

UNIVERSITE EVRY VAL D'ESSONNE

ECOLE DOCTORALE DES GENOMES

AUX ORGANISMES (GAO)

Thèse de **Laurent Dujancourt**

Pour le grade de :

« Docteur en science de l'Université d'Evry Val d'Essonne »

**Métabolisme et traduction des ARNs
mitochondriaux chez la levure
*Schizosaccharomyces pombe***

Thèse soutenue le 19 décembre 2012 à Gif sur Yvette en présence de :

Président du jury : **Anne-Marie Prêt**, UVSQ, CGM Gif sur Yvette

Rapporteur : **Pascale Belenguer**, Université de Toulouse, CBD Toulouse

Rapporteur : **Hakim Mireau**, Université Paris sud 11 Orsay, IJPB Versailles

Examineur : **Jean-Pierre Rousset**, Université Paris sud 11 Orsay, IGM Orsay

Directeur de Thèse : **Christopher James Herbert**, CNRS, CGM Gif sur Yvette

Remerciements

J'aimerais profiter de ce manuscrit pour remercier les différentes personnes qui m'ont supporté et accompagné tout au long de ma thèse.

Pour commencer je voudrais remercier **Nathalie Bonnefoy** et **Christopher James Herbert**, mes directeurs de thèse au Centre de Génétique Moléculaire de Gif sur Yvette, sans qui cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu. De plus j'aimerais les remercier pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté lors de ces 3 dernières années, pour toutes ces discussions scientifiques ou non qui m'ont permis d'avancer, et tout particulièrement leur très grande aide pour la rédaction de ce travail.

J'aimerais ensuite remercier **Geneviève Dujardin** ainsi que tous les membres de son équipe pour leur aide et leur enthousiasme qui m'ont permis de conserver ma motivation tout au long de ma thèse, ainsi que pour les petites gourmandises qu'ils ont apporté de nombreuses fois au laboratoire.

Ensuite j'aimerais remercier les différents ITA de l'instituts avec qui j'ai été amené à travailler comme **Mauricette Gaisne**, avec qui j'ai beaucoup discuté et qui m'a transmise de nombreuses techniques. **Sophie Marsy** pour tout son soutien ainsi que ses précieux conseils en biochimie. **Anita Prevot**, **Marie-Line Bourbon** et **Anne-Marie Pontillon** « Les Dames de la cuisine », pour toutes leurs préparations ainsi que pour leur grande disponibilité et leur bonne humeur sans lesquelles mon travail aurait été plus compliqué. **Sarah-Morgane Zaoui**, pour toute l'aide qu'elle a pu apporté vis-à-vis des réglementations et encore une fois ses discussions qui permettent de décompresser de temps en temps, ainsi qu'**Alexandre Chol** pour les mêmes raisons. J'aimerais également remercier **Cyrielle Sophie** pour sa joie de vivre et sa fraîcheur au sein du laboratoire.

Je voudrais aussi remercier **Inge Kühl**, avec qui j'ai partagé de nombreux bons moments lors de mes deux premières années de thèse, et qui m'a transmis beaucoup de son savoir. **Jelena Ostojic**, **Elodie Bovier** et **Cindy Vallières**, avec qui j'ai passé de bons moments notamment lors des congrès parfois un peu longs.

J'aimerais surtout remercier ma famille et mes amis et tout particulièrement **Sonia Narme** pour m'avoir supporté dans tous les sens du terme lors de cette thèse.

Pour finir j'aimerais remercier les membres du jury qui vont juger ce travail.

Sommaire

Résumé	1
Introduction	2
I : Les mitochondries	3
A. Origine et dynamique des mitochondries	3
B. Les fonctions mitochondriales	4
C. La chaîne respiratoire	4
1. Chaîne de transfert d'électrons	5
2. Synthèse d'ATP par l'ATP synthase	5
II : Le génome mitochondrial	7
A. Structure et capacité codante de l'ADNmt	7
1. Taille et forme	7
2. Capacité codante	8
3. ADNmt de l'homme et des levures	8
B. Réplication et maintien de l'ADNmt	9
1. Réplication de l'ADNmt	9
2. Maintien et intégrité de l'ADNmt	10
C. Transcription et maturation des ARN	11
1. La transcription mitochondriale	11
<i>a. Séquences cis</i>	11
<i>b. Facteurs trans</i>	12
2. Maturation des transcrits mitochondriaux	12
III : La traduction mitochondriale	14
A. Les acteurs	14
1. Les ARNt	14
2. Les aa-ARNt synthétases	14
3. Le ribosome	15
<i>a. Les trois sites ribosomiaux</i>	15
<i>b. Particularités du ribosome mitochondrial</i>	15
<i>c. Association des ribosomes à la membrane mitochondriale</i>	16
4. Les séquences UTR	16
<i>a. UTR bactériens</i>	17
<i>b. UTR eucaryotes</i>	17
<i>c. UTR mitochondriaux</i>	17

B. Les mécanismes	18
1. La traduction bactérienne	18
<i>a. Initiation</i>	18
<i>b. Elongation</i>	18
<i>c. Terminaison et recyclage</i>	18
2. Particularités de la traduction mitochondriale	19
<i>a. Origine génétique</i>	19
<i>b. Code génétique</i>	19
<i>c. Structure des ARNt et effet Wobble</i>	19
<i>d. Facteurs de traduction</i>	20
IV : Contrôle post transcriptionnel de l'expression du génome mitochondrial	21
A. Rôle des protéines à motif Penta-trico Peptide Repeat (PPR)	21
1. Organismes contenant des protéines PPR et localisation cellulaire	21
2. Structure et propriétés des protéines PPR	22
3. Exemples de fonctions des protéines PPR	22
<i>a. Protéines PPR de plantes</i>	23
<i>b. Protéines PPR humaines</i>	23
<i>c. Protéines PPR de S. cerevisiae</i>	24
B. Les facteurs de traduction spécifiques d'un ARNm chez S. cerevisiae	25
1. Facteurs de traduction « classiques »	25
2. Facteurs de traduction ayant aussi un rôle dans le métabolisme des ARN	26
3. Facteurs de traduction interagissant avec la protéine naissante	26
C. Les systèmes déblocage de la traduction	27
1. Les ARNtm bactériens	27
2. Les Peptidyl-ARNt hydrolases	27
<i>a. Peptidyl tRNA hydrolases bactériennes</i>	28
<i>b. Peptidyl tRNA hydrolases de levures et de l'homme</i>	28
V : Maladies due à des défauts de la traduction mitochondriale	30
A. Préambule	30
B. La protéine PPR multifonctionnelle, LRPPRC	30
1. LRPPRC et le « French-Canadian Leigh Syndrome (FCLS) »	30
2. Rôles multiples de LRPPRC	31
3. Interaction de LRPPRC avec SLIRP	31
4. Rôle nucléaire de LRPPRC	32
5. Conclusion	33
C. Le facteur de traduction spécifique de COX1, TACO1	33
D. Le facteur de traduction général C12orf65	34

VI. Choix du système modèle et buts de la thèse	35
Matériels et Méthodes	37
Résultats	43
Chapitre I : Etiquetage de sous-unités du ribosome mitochondrial de <i>S. pombe</i>	44
A. Recherche des protéines ribosomales de <i>S. pombe</i>	44
B. Choix des protéines à étiqueter et construction des souches	47
1. La petite sous-unité ribosomale	47
2. La grande sous-unité ribosomale	47
3. Stratégie de construction des souches étiquetées	48
4. Souches Mrp4-HA et MrpL12-cMyc	48
5. Etiquetage de Mrp4, MrpL12, MrpL24 et Mrp49 par 7 histidines	48
C. Caractérisation biochimique des protéines ribosomales choisies	49
1. Expression des constructions	49
2. Localisation cellulaire	49
3. Localisation subcellulaire	49
a. Comportement en gradient de sucrose	49
b. Association aux membranes	50
Chapitre II : Etude chez <i>S. pombe</i> de protéines à motif « peptidyl tRNA hydrolase »	51
A. Situation du sujet : rôle de Mrf1	51
B. Article 1	53
C. Localisation de Pth3 et Pth4	88
1. Localisation cellulaire	88
2. Localisation subcellulaire	88
D. Phénotype des mutants <i>pth</i> chez <i>S. pombe</i>	88
E. Interactions entre les gènes <i>pth</i> et <i>mrf1</i>	89
1. Construction de doubles mutants	89
2. Etat de l'ADNmt dans le mutant <i>pth4 mrf1</i> dans un contexte <i>ptp1-1</i>	89
3. Surexpression de <i>pth4</i>	90
F. Association avec le ribosome mitochondrial	90
G. Ces fonctions sont-elles conservées au cours de l'évolution?	91
H. D'autres gènes de <i>S. pombe</i> peuvent-ils compenser l'absence de Pth3 et Pth4?	92

Chapitre III : Etude chez <i>S. pombe</i> de la famille des protéines à motif Penta-tricoPeptide Repeat (PPR)	93
A. Article 2	94
B. Résumé de l'article 2 en français	107
C. Résultats complémentaires concernant Ppr3	110
D. Résultats complémentaires sur Ppr2	111
1. Interaction avec le ribosome	111
2. Délétion de motifs PPR	112
<i>a. Choix des motifs</i>	112
<i>b. Délétions des motifs</i>	112
 Discussion	 114
 Bibliographie	 119

Liste des Figures

Introduction

Section I

Figure 1 : Les mitochondries

Figure 2 : Représentation schématique de la machinerie d'importation des protéines chez *S. cerevisiae*

Figure 3 : La chaîne respiratoire de levure

Section II

Figure 4 : Les différents types de génomes mitochondriaux

Figure 5 : Composition du génome mitochondrial

Figure 6 : Le génome mitochondrial

Figure 7 : Les transcrits mitochondriaux chez *S. pombe*

Figure 8 : Synthèse et maturation des ARN mitochondriaux chez *S. pombe*

Section III

Figure 9 : Représentation d'un ARNt

Figure 10 : L'amino-acyl-ARNt synthétase

Figure 11 : Le ribosome 70S de *E. coli*

Figure 12 : Représentation schématique des différents 5' UTR selon les organismes

Figure 13 : La traduction bactérienne

Figure 14 : La traduction mitochondriale

Section IV

Figure 15 : Représentation de la répartition des protéines PPR au sein des eucaryotes

Figure 16 : Modèle de structure de la protéine PPR de plante At1g05750

Figure 17 : Les différents types de protéines PPR

Figure 18 : La protéine PPR10 d' *A. thaliana*

Figure 19 : Les protéines PPR chez l'homme

Figure 20 : Modèle d'activation de la traduction de l'ARNm *COX2* chez *S. cerevisiae*

Figure 21 : Représentation de l'ARNtm impliqué dans le déblocage de la traduction

Figure 22 : Modèle de fonctionnement du facteur Pth chez *E. coli*

Figure 23 : Interactions génétiques entre divers facteurs et la Peptidyl-ARNt hydrolase bactérienne (Pth)

Figure 24 : Structure de la protéine Pth humaine ICT1

Section V

Figure 25 : Répartition des mutations ponctuelles pathogènes de l'ADNmt

Figure 26 : Mutations pathogènes dans la séquence de l'ARNt^{Leu}

Section VI

Figure 27 : Arbre phylogénétique

Résultats

Chapitre I

Figure 28 : Structure du ribosome 70S d'*E. coli*

Figure 29 : Phénotypes des souches étiquetées au niveau du mitoribosome

Figure 30 : Protéines totales des souches étiquetées au niveau du mitoribosome

Figure 31 : Localisation des protéines ribosomales étiquetées

Figure 32: Analyse par gradient de saccharose des protéines ribosomales étiquetées dans une souche sauvage

Figure 33 : Etude de l'interaction des protéines ribosomales avec les membranes

Chapitre 2

Figure 1 Article 1 : Multiple alignment of part of the *S. pombe* Mrf1 with all Pth proteins from *S. pombe* (Pth1 to 4) and two human Pth proteins, c12orf65 and ICT1

Figure 2 Article 1 : Mitochondrial localization and membrane association of Pth3, Pth4 and Mrf1

Figure 3 Article 1 : Phenotypic and spectral effects of *pth* gene deletion

Figure 4 Article 1 : Genetic interaction between *mrf1* and *pth4*

Figure 5 Article 1 : *pth4* is a high copy suppressor of $\Delta mrf1$

Figure 6 Article 1 : Ribosomal localization of Pth4

Figure 7 Article 1 : Yeast Pth4-FLAG is able to immunoprecipitate human mitochondrial ribosomal proteins

Figure 8 Article 1 : Pth4-FLAG cannot suppress the mitochondrial ribosomal defect caused by ICT1 depletion

Figure S1 Article 1 : Cellular localisation of Su9-Pth4-FLAG within human cells HEK293T

Figure S2 Article 1 : Ribosomal localization of His tagged Pth3

Figure 34 : Comparaison des phénotypes des simples ou double mutants $\Delta pth3$, $\Delta pth4$, $\Delta mrf1$

Figure 35: Résultat de croisement des simples mutants $\Delta pth4$ et $\Delta mrf1$

Figure 36: Comparaison de tétratypes issus de croisement des simples mutants $\Delta pth4$ et $\Delta mrf1$ en présence ou absence de la mutation *ptp1-1*

Figure 37 : Suppression en copies multiples d'un mutant $\Delta mrf1$

Chapitre 3

Figure 2 Article 2 : The PPR proteins of *S. pombe*

Figure 3 Article 2 : Cellular localization of the *S. pombe* Ppr proteins

Figure 4 Article 2 : Phenotypes of the Δppr mutants

Figure 5 Article 2 : Steady state mtRNA levels in the Δppr mutants

Figure 6 Article 2 : Synthesis and steady state of mitochondrial proteins in Δppr mutants

Figure 7 Article 2 : Effect of *ppr4* and *ppr5* over-expression or deletion in different strain backgrounds

Figure 38 : Représentation schématique de la construction *ppr3-Δi*

Figure 39 : Expression de *DMR1* dans une souche $\Delta ppr3$

Figure 40 : Etude de la co-sédimentation de Ppr2 avec le ribosome en coussin de saccharose

Figure 41 : Fractionnement ribosomal d'une souche étiquetée pour Ppr2 sur gradient de 10 à 45% saccharose

Figure 42 : Principe de délétion des motifs PPR

Figure 43 : Représentation schématique des différentes constructions de délétion de motifs de la protéine Ppr2

Figure 44 : Phénotype du mutant $\Delta ppr2$ complémenté par des variants de Ppr2.

Figure 45 : Marquage des protéines mitochondriales néo-synthétisées en présence de [³⁵S] et cycloheximide dans des souches contenant des variants de Ppr2

Discussion

Figure 46 : Prédiction de structures comparées de Pth4 et Mrf1, et Pth3 et Mrf1

Figure 47 : Modèles de structures de protéines PPR de *S. pombe*

Liste des Tableaux

Introduction

Section II

Tableau 1 : Comparaison des génomes mitochondriaux humains et de levure

Tableau 2 : Comparaison des ARNm mitochondriaux de l'homme, *S. cerevisiae* et *S. pombe*

Section III

Tableau 3 : Comparaison de la composition des ribosomes bactérien, d'homme et de levures

Tableau 4 : Variations du code génétique

Tableau 5 : Conservation des facteurs de traduction généraux bactériens et mitochondriaux

Section IV

Tableau 6 : Comparaison des propriétés des motifs PPR et TPR

Tableau 7 : Protéines PPR de la levure *S. cerevisiae*

Tableau 8 : Conservation des facteurs de traduction spécifiques

Section V

Tableau 9 : Exemples de gènes mitochondriaux impliqués dans la traduction mitochondriale et dont la mutation conduit à des maladies

Tableau 10 : Exemples de gènes nucléaires impliqués dans la traduction mitochondriale et dont la mutation conduit à des maladies

Section VI

Tableau 11 : Résumé des différences majeures entre l'homme, *S. pombe* et *S. cerevisiae* d'un point de vue mitochondrial

Résultats

Chapitre I

Tableau 12 : Nombre minimum de protéines ribosomales prédites chez *S. pombe*, *E. coli*, *S. cerevisiae* et l'homme

Tableau 13 : Protéines de la petite sous-unité du ribosome bactérien ou mitochondrial

Tableau 14: Protéines de la grande sous-unité du ribosome bactérien ou mitochondrial

Chapitre II

Tableau 15: Résumé des protéines à motif "peptidyl tRNA hydrolases" de *S. pombe*

Tableau 16: Résumé du criblage de supprimeurs en copies multiples dans le double mutant $\Delta pth3 \Delta pth4$

Chapitre III

Tableau 17 : Résumé des données sur les protéines PPR de *S. pombe*

Résumé

Les mitochondries sont des organites présents dans la plupart des cellules eucaryotes et spécialisés dans la production d'énergie, *via* la chaîne respiratoire localisée dans leur membrane interne. Les mitochondries possèdent leur propre génome et leur propre système d'expression participant à la biogenèse des complexes respiratoires. En particulier la machinerie de traduction mitochondriale, comme les complexes respiratoires, est d'origine génétique double, nucléaire et mitochondriale. De nombreuses maladies humaines résultent de défauts de l'expression des gènes mitochondriaux et en particulier de mutations de facteurs impliqués dans la traduction mitochondriale. La levure *Schizosaccharomyces pombe* est un modèle de choix pour identifier ces facteurs et comprendre leur fonctionnement car c'est un micro-organisme simple et physiologiquement plus proche des eucaryotes supérieurs que ne l'est *Saccharomyces cerevisiae*.

Lors de ma thèse j'ai tout d'abord participé à la mise en place de nouveaux outils permettant de mieux comprendre le fonctionnement de la traduction mitochondriale, en étiquetant le mitoribosome de *S. pombe* au niveau de la petite et de la grande sous-unité. Par la suite j'ai mis au point des expériences de fractionnement sur gradient de saccharose pour analyser la sédimentation du ribosome associé ou dissocié et tester si des facteurs donnés sont liés au mitoribosome.

Dans un second temps je me suis intéressé à des facteurs qui pouvaient être impliqués dans la terminaison de la traduction. En fait le seul facteur de reconnaissance des codons stop connu chez *S. pombe*, Mrf1, n'est pas essentiel, et j'ai cherché à comprendre pourquoi. Deux enzymes, des Peptidyl ARNt hydrolase (Pth) nommées Pth3 et Pth4 possédant toutes deux un motif GGQ comme Mrf1, semblaient être de bons candidats pour expliquer que *S. pombe* puisse se passer de Mrf1. J'ai montré que ces facteurs jouent un rôle dans la biogenèse mitochondriale et plus précisément que Pth4 est à la fois un supprimeur multicopie et un gène létal synthétique de l'absence de Mrf1.

Pour finir j'ai travaillé sur une famille de protéines de *S. pombe* prédites comme impliquées dans le métabolisme des ARN mitochondriaux : les protéines à Pentatrigo Peptide Repeat (PPR). Ainsi il existe au moins 9 protéines PPR chez *S. pombe* nommée de Ppr1 à Ppr8 ainsi que l'ARN polymérase mitochondriale, Rpo41. L'étude de ces protéines PPR a permis de mettre en évidence qu'elles interviennent toutes dans le métabolisme des ARN à différentes étapes, majoritairement stabilité et traduction, et qu'elles ont souvent des cibles spécifiques. Par exemple la protéine Ppr3 est impliquée dans la stabilité du petit ARNr *rns* alors que Ppr4 est un activateur spécifique de la traduction de *cox1* et que Ppr2 est un activateur général de la traduction mitochondriale dont la cible reste à définir.

Globalement, ces travaux montrent que *S. pombe* est un excellent modèle des fonctions mitochondriales, aussi bien pour les études fondamentales que comme outil pour appréhender les organismes plus complexes comme l'homme.

INTRODUCTION

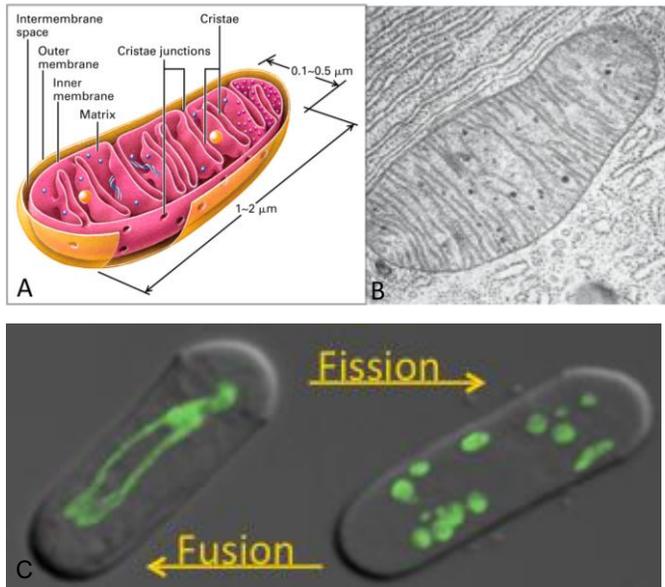


Figure 1 : Les mitochondries. A) Structure, d'après Lodish 5ème édition (2003). B) Microscopie électronique, d'après Karp (2005). C) Visualisation du réseau mitochondrial par étiquetage GFP « Green Fluorescent Protein » d'une protéine mitochondriale dans des mutants de fission ou de fusion, photo Emmanuelle Guillou UMR5088 Toulouse.

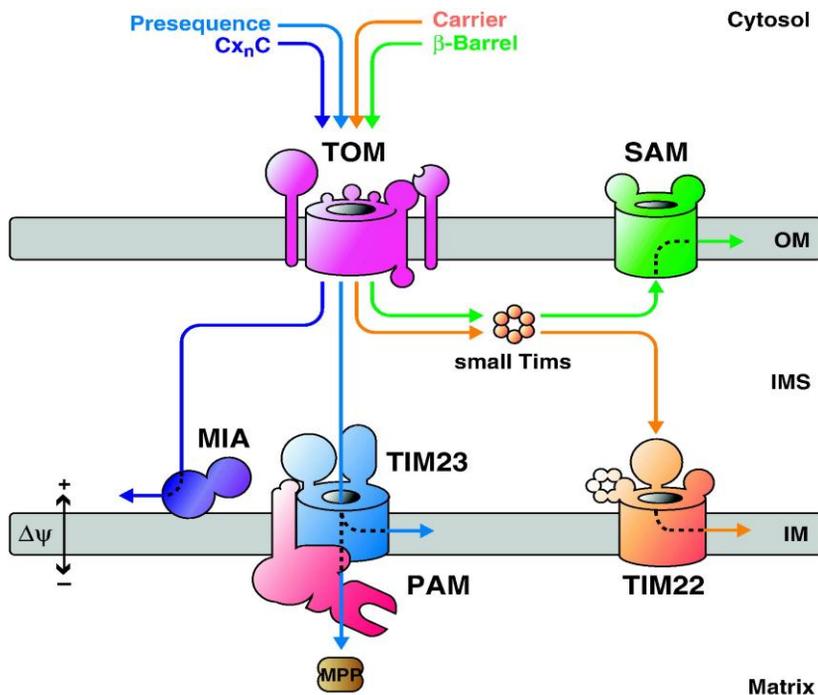


Figure 2 : Représentation schématique de la machinerie d'importation des protéines chez *S. cerevisiae*. En fonction de leur signal d'importation et de leur destination dans les compartiments mitochondriaux, les protéines importées vont utiliser différentes voies. D'après Dudek *et al.* (2012).

I : Les mitochondries

A. Origine et dynamique des mitochondries

Les mitochondries sont des organites présents dans la plupart des cellules eucaryotes. En fait tous les organismes eucaryotes ont, ou ont eu, des mitochondries, seuls certains organismes parasites, comme les ascosporidies, semblent les avoir perdues au cours de l'évolution tout en gardant des traces de celles-ci au sein de leur génome nucléaire (pour revue Van des Giezen & Tovar, 2005). Il est aujourd'hui largement admis que l'origine des mitochondries est bactérienne, des études phylogénétiques les rapprochant des α -protéobactéries. Ces organites résulteraient donc d'un processus d'endosymbiose, c'est-à-dire de l'internalisation d'une bactérie au sein d'une cellule proto-eucaryote. Du fait de cette endosymbiose les mitochondries possèdent une double paroi, une membrane externe qui serait le vestige de la vésicule de phagocytose et une membrane interne qui serait l'ancienne membrane de la bactérie. Ces deux membranes délimitent ainsi deux compartiments mitochondriaux différents, l'espace intermembranaire, qui comme son nom l'indique est l'espace entre ces deux membranes, par opposition à la matrice qui est l'espace délimité par la membrane interne. Cette membrane interne présente de nombreuses invaginations appelées crêtes mitochondriales, permettant d'augmenter et de structurer sa surface et donc d'optimiser les échanges entre les différents compartiments des mitochondries où ont lieu de nombreuses réactions métaboliques.

Les mitochondries sont souvent symbolisées sous les traits de bacilles, or les études d'imagerie ont permis de mettre en évidence qu'on doit plutôt parler de réseau mitochondrial. Ce réseau est très dynamique car il subit de nombreux phénomènes de fusion et de fission qui peuvent avoir lieu en quelques minutes au sein d'une cellule. Ce dynamisme, nécessaire au bon fonctionnement des mitochondries (Figure 1), a notamment pour rôle d'aider à la circulation des métabolites dans les mitochondries, et participe activement à la lutte contre l'accumulation de mitochondries défectueuses. Des mutations forçant la fusion ou au contraire favorisant la fission du réseau mitochondrial, engendrent des défauts respiratoires (Chan, 2012).

Les mitochondries possèdent leur propre génome ainsi que leur propre machinerie d'expression, même si ce génome tend vers une simplification au cours de l'évolution, *via* un transfert de gènes vers le noyau de la cellule. Ainsi la très grande majorité des protéines qu'on retrouve dans la mitochondrie sont codées par le génome nucléaire, et de fait nécessitent un système d'importation des protéines. En fonction de signaux particuliers ces protéines seront adressées aux différents compartiments et membranes de la mitochondrie (Figure 2).

