1 OS=Sacchar	68.3	6.1	188.3	5	8.2
Bande 8	P53622	COPA_YEAST Coatomer subunit alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (135.5	5.6	260.3	5	6.0
Bande 8	P04802	SYDC_YEAST Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Saccharomyces	63.5	6.1	177.6	5	12.0

Bande 9	P54113	PUR91_YEAST	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE16 OS=Sacc	65.2	6.1	145.1	5	10.7
Bande 9	Q06678	RM35_YEAST	54S ribosomal protein L35, mitochondrial OS=Saccharor	42.8	9.9	171.2	5	21.0
Bande 9	P53210	YG1B_YEAST	Uncharacterized protein YGR017W OS=Saccharomyces	34.7	4.4	256.4	5	17.2
Bande 9		SYMC_YEAST	Methionyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Saccharon	85.6	6.2	128.4	5	7.7
Bande 9	P30771	NAM7_YEAST	ATP-dependent helicase NAM7 OS=Saccharomyces cere	109.4	6.0	278.0	4	5.5
Bande 9	P43621	COPD_YEAST	Coatomer subunit delta OS=Saccharomyces cerevisiae (60.6	4.9	200.8	4	7.3
Bande 9	Q04225	RRB1_YEAST	Ribosome assembly protein RRB1 OS=Saccharomyces ce	57.2	4.3	139.6	4	10.0
Bande 9	P47077	NOP9_YEAST	Nucleolar protein 9 OS=Saccharomyces cerevisiae (strai	77.7	8.9	120.6	4	5.4
Bande 11	P24784	DBP1_YEAST	ATP-dependent RNA helicase DBP1 OS=Saccharomyces	67.9	9.5	540.1	4	8.9
Bande 11	P47052	DHSX_YEAST	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein suk	69.3	7.1	206.4	4	6.9
Bande 11	P43621	COPD_YEAST	Coatomer subunit delta OS=Saccharomyces cerevisiae (60.6	4.9	266.1	4	7.3
Bande 11	P40055	UTP7_YEAST	U3 small nucleolar RNA-associated protein 7 OS=Saccha	62.3	9.9	157.5	4	10.1
Bande 11	Q05515	SVF1_YEAST	Survival factor 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain A	54.3	4.3	129.0	4	8.9
Bande 11	P53297	PBP1_YEAST	PAB1-binding protein 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (s	78.7	6.4	185.9	4	5.5
Bande 12	Q12123	DCS2_YEAST	Protein DCS2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATC	40.9	6.2	104.4	4	14.2
Bande 12	P53292	RT35_YEAST	37S ribosomal protein S35, mitochondrial OS=Saccharor	39.6	10.3	144.5	4	13.0
Bande 12	P40217	EIF3I_YEAST	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Sæ	38.7	5.3	273.0	4	15.9
Bande 12	P04050	RPB1_YEAST	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 OS=Sacc	191.5	5.3	108.1	3	1.6
Bande 13	P32908	SMC1_YEAST	Structural maintenance of chromosomes protein 1 OS=!'	141.2	6.1	122.2	3	2.4
Bande 13	P32898	CYM1_YEAST	Mitochondrial presequence protease OS=Saccharomyce	112.1	6.0	133.3	3	3.8
Bande 13	Q07381	TSR1_YEAST	Ribosome biogenesis protein TSR1 OS=Saccharomyces c	90.7	5.4	126.3	3	4.3
Bande 13	Q07844	RIX7_YEAST	Ribosome biogenesis ATPase RIX7 OS=Saccharomyces c	93.0	5.1	131.5	3	2.2
Bande 13	P52891	NUP84_YEAST	Nucleoporin NUP84 OS=Saccharomyces cerevisiae (stra	83.6	4.6	84.2	3	3.7
Bande 13	P14742	GFA1_YEAST	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [80.0	6.0	115.2	3	3.9
Bande 13	Q06682	UBX5_YEAST	UBX domain-containing protein 5 OS=Saccharomyces ce	56.7	4.4	206.1	3	7.8
Bande 13	Q04636	POB3_YEAST	FACT complex subunit POB3 OS=Saccharomyces cerevis	63.0	4.6	161.0	3	7.1
Bande 13	P06782	SNF1_YEAST	Carbon catabolite-derepressing protein kinase OS=Saccl	72.0	6.2	81.4	3	5.4
Bande 13	P09032	EI2BG_YEAST	Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma OS=ÿ	65.7	4.6	147.1	3	4.8
Bande 13	P53235	EIF2A_YEAST	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS=Saccharor	71.3	9.7	98.2	3	7.0
Bande 13	P43609	RSC8_YEAST	Chromatin structure-remodeling complex protein RSC8	63.1	5.1	78.2	3	7.0
Bande 14	P39522	ILV3_YEAST	Dihydroxy-acid dehydratase, mitochondrial OS=Sacchar	62.8	8.8	99.5	3	4.4
Bande 14	P32608	RTG2_YEAST	Retrograde regulation protein 2 OS=Saccharomyces cer	65.5	9.0	125.5	3	7.0
Bande 14	P28240	ACEA_YEAST	Isocitrate lyase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain AT	62.4	6.0	142.0	3	6.6
Bande 14	P40959	MVP1_YEAST	Sorting nexin MVP1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strai	59.6	5.2	171.9	3	7.0