La suite de l'introduction va se focaliser sur les fonctions, dysfonctions et la biogenèse des mitochondries chez les levures et l'homme.

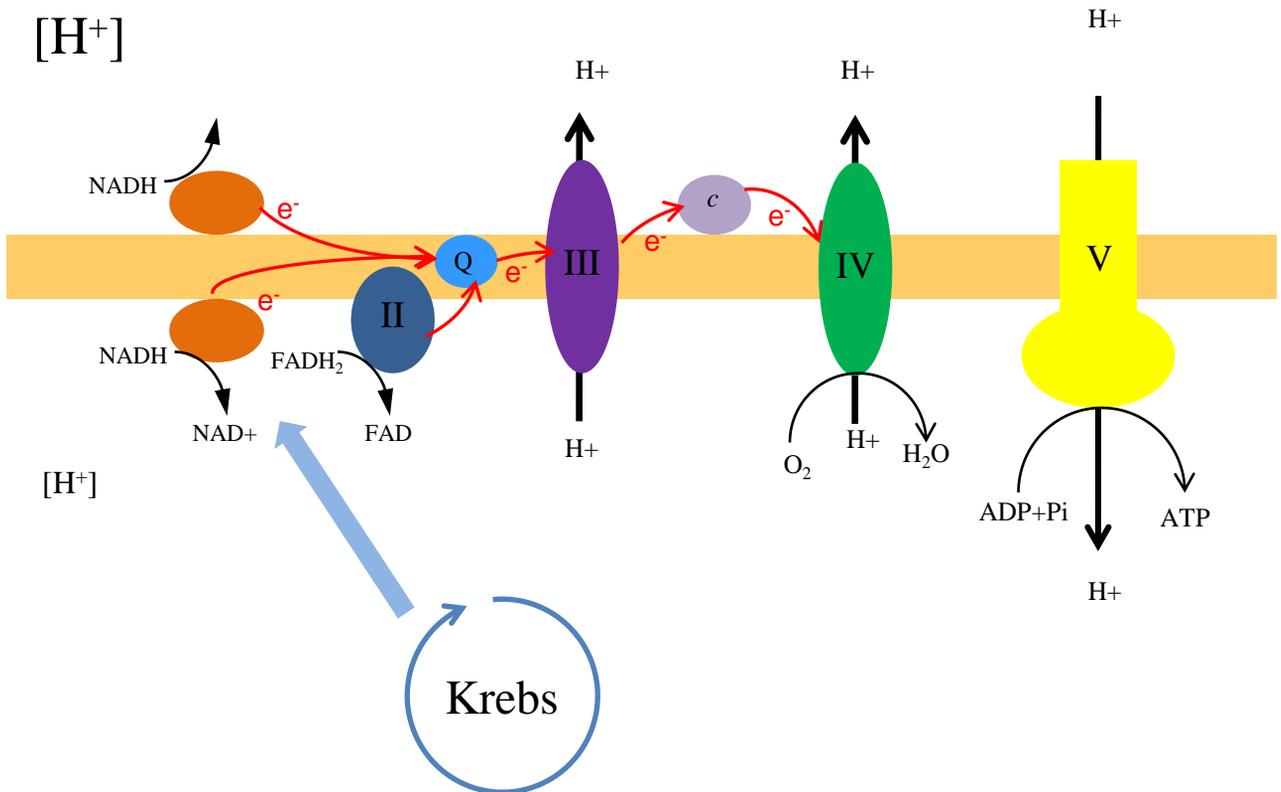


Figure 3 : La chaîne respiratoire de levure. A la place du complexe I, les levures possèdent des NADH déshydrogénases localisées sur les faces interne et externe de la membrane interne. Un transfert d'électrons entre les différents complexes s'accompagne de l'établissement d'un gradient de protons médié par les complexes III et IV. Ce gradient sera dissipé au niveau du complexe V ce qui permettra la production d'ATP.

B. Les fonctions mitochondriales

Les mitochondries participent à de très nombreuses fonctions métaboliques essentielles à la vie cellulaire. Le bon fonctionnement mitochondrial requiert une membrane énergisée (présentant une différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane interne) pour permettre la circulation des métabolites impliqués dans ces mécanismes.

La fonction principale des mitochondries est la synthèse d'énergie sous forme chimique directement utilisable par la cellule : l'Adénosine Triphosphate (ATP). La voie majeure est le cycle de Krebs qui permet la synthèse de molécules à haut pouvoir réducteur, le NADH et le FADH₂, à partir d'acétyl-CoA qui provient notamment de la glycolyse *via* le pyruvate et le coenzyme A. Ce cycle permet également la synthèse d'un GTP qui pourra être transformé en ATP. Les molécules à haut pouvoir réducteur seront ensuite utilisées pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire qui est la voie principale de la synthèse d'ATP. Une autre voie utilisée pour produire de l'énergie est la β -oxydation, métabolisme présent dans les mitochondries de nombreux eucaryotes mais existant dans les peroxysomes chez certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae*. La β -oxydation consiste en une dégradation des acides gras conduisant à la synthèse d'acétyl-CoA, qui peut aussi alimenter le cycle de Krebs.

Les mitochondries sont aussi impliquées dans le métabolisme des acides aminés et le cycle de l'urée. Par exemple l'arginine est dégradée en urée et en ornithine dans le cytoplasme. L'ornithine est ensuite importée dans les mitochondries où elle va pouvoir être transformée en citrulline, qui est un précurseur de la synthèse de l'aspartate (Kanazawa & Mori, 2002). Les mitochondries jouent un rôle crucial dans l'homéostasie du fer notamment *via* la ferritine. Ce fer servira à la synthèse de cluster fer-soufre nécessaires à l'activité catalytique de nombreuses enzymes, certaines étant essentielles à la vie de la cellule (Lill *et al.*, 2012). Les mitochondries interviennent également dans la synthèse des nucléotides notamment *via* l'enzyme dihydroorotate déshydrogénase qui est mitochondriale chez certains organismes comme l'homme et la levure *Schizosaccharomyces pombe*, même si l'homologue de cette enzyme chez *S. cerevisiae* se trouve dans le cytoplasme. Cette enzyme intervient dans la synthèse des pyrimidines (Lacroute *et al.*, 1992).

C. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire mitochondriale est un ensemble de complexes protéiques insérés dans la membrane interne de la mitochondrie. Cette chaîne est composée de 5 complexes même si le premier est parfois absent, notamment chez les levures (Figure 3). Les 4 premiers complexes permettent le transfert d'électrons en réoxydant du NADH ou FADH₂ jusqu'à un accepteur final d'électrons, l'oxygène. Ce transfert d'électron s'accompagne de la translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Cette translocation permet la mise en place d'un gradient de protons qui sera utilisé par le cinquième complexe, nommé ATP synthase, pour fabriquer l'ATP.

1. Chaîne de transfert d'électrons

Le NADH produit par le cycle de Krebs transmet au complexe I de la chaîne respiratoire des électrons qui sont ensuite transférés vers les quinones. Ce transfert s'accompagne de la translocation de protons (H^+) de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe I est le plus gros de la chaîne respiratoire, il est constitué d'environ 40 sous-unités chez l'homme, mais il n'existe que chez certaines levures comme *Yarrowia lipolytica* et *Candida albicans*. Chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, il est remplacé par des NADH déshydrogénases mono peptidiques de part et d'autre de la membrane mitochondriale. Dans ce cas, du fait de l'absence d'un complexe transmembranaire, il ne peut pas y avoir de translocation de protons. Le complexe II ou succinate déshydrogénase, est une enzyme membranaire du cycle de Krebs composée de 4 sous-unités. Ce complexe oxyde du $FADH_2$, ce qui va permettre la réduction des quinones, comme pour le complexe I, mais sans transfert de protons. Les quinones réduites par le complexe I ou le complexe II vont à leur tour transférer leurs électrons au complexe III. Ce complexe est composé d'environ 10 sous-unités dont 3 catalytiques : les cytochromes *b* et *c1* ainsi que la protéine fer-soufre. Le complexe III va réoxyder les quinones réduites et transférer leurs électrons vers le cytochrome *c*. Ce transfert d'électrons s'accompagne toujours de la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe IV ou cytochrome oxydase est constitué d'environ 10 sous-unités dont 2 sont catalytiques : Cox1 et Cox2 qui contiennent deux hèmes *a* et *a3* ainsi que deux centres cuivre. Il reçoit les électrons du cytochrome *c* et les transfère vers l'accepteur final qu'est l'oxygène moléculaire, pour former de l'eau. Là encore des protons sont transférés de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'ensemble des translocations de protons associées aux transferts l'électron conduit à la formation d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient est dit électro-chimique ou potentiel de membrane car il induit une polarité de la membrane due à la différence de concentration de protons de part et d'autre de cette membrane.

2. Synthèse d'ATP par l'ATP synthase

Le dernier complexe de la chaîne respiratoire est le complexe V ou ATP synthase, il permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Phosphate inorganique. L'ATP synthase est composée de 2 parties. La partie globulaire, dite F1, est localisée dans la matrice mitochondriale. Elle est qualifiée de « stator » et comprend 3 sous-unités β catalytiques responsables de la synthèse d'ATP, 3 sous-unités α structurales, ainsi que les sous-unités ϵ , γ et δ . La partie membranaire, F0, est enchâssée dans la membrane interne de la mitochondrie. Il s'agit d'un module mobile, qui peut tourner dans la membrane au tour d'un axe constitué par des sous-unités du F1. Par opposition au « stator », F0 est ainsi appelé le « rotor ». La partie F0 comprend des sous-unités membranaires dont le nombre varie en fonction des organismes (entre 10 et 15). Les sous-unités *c* (codées par le gène *atp9*) comportent des acides aminés aspartate (Asp) ayant la particularité d'être chargées négativement, comme le sont les sous-unités γ et ϵ du domaine F1. Le fait que les sous-unités *c* soient chargées ainsi est défavorable à la rotation de F0.

La synthèse de l'ATP ne peut donc se faire indépendamment d'une membrane car elle dépend du potentiel de membrane créé par les complexes I, III et IV lors du transfert des électrons. Ce potentiel membranaire tend en effet à se dissiper en renvoyant des protons dans la matrice au niveau des rotors F₀, qui constituent pratiquement les seuls points de passage dans la bicouche lipidique. Ce passage de protons provoque la neutralisation temporaire des charges portées par les aspartates des sous-unités c et entraîne la rotation de F₀, ce qui aboutit à des changements de conformation des sous-unités du F₁, en particulier les sous-unités α . Il s'ensuit une conversion énergétique qui permet la synthèse d'ATP par les sous-unités catalytiques β . Il y a ainsi conversion de l'énergie chimio-osmotique du gradient électrochimique en énergie mécanique puis chimique.

Dans certains cas l'ATP synthase peut fonctionner à l'envers et hydrolyser de l'ATP ; elle peut alors générer un gradient électrochimique en produisant de l'ADP, qui est ensuite exporté vers le cytosol par le translocateur ATP/ADP en échange d'un ATP qui rentre dans la mitochondrie. Chez la levure *S. cerevisiae*, ce fonctionnement réverse peut être réalisé par la partie F₁ libre, alors que chez *S. pombe* il semble être réalisé seulement par l'ATP synthase associée. La production d'un gradient électrochimique par l'ATP synthase est donc dépendante de la présence de la partie F₀ chez certains organismes, comme *S. pombe*.

La chaîne respiratoire de la mitochondrie possède une double origine génétique, c'est-à-dire que la majorité des sous-unités composant ses complexes sont codées par le génome nucléaire, mais quelques sous-unités essentielles sont codées par le génome mitochondrial, ceci sera discuté plus en détails dans la section suivante (II).

Rickettsia

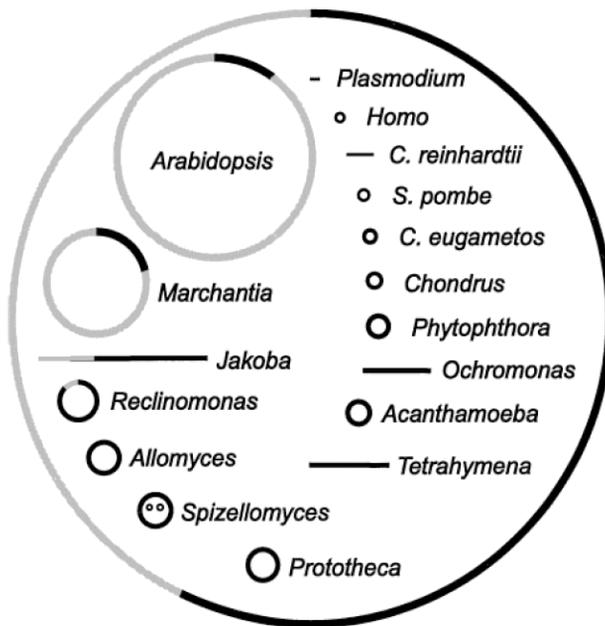


Figure 4 : Les différents types de génomes mitochondriaux. Représentation schématique de plusieurs ADNmt comparés au génome de *Rickettsia*, une α -protéobactérie, qui serait le plus proche ancêtre bactérien de la mitochondrie. Les gènes sont représentés en noir, alors que les régions non codantes et les pseudo-gènes sont représentés en gris. D'après Lang *et al.*, 1999.

II : Le génome mitochondrial

Comme dit précédemment la mitochondrie possède son propre génome (ADNmt). Ce dernier n'est pas réparti de façon homogène dans la mitochondrie, mais il se concentre au niveau de structures appelées nucléoïdes (Williamson & Fennell, 1979, Malka *et al.*, 2006). L'ADNmt existe en plusieurs exemplaires dans chaque cellule et ce nombre de copies peut changer d'un organisme à un autre. De plus les mitochondries se présentant sous forme d'un réseau plus ou moins fragmenté, le nombre de copies d'ADNmt par mitochondrie est difficile à estimer. L'homme posséderait entre 200 et 1700 copies d'ADNmt par cellule, ce nombre dépendant des tissus (Robin & Wong, 1988) et pouvant varier en cas de maladies telles que des déficiences hépatiques ou des cancers du sein (Morten *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2007). Chez *S. cerevisiae*, il y aurait entre 50 et 100 copies (Malka *et al.*, 2006) et chez *S. pombe* on aurait une situation intermédiaire avec 100 à 200 copies (Chu *et al.*, 2007). Ce génome est en général homoplasmique, c'est-à-dire que toutes les copies sont identiques mais il peut arriver qu'il y ait des cas d'hétéroplasmie de l'ADNmt, en particulier dans des maladies dues à des mutations mitochondriales où de l'ADNmt muté coexiste avec de l'ADNmt sauvage. Pour finir, ce génome possède un mode de transmission particulier ne respectant pas les règles de transmission mendélienne. Par exemple, chez l'homme le génome mitochondrial a une transmission uniquement maternelle.

A. Structure et capacité codante de l'ADNmt

1. Taille et forme

La taille du génome mitochondrial varie en fonction des organismes, il fait plus de 2400 kb chez le melon (*Cumis melo*) (Alverson *et al.*, 2010) pour ne faire plus que 5,9 kb chez *Plasmodium falciparum* (Feagin *et al.*, 1992), agent du paludisme, en passant par 85,7 kb chez *S. cerevisiae* (Foury *et al.*, 1998), 19,4 kb chez *S. pombe* et 16 kb chez l'homme (Attardi & Schatz, 1988) (Figure 4). On a ainsi une différence de taille d'un facteur d'environ 400 entre le plus grand et le plus petit génome mitochondrial connu. Ce génome peut aussi varier en forme, il peut ainsi être une molécule linéaire, circulaire, ou organisée en un ou plusieurs chromosomes. Cependant à l'heure actuelle, la forme d'un grand nombre de génomes mitochondriaux n'est pas clairement définie. Par exemple chez *S. cerevisiae*, le génome mitochondrial a longtemps été admis comme étant circulaire mais des études plus récentes mettent cette hypothèse en doute (Williamson, 2002 ; Bendich, 2010). Par électrophorèse en champs pulsé, il a été mis en évidence que la taille de l'ADNmt de *S. cerevisiae* est comprise entre 75 et 150 kb (Maleszka *et al.*, 1991) et que celle de l'ADNmt de *S. pombe* peut atteindre 100 kb (Han & Stachow, 1994), suggérant que ces ADNmt se trouvent sous forme de concatémères, c'est-à-dire des multimères linéaires. Chez l'homme, ce même type d'analyse a permis d'identifier clairement des molécules d'ADNmt sous forme circulaire (Bendich, 1993).

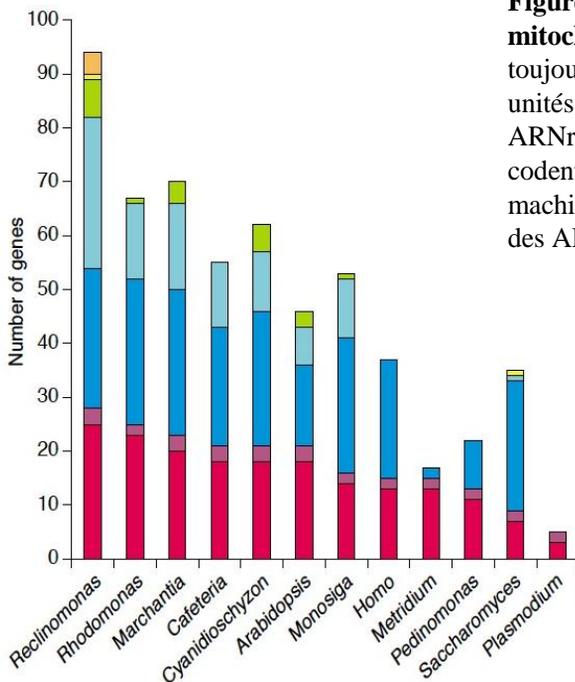


Figure 5 : Composition du génome mitochondrial. Ces génomes contiennent toujours des gènes codants pour des sous-unités des complexes respiratoires et des ARNr. Les génomes les plus « complexes » codent également des composants de la machinerie d'importation et du métabolisme des ARN. D'après Burger *et al.*, 2003.

Key:

- Respiration and oxidative phosphorylation
- Ribosomal RNAs
- Transfer RNAs
- Ribosomal proteins and EF-Tu
- Protein import and maturation
- RNA maturation
- Transcription

2. Capacité codante

Les gènes portés par les génomes mitochondriaux codent pour des produits impliqués dans 5 mécanismes de base : la respiration/phosphorylation oxydative, la traduction, et dans certains cas la transcription, la maturation des ARN et l'importation des protéines. Ainsi l'ADNmt de *P. falciparum* ne contient que 5 gènes codant les deux ARN ribosomiaux (ARNr) ainsi que des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Chez *Arabidopsis thaliana* le génome mitochondrial d'environ 370 kb contient au moins 58 gènes qui codent pour 3 ARNr, 21 ARN de transfert (ARNt), 6 protéines ribosomiales, une maturase, des sous-unités de la chaîne respiratoire, une protéine mttB dont la fonction est inconnue, et d'autres ORFs non caractérisées. Pour finir, le génome mitochondrial de *Jakoba libera* qui mesure 96 kb est en réalité très compact, puisqu'il contient une centaine de gènes codant les ARNr, des ARNt, des sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, des protéines ribosomiales, et comporte aussi des gènes ou pseudo-gènes de fonctions inconnues qui lui sont propres (Lang *et al.*, 1999). De façon intéressante on retrouve dans cet ADNmt des gènes typiquement bactériens comme *rpoB* et *rpoC*, composants de l'ARN polymérase bactérienne, ainsi que *tufA* codant pour le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu. Il n'existe donc pas de corrélation directe entre la taille d'un ADNmt et son contenu en gènes (Figure 5), cependant la capacité codante des génomes mitochondriaux est en moyenne de 40-50 gènes, avec un facteur 20 entre les 2 extrêmes (Lang *et al.*, 1999). Les facteurs qui influent le plus sur la relation entre taille et capacité codante sont les régions intergéniques et les introns. Par exemple chez le champignon filamenteux *Podospora anserina* dont l'ADNmt fait 95 kb, les introns comptent pour 75% du génome, et ils peuvent varier fortement en taille (0,15 à 4 kb) et en nombre (0 à >30) alors que chez *J. libera*, malgré le grand nombre de gènes, aucun ne possède d'intron, le génome est donc très compact.

3. ADNmt de l'homme et des levures

Les génomes de *S. pombe*, de *S. cerevisiae* et de l'homme comportent moins de 40 gènes (Tableau 1 et Figure 6). La plupart de ces gènes codent des ARNt. Ils sont au nombre de 25 chez les deux levures et de 22 chez l'homme. Ces gènes d'ARNt sont regroupés dans l'ADNmt de *S. cerevisiae* alors qu'ils sont dispersés entre les autres gènes tout au long du génome mitochondrial chez *S. pombe* et chez l'homme, on dit que ce sont des génomes ponctués. Dans ces 3 génomes on retrouve 2 gènes d'ARNr. On trouve aussi chez les levures un dernier ARN impliqué dans la maturation des ARNt mitochondriaux, c'est le composant ARN de la RNase P (celle-ci étant entièrement protéique chez l'homme, voir Section II-C-2). Le reste des gènes mitochondriaux de *S. pombe*, de *S. cerevisiae* et de l'homme code pour diverses protéines qui sont pour la très grande majorité des sous-unités des complexes respiratoires. Ainsi ces 3 génomes codent pour la sous-unité Cytb du complexe III, les sous-unités Cox1, Cox2 et Cox3 du complexe IV, et les sous-unités Atp6 et Atp8, seules les levures possèdent aussi le gène d'Atp9. Le génome mitochondrial humain code en plus pour des sous-unités du complexe I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 et ND6) les levures étant dépourvues de ce complexe comme vu précédemment (Introduction Section I-C-1). Enfin les génomes de levures possèdent aussi un gène codant pour une sous-unité du ribosome mitochondrial appelé Var1 chez *S. cerevisiae* et Rps3 chez *S. pombe*.

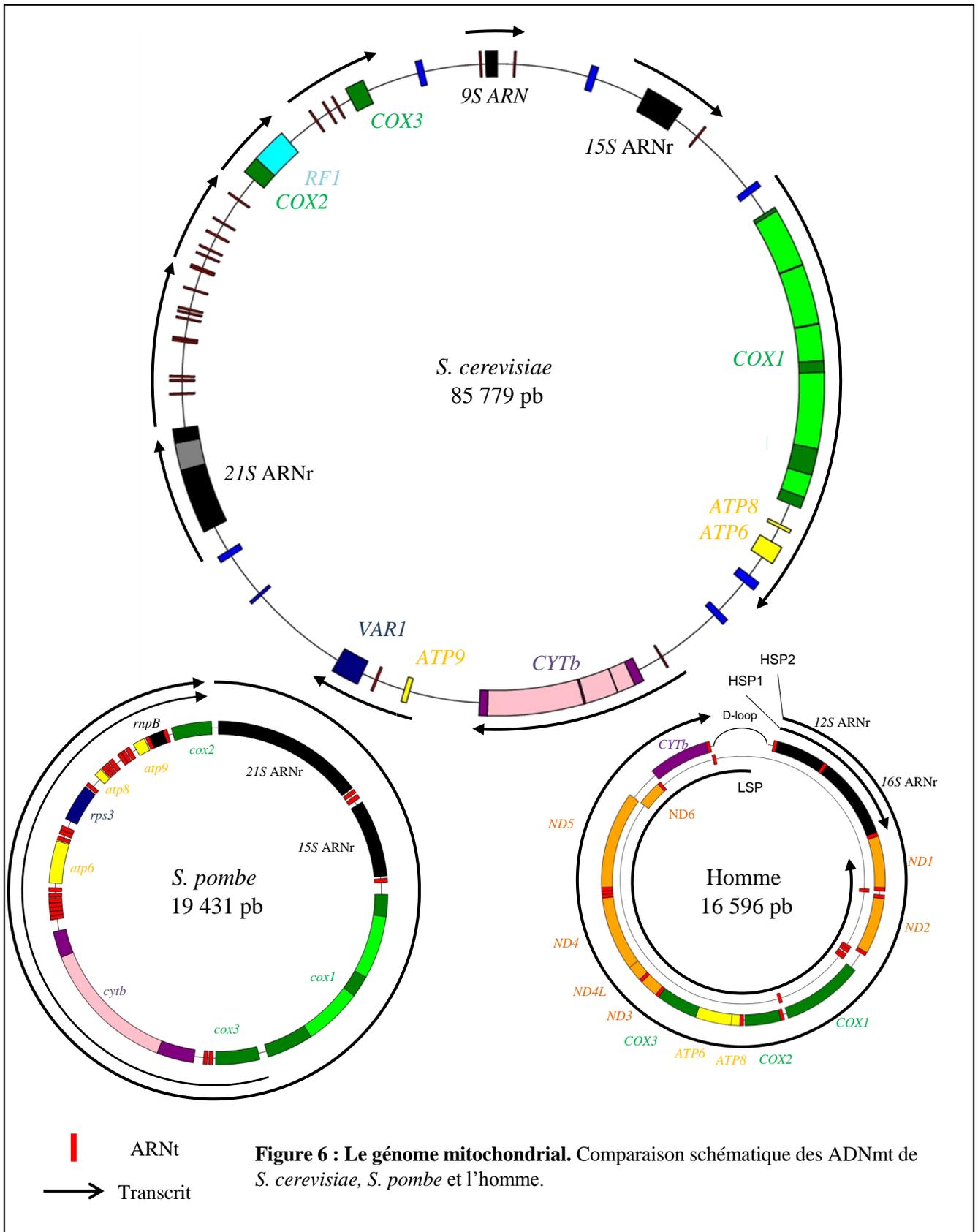


Figure 6 : Le génome mitochondrial. Comparaison schématique des ADNmt de *S. cerevisiae*, *S. pombe* et l'homme.

Un certain nombre d'introns présents dans les génomes mitochondriaux de levures ont la particularité d'être codants. Ces introns peuvent coder pour trois types de protéines : endonucléase, transcriptase réverse, et maturase. La plupart du temps les maturases sont impliquées dans l'excision de leur propre intron codant lors de l'épissage des ARN pré-messagers.