Bande 14	P31383	2AAA_YEAST	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit A OS=Sac	70.9	4.4	92.8	3	4.9
Bande 14	P53729	YN8H_YEAST	Uncharacterized protein YNR029C OS=Saccharomyces c	48.1	4.9	116.4	3	10.3
Bande 14	P07250	IPMK_YEAST	Inositol polyphosphate multikinase OS=Saccharomyces	40.3	4.4	139.6	3	7.9
Bande 14	P06245	KAPB_YEAST	cAMP-dependent protein kinase type 2 OS=Saccharomy	44.2	6.8	131.5	3	12.1
Bande 14	P00924	ENO1_YEAST	Enolase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 20	46.8	6.2	163.2	3	9.6
Bande 14	P43558	OTU1_YEAST	Ubiquitin thioesterase OTU1 OS=Saccharomyces cerevis	33.5	5.0	140.5	3	15.3
Bande 14		VTC4_YEAST	Vacuolar transporter chaperone 4 OS=Saccharomyces c	83.1	6.4	119.2	3	3.7
Bande 14		YPK1_YEAST	Serine/threonine-protein kinase YPK1 OS=Saccharomyc	76.4	6.1	115.8	3	6.2
Bande 14		SYC_YEAST	Cysteinyl-tRNA synthetase OS=Saccharomyces cerevisia	87.5	6.4	95.1	3	3.8
Bande 14		MRS_D.Laporte_H.Be	>MRS_D.Laporte_H.Becker	88.6	6.9	89.9	3	4.8
Bande 14	P48563	MON2_YEAST	Protein MON2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATC	186.7	5.4	107.9	2	1.0
Bande 14	P47068	BBC1_YEAST	Myosin tail region-interacting protein MTI1 OS=Sacchar	128.2	5.0	126.8	2	1.9
Bande 14	P35845	OSH1_YEAST	Oxysterol-binding protein homolog 1 OS=Saccharomyce	135.0	5.2	84.9	2	1.9
Bande 14	P36048	SN114_YEAST	Pre-mRNA-splicing factor SNU114 OS=Saccharomyces c	114.0	5.6	83.3	2	2.0
Bande 14	P40547	VID28_YEAST	Vacuolar import and degradation protein 28 OS=Saccha	105.4	5.6	107.4	2	2.4
Bande 15	P07245	C1TC_YEAST	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Sacchar	102.1	6.4	130.9	2	2.3
Bande 15	Q12136	SAS10_YEAST	Something about silencing protein 10 OS=Saccharomyce	70.2	4.4	99.8	2	4.9
Bande 15	P47050	CUL8_YEAST	Regulator of Ty1 transposition protein 101 OS=Saccharc	99.3	7.8	186.6	2	3.0
Bande 15	Q08412	CUE5_YEAST	Ubiquitin-binding protein CUE5 OS=Saccharomyces cere	46.8	4.6	121.2	2	5.8
Bande 15	P53011	SEH1_YEAST	Nucleoporin SEH1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain	39.1	5.2	137.8	2	6.3
Bande 15	P25342	CDC10_YEAST	Cell division control protein 10 OS=Saccharomyces cere	37.0	5.4	94.3	2	6.8
Bande 16	Q01476	UBP2_YEAST	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2 OS=Saccharom	146.3	4.9	58.4	1	0.9
Bande 16	P35207	SKI2_YEAST	Antiviral helicase SKI2 OS=Saccharomyces cerevisiae (st	146.0	6.3	46.9	1	0.9
Bande 16	P36006	MYO3_YEAST	Myosin-3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 20	142.4	9.9	83.4	1	1.4
Bande 16	Q04175	SXM1_YEAST	Importin beta SMX1 OS=Saccharomyces cerevisiae (stra	108.3	4.5	112.8	1	1.3
Bande 16	Q04660	ERB1_YEAST	Ribosome biogenesis protein ERB1 OS=Saccharomyces c	91.6	4.9	35.6	1	1.1
Bande 16	P40469	MET18_YEAST	DNA repair/transcription protein MET18/MMS19 OS=Sc	117.8	5.6	67.6	1	1.1
Bande 16	P53914	KRE33_YEAST	UPF0202 protein KRE33 OS=Saccharomyces cerevisiae (119.3	8.3	65.7	1	0.9
Bande 16	P40825-2	SYA_YEAST	Isoform Cytoplasmic of Alanine--tRNA ligase, mitochonc	107.2	5.2	45.1	1	1.3
Bande 16	Q05934	VID22_YEAST	Vacuolar import and degradation protein 22 OS=Saccha	102.4	4.9	48.7	1	1.0
Bande 16	P38996	NAB3_YEAST	Nuclear polyadenylated RNA-binding protein 3 OS=Sacc	90.4	4.2	76.8	1	2.5
bande 10 (MRS	P32074	COPG_YEAST	Coatomer subunit gamma OS=Saccharomyces cerevisia	104.8	4.9	81.1	1	1.5
bande 10 (MRS	P31688	TPS2_YEAST	Trehalose-phosphatase OS=Saccharomyces cerevisiae (:	102.9	9.0	69.1	1	1.2
bande 10 (MRS	P30665	MCM4_YEAST	DNA replication licensing factor MCM4 OS=Saccharomy	104.9	5.8	51.2	1	1.2