B. Réplication et maintien de l'ADNmt

Contrairement à l'ADN nucléaire qui ne se réplique qu'une seule fois par cycle cellulaire, l'ADNmt se réplique continuellement et ce même dans des cellules qui ne se divisent pas comme les cellules de muscle squelettique ou les cellules neuronales. La réplication et le maintien de l'intégrité de l'ADNmt sont très importants pour les organismes eucaryotes. Le génome mitochondrial codant pour des sous-unités essentielles de la chaîne respiratoire, une perte de ce génome ou une mutation des séquences codantes peuvent entraîner des dommages au niveau de la respiration. Plusieurs mécanismes cellulaires permettent de répliquer et maintenir l'ADNmt en évitant l'accumulation de délétions ponctuelles ou duplications. Ces mécanismes nécessitent différents acteurs qui sont codés par le génome nucléaire et synthétisés dans le cytoplasme avant d'être importés dans la mitochondrie. En effet, le génome mitochondrial n'est plus capable de se répliquer et de se maintenir de manière autonome, et il faut plus de 200 protéines codées par le génome nucléaire pour remplir ces fonctions (Lipinski *et al.*, 2010).

1. Réplication de l'ADNmt

Tout d'abord la réplication requiert une polymérase. Chez l'homme cette polymérase se nomme polymérase γ , consistant en un hétéro trimère composé d'une sous-unité catalytique PolG et d'un dimère de PolG2 capable de lier l'ADN et d'augmenter la processivité de PolG. Elle nécessite également Twinkle, une hélicase 5' \rightarrow 3' permettant de dérouler l'ADNmt double brin, qui participe aussi au maintien de l'ADNmt ainsi qu'au contrôle de son nombre de copies. Ensuite la protéine mtSSB, qui se fixe à l'ADNmt simple brin déroulé par Twinkle pour éviter que les 2 brins d'ADNmt ne se réappariant, permet de stimuler l'activité de Twinkle et de la polymérase γ . Pour finir, une topoisomérase permet de résoudre les concatémères et de couper/réassocier les fragments d'ADNmt.

Certains de ces facteurs ne semblent pas conservés chez les levures. Par exemple aucun homologue clair de Twinkle et de PolG2 n'est retrouvé chez *S. pombe*, laissant à penser que certains détails du mécanisme de la réplication mitochondriale diffèrent de celui existant chez l'homme. Chez *S. pombe* la délétion du gène *pog1*, codant pour l'homologue de PolG, entraîne une déplétion (forte diminution en quantité) de l'ADNmt ainsi que la perte des mitochondries fonctionnelles (Chu *et al.*, 2007).

Chez les levures, l'existence de molécules d'ADNmt de grande taille et sous forme linéaire peut s'expliquer par un mode de réplication par cercle roulant, qui permet d'obtenir des fragments d'ADN linéaires sous forme de concatémères à partir d'une matrice circulaire (Maleszka *et al.*, 1991). Ce type de mécanisme est celui existant chez le bactériophage Φ X174 (Dressler, 1970). Il est unidirectionnel et non conservatif car un seul brin est utilisé comme

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Homme
Taille (pb)	85779	19431	16596
Contenu en GC (%)	18	30	44,4
Origine de réplication	8	?	2
Régions non codantes	≈ 2/3	≈ 1/4	-
Unité de transcription	≥ 11	2	3
5' UTR	Long	Court	Très court/absent*
Nombre d'introns	8 (<i>21S, CYTb, COX1</i>)	3 (<i>cytb, cox1</i>)	-
ARNt	nombre	25	22
	distribution	groupés	dispersés
ARNr	16S, 21S	15S, 21S	12S, 16S
Composant ARN de la Rnase P	9S	<i>rnpB</i>	pas de composante ARN
Gènes codant pour des protéines	8	8	13
Protéine ribosomale	Var1	Rps3	-
Complexe I	-	-	ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6
Complexe III	Cytb	Cytb	CYTb
Complexe IV	Cox1, 2, 3	Cox1, 2, 3	COX1, 2, 3
Complexe V	Atp6, 8, 9	Atp6, 8, 9	ATP6, 8

Tableau 1 : Comparaison des génomes mitochondriaux humains et de levure.

* Certains ARN mitochondriaux humains possèdent des régions 5' UTR (*ND4, ATP6*) et 3'UTR (*ND5, COX1, ND6, ND4L, ATP8*) de plus de 25 pb; la région 3'UTR de *ND6* est d'une longueur indéterminée (Temperley *et al.*, 2010; Tableau 2).

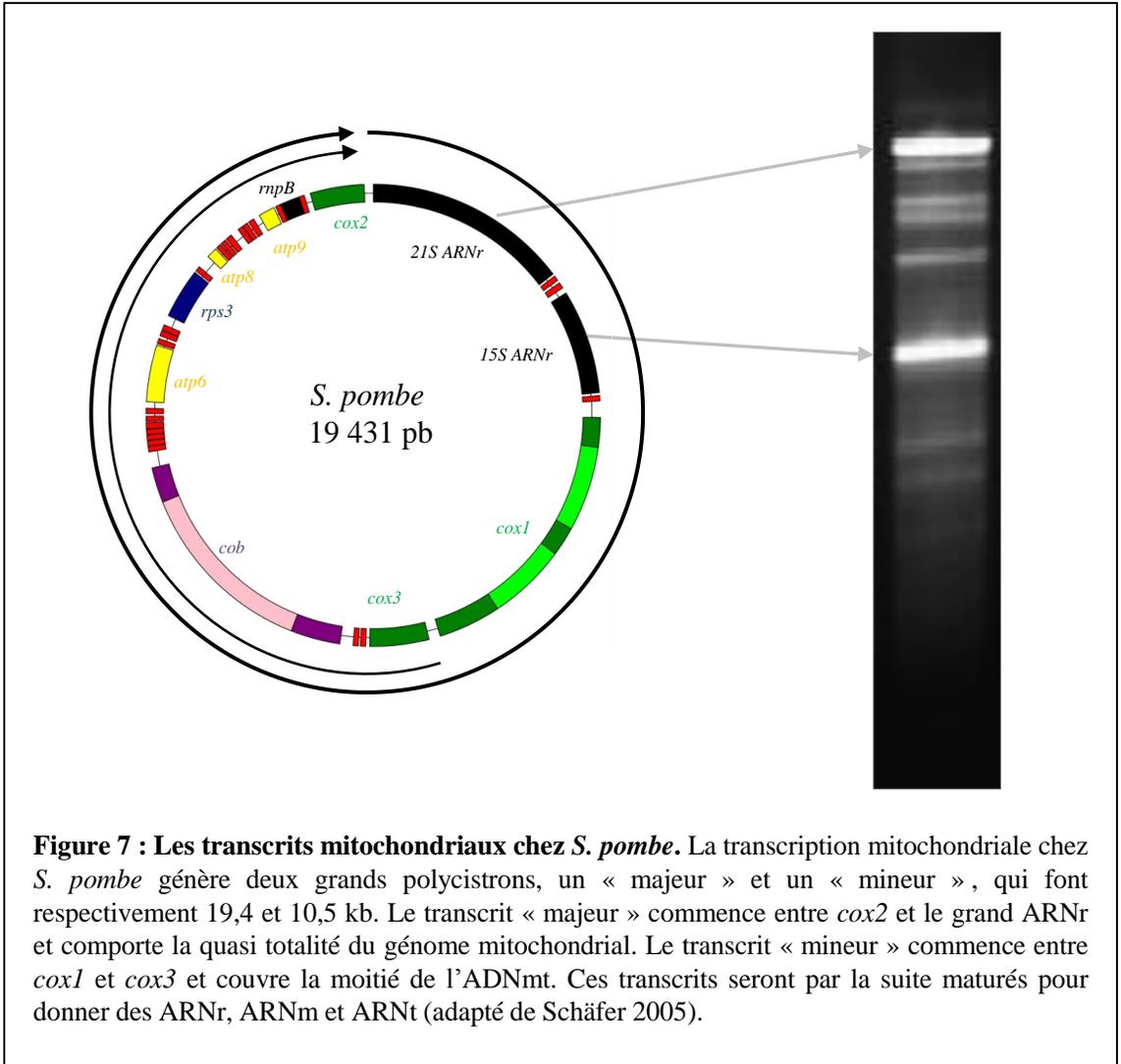
matrice. La première étape de cette réplication en cercle roulant consiste en l'interaction de l'origine de réplication avec les protéines initiatrices. Il en résulte l'apparition d'une boucle d'ADN et/ou la génération d'une structure en épingle à cheveux simple, contenant un site de coupure. Une protéine d'initiation va ainsi couper l'ADN et se lier de manière covalente à l'extrémité 5' phosphate du fragment généré. Les facteurs de réplication vont ensuite être recrutés et synthétiser l'ADN en utilisant comme matrice l'ADNmt circulaire. Ce complexe de réplication va faire plusieurs fois le tour de la matrice, ce qui génère des concatémères qui pourront par la suite être résolus et éventuellement circularisés.

2. Maintien et intégrité de l'ADNmt

La réparation et le maintien de l'intégrité du génome mitochondrial sont indispensables pour éviter l'accumulation de mutations. Toutefois l'ADNmt possède un taux de mutations de 10 à 20 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire (Parsons *et al.*, 1997). Cela est dû à plusieurs facteurs : l'absence de protéines de type histones sur l'ADNmt (Arents & Moudrianakis, 1995), la moindre efficacité du système de réparation, et la proximité entre le génome et des substances très réactives de l'oxygène (ROS) produites par la chaîne respiratoire, pouvant détériorer l'ADNmt (Richter *et al.*, 1988).

De nombreuses études menées notamment chez *S. cerevisiae* ont permis de mettre en évidence un grand nombre de facteurs (environ 170) impliqués dans le maintien de l'ADNmt. Ces facteurs possèdent des fonctions très diverses et peuvent ne pas être directement liés au métabolisme de l'ADNmt. En effet, l'ADNmt est lié à la membrane interne de la mitochondrie dans un complexe mixte d'acides nucléiques et protéines, le nucléoïde. Ce nucléoïde est composé de l'ADNmt lui-même ainsi qu'au moins une trentaine de protéines qui ont des fonctions diverses. On retrouve dans le nucléoïde humain des protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADNmt, la transcription, la recombinaison et la compaction du génome mitochondrial, mais aussi des protéines « Heat Shock », des enzymes (Aco1, Arg5/6...), des composants du cytosquelette et des protéines impliquées dans la dynamique du réseau mitochondrial ou la traduction des ARNm mitochondriaux (Bogenhagen *et al.*, 2008). De ce fait le maintien de l'ADNmt peut être affecté par des facteurs influençant la morphologie et la ségrégation mitochondriale lors de la division cellulaire.

Des défauts du métabolisme basal sont également retrouvés comme modifiant la stabilité de l'ADNmt. Par exemple des défauts dans la biosynthèse de la thymidine sont responsables de l'instabilité du génome mitochondrial chez *S. cerevisiae* et chez l'homme. De manière plus surprenante, la traduction mitochondriale semble également jouer un rôle dans le maintien de l'ADNmt. En effet, il a été mis en évidence, en particulier chez les levures, que des mutations causant des défauts importants de la traduction mitochondriale, telles que des mutations dans des protéines ribosomales, des aa-ARNt synthétases et des facteurs de traduction, provoquent une instabilité du génome mitochondrial. On accumule ainsi des cellules *rho*⁻ (c'est-à-dire portant un ADNmt délété) et *rho*⁰ (ayant complètement perdu l'ADNmt) chez *S. cerevisiae* (pour revue, Contamine & Picard, 2000), ou *rho*^d (c'est-à-dire déplétées en ADNmt) chez *S. pombe* (Chiron *et al.*, 2005). Cependant le lien entre traduction et maintien de l'ADNmt n'est pas compris à ce jour, même si le facteur d'élongation de la traduction mtEF-Tu fait partie des protéines associées



au nucléoïde humain aussi bien en conditions natives qu'après pontage (Bogenghagen *et al.*, 2008).

C. Transcription et maturation des ARN.

Comme pour le métabolisme de l'ADNmt, la plupart des facteurs impliqués dans l'expression de l'ADNmt et son contrôle sont codés par le noyau. La mitochondrie ayant une origine bactérienne, de nombreuses hypothèses sur l'expression du génome mitochondrial s'appuient sur ce qui est déjà connu chez les bactéries, cependant toutes les caractéristiques bactériennes ne sont pas conservées. En particulier, la machinerie de transcription est en général de type phagique T3/T7, sauf chez des Jakobid de la famille des protistes où l'on retrouve une polymérase bactérienne typique, avec 4 sous-unités.

1. La transcription mitochondriale

a. Séquences cis

Les promoteurs mitochondriaux sont en général différents de ceux que l'on retrouve chez les bactéries. Parmi les levures, ils ont été le mieux étudiés chez *S. cerevisiae*, où il s'agit de nonanucléotides de type ATATAAGTA, la transcription débutant au niveau du dernier A de ce motif, appelé nucléotide +1 (Christianson *et al.*, 1982). Un motif légèrement différent de type TTATAAGTA est typiquement retrouvé comme site d'initiation en amont des séquences d'ARNt (Burke *et al.*, 1987). Il a été montré *in vitro* que cette séquence consensus est suffisante à elle seule pour l'initiation de la transcription (Biswas *et al.*, 1985 ; Schinkel *et al.*, 1986) et que sa « force » (Biswas & Getz, 1986) et sa sensibilité à l'ATP (Amiott & Jaehning, 2006) sont affectées par les régions adjacentes, en particulier le nucléotide +2 pour la régulation par l'ATP. Cela permet donc de petites différences (d'un facteur 2 à 3) de régulation transcriptionnelle d'une unité de transcription à l'autre selon les conditions de croissance (Deshpande & Patel, 2012). Ces différences sont médiées par les facteurs *trans* présentés au paragraphe suivant (II-C-1-b) : Rpo41 qui joue un rôle de senseur d'ATP et Mtf1 qui intervient aussi dans la réponse à la concentration d'ATP (Amiott and Jaehning, 2006).

Des séquences promotrices du même type ont pu être mise en évidence aussi bien chez *Kluyveromyces lactis* (Ragnini & Frontali, 1994), *Y. lipolytica* (Kersher *et al.*, 2001) et *S. pombe* (Schäfer *et al.*, 2005). Chez *S. pombe* on retrouve 4 de ces séquences promotrices, un promoteur dit majeur en amont du gène du grand ARNr (ATATATGTA), un promoteur dit mineur devant le gène *cox3* (TTATATGTG), un troisième localisé dans l'intron de *cytb* (ATATATGTG) et un quatrième en amont du gène *rps3* (TTATATGTA). Cependant il semblerait que les deux derniers promoteurs ne soient pas ou très peu utilisés (Schäfer *et al.*, 2005 ; Jiang *et al.*, 2011) (Figure 7). Chez l'homme il existe 3 promoteurs très courts aussi, deux transcrivant le brin lourd (HSP1 et HSP2) et un transcrivant le brin léger (LSP) (voir Figure 6, schéma de l'ADNmt humain). Le promoteur HSP1, transcrivant seulement les ARNr, est 50 à 100 fois plus utilisé que HSP2 dans des cellules Hela en forte croissance (pour revue, Temperley *et al.*, 2010).

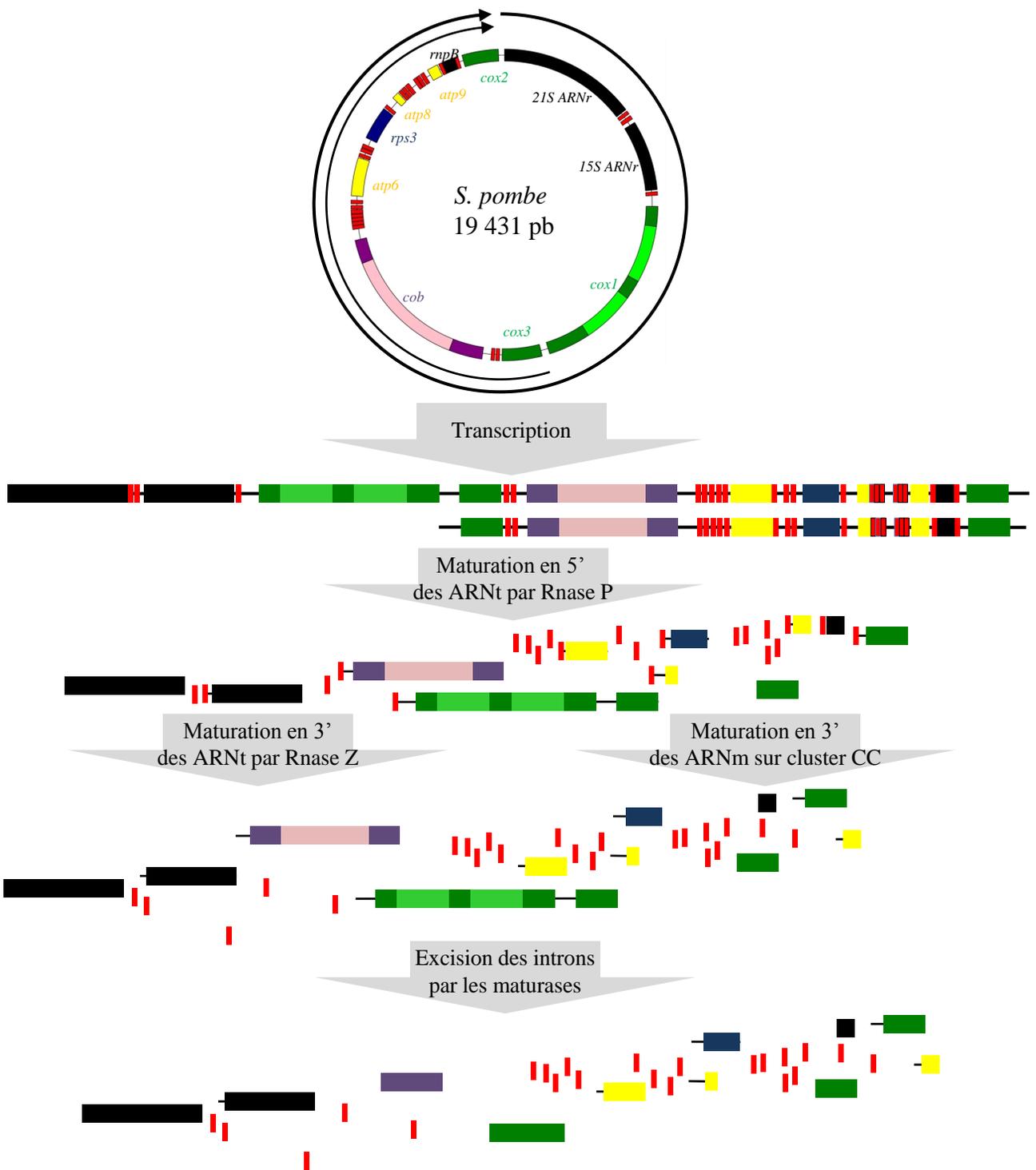


Figure 8 : Synthèse et maturation des ARN mitochondriaux chez *S. pombe*. Après synthèse des 2 transcrits, les ARNt sont excisés par les Rnases P et Z. Le fait que le génome mitochondrial de *S. pombe* soit ponctué permet de libérer les différents transcrits. Les « C-core motifs » en 3' de certains gènes permettent de maturer les dernières extrémités. Les introns sont excisés grâce aux maturases qui sont codées par ces mêmes introns. L'extrémité 3' du petit ARN ribosomal est ainsi maturée grâce à la présence d'un ARNt alors qu'on ne sait pas comment est maturé l'extrémité 3' du grand ARN ribosomal. L'extrémité 5' de *cox3* n'est générée que grâce à la présence du promoteur mineur, le transcrite majeur génère un cotranscrit *cox1-cox3*.

b. Facteurs trans

Les promoteurs mitochondriaux ont pour rôle de recruter en un même point la polymérase et les facteurs associés qui permettent de moduler son activité (Gray & Lang, 1998). La polymérase de type phagique est appelée Rpo41 chez les levures et POLRMT chez l'homme, elle agit de concert avec au moins un facteur dit de spécificité, appelé Mtf1 chez les levures. Les facteurs Rpo41 et Mtf1 de *S. pombe* ont été isolés récemment et ils sont essentiels pour la survie cellulaire (Jiang *et al.*, 2011).

Chez *S. cerevisiae* il a été montré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* que l'association du facteur Mtf1 à la polymérase (Rpo41) est nécessaire à la transcription, ce mécanisme étant semblable à l'activation de la polymérase bactérienne par le facteur σ . Ce complexe de pré-initiation va ensuite se fixer de façon non-spécifique à l'ADNmt avant de le « scanner » jusqu'à rencontrer une séquence promotrice. Après avoir rencontré ce site d'initiation le complexe de pré-initiation va subir un changement de conformation nécessaire au début de la transcription. Le facteur Mtf1 est décroché juste après le début de la synthèse de l'ARN (Shadel & Clayton 1993 ; Mangus *et al.*, 1994 ; Cliften *et al.*, 1997). Le mécanisme d'arrêt de la transcription mitochondriale n'a ensuite pas été clairement mis en évidence.

2. Maturation des transcrits mitochondriaux

La maturation des ARN mitochondriaux polycistroniques se fait au fur et à mesure de leur synthèse (Dieckmann & Staples, 1994) et génère des ARNm mitochondriaux avec des régions transcrites non traduites (UTR) en 5' et 3' (Tableau 2). L'excision des séquences d'ARNt (voir structure de l'ARNt plus loin section III-A-1 et Figure 9) constitue le mode majeur de maturation, grâce aux RNases P et Z, qui sont trouvées sous forme de complexe chez *S. cerevisiae* (Daoud *et al.*, 2011). Chez les levures, la RNase P comporte une protéine codée par le génome nucléaire et un petit ARN codé par le génome mitochondrial alors que chez l'homme et les plantes, elle est constituée de 3 protéines codées par le génome nucléaire sans composante ARN. Cette enzyme permet de cliver le bras en 5' des ARNt. L'activité RNase Z correspond à un seul polypeptide. Chez *S. cerevisiae* c'est le même gène qui code les formes nucléaires et mitochondriales alors que chez *S. pombe*, il existe deux gènes différents (Gan *et al.*, 2011). Cette RNase Z permet de cliver le bras en 3' des ARNt.

Du fait de la structure des génomes mitochondriaux de l'homme et de *S. pombe* la maturation en 5' et en 3' des ARNt par la RNase P et la RNase Z permet de libérer un grand nombre d'ARN messagers même si leurs extrémités 3' peuvent nécessiter une maturation supplémentaire (Figure 8). Pour médier cette maturation 3' additionnelle des ARNm, on retrouve chez les levures un signal de clivage (dodécamère chez *S. cerevisiae* et un « C-core motif » chez *S. pombe*) en 3' de certains gènes. Chez *S. pombe* ce « C-core motif » de 10 bases se trouve entre 0 et 15 nucléotides en aval du codon stop, il comporte 5 cytosines successives, et le clivage se fait 2 nucléotides après ce motif (Schäfer *et al.*, 2005). Il a été proposé qu'une hélicase et une RNase homologues aux facteurs du dégradosome de *S. cerevisiae* soient responsables de ce clivage en 3' chez *S. pombe* (Hoffmann *et al.*, 2008). On retrouve le motif « C-core » après tous les ORFs de l'ADNmt mais pas après les séquences codant pour le grand ARNr et pour

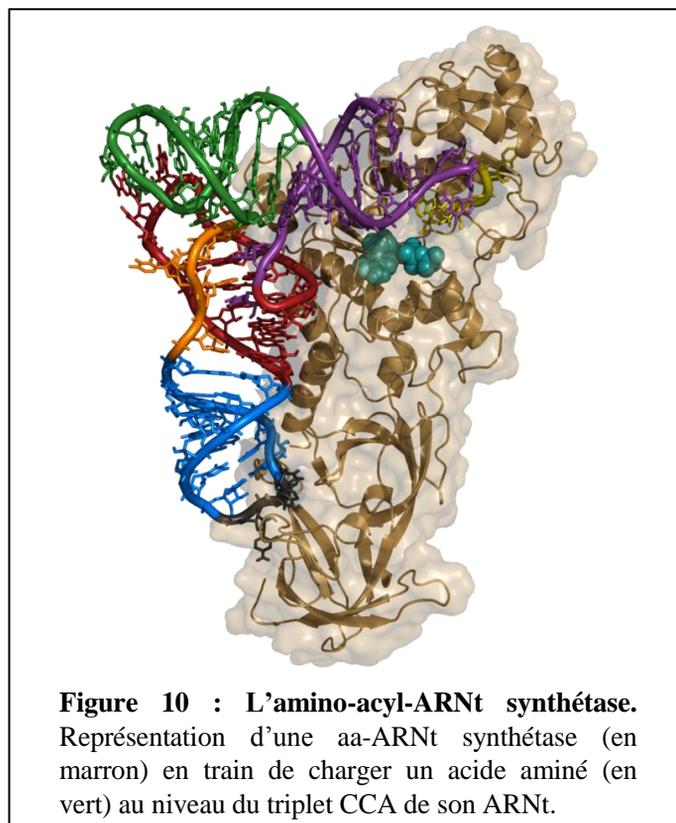
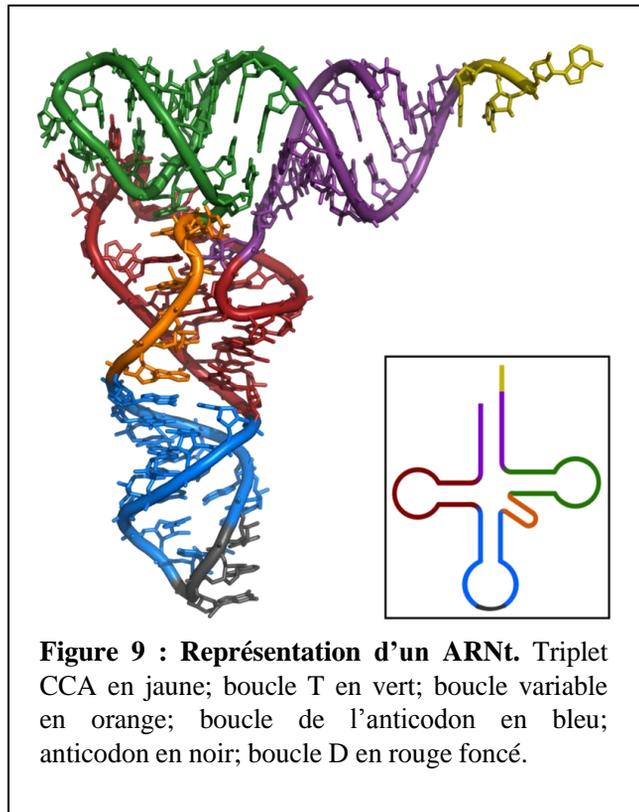
Protéines codées par l'ADNmt		Homme				<i>S. pombe</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
		5' (nt)	ORF (nt)	3' (nt)	Poly (A)	5'UTR (nt)	ORF (nt)	3'UTR (nt)	5'UTR (nt)	ORF (nt)	3'UTR (nt)
I	ND1	2	955	0	45	-	-	-	-	-	-
	ND2	0	1041	0	43	-	-	-	-	-	-
	ND3	0	345	0	44	-	-	-	-	-	-
	ND4	296	1377	0	48	-	-	-	-	-	-
	ND4L	0	296	1371	48	-	-	-	-	-	-
	ND5	0	1811	568	0/8	-	-	-	-	-	-
	ND6	0	524	nd	-	-	-	-	-	-	-
III	CYTb	0	1140	0	40	174	1164	13	954	1158	98
IV	COX1	3	1541	72	37	220	1614	21	461	1605	70
	COX2	0	708	24/15	45	85	747	11	54	756	63
	COX3	0	783	0	43	38	819	25	613	810	101
V	ATP6	161	679	0	45	86	774	13	?	780	90
	ATP8	1	206	634	45	179	147	11	?	147	?
	ATP9	-	-	-	-	81	225	10	?	231	84
R	Rps3 Var1	-	-	-	-	134	684	13	162	1197	580

Tableau 2 : Comparaison des ARNm mitochondriaux de l'homme, *S. cerevisiae* et *S. pombe*.