3	bande 10 (MRS	Q04175	SXM1_YEAST	Importin beta SMX1 OS=Saccharomyces cerevisiae (stra	108.3	4.5	109.5	1	1.3
3	bande 10 (MRS	P38112	MAK5_YEAST	ATP-dependent RNA helicase MAK5 OS=Saccharomyces	87.0	9.1	66.2	1	1.3
3	bande 10 (MRS	P38217	IMB2_YEAST	Importin subunit beta-2 OS=Saccharomyces cerevisiae (103.6	4.4	72.0	1	1.0
3	bande 10 (MRS	Q08968	FMP40_YEAST	UPF0061 protein FMP40 OS=Saccharomyces cerevisiae	78.3	5.1	58.7	1	1.6
3	bande 10 (MRS	Q04951	SCW10_YEAST	Probable family 17 glucosidase SCW10 OS=Saccharomy	40.4	4.3	50.5	1	2.8
3	bande 10 (MRS	P27472	GYS2_YEAST	Glycogen [starch] synthase isoform 2 OS=Saccharomyce	80.0	5.9	94.7	1	1.6
3	bande 10 (MRS	P32583	SRP40_YEAST	Suppressor protein SRP40 OS=Saccharomyces cerevisia	41.0	4.0	62.0	1	3.0
3	bande 10 (MRS	P40150	HSP76_YEAST	Heat shock protein SSB2 OS=Saccharomyces cerevisiae	66.6	5.2	2542.0	1	3.4
3	bande 10 (MRS	Q12242	RUP1_YEAST	UBA domain-containing protein RUP1 OS=Saccharomyc	75.3	4.5	54.0	1	1.6
3	bande 10 (MRS	P32523	PRP19_YEAST	Pre-mRNA-splicing factor 19 OS=Saccharomyces cerevis	56.5	4.9	65.6	1	2.2
3	bande 10 (MRS	P39517	DHH1_YEAST	ATP-dependent RNA helicase DHH1 OS=Saccharomyces	57.5	8.9	38.6	1	2.2
3	bande 10 (MRS	P53140	RMD9_YEAST	Protein RMD9, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevi	74.5	8.7	45.2	1	1.9
3	bande 10 (MRS	P32468	CDC12_YEAST	Cell division control protein 12 OS=Saccharomyces cere	46.6	8.7	60.9	1	3.4
3	bande 10 (MRS	P32264	PROB_YEAST	Glutamate 5-kinase OS=Saccharomyces cerevisiae (strai	47.1	6.3	77.6	1	3.7
3	bande 10 (MRS	P40335	PEP8_YEAST	Carboxypeptidase Y-deficient protein 8 OS=Saccharomy	42.5	9.1	49.0	1	6.1
3	bande 10 (MRS	Q05583	CIAO1_YEAST	Cytosolic iron-sulfur protein assembly protein 1 OS=Sac	37.3	4.4	78.4	1	3.3
3	bande 10 (MRS	P15790	CSK21_YEAST	Casein kinase II subunit alpha OS=Saccharomyces cerevi	44.6	9.1	56.0	1	2.4
3	bande 10 (MRS	P38829	YHS2_YEAST	MIP18 family protein YHR122W OS=Saccharomyces ceri	25.7	4.4	88.2	1	6.9