R: Ribosome. nd = non déterminé

rnpB, la composante ARN de la RNase P. On ne sait donc pas comment se fait la maturation en 3' des de ces deux gènes.

Chez certains organismes, les ARN synthétisés puis maturés sont stabilisés *via* l'ajout d'une queue poly-A (pour revue Gagliardi *et al.*, 2004). Chez l'homme ces queues poly-A mesurent entre 40 et 60 nucléotides pour la plupart des ARNm ; les ARNr peuvent aussi être polyadénylés mais le phénomène est marginal (Slomovic *et al.*, 2005). Pour certains ARNm mitochondriaux humains, cette queue poly-A participe en ajoutant des A à la formation du codon stop UAA qui sera utilisé pour terminer la traduction. Au contraire, il n'existe aucun système de poly-adénylation chez les levures (Tableau 2).



III : La traduction mitochondriale

A. Les acteurs

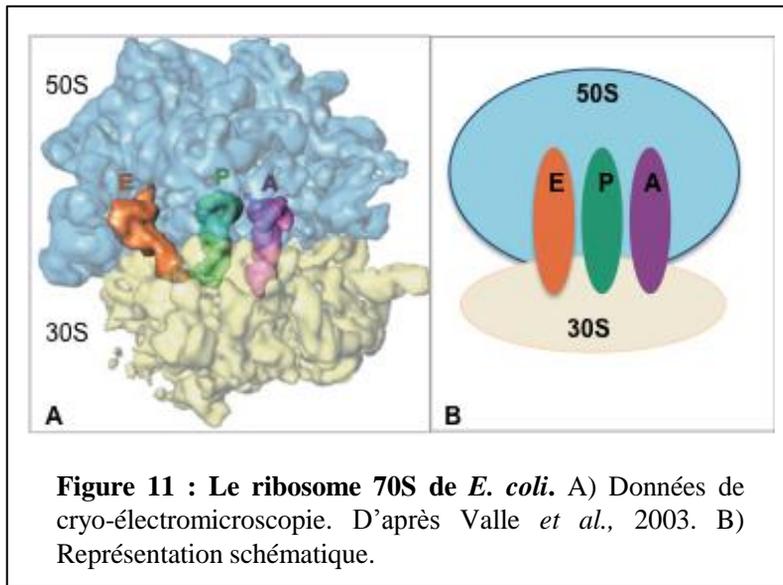
1. Les ARNt

Les ARNt mesurent en moyenne une centaine de nucléotides dont une dizaine sont modifiés après la transcription. Ils possèdent une structure secondaire en forme de trèfle à 3 feuilles, composé de 4 régions d'appariement de bases (tiges) permettant de délimiter 4 régions non appariées : la boucle T, puis la boucle variable, la boucle anticodon et pour finir la boucle D (Figure 9). La boucle anticodon comporte l'anticodon correspondant à la séquence complémentaire des codons présents sur l'ARNm et permettant de fait l'interaction entre l'ARNt et l'ARNm. Le triplet CCA en 3', ajouté lors de la maturation de l'ARNt, joue également un rôle important car c'est sur lui que l'aa-ARNt synthétase fixera un acide aminé. La structure primaire d'un ARNt n'est pas essentielle à sa fonction, sauf la séquence de l'anticodon et les nucléotides qui sont reconnus par l'aa-ARNt synthétase. Cependant la complémentarité des séquences au sein de l'ARNt est très importante car ce sont les appariements qui en résultent qui vont donner la forme tridimensionnelle de l'ARNt qui est essentielle à sa fonction.

Les ARNt utilisés lors de la traduction mitochondriale chez l'homme et chez *S. pombe* sont tous codés par le génome mitochondrial. Chez *S. cerevisiae* un des ARNt^{Lys} n'est pas codé par le génome mitochondrial mais par le génome nucléaire ; il est ensuite importé dans la mitochondrie mais ne semble pas être utilisé (Tarassov & Entelis, 1992). A l'opposé on retrouve les trypanosomes dont aucun ARNt n'est codé par le génome mitochondrial ou *Clamydomonas* dont l'ADNmt comporte 3 gènes d'ARNt. Dans ce cas les ARNt cytoplasmiques sont aussi retrouvés dans la mitochondrie (Salinas *et al.*, 2012).

2. Les aa-ARNt synthétases

Les amino-acyl-ARNt synthétases ou aa-ARNt synthétases reconnaissent spécifiquement un ARNt donné pour y accrocher l'acide aminé correspondant. Le chargement correct de l'ARNt est un élément important dans la fidélité de la traduction. Les ARNt synthétases sont donc essentielles à la traduction mitochondriale et contrairement aux ARNt, elles sont toutes codées par le génome nucléaire ce qui implique qu'elles devront être importées dans la mitochondrie après leur synthèse dans le cytoplasme. Chez *S. cerevisiae*, il existe 17 aa-ARNt synthétases strictement cytoplasmiques, 15 strictement mitochondriales et 7 possédant une double localisation cytoplasme/mitochondrie. On peut les regrouper en deux catégories, les aa-ARNt synthétases de classe I qui fixent l'acide aminé sur le 2' OH du triplet CCA et les aa-ARNt synthétases de classe II qui le fixent sur le 3' OH du triplet CCA (Figure 10). En règle générale un acide aminé est chargé sur son ou ses ARNt par un seul type d'aa-ARNt synthétase. Ce chargement se déroule en 2 étapes. Tout d'abord, l'enzyme va activer l'acide aminé en formant un aminoacyl-adenylate. Cet aminoacyl est ensuite transféré sur l'adénine du triplet CCA en 3' de l'ARNt avec libération d'adénosine mono phosphate (AMP). On forme donc un aa-ARNt.



Origine du ribosome	Sous-unité	Taille des sous-unités	Protéines	ARNr	Taille des ARNr (nucléotides)	
<i>Escherichia coli</i>	Petite	30S	21	16S	1542	
	Grande	50S	33	23S et 5S	3024	
Eucaryote cytoplasmique	Petite	40S	32	18S	1900	
	Grande	60S	50	28S, 5,8S et 5S	4976	
Mitochondrial	<i>S. cerevisiae</i>	Petite	37S	34*	15S	1648
		Grande	50S	44	21S	3294
	<i>S. pombe</i>	Petite	N.D.	33	15S	1422
		Grande	N.D.	43	21S	2822
	Homme	Petite	28S	30	12S	954
		Grande	39S	48	16S	1559

Tableau 3 : Comparaison de la composition des ribosomes bactérien, d'homme et de levures.

Pour plus de détails sur les protéines ribosomales voir aussi résultats Tableaux 13 et 14.

*: 35 avec MrpS2/PPE. Cette protéine a été isolée comme associée à la petite sous-unité ribosomale chez *S. cerevisiae* mais elle a une fonction de déméthylase. Chez l'homme et *S. pombe* l'homologue existe; il n'est pas considéré comme une protéine ribosomale chez l'homme et n'a pas été étudié chez *S. pombe*.

3. Le ribosome

a. Les trois sites ribosomaux

Les ribosomes sont constitués d'une grande et d'une petite sous-unité qui sont toutes deux des complexes ribonucléoprotéiques, chacune composée d'au moins un ARNr codé par l'ADNmt (Introduction section II-A-3) et de protéines ribosomales, presque toutes codées par l'ADN nucléaire. Ils présentent 3 sites fonctionnels situés au niveau de la grande sous-unité du ribosome, jouxtant l'interface entre les deux sous-unités. Ces sites sont nommés site A pour Aminoacyl ou Accepteur, site P pour Peptidyl et E pour Exit (Figure 11). Le site A correspond au site d'entrée des aa-ARNt libres, accompagnés par le facteur d'élongation EF-Tu. Le site P est le site où se trouve le peptidyl-ARNt lors de la traduction, ce peptidyl-ARNt correspondant au peptide en cours de traduction encore attaché au dernier ARNt ayant apporté un acide aminé au niveau du ribosome. Le site E correspond au site de sortie de l'ARNt qui va pouvoir être recyclé après avoir cédé son acide aminé. Ce dernier site semble présenter des différences selon les mitoribosomes, il serait moins bien défini voir même absent chez certaines espèces comme l'homme et *C. elegans* (Sharma *et al.*, 2003 ; Mears *et al.*, 2002).

b. Particularités du ribosome mitochondrial

Le ribosome mitochondrial est proche du ribosome bactérien. Ainsi des antibiotiques comme le chloramphénicol, l'érythromycine ou encore la paromomycine, qui sont capables de bloquer le ribosome bactérien, agissent aussi sur le mitoribosome. Au contraire un antibiotique comme la cycloheximide, qui bloque spécifiquement le ribosome eucaryote, n'affecte pas le mitoribosome. Des résistances aux drogues bloquant spécifiquement le ribosome mitochondrial ont pu être mises en évidence chez des levures. Ces résistances résultent de mutations dans les ARNr. Malgré ces similarités de sensibilité aux drogues, le ribosome bactérien et le mitoribosome diffèrent notamment au niveau de leur composition, le mitoribosome étant plus riche en protéines, et la taille des ARNr mitochondriaux étant plus petite que celle des ARNr bactériens. Ainsi le ratio protéine : ARN serait de l'ordre 2 : 1 chez le mitoribosome alors qu'il est de 1 : 2 chez les bactéries (Sharma *et al.*, 2003). Au cours de l'évolution on constate une diminution de la taille des ARNr compensée par une hausse du nombre de protéines ribosomales comme détaillé dans le Tableau 3.

Le mitoribosome possède des caractéristiques qui lui sont propres comme les nombreux ponts protéines-protéines participant au maintien de l'association des deux sous-unités ribosomales. La composition et la structure du tunnel de sortie du peptide en cours de traduction ne sont pas connues mais ce tunnel semble être sensiblement différent de celui de son homologue bactérien. Par exemple la protéine L29 de la grande sous-unité ribosomale bactérienne, qui fait partie intégrante du tunnel de sortie est absente du mitoribosome (Sharma *et al.*, 2003).

Mitochondrie

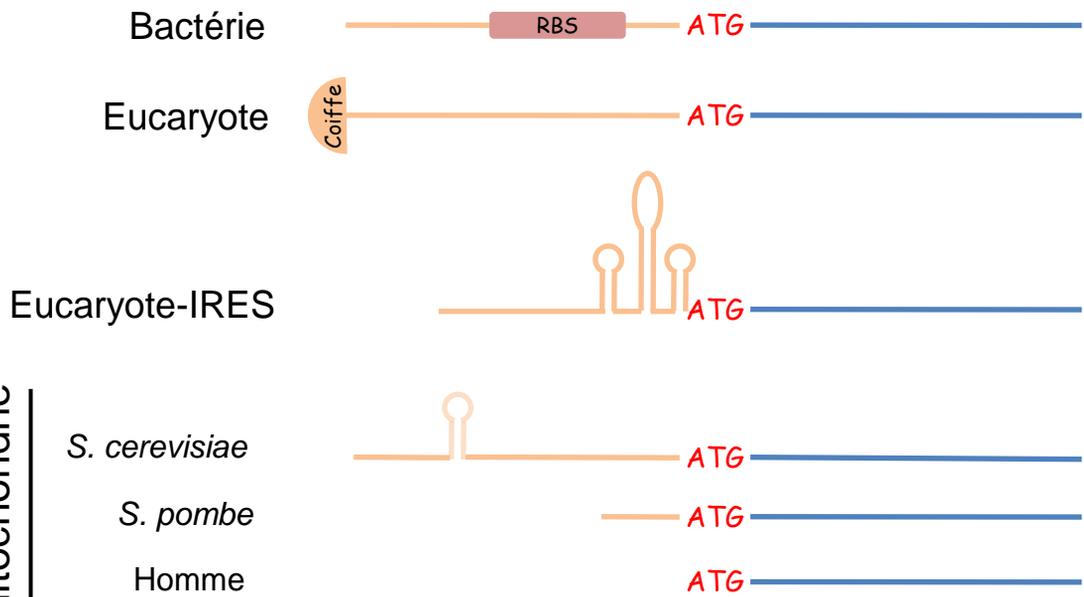


Figure 12 : Représentation schématique des différents 5' UTR selon les organismes.
IRES : Internal Ribosome Entry Site

c. Association des ribosomes à la membrane mitochondriale

Chez *S. cerevisiae* ainsi que chez certains mammifères comme le bœuf, le mitoribosome semble être associé à la membrane interne de la mitochondrie (Liu & Spremulli, 2000 ; Ott & Hermann, 2010). Les protéines codées par le génome mitochondrial étant essentiellement membranaires, leur synthèse à proximité de la membrane interne permettrait de favoriser leur insertion dans les membranes et leur assemblage au sein des complexes respiratoires.

Des liens entre le mitoribosome et des protéines membranaires telles qu'Oxa1, Mba1, Mdm38 (Ott *et al.*, 2006 ; Bauerschmitt *et al.*, 2010) et Cox11 (Khalimonchuk *et al.*, 2005) ont été mis en évidence. Oxa1 intervient dans l'insertion et la translocation des protéines membranaires codées par la mitochondrie. L'extrémité C-terminale d'Oxa1 localisée dans la matrice mitochondriale interagit avec le mitoribosome (Jia *et al.*, 2003 ; Szyrach *et al.*, 2003). Cette interaction joue un rôle particulier pour l'assemblage efficace des sous-unités du complexe IV, suggérant qu'Oxa1 coordonne spatialement le ribosome et les facteurs d'assemblage (Keil *et al.*, 2012). La protéine membranaire Mba1 (Preuss *et al.*, 2001) est capable, comme Oxa1, de lier directement la grande sous-unité du ribosome (Ott *et al.*, 2006). Mba1 pourrait être un récepteur aidant à aligner le tunnel de sortie du peptide au niveau du ribosome et le site d'insertion de la protéine au niveau de la membrane (Bauerschmitt *et al.*, 2010). La protéine Mdm38 aurait une fonction chevauchante avec Mba1, elle est impliquée non seulement dans la liaison du ribosome mitochondrial, mais aussi dans le processus de mitophagie (Bauerschmitt *et al.*, 2010 ; Nowikovsky *et al.*, 2007). Enfin Cox11, qui est un facteur d'insertion du cuivre CuB dans le complexe IV, co-sédimente avec le ribosome mitochondrial et co-immunoprécipite faiblement des sous-unités du ribosome, elle pourrait interagir directement, ou indirectement, avec le ribosome mitochondrial pour favoriser une formation co-translationnelle du site CuB dans la protéine Cox1 (Khalimonchuk *et al.*, 2005). De manière intéressante, *S. pombe* possède deux protéines Cox11 qui présentent toutes deux une extension terminale codant pour la sous-unité ribosomale Rsm22 ; cependant il a été montré que les protéines Cox11 et Rsm22 de *S. pombe* sont séparées par clivage protéolytique après importation, Cox11 ne reste donc pas associée au ribosome de manière covalente (Khalimonchuk *et al.*, 2006).

4. Les séquences UTR

Les séquences UTR « UnTranslated Region » sont des séquences transcrites non traduites des ARNm autres que les introns, car elles encadrent l'ORF correspondant à la séquence codante de la future protéine. Ces UTR sont le siège de nombreuses régulations de la traduction, notamment la région 5' UTR en amont de l'ORF est souvent importante pour l'initiation de la traduction (voir plus loin Introduction Section IV-B). Ces régions UTR varient en fonctions des organismes et des compartiments où se trouvent les ARNm, voire sont absentes dans certains ARNm (Figure 12 et Tableau 2).

a. UTR bactériens

Chez les bactéries, la majorité des ARNm possèdent une séquence de Shine-Dalgarno ou RBS « Ribosome Binding site » localisée dans le 5'UTR, quelques bases avant le premier codon de l'ORF, le codon initiateur. Ce site RBS (AGGAGG), dont la reconnaissance se fait par complémentarité avec une séquence de l'ARNr 16S de la petite unité du ribosome, permet le recrutement du ribosome au niveau de l'ARNm juste en amont de l'ORF qu'il devra traduire. Cependant il arrive que chez les bactéries ce site RBS ne soit pas présent. Dans ce cas le recrutement du ribosome se fait par un mécanisme de type IRES-like (Internal Ribosome Entry Site) (Boni *et al.*, 2001) qui présente des similitudes avec le mécanisme IRES des eucaryotes décrit ci-dessous.

b. UTR eucaryotes

Chez les eucaryotes, on ne retrouve pas de structure RBS, celle-ci est remplacée fonctionnellement par la structure coiffe des ARNm. Cette structure est une 7-Methyl guanosine reliée en 5' à l'extrémité 5' de l'ARNm par un pont triphosphate. Elle va permettre de recruter la petite sous-unité du ribosome, qui va ensuite « scanner » toute la séquence 5'UTR avant de s'arrêter en général au premier AUG rencontré. On parle ici d'initiation coiffe dépendante. Mais le ribosome peut également être recruté sans passer par la coiffe, *via* les IRES, qui sont comme chez les bactéries des régions très structurées des 5' UTR, généralement en tige/boucle. Ces structures situées juste en amont du codon initiateur vont permettre le recrutement du ribosome. Ce système d'initiation se retrouve notamment chez des virus.

c. UTR mitochondriaux

Les séquences 5' UTR des ARNm mitochondriaux sont variables en taille comme vu précédemment (Introduction Section II-C-2 et Tableau 2). Elles sont courtes voire absentes chez l'homme, mis à part quelques exceptions (Temperley *et al.*, 2010), assez courtes chez *S. pombe* (estimées entre 38 et 220 nucléotides) (Schäfer *et al.*, 2005) et longues chez *S. cerevisiae* (de 54 à environ 1000 nucléotides). Dans tous les cas, ces messagers sont dépourvus de structure coiffe ou RBS au niveau de leur région 5' UTR, cependant chez *S. cerevisiae*, une séquence de huit nucléotides UAUAAAUA est présente dans le 5' UTR de tous les ARNm à différentes distances de l'AUG. Il a été proposé mais pas démontré que cette séquence joue le rôle de RBS car une séquence complémentaire est retrouvée dans l'ARNr 15S de la petite sous-unité du mitoribosome (Dunstan *et al.*, 1997).

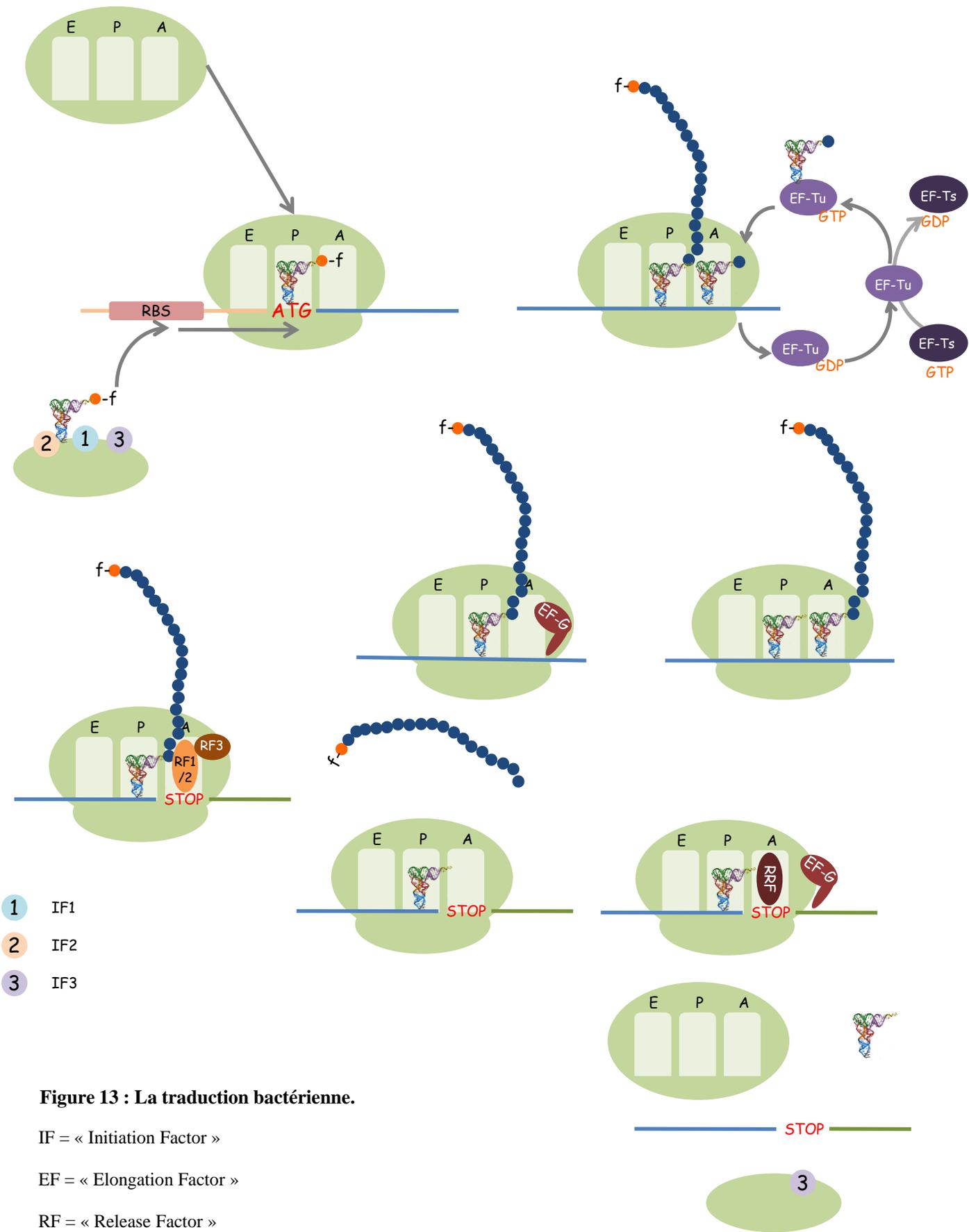


Figure 13 : La traduction bactérienne.

IF = « Initiation Factor »

EF = « Elongation Factor »

RF = « Release Factor »

RRF = « Ribosome Recycling Factor »

B. Les mécanismes

1. La traduction bactérienne

La traduction se déroule selon 3 étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison (Figure 13).

a. Initiation

La petite sous-unité du ribosome recrutée au niveau du RBS de l'ARNm bactérien est associée à trois facteurs, dits IF pour « Initiation Factors ». IF3, qui est un facteur d'anti-association du ribosome, empêche la petite sous-unité de se réassocier trop vite à la grande sous-unité lors de la phase d'initiation. IF3 contrôle aussi l'association de la petite sous-unité et de l'ARNm, en influençant le choix du codon initiateur. C'est un facteur de contrôle de qualité. IF2 est une GTPase qui se fixe au niveau du site P du ribosome pour apporter l'ARNt initiateur (amino-acylé avec une méthionine formylée) au niveau de la petite sous-unité du ribosome. IF1 potentialise l'action d'IF2 et IF3 ; ce facteur permet notamment le recrutement du facteur IF2 et se fixe au site A du ribosome pour en interdire l'accès à l'ARNt initiateur, c'est aussi un facteur de dissociation du ribosome.

b. Elongation

Après la fixation du facteur IF2 chargé, IF3 et IF1 sont relargués, la grande sous-unité du ribosome est recrutée, et IF2 hydrolyse le GTP. Cela va changer sa conformation, permettre sa libération et favoriser l'association du ribosome entier qui va commencer la traduction avec l'arrivée au site A d'un nouvel acide aminé-ARNt apporté par le facteur d'élongation EF-Tu. EF-Tu est aussi une GTPase mais à la différence de IF2 elle a besoin d'un facteur de recyclage du GDP en GTP, EF-Ts. Une fois que des acides aminés-ARNt sont présents au site P et au site A, une liaison peptidique va se créer entre eux sur l'ARNt localisé au site A, c'est l'élongation de la chaîne qui démarre. La translocation du ribosome d'un codon le long de l'ARNm se fait ensuite grâce au facteur EF-G, le site A est libéré et le peptidyl-ARNt se retrouve au site P alors que l'ARNt libre arrive au site E du ribosome, pour sortir et être recyclé. Le site A va pouvoir accueillir un nouvel acide aminé-ARNt et l'élongation va se poursuivre.

c. Terminaison et recyclage

Pour finir, la terminaison de la traduction se fait au niveau d'un codon stop pouvant être UAA, UAG ou UGA. Ces 3 codons ne codent pas pour des acides aminés et donc aucun aa-ARNt ne viendra s'apparier en face de ces codons, cependant il existe 2 facteurs de terminaisons de classe I qui les reconnaissent, RF1 (pour UAA et UAG) et RF2 (UAA et UGA). Il existe un troisième facteur, dit de classe II, RF3, qui stimule l'activité des facteurs RF1 et RF2. Les facteurs de terminaison vont hydrolyser le lien entre le peptide et le dernier ARNt, libérant ainsi le peptide. Pour finir les facteurs d'élongation EF-G et de recyclage RRF vont permettre la dissociation du ribosome et la petite sous-unité va être prise en charge par les facteurs d'initiation, notamment IF3, avant de recommencer une nouvelle synthèse.

Codons	Universel	Mitochondrie		
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Homme
CTT CTC CTA CTG	Leu	Thr	Leu	Leu
ATA	Ile	Met	Met	Met
TGA	Stop	Trp	Trp	Trp
AGA AGG	Arg	Arg	Arg	Non utilisés

Tableau 4 : Variations du code génétique. Le code génétique mitochondrial diffère du code génétique universel. Il n'existe pas d'ARNt codant pour AGA et AGG chez l'homme, dans ce cas le ribosome s'arrête puis revient en arrière d'une base et trouve un codon stop classique (Richter *et al.*, 2010).

2. Particularités de la traduction mitochondriale

a. Origine génétique

La machinerie de traduction mitochondriale possède une origine génétique double, les ARNr et les ARNt en plus des ARNm étant codés par le génome mitochondrial, alors que la plupart des acteurs protéiques sont codés par le génome nucléaire et donc synthétisés dans le cytoplasme avant d'être importés dans la mitochondrie. L'assemblage du ribosome mitochondrial est donc d'autant plus complexe. Mtg1 est une GTPase mitochondriale localisée dans la membrane interne de la mitochondrie, qui semble intervenir dans l'assemblage du mitoribosome (Barrientos *et al.*, 2003). Mtg1 est retrouvée chez les plantes, les animaux et les levures, mais absente chez les bactéries, suggérant que l'assemblage du mitoribosome est plus délicat et requiert des facteurs spécifiques.

b. Code génétique

Le code génétique mitochondrial diffère du code génétique « universel ». Le codon stop TGA devient généralement un codon tryptophane. C'est la seule différence observée avec le code universel chez *S. pombe*, par contre chez l'homme le codon ATA code aussi pour la méthionine et les codons AGA et AGG ne sont pas utilisés, leur présence induit un retour en arrière du ribosome qui trouve alors un codon stop dans la phase n-1 (Temperley *et al.*, 2010). Chez *S. cerevisiae* il existe une différence supplémentaire à TGA et ATA : tous les codons commençant par CT codent pour la thréonine au lieu de la leucine (Tableau 4).

c. Structure des ARNt et effet Wobble

Les ARNt mitochondriaux sont dans l'ensemble très semblables aux ARNt bactériens ou cytoplasmiques, même si des différences notables ont pu être mises en évidence au niveau de la taille de la boucle D ou du bras T, ainsi que de l'anticodon chez des champignons ou chez certains mammifères (Sprinzl *et al.*, 1998). Ces changements de structure secondaire entraînent des modifications de la structure tridimensionnelle (Steinberg *et al.*, 1994 ; 1997). De plus la base située juste après l'anticodon est très souvent modifiée : cette modification améliore l'interaction codon/anticodon et évite que l'ARNt ne glisse et ne crée un décalage de phase de lecture. Enfin, la première base de l'anticodon des ARNt mitochondriaux joue un rôle particulier. Chez *S. cerevisiae*, quand cette position est un U, il est modifié en U^m qui permet la reconnaissance des codons se terminant par une purine (A/G), donc par exemple un anticodon U^mAA peut reconnaître aussi bien UUA que UUG. Chez l'homme cette première base de l'anticodon est un U qui permet la reconnaissance des 4 bases ; donc par exemple un anti-codon UGA peut reconnaître UCU, UCC, UCA et UCG (Barrell *et al.*, 1980). Cette flexibilité au niveau de la troisième base de l'anticodon s'appelle l'effet Wobble, elle permet de n'utiliser que 22 ARNt chez l'homme et 25 chez les levures pour décoder l'ensemble des codons utilisés dans la mitochondrie. La traduction mitochondriale se révèle ainsi être un système extrêmement souple capable de synthétiser des protéines avec un nombre limité d'ARNt.

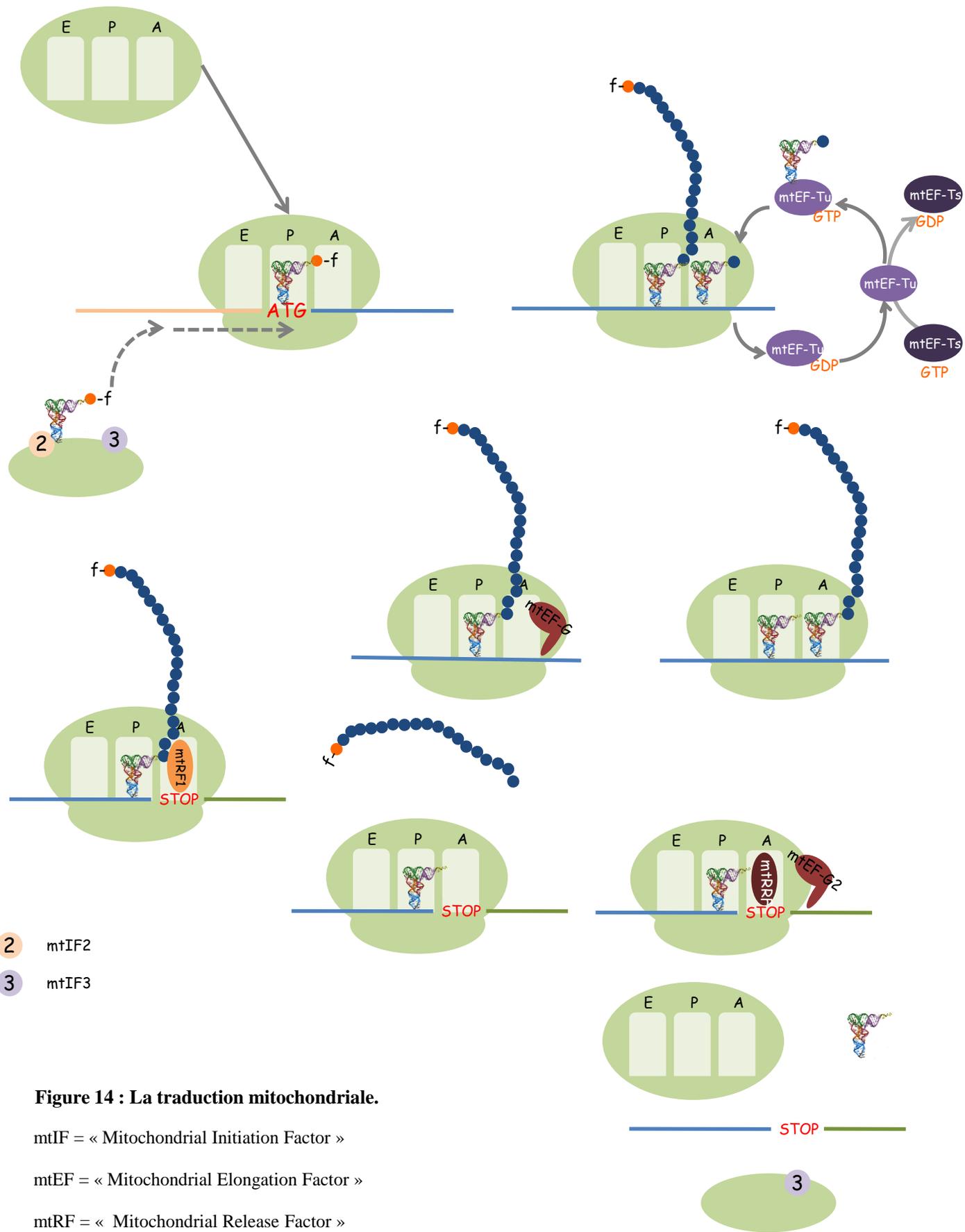


Figure 14 : La traduction mitochondriale.

mtIF = « Mitochondrial Initiation Factor »

mtEF = « Mitochondrial Elongation Factor »

mtRF = « Mitochondrial Release Factor »

mtRRF = « Mitochondrial Ribosome Recycling Factor »

d. Facteurs de traduction

Le mécanisme de la traduction mitochondriale (Figure 14) et l'ensemble des facteurs mitochondriaux (Tableau 5) sont globalement similaires à ceux des bactéries, même si certains facteurs sont absents.

Par exemple, seuls 2 des trois facteurs bactériens d'initiation sont retrouvés, mtIF2 et mtIF3. Cependant chez les vertébrés une insertion de 37 acides aminés dans mtIF2 semble jouer le rôle d'IF1, mtIF2 serait donc bi-fonctionnelle (Gaur *et al.*, 2008). On ne sait pas comment la fonction d'IF1 est assurée chez les levures, d'autres facteurs pourraient jouer ce rôle. Par exemple il a été mis en évidence chez *S. cerevisiae* que les gènes de deux protéines, Aep3 qui contrôle la stabilité du transcrit *ATP6/8*, et Rsm28, une protéine de la petite sous-unité du ribosome, interagissent génétiquement avec les gènes de mtIF2 et de la formyl transférase Fmt1 (Williams *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2009). Aep3 interagit aussi physiquement avec mtIF2 et pourrait jouer un rôle de facteur d'initiation accessoire, compensant l'absence d'un facteur mtIF1 (Lee *et al.*, 2009).

En ce qui concerne l'élongation, la GTPase mtEF-Tu qui apporte les aa-ARNt au site A du ribosome est très conservée, au contraire du facteur de recyclage mtEF-Ts qui est absent chez *S. cerevisiae*, alors qu'il est présent chez l'homme et *S. pombe* (Chiron *et al.*, 2005). L'équivalent de la translocase EF-G qui permet au ribosome d'avancer est retrouvée dans toutes les mitochondries où deux isoformes existent (Hammarlund *et al.*, 2001 ; Ling *et al.*, 1997 ; Xin *et al.*, 1995). Ces deux facteurs nommés mtEFG1 et mtEFG2 ont 35% d'identité (Sprengli *et al.*, 2004 ; Hammarlund *et al.*, 2001). Le facteur mtEFG1 possède bien une activité translocase (Bhargava *et al.*, 2004), mais la délétion de mtEFG2 chez *S. cerevisiae* n'entraîne aucun phénotype contrairement à celle de mtEFG1 (Winzler *et al.*, 1999). Il a été mis en évidence que le facteur d'élongation mtEFG2 intervient dans le recyclage du ribosome (Bhargava *et al.*, 2004 ; Tsuboi *et al.*, 2009). Ainsi le facteur bifonctionnel EF-G de *E. coli* semble remplacé dans les mitochondries par deux facteurs fonctionnant chacun dans une étape différente (pour revue Christian *et al.*, 2009).

Le recyclage du ribosome fait intervenir en plus de mtEFG2 un facteur mtRRF (Tsuboi *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Rorbach *et al.*, 2008). Par ailleurs il n'existe aucun facteur de terminaison de classe II dans la mitochondrie, et un seul facteur de classe I, Mrf1 qui reconnaît les 2 codons stop TAA et TAG (par exemple chez *S. cerevisiae*, Pel *et al.* 1992 ; Towpik *et al.*, 2005 et références incluses). Chez l'homme 2 isoformes de ce facteur de terminaison sont présentes, mtRF1 et mtRF1a mais seul mtRF1a est réellement fonctionnel en tant que facteur reconnaissant les codons stop (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007). La fonction de mtRF1 a été récemment identifiée, il s'agirait d'un facteur de déblocage du ribosome mitochondrial (Huynen *et al.*, 2012).

Etape	<i>E.coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Homme
Initiation	IF1	-	-	Insertion dans mtIF2
	IF2	+	+	+
	IF3	+	+	+
Elongation	EF-Tu	+	+	+
	EF-Ts	-	+	+
	EF-G	mtEFG1	mtEFG1	mtEFG1
Terminaison Recyclage	RF1	+	+	2
	RF2	-	-	-
	RF3	-	-	-
	RRF	+	+	+
	EF-G	mtEFG2	mtEFG2	mtEFG2

Tableau 5 : Conservation des facteurs de traduction généraux bactériens et mitochondriaux. Le facteur mtEF-Ts n'est pas retrouvé chez la levure *S. cerevisiae* (Chiron *et al.*, 2005). Il n'existe pas de facteur d'initiation mtIF1 dans la mitochondrie, mais ce facteur est remplacé chez l'homme par une insertion de 37 acides aminés dans mtIF-2 (Yassin *et al.*, 2011). Il existe deux facteurs de terminaison de classe I dans la mitochondrie humaine mais un seul est fonctionnel, mtRF1a (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007). L'autre, mtRF1, pourrait intervenir dans le recyclage des ribosomes bloqués en cours de traduction (Huynen *et al.*, 2012).

IV : Contrôle post transcriptionnel de l'expression du génome mitochondrial

L'expression des gènes mitochondriaux n'est en général que peu régulée au niveau transcriptionnel. Par exemple chez *S. cerevisiae* la concentration d'ATP module l'efficacité de transcription de chaque promoteur (Amiott & Jaehning, 2006 ; Deshpande & Patel, 2012 ; Introduction section II-C-1). Cependant quantitativement ce type régulation s'avère très limitée, et ne peut jouer un rôle important que pour un ADNmt comportant plusieurs unités de transcription. Chez *S. pombe* et l'homme, qui présentent respectivement 2 et 3 unités transcriptionnelles, la plupart des ARN sont ainsi synthétisés en quantités très similaires, mis à part les ARNr qui appartiennent au même co-transcrit (Introduction paragraphe II-C-1). Pourtant, la stœchiométrie finale des produits mitochondriaux doit être différente, par exemple la sous-unité Atp9 est 10 fois plus abondante qu'Atp6 au sein de la partie F0 de l'ATP synthase. L'expression différentielle des gènes mitochondriaux est donc nécessaire et elle doit plutôt se faire au niveau post-transcriptionnel, notamment en contrôlant la stabilité, l'épissage, l'édition (chez les plantes et trypanosomes par exemple) et la traduction des ARN mitochondriaux. Dans cette partie je m'intéresserai plus particulièrement à trois familles de protéines intervenant dans ces étapes post-transcriptionnelles : les protéines dites à motifs « PPR » qui sont largement impliquées dans le métabolisme des ARN mitochondriaux, les activateurs de la traduction mitochondriale ARN-spécifiques, et les facteurs de déblocage et contrôle de la qualité de la traduction mitochondriale.

A. Rôle des protéines à motif Penta-trico Peptide Repeat (PPR)

1. Organismes contenant des protéines PPR et localisation cellulaire

La première protéine PPR identifiée a été la protéine Pet309 de *S. cerevisiae* (Manthey & McEwen, 1995) sans qu'on réalise alors qu'elle faisait partie d'une grande famille de protéines. Cette famille a été découverte il y a environ une dizaine d'années, lors du séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana*, qui a révélé dans un premier temps plus de 200 protéines présentant des homologies de séquence et étant toutes prédites comme mitochondriales ou chloroplastiques (Lurin *et al.*, 2004). Le nombre de protéines PPR d'*A. thaliana* est au final d'au moins 450. Ces protéines PPR sont particulièrement abondantes chez les organismes photosynthétiques comme les plantes terrestres, 70% étant mitochondriales et 30% chloroplastiques chez *A. thaliana*, mais elles sont aussi présentes chez de très nombreux eucaryotes (Figure 15). Il y a en effet 9 à 10 protéines chez *S. pombe* (voir Résultats Chapitre III), 15 chez *S. cerevisiae* (voir plus loin Tableau 7), 7 chez l'homme (voir plus loin Figure 19). Malgré l'origine bactérienne des mitochondries et des chloroplastes, on ne retrouve pas de protéines PPR chez les bactéries ou chez les archées, mis à part de rares exceptions chez des bactéries pathogènes, ces protéines devant leur présence à de probables transferts horizontaux nécessaires à leurs pathogénicité. Les protéines PPR ont donc probablement émergé après la première endosymbiose donnant naissance aux mitochondries.

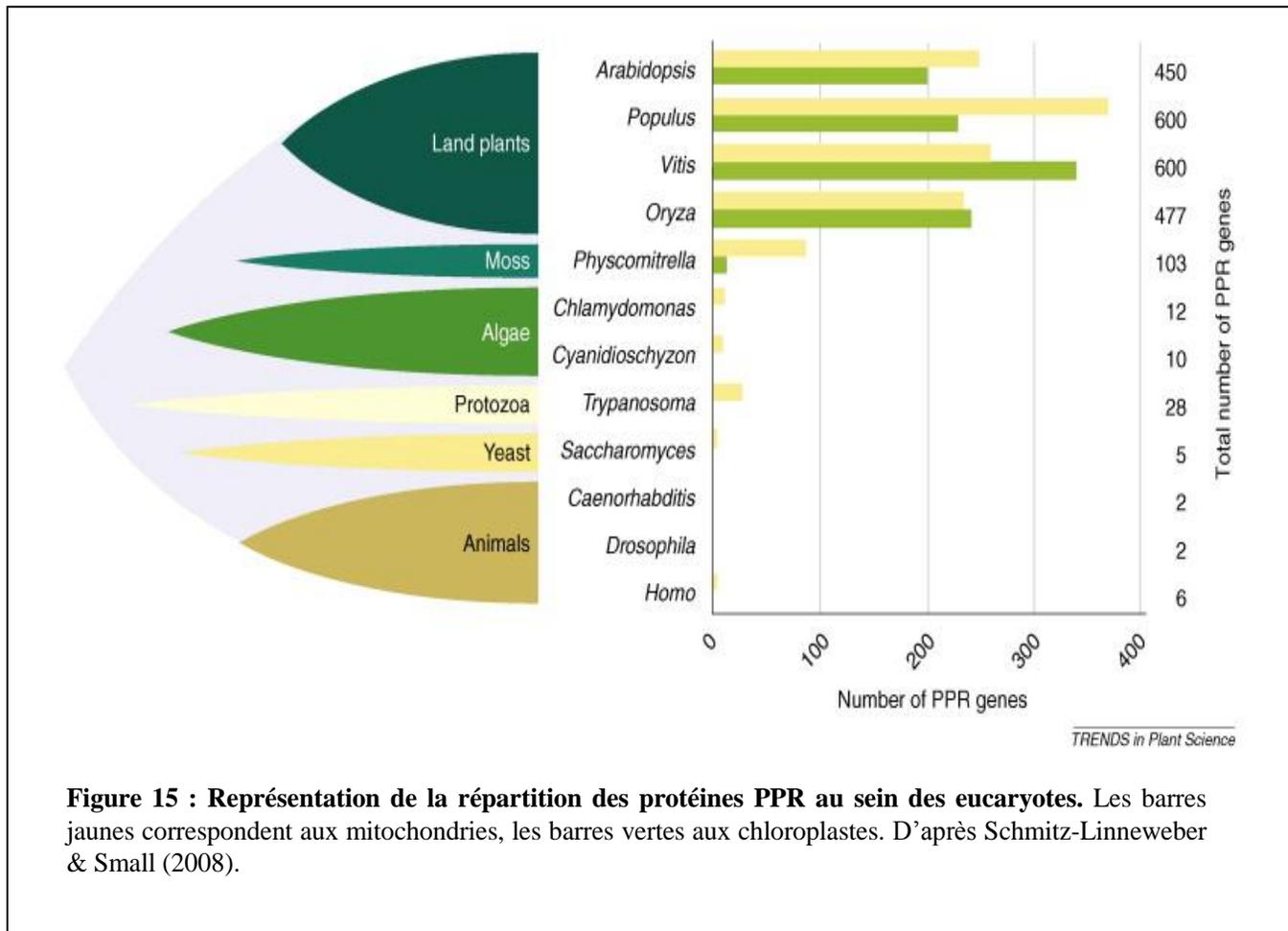


Figure 15 : Représentation de la répartition des protéines PPR au sein des eucaryotes. Les barres jaunes correspondent aux mitochondries, les barres vertes aux chloroplastes. D’après Schmitz-Linneweber & Small (2008).

	TPR	PPR
Répétitions d’hélices dégénérées en tandem	Oui	Oui
Tyrosine facilitant le repliement de l’hélice	Oui	Oui
Taille des répétitions	34	35
Liaison à	Protéines	ARN simple brin
Chaîne latérale dans le sillon	Variable	Hydrophile
Procaryotes	Présent	Absent
Plantes	Plantes inférieures	Prédominant
Animaux	Abondant	Rare

Tableau 6 : Comparaison des propriétés des motifs PPR et TPR.

2. Structure et propriétés des protéines PPR

Ces protéines sont caractérisées par des répétitions d'un motif dégénéré constitué de paires d'hélices α amphiphiles mesurant 35 acides aminés de long, d'où le nom de « PentatrigoPeptide Repeat » (Small & Peeters, 2000 ; Figure 16). La dégénérescence et la répétition des motifs permettent par recombinaison une évolution très rapide de ces protéines, qui peuvent donc s'adapter à des besoins nouveaux de la cellule (Hernandez Mora *et al.*, 2010).

Les motifs PPR ressemblent aux motifs TPR de 34 acides aminés « Tetratrigo-Peptide Repeat » mais ont une spécificité différente, puisqu'ils permettent aux protéines PPR de se lier à des ARNs et non à d'autres protéines comme pour les TPR (Tableau 6). Il a été proposé que les protéines PPR jouent plutôt un rôle de « docking » c'est-à-dire qu'elles se lient aux ARNs sans porter elles-mêmes d'activité catalytique. Leur fonction pourrait donc être de fixer des ARNs et de recruter des protéines catalytiques pour agir sur ces ARNs cibles. Elles pourraient aussi jouer par simple liaison passive un rôle protecteur des ARNs en empêchant leur dégradation ou en faisant fondre des structures secondaires pour libérer des séquences qui deviennent accessibles à d'autres facteurs, par exemple d'initiation de la traduction.

Même si la classe de protéines PPR la plus abondante et la plus universelle est composée uniquement de motifs de 35 acides aminés (elles sont dites P pour « Pure »), il existe 3 autres sous populations de protéines PPR retrouvées uniquement chez les plantes et les protistes (Figure 17 ; Schmitz-Linneweber & Small, 2008 ; Rüdinger *et al.*, 2011, 2012). Les protéines du sous-type PLS sont composées d'un mélange de motifs de type P, L (« Long », motifs de plus de 35 acides aminés), et S (« Short », motifs de moins de 35 acides aminés). Ces protéines PLS peuvent présenter en C-terminal un domaine additionnel de type E (pour « Extended », protéines PLS-E), ou un domaine E et un domaine DYW (pour aspartate-tyrosine-tryptophane, protéines PLS-E-DYW). La fonction de ces motifs additionnels n'est pas totalement comprise, mais le fait qu'on les retrouve dans les protéines PPR de plantes et protistes (Rüdinger *et al.*, 2011, 2012) suggèrent qu'elles participent à une ou des fonctions qu'on retrouve préférentiellement dans les organelles de ces organismes. L'hypothèse actuellement admise est que ces protéines PPR plus complexes interviennent dans le phénomène d'édition des ARN, qui consiste en des changements très spécifiques de bases après transcription. Le motif DYW pourrait jouer un rôle de désaminase lors de ce processus (voir ci-dessous Section 3-a).

3. Exemples de fonctions des protéines PPR

Grâce à leur capacité de liaison aux ARNs des organelles, les protéines PPR jouent des rôles variés dans l'expression des gènes mitochondriaux et chloroplastiques. Comme vu plus haut, elles sont particulièrement abondantes chez les plantes dont le métabolisme des ARN est très riche dans les organelles, et chez qui le plus grand nombre de données mécanistiques et fonctionnelles ont été rassemblées. Je vais donc d'abord m'intéresser aux données connues chez les plantes avant de présenter les protéines PPR de *S. cerevisiae* et de l'homme.

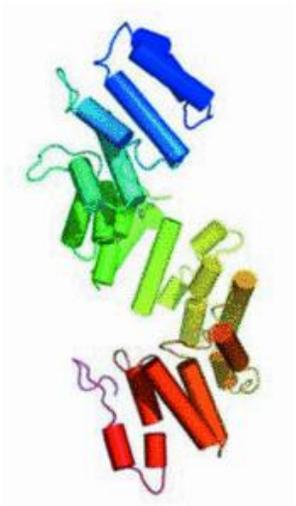


Figure 16 : Modèle de structure de la protéine PPR de plante At1g05750. Cette protéine présente 10 motifs. D'après Delanoy *et al.* (2007).