Résumé

La méthionyl-ARNt synthétase (MetRS) de *Saccharomyces cerevisiae* aminoacyle les ARNt méthionine initiateur et élongateur (ARNtiMet et ARNteMet), mais possède également des fonctions atypiques. Nous avons montré que la MetRS rejoint le noyau durant la transition diauxique afin de réguler la transcription des gènes nucléaires des complexes III et V de la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour ce faire, la MetRS possède au moins deux signaux de localisation nucléaire (NLS) dans sa séquence, l'un se situant dans les 55 premiers acides aminés (aa) et le second, au delà de la partie N-terminale lui permettant de recruter les sous-unités Rpb4 et Rpb7 de l'ARN pol II. Nous avons montré qu'en fermentation, la MetRS est clivée entre le 114ème et le 132ème aa et que cette forme clivée est essentielle à la viabilité des cellules, puisqu'un variant non clivé (MetRSK11A) ne permet pas la croissance. Nous avons surproduit et purifié un mutant de la MetRS clivée (MetRS Δ 142) et montré que ce variant est plus efficace pour l'aminoacylation de l'ARNtiMet que la forme entière de MetRS. Ainsi, notre étude suggère que chez *S. cerevisiae*, la forme longue de MetRS cytoplasmique permet l'aminoacylation de l'ARNteMet, la forme longue de MetRS nucléaire régule la transcription, et la forme clivée de MetRS nucléaire et cytoplasmique permet l'aminoacylation de l'ARNtiMet.

Aminoacyl-ARNt synthétase, ARNt, noyau, *Saccharomyces cerevisiae*, transition diauxique, transcription, clivage.

Résumé en anglais

Methionyl-tRNA synthetase (MetRS) is the enzyme in charge of aminoacylation of tRNA methionine initiator and elongator (tRNAiMet et tRNAeMet), but also displays atypical functions in *Saccharomyces cerevisiae*. In the present work, we showed that MetRS is imported to the nucleus during the diauxic shift in order to regulate transcription of genes coding for the complexes III and V subunits of the mitochondrial respiratory chain. To do so, MetRS harbors at least two nuclear localization signals (NLS), located within the 55 first aminoacids (NLS1) and beyond the N-terminal part (NLS2). The N-terminal part is responsible for the recruitment of RNA pol II subunits Rpb4 and Rpb7. We also showed that MetRS is cleaved through the 114th and the 132nd aminoacid during fermentation and that the proteolysed form is essential for the viability of the cell, since a mutant of MetRS which is not cleaved (MetRSK11A) did not allow the growth. We showed that an overproduced and purified a mutant representative of the cleaved form (MetRS Δ 142) is more efficient for tRNAiMet aminoacylation than the full length MetRS. Thus, our study suggests that in *S. cerevisiae*, the cytoplasmic full length MetRS aminoacylates tRNAeMet, the nuclear full length MetRS regulates genes transcription, and the cytoplasmic and nuclear cleaved MetRS aminoacylates the tRNAiMet.

Aminoacyl-tRNA synthetase, tRNA, nucleus, *Saccharomyces cerevisiae*, diauxic shift, transcription, cleavage.