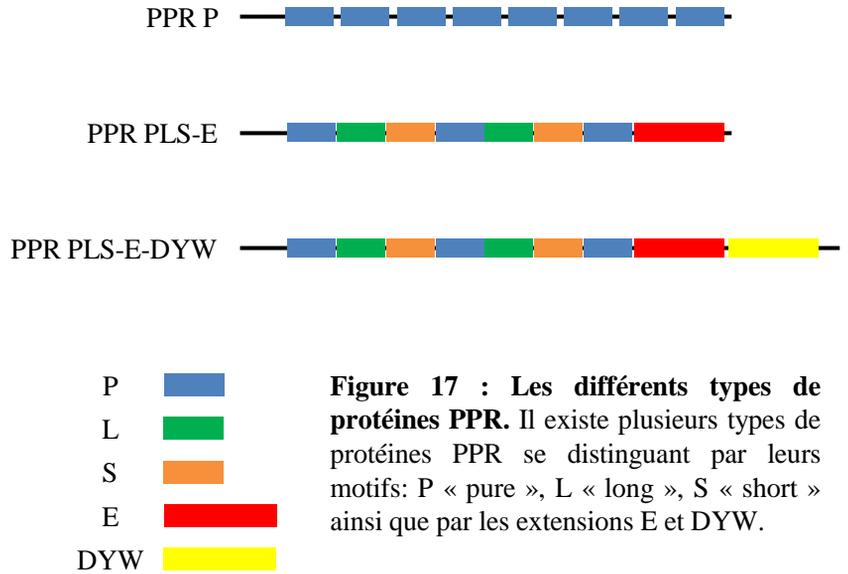


Figure 17 : Les différents types de protéines PPR. Il existe plusieurs types de protéines PPR se distinguant par leurs motifs: P « pure », L « long », S « short » ainsi que par les extensions E et DYW.

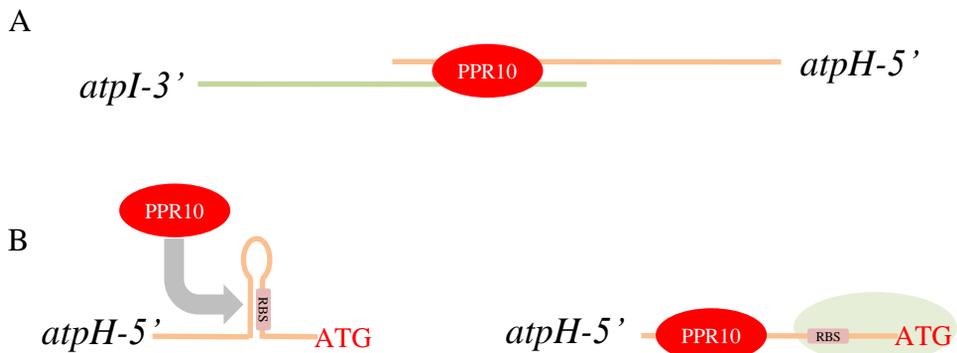


Figure 18 : La protéine PPR10 d'*A. thaliana*. *atpH* et *atpI* codent respectivement les sous-unité c et a de l'ATP synthase chloroplastique. A) PPR10 stabilise les extrémités 5' d'*atpH* et 3' d'*atpI*, en s'y fixant elle empêche l'action des exonucléases. B) Elle permet également de libérer le le site de fixation du ribosome (RBS) d'*atpH* et ainsi d'activer sa traduction.

a. Protéines PPR de plantes

Une des protéines PPR de plante les mieux connues est PPR10, localisée dans le chloroplaste chez le maïs. Cette protéine est capable de se fixer au niveau du 5'UTR de l'ARNm *atpH* et du 3'UTR de l'ARNm *atpI*. Cette interaction physique joue un rôle protecteur qui va empêcher les ribonucléases de dégrader ces ARNm (Prikryl *et al.*, 2010). En même temps, PPR10 joue également un rôle de régulateur de la traduction de l'ARNm *atpH* : en interagissant avec le 5'UTR de cet ARN, elle fait fondre une structure secondaire qui séquestre le site de fixation du ribosome. Ce site de fixation étant libéré, l'ARNm va pouvoir être traduit (Prikryl *et al.*, 2010 ; Figure 18).

Les séquences ARN liées par PPR10 sont bien connues et se ressemblent fortement. En se basant sur ces séquences et celles des 19 motifs PPR de PPR10, une analyse informatique très récente (Barkan *et al.*, 2012) a mis en évidence une corrélation entre les acides aminés 1 et 6 des motifs PPR et les nucléotides reconnus sur l'ARN. Après extrapolation avec d'autres protéines et test expérimental de cette hypothèse, un modèle a été proposé, où la nature de chaque nucléotide reconnu par la protéine dépend du résidu 6 d'un motif PPR et du résidu 1 du motif PPR immédiatement adjacent. Le code de reconnaissance des protéines PPR fait donc intervenir deux motifs adjacents. Il reste à généraliser ce code pour un plus grand nombre de protéines PPR et à déterminer dans quelle mesure il peut s'appliquer aux protéines PPR d'autres organismes non photosynthétiques. Cependant ces résultats vont probablement permettre d'élucider un grand nombre de nouvelles cibles et donc de fonctions des protéines PPR.

Une fonction de grande ampleur des protéines PPR chez les plantes est le phénomène d'édition des ARN, réalisé par les protéines PPR possédant des domaines additionnels (Fuji & Small, 2011 ; Castandet & Araya, 2011). Le site participant à la reconnaissance sur l'ARNm consiste en une séquence d'environ 15 nucléotides directement en amont du site à éditer (Hirose & Sugiura, 2001; Miyamoto *et al.*, 2002, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008). Cependant le mécanisme de reconnaissance n'est pas complètement clair. Ainsi 2 sites d'édition reconnus par une même protéine PPR ne présentent pas forcément de séquences de reconnaissance très conservées (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008; Okuda *et al.*, 2009). A l'opposé, les ARN *rpoB* et *ndhB*, possèdent une séquence de reconnaissance très proche mais sont édités par des facteurs différents (respectivement YS1 et CCR22) (Hammani *et al.*, 2009). Les nouvelles informations sur le code de reconnaissance des protéines PPR (Barkan *et al.*, 2012) vont certainement permettre de revisiter ces résultats.

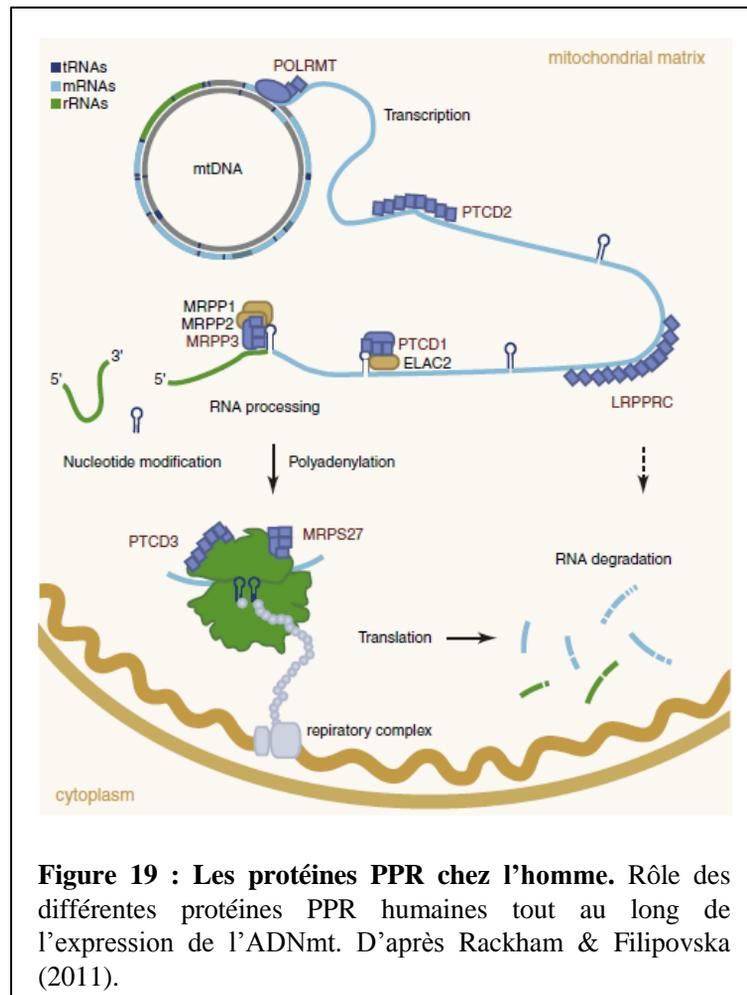
b. Protéines PPR humaines

Chez l'homme 7 protéines PPR ont été mises en évidence, et elles interviennent toutes dans la biogenèse mitochondriale à différentes étapes (Figure 19 ; Rackham & Filipovska, 2011). La plus connue et peut-être la plus complexe, LRPPRC, est impliquée dans une maladie mitochondriale et sera traitée dans la section suivante (V-1).

Les autres protéines PPR humaines incluent comme chez les levures l'ARN polymérase mitochondriale ou POLMRT, qui possède deux motifs PPR. C'est en fait la seule protéine PPR qui a pu être cristallisée à ce jour (Ringel *et al.*, 2011). Cependant la fonction de ses deux motifs

Nom	Taille	Nombre de motifs	Rôle	Cible majeure	Autres cibles
Aep1	518	2	Stabilisation	<i>ATP9</i>	
Aep2	580	4	Traduction	<i>ATP9</i>	
Aep3	606	5	Stabilisation	<i>ATP6/8</i>	
Atp22	684	2	Traduction	<i>ATP6</i>	<i>ATP8</i>
Cbp1	654	3	Maturation Stabilisation Traduction	<i>CYTb</i>	
Dmr1	864	4	Stabilisation	ARNr 15S	
Msc6	677	5	?	?	
Pet111	800	5	Traduction	<i>COX2</i>	
Pet309	965	13	Stabilisation Traduction	Pré- <i>COX1</i> <i>COX1</i>	
Rmd9	646	7	Distribution	<i>COX2</i>	Tous les ARNm, 15S
Rna14	692	2	Maturation, polyA	ARNs nucléaires	ARNmt???
Rpm2	1202	4	Maturation	ARNt	
Rpo41			Transcription	Tous les ARNm	
Sov1	898	3	Traduction	<i>VAR1</i>	
Yer077c	688	2	?	?	

Tableau 7 : Protéines PPR de la levure *S. cerevisiae*.

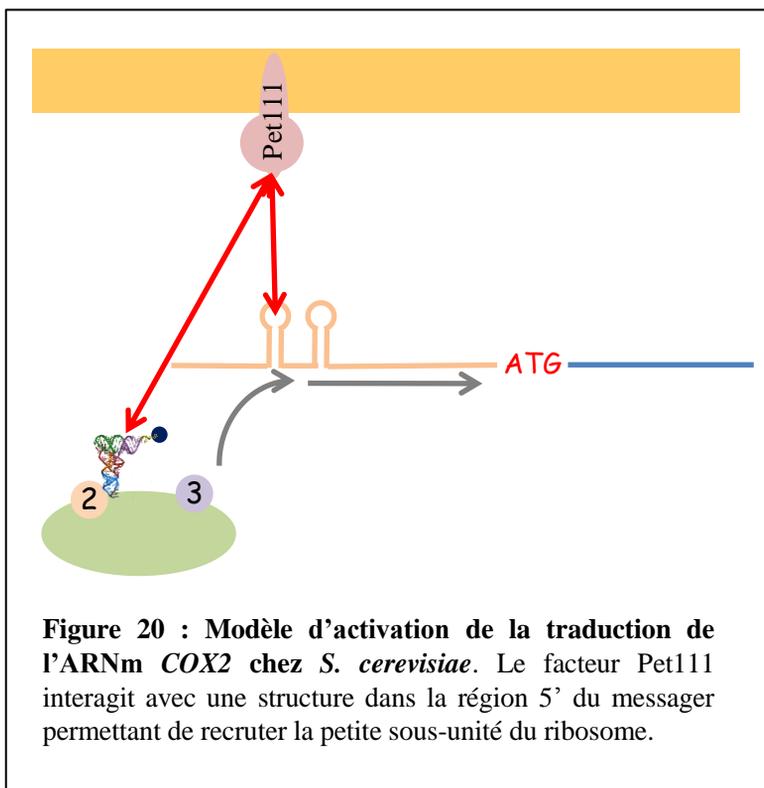


PPR n'est pas comprise. Ils pourraient être impliqués dans la stabilisation du néo-transcrit, en servant de rails permettant une bonne évacuation des ARNs en cours de synthèse afin de poursuivre la transcription sans encombrement stérique. MRPP3, une sous-unité de la RNase P humaine (voir Introduction Section II-C-2), est aussi une protéine PPR, comportant 3 motifs. Une déplétion de MRPP3 conduit à une accumulation de transcrits précurseurs accompagnée d'une baisse de la quantité d'ARNm et d'ARNt matures (Sanchez *et al.*, 2011).

Trois autres protéines PPR humaines, PTCD1, 2 et 3 ont chacune des cibles spécifiques, au contraire de POLMRT et MRPP3. PTCD1, qui comporte 8 motifs PPR, contrôle la quantité d'ARNt^{Leu} présent dans la mitochondrie (Rackam *et al.*, 2009 ; Sanchez *et al.*, 2011). Ainsi une perte de la protéine PTCD1, conduit à une augmentation de la quantité d'ARNt^{Leu}, alors que si on surexprime PTCD1, on observe une diminution de la quantité d'ARNt^{Leu}, qui devient limitant et le taux de traduction mitochondriale diminue. PTCD1 est donc, *via* des cibles spécifiques (les deux séquences d'ARNt^{Leu}) un répresseur général de la traduction. PTCD2 contient 5 motifs PPR et intervient dans la maturation de la région située entre *ND5* et *CYTb*. En effet aucun ARNt n'est présent en amont de l'ORF *CYTb*, il faut donc maturer cette extrémité 5' par un autre moyen que l'excision des ARNt. Une perte de l'homologue chez la souris engendre une accumulation de précurseurs *ND5-CYTb* accompagnée d'une baisse de la quantité des transcrits *ND5* et *CYTb* matures (Xu *et al.*, 2008). PTCD3 interagit avec l'ARNr *12S* et la petite sous-unité du ribosome et sa déplétion diminue la traduction mitochondriale, il pourrait contrôler la stabilité de l'ARNr *12S* (Davies *et al.*, 2009). Enfin MRPS27 est une protéine de la petite sous-unité du ribosome mitochondrial, qui s'associe avec l'ARNr *12S* et l'ARNt^{Glu} (Davies *et al.*, 2012), et qui est nécessaire pour la traduction mitochondriale.

c. Protéines PPR de *S. cerevisiae*

Chez la levure *S. cerevisiae*, 15 protéines PPR ont été détectées, en utilisant un algorithme adapté à la détection de ces motifs chez les levures (Lipinski *et al.*, 2011). Les fonctions et cibles de ces protéines, quand elles sont connues, sont résumées dans le Tableau 7. On retrouve majoritairement des équivalents fonctionnels confirmés ou probables de certaines protéines PPR humaines, comme Rpo41 (POLMRT), Rpm2 (MRPP3) et Dmr1 (PTCD3), ainsi que des protéines impliquées dans la stabilisation ou la traduction d'ARNm mitochondriaux donnés. Ces activateurs traductionnels spécifiques incluent Aep2, Atp22, Pet111, Pet309 et peut-être Sov1, qui sont spécifiques respectivement d'Atp9, Atp6, Cox2, Cox1 et Var1. Ces activateurs traductionnels, connus au début de ma thèse uniquement dans la levure *S. cerevisiae* et les levures proches, agissent généralement au niveau des séquences 5'-UTR des ARNm. Quelques exemples d'activateurs de ce type, qu'ils soient des protéines PPR ou non, sont présentés dans la section suivante.



ARN cible	<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. pombe</i>	Homme	
	Facteurs	Séquences cibles:			
		5'UTR			autre
<i>VAR1</i>	<i>Sov1</i>	?	?	-	-
<i>CYTb</i>	<i>Cbs1</i>	+	-	-	-
	<i>Cbs2</i>	+	-	-	-
	<i>Cbp6</i>	+	protéine	<i>Cbp6</i>	?
	<i>Cbp3</i>	+	protéine	<i>Cbp3</i>	?
<i>COX1</i>	<i>Pet309</i>	+	?	<i>Ppr4</i> *	LRPPRC
	<i>Mss51</i>	+	protéine	<i>Mss51</i>	ZMYND17
<i>COX2</i>	<i>Pet111</i>	+	-	-	-
<i>COX3</i>	<i>Pet54</i>	+	-	-	-
	<i>Pet122</i>	+	-	-	-
	<i>Pet494</i>	+	-	-	-
<i>ATP6/8</i>	<i>Atp22</i>	+	?	-	-
<i>ATP9</i>	<i>Aep1/Nca1</i>	?	?	-	-
	<i>Aep2/Atp13</i>	+	-	<i>Ppr6</i> *	

Tableau 8 : Conservation des facteurs de traduction spécifiques. D'après Kühl *et al.* (2012). Les facteurs en bleu sont des protéines PPR, voir tableau 7. * Voir aussi chapitre III des résultats.

B. Les facteurs de traduction spécifiques d'un ARNm chez *S. cerevisiae*

Chez la levure *S. cerevisiae*, le contrôle traductionnel est assuré par des activateurs spécifiques d'un ARNm mitochondrial. Ces facteurs possèdent en général plusieurs voire l'ensemble des propriétés suivantes : (i) leur absence aboutit à un défaut de synthèse de la protéine sans affecter l'accumulation de l'ARNm qui la code, (ii) ils ont pour cible les séquences 5'-UTR de l'ARNm mitochondrial qu'ils contrôlent, (iii) ils interagissent souvent avec le ribosome, probablement pour activer la traduction, (iv) ils sont également capables de se lier aux membranes mitochondriales, où les protéines codées par l'ADNmt doivent être insérées, (v) leur quantité est limitante dans la cellule, donc toute régulation de leur expression va affecter en plus ou en moins la traduction de leur ARN cible, et (vi) ils peuvent dans certains cas interagir avec le peptide naissant pour faciliter son assemblage (pour revue Herrmann *et al.*, 2012).

Tous les ARNm mitochondriaux de *S. cerevisiae* ont un ou plusieurs activateurs de traduction (Tableau 8), mis à part peut-être Sov1 (Thèse de Marie Sanchirico, 1998), dont le rôle n'est pas clair entre facteur de stabilité ou de traduction de l'ARN *VARI*. Je présenterai ci-dessous trois classes de facteurs : (i) ceux agissant exclusivement sur le 5'UTR de leur ARN cible, comme Pet111 ; (ii) ceux agissant sur le 5' UTR, mais ayant aussi une fonction additionnelle sur l'ARN ; (iii) ceux ayant pour cible non seulement des régions UTR de l'ARN mais aussi la protéine naissante.

1. Facteurs de traduction « classiques »

Pet111 est l'exemple le mieux connu parmi cette classe de facteurs. Il est conservé seulement chez *S. cerevisiae* et les levures proches comme *Saccharomyces kluyveri* et *K. lactis* (Costanzo *et al.*, 2000). Pour activer la traduction de *COX2*, il se fixe directement sur les 54 bases de la région 5'UTR de l'ARNm de *COX2*, au niveau d'une structure tige/boucle mise en évidence par une analyse de nombreux mutants construits par transformation mitochondriale (Dunstan *et al.*, 1997). Cette structure est conservée dans les levures proches (Hardy & Clark-Walker, 1990). Chez *S. cerevisiae* si on transfère cette séquence UTR sur un autre transcrit comme *COX3*, on rend *COX3* dépendant de Pet111 pour sa traduction. Inversement si une autre région UTR que celle de *COX2* est greffée en amont de l'ORF *COX2*, la traduction de cette ARN chimère devient indépendante de Pet111 (Mulero & Fox, 1992). La partie 5'UTR est donc nécessaire et suffisante pour la régulation.

Pet111 est une protéine appartenant à la membrane interne de la mitochondrie faisant face à la matrice mitochondriale (Green-Willms *et al.*, 2001) et elle interagit avec les activateurs traductionnels de *COX1* et *COX3* (Naithani *et al.*, 2003) (Figure 20). Les activateurs pourraient ainsi organiser spatialement la synthèse des différentes sous-unités mitochondriales de la cytochrome oxidase ou complexe IV, de manière à optimiser leur assemblage. Cette synthèse coordonnée assure un équilibre très subtil. En effet, une surexpression de Pet111 est délétère pour la respiration. Le taux de traduction de l'ARN *COX2* est accru, mais la protéine Cox2 synthétisée est instable, ainsi que la protéine avec laquelle elle s'assemble, Cox1. Au final l'assemblage du complexe IV est diminué (Fiori *et al.*, 2005). Il est possible qu'en présence d'une surdose de Pet111, un grand nombre de ribosomes soient recrutés pour traduire l'ARN

COX2 au détriment d'autres ARN ; la synthèse des protéines mitochondriales serait alors déséquilibrée quantitativement et spatialement, rendant l'assemblage des complexes défectueux. De nombreuses protéines non assemblées seraient alors dégradées.

D'autres activateurs fonctionnant de manière similaire à Pet111, mais dans la traduction d'un autre ARNm, sont trouvés pour *CYTb* (Cbs1, Cbs2) et *COX3* (Pet54, Pet123, Pet494) (Tableau 8). Ils agissent sous forme de complexe dont chaque élément est essentiel au fonctionnement de l'ensemble.

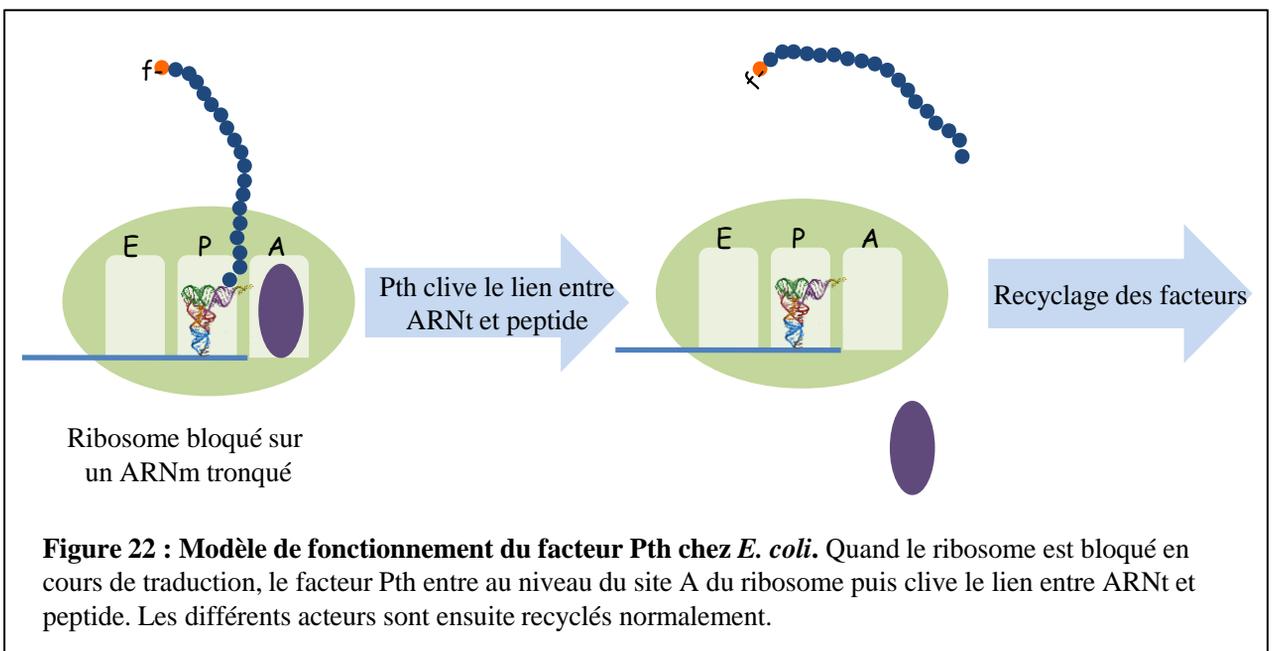
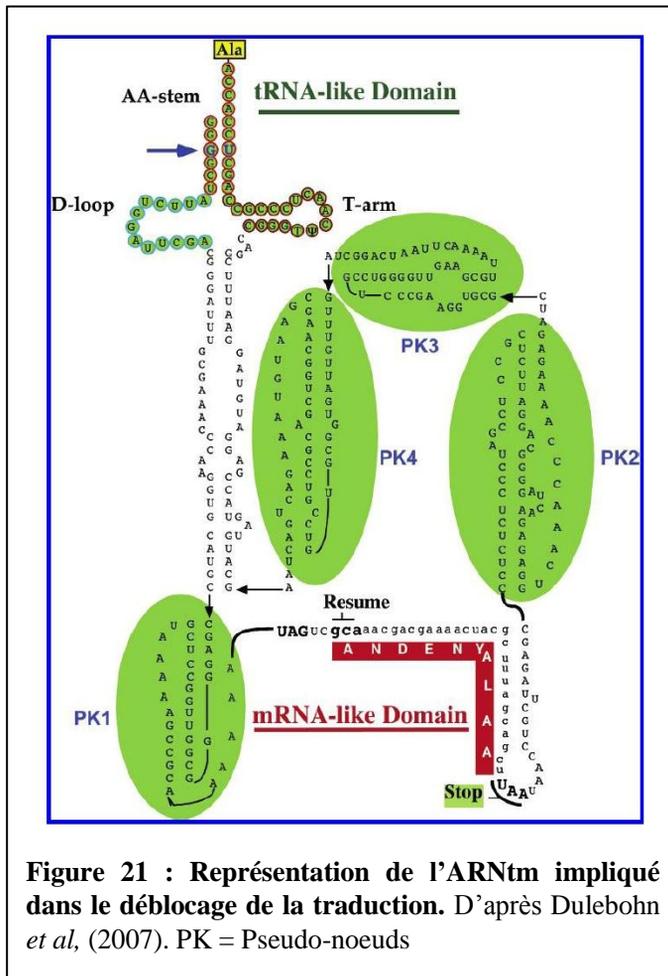
2. Facteurs de traduction ayant aussi un rôle dans le métabolisme des ARN

Ces facteurs sont au moins au nombre de deux, Pet54 et Pet309. Pet54 est un facteur de traduction de *COX3* se fixant au 5'UTR mais il intervient aussi dans l'épissage de l'intron de groupe I *ai5beta*. Les deux séquences cibles ayant des similarités, le même domaine de liaison aux ARNs serait impliqué dans les deux activités, l'activité d'épissage ayant vraisemblablement été acquise au cours de l'évolution (Kaspar *et al.*, 2008). D'autre part, Pet309 est un facteur de traduction spécifique de l'ARNm *COX1* par fixation au 5'UTR, mais il stabilise aussi certains longs ARNs *COX1* précurseurs (Manthey & McEwen, 1995). Pet309 est une protéine PPR, comme cité plus haut : des délétions des différents motifs PPR ont montré qu'ils sont tous importants pour la traduction de *COX1* mais pas pour la stabilité des ARN *COX1* précurseurs (Tavares-Carreón *et al.*, 2008).

3. Facteurs de traduction interagissant avec la protéine naissante

L'exemple le plus connu de cette classe de facteurs est Mss51, le deuxième activateur traductionnel de *COX1*, cependant Cbp6/Cbp3 et Atp22 jouent aussi des rôles similaires respectivement pour les ARN *CYTb* et *ATP6* (Tableau 8). Mss51 est associée à la membrane interne de la mitochondrie. Elle possède une double cible en interagissant avec les parties UTR de l'ARNm *COX1*, probablement la région 5'UTR, pour activer la traduction, et en se liant à la protéine Cox1 naissante, avec d'autres facteurs (Perez-Martinez *et al.* 2003; 2009 ; Mick *et al.*, 2010 ; Fontanesi *et al.*, 2011). Tant que la protéine Cox1 néosynthétisée n'est pas assemblée la protéine Mss51 est séquestrée et ne peut pas activer de nouveaux cycles de traduction de *COX1*. Au contraire si l'assemblage de Cox1 est efficace, Mss51 est très vite libérée et la synthèse est activée. Ce rétrocontrôle permet de coordonner la synthèse de Cox1 avec son insertion membranaire et son assemblage au sein du complexe IV de la chaîne respiratoire (Zambrano *et al.* 2007). Ce facteur semble jouer un rôle crucial dans l'assemblage du complexe IV car il est conservé chez *S. pombe* et peut-être aussi chez l'homme. Cependant l'homologue chez *S. pombe* semble n'avoir gardé que le rôle post-traductionnel (Kühl *et al.*, 2012).

Les facteurs de traduction trouvés chez *S. cerevisiae* sont donc des éléments centraux de régulation de l'expression des gènes mitochondriaux, non seulement ils contrôlent la synthèse de chaque protéine mitochondriale, mais pour chaque complexe respiratoire, ils participent aussi à coupler la synthèse d'une sous-unité avec son assemblage.



C. Les systèmes déblocage de la traduction

Lorsqu'un accident de traduction survient, par exemple parce qu'un ARNm est tronqué et n'a plus de codon stop, le ribosome et tous ses facteurs associés restent bloqués sur cet ARNm. Le déblocage de cette situation permet de recycler les acteurs piégés et éliminer les peptides non terminés.

1. Les ARNtm bactériens

Il existe chez les bactéries un petit ARN appelé *10Sa* ou *Ssra* qui est bifonctionnel, car il a les propriétés d'un ARNt et d'un ARNm, d'où son nom d'ARNtm (Figure 21). La partie ARNt de *Ssra* est repliée en une structure très proche de la structure d'un ARNt^{Ala}. Cette structure très proche trompe même l'alanine-ARNt synthétase qui charge ainsi une alanine sur cet ARNtm. De plus cette structure en forme d'ARNt permet à cet ARNtm d'interagir avec le ribosome et d'initier un mécanisme de *trans*-traduction. Durant cette *trans*-traduction, l'ARNtm entre grâce à ses propriétés d'ARNt au niveau du site A d'un ribosome bloqué, et va remplacer la matrice défectueuse grâce à sa partie ARNm. Le ribosome va ainsi traduire la partie messagère de l'ARNtm pour générer une étiquette à la fin de la protéine (AANDENEALAA). Cette étiquette sera un signal de dégradation. Une fois cette partie messagère traduite, la traduction se termine normalement, car la partie messagère possède un codon de terminaison, libérant le peptide « chimérique » qui va être éliminé. Cet ARNtm a été retrouvé chez toutes les bactéries et semble même être l'ARN le plus présent dans les cellules bactériennes, par contre aucun homologue eucaryote n'a été retrouvé à ce jour. Cependant, des données récentes proposent que chez l'homme, la protéine mtRF1 qui est homologue au facteur de terminaison de la traduction mtRF1a mais ne reconnaît pas les codons stop, puisse jouer fonctionnellement le rôle de l'ARNtm (Huynen *et al.*, 2012).

2. Les Peptidyl-ARNt hydrolases

Il existe d'autres systèmes de déblocage de la traduction, comme par exemple les Peptidyl-ARNt-hydrolase ou Pth. Ces Pth sont des estérases, qui ont pour fonction de couper le lien ester entre l'extrémité C-terminale d'un peptide et le 2' ou 3'-hydroxyl du ribose de l'extrémité de l'ARNt. Ce clivage permet de libérer à la fois le peptide et l'ARNt : le peptide sera dégradé et l'ARNt recyclé (Cuzin *et al.*, 1967 ; Kössel & RajBhandary, 1968 ; Figure 22). Les Pth sont également capables de cliver un lien amide entre un peptide et le groupe 3'-amino d'un ribose modifié porté par un ARNt synthétique (Jost & Bock, 1969), mais ne peuvent pas agir sur un peptidyl-ARNt lié au ribosome associé (70S) (Vogel *et al.*, 1971). Des liens entre les Pth et la petite sous-unité du ribosome ont été mis en évidence (Kössel, 1970) même si leur signification fonctionnelle reste actuellement incomprise.

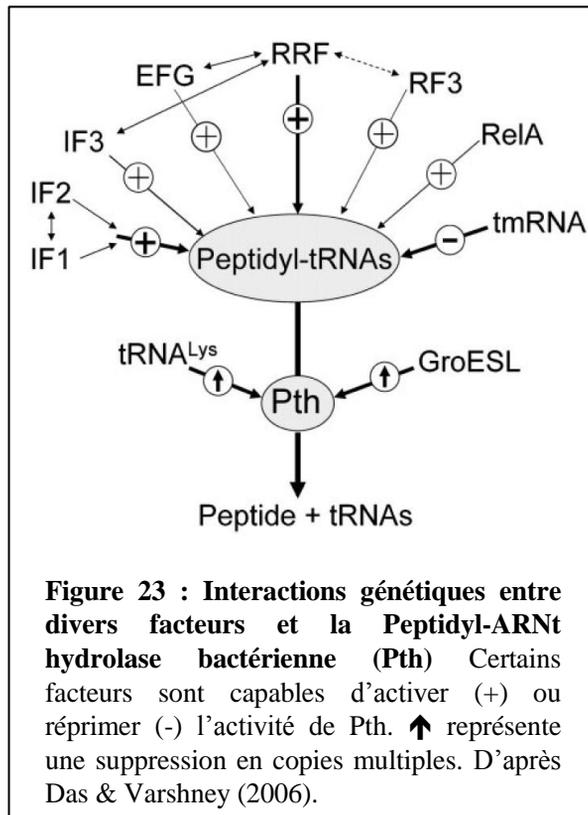


Figure 23 : Interactions génétiques entre divers facteurs et la Peptidyl-ARNt hydrolase bactérienne (Pth) Certains facteurs sont capables d'activer (+) ou réprimer (-) l'activité de Pth. ↑ représente une suppression en copies multiples. D'après Das & Varshney (2006).

a. Peptidyl tRNA hydrolases bactériennes

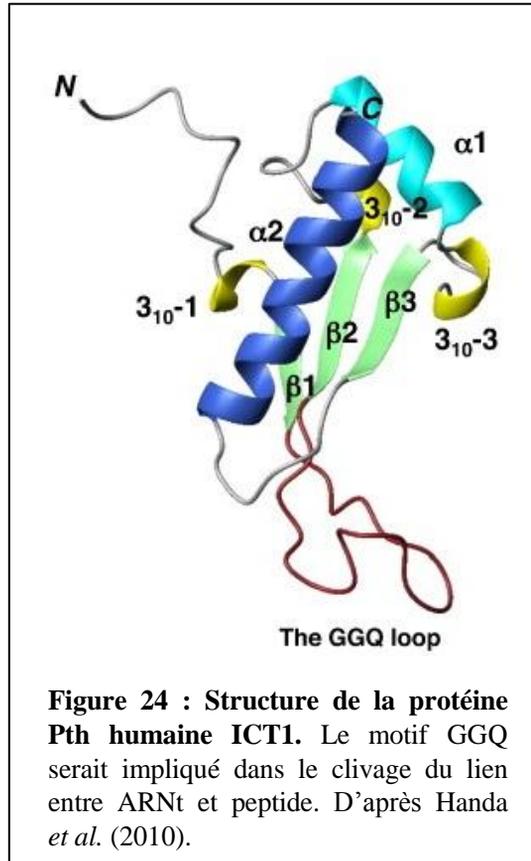
Chez les bactéries et les archées, on trouve un seul facteur Pth, nommé respectivement Pth et Pth2. Les données structurales permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action des Pth et les différences entre le Pth bactérien et le Pth2 archéen. En effet les structures de Pth et Pth2 sont très différentes même si leurs fonctions restent très similaires, de plus Pth fonctionnerait de façon monomérique alors que Pth2 fonctionnerait de façon dimérique (Rosas-Sandoval *et al.*, 2002).

Des études menées chez *E. coli*, montrent que les Pth semblent avoir une certaine spécificité de substrats. Par exemple, un facteur Pth ne peut pas cliver le lien ester d'un ^{fMet}ARNt qui est l'aa-ARNt initiateur, la principale hypothèse étant de préserver cet aa-ARNt initiateur et donc d'éviter de trop perturber l'initiation de la traduction (pour revue Das & Varshney, 2006). Les Pth ont leur activité maximale sur des peptidyl-ARNt d'un minimum de 3 ou 4 acides aminés (Dutka *et al.*, 1993). Des études ont également pu mettre en évidence que certains facteurs impliqués dans la traduction comme RelA, RRF, RF3, IF1, IF2 et IF3 activent le relargage du peptidyl-ARNt qui sera par la suite clivé par le facteur Pth (pour revue Das & Varshney, 2006 ; Figure 23). Chez *E. coli*, une surproduction de Pth entraîne une déplétion du pool d'aa-ARNt dans la cellule ainsi qu'un arrêt de la traduction (Das & Varshney 2006), et une déplétion du facteur Pth est létale (Menninger, 1979). Dans ce dernier cas les cellules manquent d'ARNt essentiels comme l'ARNt^{Lys} qui est limitant et est majoritairement séquestré sous forme de peptidyl-ARNt (Heurgué-Hamard *et al.*, 1996). Une surexpression du gène de l'ARNt synthétase lysine permet ainsi de mieux tolérer l'absence de Pth. En utilisant une souche d'*E. coli* portant une mutation thermosensible de Pth, il a aussi été montré qu'une surproduction de l'ARNtm permet de mieux tolérer le défaut de Pth à température restrictive (Singh & Varshney, 2004).

b. Peptidyl tRNA hydrolases de levures et de l'homme

Chez les eucaryotes, il existe plusieurs facteurs Pth. Pth1 est l'homologue du Pth bactérien et Pth2 est l'homologue du Pth2 archéen, alors que Pth3 et Pth4 sont spécifiques aux eucaryotes. Tous ces facteurs pourraient être mitochondriaux selon la base de données Uniprot (www.uniprot.org). Cependant chez *S. cerevisiae*, une double délétion des gènes *PTH1* et *PTH2* n'affecte pas la croissance, que ce soit sur milieu fermentescible ou non fermentescible (Rosas-Sandoval *et al.*, 2002), ces gènes ne sont donc essentiels ni pour la respiration ni pour la vie cellulaire. D'autres travaux mettent en évidence que Pth2 de *S. cerevisiae* joue un rôle dans la dégradation des protéines en interagissant avec des Ubiquitine-ligases (Ishii *et al.*, 2006).

Les facteurs Pth3 et Pth4 de *S. cerevisiae* n'ont pas été étudiés. Ils ont la particularité, de posséder tous les deux un motif GGQ qu'on retrouve également chez le facteur de terminaison de classe I de la traduction mitochondriale Mrf1 et dans les équivalents humains ou de *S. pombe* (Voir résultats, article 1 Figure 1). Ce motif GGQ est impliqué chez Mrf1 dans le clivage du lien entre le peptide et l'ARNt, permettant en fin de traduction de libérer le peptide terminé. Cependant contrairement à Mrf1, Pth3 et Pth4 ne semblent pas posséder de motif de



reconnaissance du codon stop, ils pourraient donc jouer un rôle de facteurs de terminaison indépendants d'un codon stop. C12orf65, l'homologue humain de Pth3 de levure, joue un rôle dans la traduction mitochondriale, car des fibroblastes de patients mutés pour cette protéine présentent également un défaut de traduction mitochondriale. Bien que C12orf65 n'ait pas d'activité peptidyl tRNA hydrolase *in vitro* en système hétérologue (ribosome de *E. coli*), il pourrait participer *in vivo* au recyclage des peptidyl-ARNt abortifs relargués par le ribosome durant la phase d'élongation de la traduction mitochondriale (Antonicka *et al.*, 2010). ICT1 (Immature colon Carcinoma Transcript 1) (Figure 24) qui est l'homologue humain du Pth4 de levure, a été tout d'abord rapporté comme étant dérégulé précocement dans les cas de cancer du côlon. Il a été par la suite montré que contrairement à C12orf65, il a une activité de peptidyl-ARNt hydrolase et qu'il serait même un composant de la grande sous-unité du ribosome humain (Richter *et al.*, 2010).

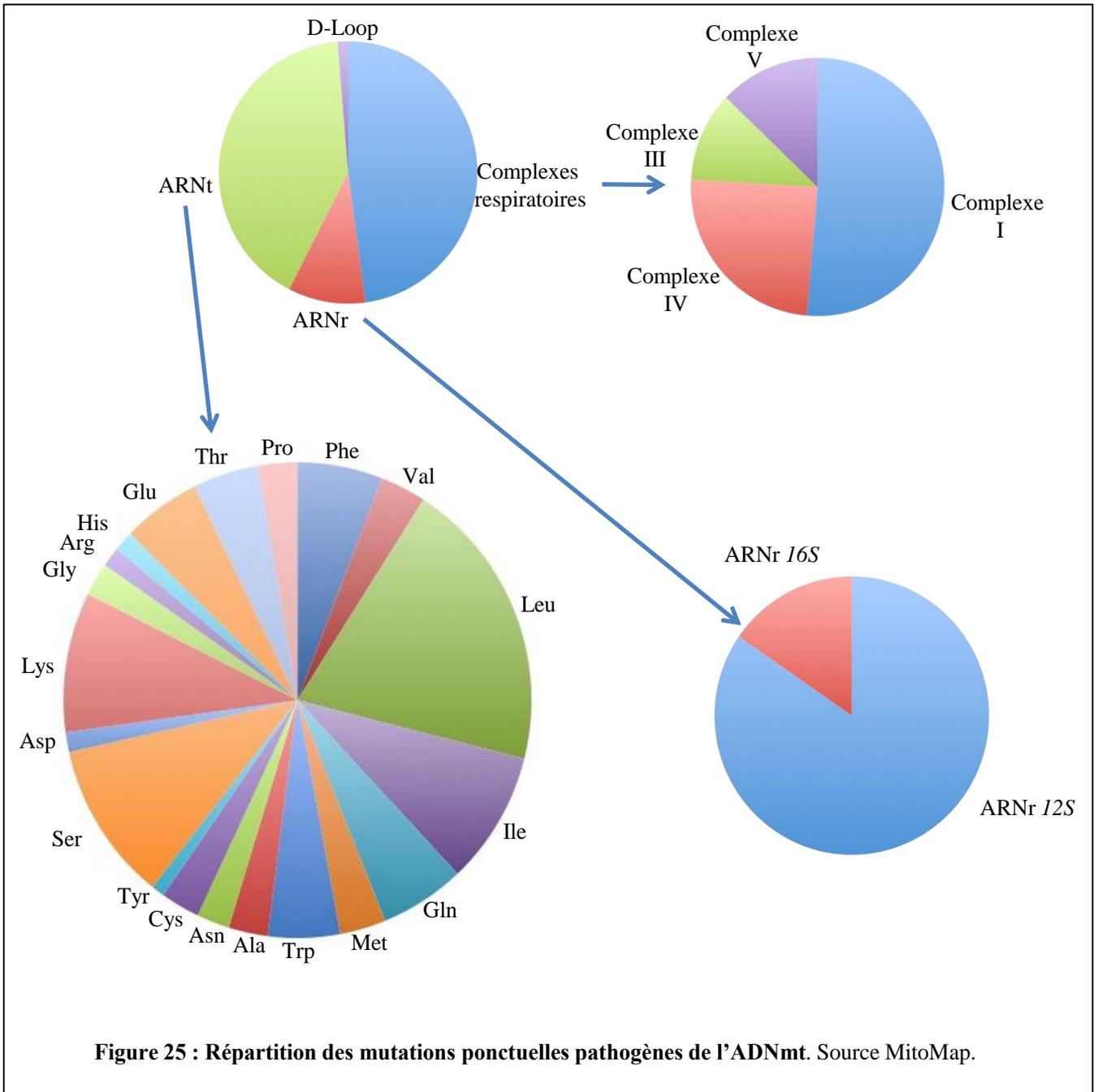


Figure 25 : Répartition des mutations ponctuelles pathogènes de l'ADNmt. Source MitoMap.

V : Maladies due à des défauts de la traduction mitochondriale

A. Préambule

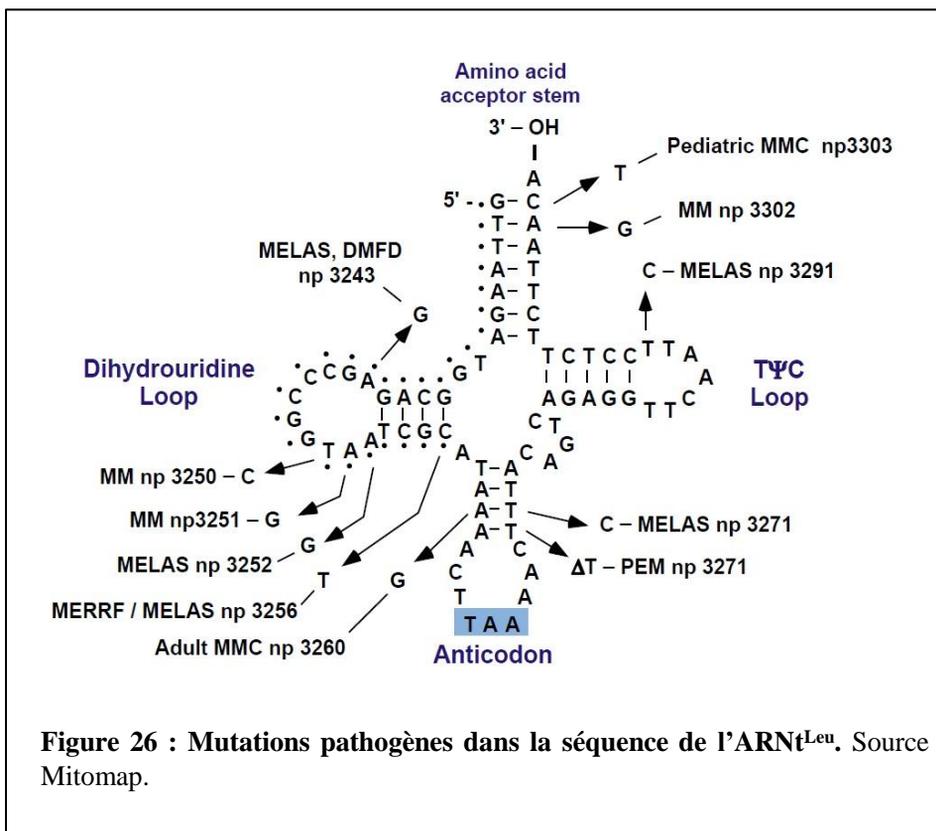
La majorité des maladies mitochondriales affecte soit le complexe I, soit la traduction mitochondriale. Cela est dû au fait que ces deux fonctions présentent un grand nombre de gènes cibles dont la mutation peut entraîner une maladie. D'une part, le complexe I est le plus gros des complexes respiratoires car il possède une cinquantaine de sous-unités dont 7 d'origine mitochondriale, et il dépend aussi de facteurs d'assemblage. D'autre part, la traduction mitochondriale implique aussi un grand nombre de gènes, codant trois classes de produits : (i) les ARN de la machinerie de traduction, d'origine mitochondriale ; (ii) les protéines de la machinerie, d'origine nucléaire ; (iii) les facteurs de régulation, également d'origine nucléaire. Tous ces gènes sont des candidats possibles dans des maladies de traduction mitochondriale (pour revue Perez-Martinez *et al.*, 2008). La majorité des mutations pathogènes connues pour affecter la traduction mitochondriale modifie les ARNt ou ARNr. Il existe sûrement un biais dû au fait que ces mutations mitochondriales sont faciles à identifier par séquençage de l'ADNmt, comparé aux mutations nucléaires dont l'identification est beaucoup plus longue et hasardeuse. Cependant il est clair que les mutations d'ARNt et ARNr sont très fréquentes puisqu'elles représentent la moitié des mutations ponctuelles pathogènes recensées dans l'ADNmt humain (Figure 25, source MITOMAP, Florentz *et al.*, 2003).

Les ARNt leucines sont ceux retrouvés le plus fréquemment mutés dans des maladies de traduction mitochondriale (Figure 25 et 26), mais d'autres ARNt et les ARNr peuvent aussi être mutés et causer ainsi des maladies (Tableau 9). Dans les dix dernières années, plus d'une dizaine de maladies de traduction mitochondriale dues à des mutations dans des gènes nucléaires ont été identifiées (Pour revue Jabobs & Turnbull, 2005 ; Perez-Martinez *et al.*, 2008 ; Pearce *et al.*, 2012, et Tableau 10). Dans les sections suivantes je présenterai plus en détails trois de ces gènes, impliqués dans des fonctions qui m'ont intéressées au cours de cette thèse : la protéine PPR LRPPRC, l'activateur traductionnel TACO1, et la « peptidyl tRNA hydrolase » C12orf65.

B. La protéine PPR multifonctionnelle, LRPPRC

1. LRPPRC et le « French-Canadian Leigh Syndrome (FCLS) »

La première protéine PPR impliquée dans une maladie a été LRPPRC « Leucine-rich pentatricopetide repeat cassette » ou LRP130 (Leucine-Rich protein 130 kDA). Des mutations dans cette protéine conduisent à une variante du syndrome de Leigh, touchant plus particulièrement les habitants de Saguenay et de Charlevoix, une région du Québec (Mootha *et al.*, 2003). Ce syndrome se traduit par une neuropathie accompagnée d'acidose lactique et de dystonie. La mutation la plus fréquente correspond à une transition A354V à l'état homozygote, conduisant à une baisse d'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire de 50% dans les fibroblastes et d'au moins 80% dans le foie et le cerveau ; de façon intéressante, l'activité du complexe IV chez ces patients reste proche de la normale dans les reins, le cœur et les muscles squelettiques (Mootha *et al.*, 2003 ; Xu *et al.*, 2004). Ce défaut d'activité du complexe IV résulte



Mutation dans:	Nom de la maladie	Produit du gène	Position	Mutation
ARNt	Myopathie mitochondriale, encéphalopathie, acidose lactique et « stroke-like episodes » (MELAS)	ARNt ^{Leu}	3243	A>G
	Myopathie mitochondriale	ARNt ^{Leu} /ARNt ^{Pro}	3250 /15990	T>C/ G>A
	Epilepsie myoclonique et détérioration des fibres musculaires (MERRF)	ARNt ^{Lys}	8344	A>G
	Myopathie mitochondriale Cardiomyopathie	ARNt ^{Leu}	3260 /3303	A>G /C>T
ARNr	Surdit�e « Dupuytren's disease »	ARNt ^{Ser}	7445	A>G
	Surdit�e	ARNr 16S ? ARNr 12S	1555/ 1494	A>G/ C>T

Tableau 9 : Exemples de gènes mitochondriaux impliqués dans la traduction mitochondriale et dont la mutation conduit à des maladies.

d'une plus faible accumulation des transcrits de *COX1* et *COX3* dans les mitochondries, conduisant à une mauvaise traduction de *COX1* et *COX3*. Par contre le transcrit et la traduction de *COX2* ne semblent pas être affectés. Il a été proposé que LRPPRC soit impliquée dans la stabilisation et/ou la traduction des ARNm de *COX1* et de *COX3*. Dans cette hypothèse, la moindre quantité des ARNm *COX1* et *COX3* résulterait d'un défaut d'importation de la protéine LRPPRC mutée dans la mitochondrie (Xu *et al.*, 2004).

2. Rôles multiples de LRPPRC

Par la suite LRPPRC s'est avérée associée directement ou indirectement à de très nombreuses autres fonctions. Il a ainsi été montré que cette protéine est capable de se lier à l'ARN polymérase mitochondriale POLMRT et d'activer la transcription mitochondriale. Cette hausse de la transcription mitochondriale entraîne une augmentation de la synthèse des sous-unités des complexes respiratoires d'origine mitochondriale conduisant à une hausse de l'activité de la chaîne respiratoire, sans pour autant avoir de rôle direct sur la biogénèse mitochondriale ou l'expression des sous-unités codées par l'ADN nucléaire (Liu *et al.*, 2011). Outre la respiration cette amélioration de la transcription mitochondriale semble jouer un rôle bénéfique sur d'autres métabolismes ayant lieu dans la mitochondrie telle que la β -oxydation des acides gras (Liu *et al.*, 2011). Un autre groupe trouve aussi que LRPPRC est impliquée dans la transcription mitochondriale, mais plus directement, en se liant à la boucle D de l'ADNmt humain (voir Figure 6) au point de terminaison de transcription (Sondheimer *et al.*, 2010). Cependant une autre étude affirme que LRPPRC n'est pas un régulateur de la transcription mais participe à la stabilité de certains ARN mitochondriaux, car une délétion conditionnelle de LRPPRC dans le cœur de souris entraîne une cardiomyopathie associée à une forte baisse des transcrits de *COX1*, *COX2*, *COX3* et *CYTB* alors que l'ARNm de *ND6* n'est pas affecté et que les ARNr *12S* et *16S* voient leurs quantités augmentées (Ruzzenente *et al.*, 2011). La délétion conditionnelle de LRPPRC conduit aussi à une dérégulation de la traduction mitochondriale car dans ce cas la synthèse *de novo* de ND1, ND2 et ND5 est fortement augmentée alors que celle de ND3, ND6, COX1 et ATP6 est très faible. Le profil de polyadénylation est aussi dérégulé.

3. Interaction de LRPPRC avec SLIRP

SLIRP « SRA-Stem Loop Interacting RNA-binding Protein » est une protéine se liant à une structure tige boucle de l'ARN régulateur SRA « Steroid Receptor RNA Activator », qui joue un rôle de co-répresseur de récepteurs nucléaires, du type récepteurs aux hormones stéroïdes (Hatchell *et al.*, 2006). En fait la majorité de SLIRP endogène réside dans la mitochondrie, et pourrait réguler les fonctions mitochondriales en modulant la trans-activation des récepteurs nucléaires. La quantité de SLIRP dans les mitochondries est réduite dans les cellules de patients mutées pour LRPPRC ou traitées par le bromure d'éthidium, inversement une déplétion de SLIRP par RNAi phénocopie la mutation de LRPPRC en diminuant l'accumulation des ARNm mitochondriaux (Baughman *et al.*, 2009). Cela suggère que l'accumulation de SLIRP est interdépendante avec celle des ARNm mitochondriaux.

Fonction	Gène	Protéine ou rôle	Symptôme clinique
Elongation de la traduction	<i>TSMF</i>	mtEF-Ts: Recyclage de mtEF-Tu	Encéphalomyopathie
	<i>TUFM</i>	mtEF-Tu: Apport aa-ARNt	Acidose lactique, mort précoce
	<i>GFM1</i>	mtEF-G: Translocation du ribosome	Troubles hépatiques, retard de croissance
aa-ARNt synthétase	<i>DARS2</i>	Aspartyl-ARNt synthétase	Leuco-encéphalopathie
	<i>LARS2</i>	Leucyl-ARNt synthétase	Susceptibilité au diabète
Modification des ARNt	<i>PUS1</i>	Pseudo-uridylylate synthétase 1	Myopathie, acidose lactique et anémie sidéroblastique (MLASA)
Protéines Ribosomales	<i>MRPS16</i>	Petite sous-unité ribosomale	Acidose lactique néonatale mortelle
	<i>MRPS22</i>	Petite sous-unité ribosomale	Cardiomyopathie
Autres facteurs	<i>LRPPRC</i>	Rôles multiples, métabolisme des ARN	Syndrome de Leigh
	<i>TACO1</i>	Activateur de la traduction de <i>COX1</i>	Syndrome de Leigh
	<i>C12orf65</i>	Déblocage/terminaison de la traduction	Encéphalomyopathie

Tableau 10 : Exemples de gènes nucléaires impliqués dans la traduction mitochondriale et dont la mutation conduit à des maladies. aa: acide aminé.

Suite à ces observations, il a été montré que LRPPRC est capable d'interagir avec SLIRP et que ces deux protéines se lient aux ARNs mitochondriaux sous forme d'un complexe ribonucléoprotéique d'au moins 250 kDa, dont l'absence mène à une baisse générale de la quantité des différents transcrits mitochondriaux (Sasarman *et al.*, 2010). Ce complexe ne semble se former qu'en présence d'ARN car un traitement RNase le dissocie et LRPPRC co-sédimente dans les fractions plus lourdes, suggérant qu'elle s'agrège ou qu'elle fait alors partie d'un autre complexe (Ruzzenente *et al.*, 2011). Le complexe comprenant SLIRP et LRPPRC ne se lie pas avec la même affinité à tous les ARN mitochondriaux, il est ainsi capable d'interagir avec les ARNm *ND1*, *COX1*, *ATP6* et *CYTB*, mais pas avec les ARNr *12S*, *16S* ou l'ARNm *ND6*, ce qui pourrait expliquer leurs différences de stabilité en absence de LRPPRC (*12S*, *16S* et *ND6* restent stables, voir paragraphe précédent).

Le complexe LRPPRC-SLIRP semble également jouer un rôle dans la poly-adénylation des ARNm mitochondriaux. Ainsi les queues poly-A passent en moyenne de 50-60 à moins de 10 bases A en absence de LRPPRC pour les transcrits du brin sens de l'ADNmt, à l'exception des ARNr dont la queue poly-A ne varie pas et de *ND6* qui ne possède naturellement pas de queue poly-A. *ND6* est le seul ARNm du brin anti-sens de l'ADNmt, transcrit à partir du promoteur LSP, (voir Introduction Section II-C-1) et il possède un 3'UTR très long. Cette structure particulière pourrait expliquer le fait que *ND6* ne se lie pas au complexe LRPPRC-SLIRP et n'en soit pas dépendant pour sa stabilité (Ruzzenente *et al.*, 2011). Récemment, Chujo *et al.*, (2012) ont montré que le complexe LRPPRC-SLIRP pouvait supprimer la dégradation 3' exonucléolytique des ARNm mitochondriaux médiée par la Polynucléotide Phosphorylase (PNPase) et l'hélicase SUV3. De plus, *in vitro* LRPPRC est capable de promouvoir la poly-adénylation des ARNm mitochondriaux par la Poly-A Polymérase mitochondriale.

Pour finir Ruzzenente *et al.*, (2011) ont montré qu'en absence du complexe LRPPRC-SLIRP, les ARNm interagissent de manière anormale avec les sous-unités ribosomales, avec la perte d'un pool d'ARNm traductionnellement inactif et probablement lié au complexe LRPPRC-SLIRP, au profit d'ARNm interagissant avec les petite et grande sous-unités ribosomales. Cela pourrait expliquer le profil de traduction mitochondrial aberrant observé dans la souris Δ LRPPRC conditionnelle.

En résumé, LRPPRC formerait avec SLIRP un complexe dépendant de la présence des ARNm mitochondriaux et régulerait la poly-adénylation, stabilité et traduction de ces ARNs.

4. Rôle nucléaire de LRPPRC

LRPPRC interagit donc avec SLIRP, qui a une double localisation nucléaire et mitochondriale. Mais LRPPRC elle-même a aussi une double localisation noyau/mitochondrie au sein de complexes ribo-nucléoprotéiques, la fraction mitochondriale étant majeure, en association avec des ARNm polyadénylés (Mili *et al.*, 2001). De plus il a été mis en évidence que LRPPRC interagit avec l'activateur transcriptionnel PGC-1-alpha, impliqué dans la régulation de l'expression de gènes nucléaires participant à la respiration (Cooper *et al.*, 2006). LRPPRC peut également se lier au facteur d'initiation de la traduction eIF4E, un facteur limitant pour la traduction cytoplasmique dans des cellules normales et surexprimé dans les cellules

cancéreuses (Lee & Pelletier, 2012). LRPPRC pourrait ainsi être impliquée dans la régulation de la transcription mitochondriale et nucléaire, jouant un rôle dans la coordination de la synthèse des transcrits des deux génomes (Sterky *et al.*, 2010).

5. Conclusion

LRPPRC tout comme d'autres protéines interagissant avec les acides nucléiques, est donc une protéine à double localisation nucléaire et mitochondriale, même si le pool mitochondrial semble majoritaire. Cette double localisation permet à cette protéine de se lier à des ARNs dans différents compartiments pour agir sur le métabolisme énergétique à de multiples niveaux, soit seul soit en partenariat avec d'autres facteurs, tels que PGC-1-alpha, SLIRP ou MTRNAPOL, et coordonner l'expression des génomes nucléaires et mitochondriaux. Son identification en 1993 comme facteur de traduction des ARNm mitochondriaux *COX1* et *COX3* est donc maintenant largement dépassée, mais peut-être expliquée par le fait que ces deux ARNs soient des cibles privilégiées, et donc les plus affectées par les mutations pathogènes.

C. Le facteur de traduction spécifique de *COX1*, TACO1

Le gène *CCDC44* ou TACO1 « Translation Activator of COI » est un activateur traductionnel de *COX1* qui a été découvert chez l'homme en recherchant la mutation responsable d'un déficit en complexe IV de la chaîne respiratoire (Weraarpachai *et al.*, 2009). De façon intéressante, dans une famille consanguine incluant 5 patients portant la même mutation homozygote de TACO1, les effets de la mutation se manifestent assez tardivement (entre 4 et 16 ans d'âge) et sont variables, allant d'une vie normale à une dépendance totale vis-à-vis d'une assistance extérieure (Seeger *et al.*, 2010). Mais dans tous les cas un retard mental ou des difficultés d'apprentissage sont observés.

Chez tous ces patients, une insertion d'une cytosine en position 472 à l'état homozygote engendre un décalage de phase suivi d'un arrêt de traduction prématuré. Cette mutation se traduit par une réduction importante de l'accumulation de l'ARNm *TACO1*, qui engendre un déficit en protéine TACO1 dans les fibroblastes de patients. Il en résulte un faible niveau de traduction de *COX1* malgré la présence en quantité normale de ce transcrit, compromettant de fait la biogenèse du complexe IV. La mutation de TACO1 a ainsi un effet primaire sur la synthèse de COX1 mais aussi un effet secondaire sur la stabilité des protéines COX2 et COX3, qui sont dégradées rapidement en absence d'assemblage avec COX1 (Weraarpachai *et al.*, 2009).

TACO1 est une protéine mitochondriale d'environ 30 kDa. Il a été montré par purification des complexes natifs au sein des mitochondries qu'elle appartient à un complexe de 74 kDa, indiquant qu'elle est multimérique et/ou associée à une autre protéine *in vivo*, mais cet éventuel partenaire n'est pas connu pour l'instant. Il pourrait s'agir d'un facteur de traduction mitochondrial général. Ainsi trois hypothèses non exhaustives ni mutuellement exclusives ont été formulées pour la fonction de TACO1 : TACO1 pourrait (i) être impliquée dans l'efficacité de l'initiation de la traduction de l'ARNm de *COX1*, (ii) stabiliser la protéine COX1 en cours de synthèse, ou (iii) interagir avec les facteurs de terminaison de la traduction pour empêcher une terminaison trop précoce de la synthèse de COX1.

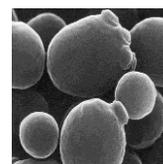
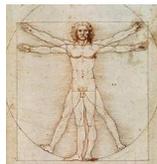
Une délétion de l'homologue de TACO1 chez *S. cerevisiae* (*YGR021w*) n'engendre aucun phénotype respiratoire. Cependant l'analyse des profils de co-expression de *YGR021w* montre que sa transcription est régulée comme celle des transcrits de gènes impliqués dans la traduction mitochondriale. Cela suggère que ce gène a bien un rôle traductionnel mais qu'il est non-essentiel dans les conditions testées ou qu'un autre gène de levure a des fonctions redondantes (Weraarpachai *et al.*, 2009). Un homologue de ce gène existe également chez *S. pombe*, *spbc8d2.12c*, mais sa délétion, viable, a seulement été construite lors d'un programme systématique, il n'y a donc pas plus de données sur le phénotype respiratoire (Kim *et al.*, 2010). Par contre la protéine est bien mitochondriale (Matsuyama *et al.*, 2006). Il serait intéressant de rechercher plus précisément le rôle de ces protéines de levure ou de combiner ces mutants avec d'autres mutations affectant le complexe IV et en particulier Cox1. Quoi qu'il en soit, le fait que la protéine de *S. cerevisiae* ne soit pas requise pour la biogenèse de la cytochrome *c* oxidase et l'apparition tardive de la maladie suggèrent que TACO1 est un facteur non essentiel, qui optimise plutôt la traduction de *COX1*.

D. Le facteur de traduction général C12orf65

Des mutations dans le gène *C12orf65* ont été identifiées comme responsables d'une maladie mitochondriale couplant un syndrome de Leigh, une atrophie optique et une ophtalmoplégie (Antonicka *et al.*, 2010) chez deux groupes de patients, une fille et deux frères. La fille et les garçons présentaient des insertions différentes d'une base dans le gène *C12orf65*, aboutissant dans les deux cas à des décalages de phase conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré à la même position, générant de fait des protéines tronquées et possiblement instable. Les cellules des deux types de patients présentaient des diminutions sévères de l'activité des complexes respiratoires I, IV et V et dans une moindre mesure du complexe III, ainsi qu'une baisse générale de la traduction mitochondriale sans affecter la stabilité des différents transcrits codés par l'ADNmt. Ces phénotypes étaient compensés par l'expression du gène *C12orf65* sauvage.

La déplétion par RNAi d'*ICT1*, codant l'autre facteur Pth humain possédant un motif GGQ, diminue la traduction mitochondriale générale dans des fibroblastes. Ces effets sur la traduction mitochondriale sont similaires à ceux des mutations de patients *C12orf65*. De façon intéressante, la surexpression d'*ICT1*, permet de supprimer partiellement le défaut de *C12orf65* en activant de 50% l'activité cytochrome *c* oxidase dans les cellules de patient (Antonicka *et al.*, 2010). Il a été montré qu'*ICT1* fait partie du ribosome mitochondrial et possède une activité peptidyl tRNA hydrolase dépendante du ribosome mais indépendante d'un codon stop (Richter *et al.*, 2010). Au contraire, aucune activité peptidyl tRNA hydrolase n'est détectable pour *C12orf65*, en présence ou en absence de codon stop (Antonicka *et al.*, 2010). Donc même si ces protéines ont une activité partiellement redondante, elles ont aussi des propriétés clairement différentes. La fonction de *C12orf65* n'est donc pour l'heure toujours pas clairement définie.

La déplétion du gène d'*ICT1* ou la mutation de son domaine GGQ conduisent à une létalité cellulaire (Richter *et al.*, 2010). Pour l'heure aucune mutation pathogène n'a été détectée dans ce gène, peut-être parce que son rôle est plus important que celui de *C12orf65*.



	Homme	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>
ADNmt	Essentiel	Essentiel	Non essentiel
Dépendance vis-à-vis de l'oxygène	+	+	-
Croissance des mutants respiratoire sur galactose	-	-	+
Taille du génome mitochondrial	16kb	19kb	75-85kb
Région transcrites non traduites	Absent	Court	Long
Unités de transcriptions	2	2	≥11
Conservation de facteur de traduction	+	+	+/-

Tableau 11 : Résumé des différences majeures entre l'homme, *S. pombe* et *S. cerevisiae* d'un point de vue mitochondrial.

VI. Choix du système modèle et buts de la thèse

Notre équipe s'intéresse de longue date aux interactions nucléo-mitochondriales permettant la biogenèse d'une chaîne respiratoire fonctionnelle. La traduction mitochondriale étant un point de contrôle important de l'expression des gènes mitochondriaux codant pour les sous-unités clés des complexes respiratoires (Introduction Chapitre III), elle est devenue au fil des années notre centre d'intérêt majeur. De plus de nombreuses maladies humaines sont dues à des défauts dans cette étape (voir Introduction Chapitre V).

Pour les études sur la biogenèse mitochondriale, la levure modèle *S. cerevisiae* a été très utilisée, dans notre équipe et beaucoup d'autres. Cette levure est aérobie facultative, elle peut survivre en l'absence de chaîne respiratoire et d'ADNmt, et elle est très facile à manipuler génétiquement, que ce soit au niveau nucléaire ou mitochondrial. Cependant elle présente aussi certains désavantages pour étudier l'étape de traduction. En effet, les mutations affectant la traduction de l'ensemble des ARNm mitochondriaux entraînent rapidement une perte de l'ADNmt, rendant leur étude difficile (Introduction section II-B-2). De plus, *S. cerevisiae* est relativement éloignée des cellules humaines, au niveau physiologique mais aussi en ce qui concerne la structure de l'ADNmt et donc son expression (Tableau 11). Les cellules humaines sont en effet dépendantes d'un ADNmt pour leur survie en culture, sauf dans des conditions bien particulières (King & Attardi, 1989), et leur ADNmt est très compact, donc les ARNm mitochondriaux humains présentent en général des régions UTR courtes ou absentes (Introduction Section II-C-2). Les activateurs traductionnels trouvés chez *S. cerevisiae* et agissant sur les UTR des ARNm mitochondriaux (Introduction Section IV-B) sont donc peu ou pas conservés chez l'homme. Inversement certains facteurs de traduction présents chez l'homme sont absents chez la levure *S. cerevisiae*, comme mtEF-Ts (Introduction Section III-B-1-d).

La levure *S. pombe* est considérée comme beaucoup plus proche des cellules humaines (Tableau 11 et Figure 27). Aux niveaux physiologique et métabolique, elle est dite « petite-négative », c'est-à-dire qu'elle dépend de la présence de l'ADNmt et des fonctions mitochondriales. En conséquence, si une mutation respiratoire tend à déstabiliser l'ADNmt, les cellules ayant perdu cet ADNmt au sein de la culture vont être aussitôt contre-sélectionnées. La culture restera donc globalement *rho*⁺ et sera ainsi plus facile à étudier puisqu'elle n'accumulera pas de cellules ayant perdu ou altéré leur génome mitochondrial. De plus, des mutations nucléaires permettant à *S. pombe* de survivre sans ADNmt ont été isolées (Haffter & Fox, 1992), si besoin ce contexte génétique peut être utilisé pour créer certains mutants. Tous les types de mutants respiratoires peuvent donc être construits chez *S. pombe*, quelles que soient leurs conséquences, et leur phénotype est facile à visualiser sur milieu à base de galactose, comme pour les cellules humaines. En effet chez *S. pombe* comme chez l'homme, la voie de Leloir qui métabolise le galactose est peu efficace et le galactose est donc une source de carbone qui peut être considérée comme non fermentescible (Matsuzawa *et al.*, 2011). Aux niveaux structurel et fonctionnel, l'ADNmt de *S. pombe* est très compact comme l'ADNmt humain, il est transcrit en peu d'unités, qui sont maturés par excision des ARNt comme dans la mitochondrie humaine, et les ARNm mitochondriaux qui en résultent ont des régions UTR courtes (Introduction Section II-C-2). De plus on trouve chez *S. pombe* un lot de facteurs de traduction mitochondriaux très

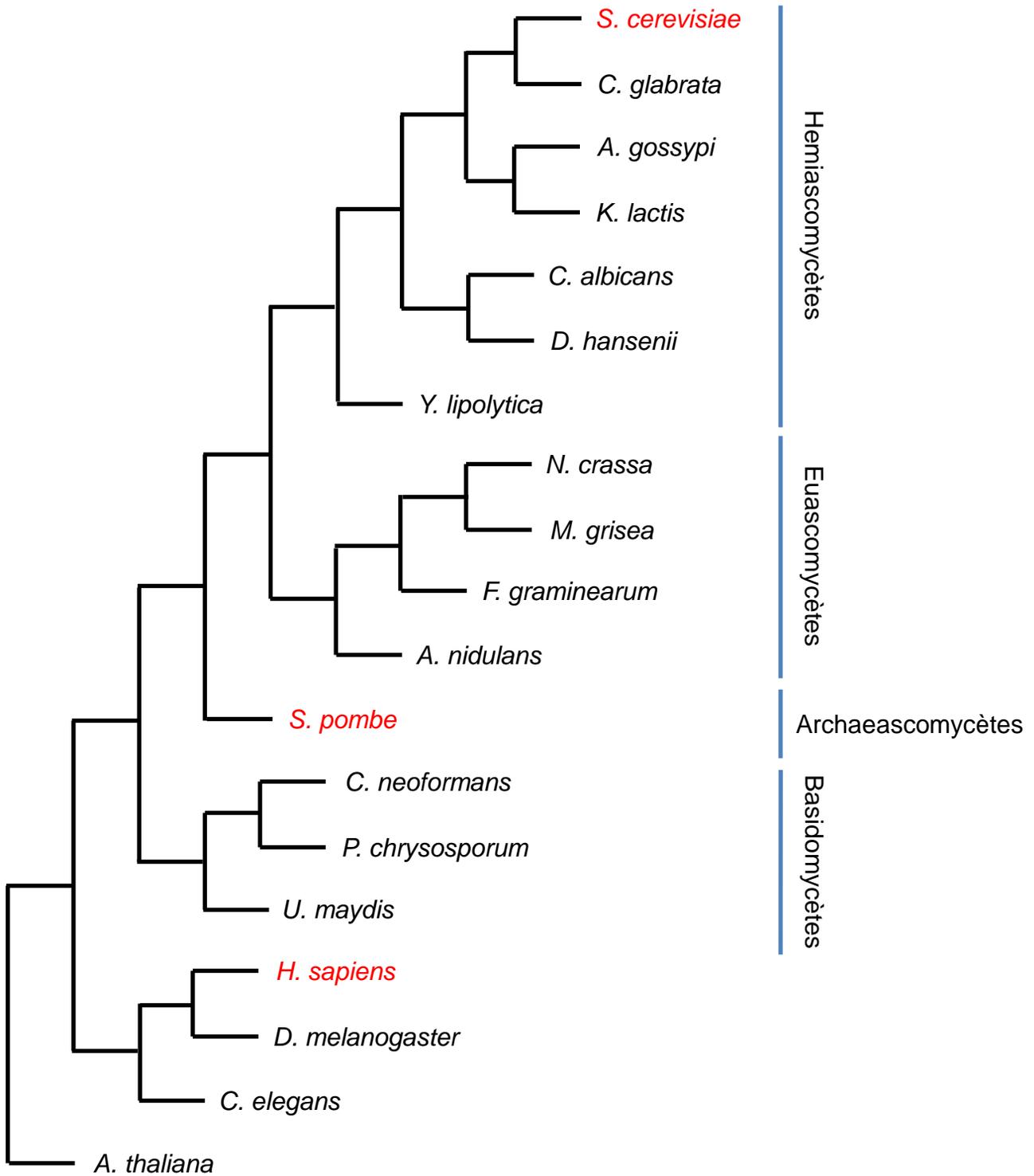


Figure 27 : Arbre phylogénétique. Arbre basé sur la concaténation de plusieurs protéines. Adapté de Kuramae *et al.* (2006).

similaire à celui de l'homme (Chiron *et al.*, 2005). Toutes ces caractéristiques suggèrent que la régulation de l'expression des gènes mitochondriaux doit se faire par des mécanismes proches chez l'homme et *S. pombe*, ce qui fait de cette levure un modèle attractif pour étudier les facteurs contrôlant et régulant la traduction et plus largement le métabolisme des ARNm dans la mitochondrie (Chiron *et al.*, 2007). J'ai donc choisi de centrer mon travail de thèse sur cette levure, en l'utilisant comme modèle pour explorer les mécanismes et les acteurs régulant la traduction mitochondriale.

Cependant, peu d'outils sont disponibles pour les études mitochondriales chez *S. pombe*, ce modèle ayant été peu utilisé pour cette thématique. Dans une première partie de la thèse, j'ai donc participé à la mise en place d'outils pour étudier la traduction mitochondriale chez *S. pombe* en étiquetant des sous-unités du ribosome mitochondrial de *S. pombe* et en mettant au point l'analyse des sous-unités ribosomales étiquetées par gradient de saccharose (Résultats Chapitre I).

Dans une deuxième partie de la thèse, je me suis concentré sur les peptidyl tRNA hydrolases ou Pth, des facteurs peu étudiés dans les levures mais reconnus comme essentiels aussi bien chez les procaryotes (Menninger, 1979) que chez l'homme (Antonicka *et al.*, 2010). J'ai ainsi étudié deux facteurs Pth de *S. pombe* et notamment analysé leur interaction avec le facteur de terminaison de la traduction mitochondriale et avec le ribosome mitochondrial (Résultats Chapitre II).

Enfin dans le but de rechercher si des activateurs spécifiques de la traduction mitochondriale pouvaient exister dans un organisme présentant des ARNm mitochondriaux avec des séquences UTR courtes, j'ai participé à l'étude d'une famille de protéines à laquelle plusieurs des activateurs traductionnels de *S. cerevisiae* appartiennent, la famille de protéine à « penta-tricopeptide repeat » ou PPR, présentée au Chapitre IV de l'introduction. Cette analyse a permis d'isoler le premier activateur traductionnel spécifique dans la mitochondrie de *S. pombe*, mais elle a aussi largement débordé le cadre de la traduction puisque plusieurs de ces protéines s'avèrent contrôler une étape plus en amont, la stabilité des ARNm mitochondriaux (Résultats Chapitre III).

Matériels et Méthodes

Souches, plasmides, milieux et méthodes génétiques

Toutes les souches utilisées lors des différentes études sont cultivées à 28 ou 36°C comme indiqué. Les souches sont construites à partir de NB205-6A (*h⁻ ade6-M216 ura4-D18 his3Δ leu1-32* [3 introns mitochondriaux]), NB34-21A (*h⁻ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32 ptp1-1* [3 introns mitochondriaux]), NBP9-725 (*h⁺ ade6M-216 leu1-32* [3 introns mitochondriaux]) NB204-14B (*h⁻ ade6M-210 his3Δ* [3 introns mitochondriaux]), P3 (*h⁺ ade7-50 rho+* [aucun intron mitochondrial]). Les plasmides utilisés lors des différentes études sont des dérivés de pGEM-T-easy (Promega), pDUALFFH1 et pDUALYFH1 (Matsuyama *et al.*, 2004), pTG1754 et pTG1754/NotI (Bonnefoy *et al.*, 1996) ainsi que pSC49, une version *leu1* de pTG1754/NotI (Chiron & Bonnefoy non publié). Les milieux utilisés ainsi que les techniques de génétiques employées sont décrits dans Bonnefoy *et al.*, (1996 ; 2000). Les asques de *S. pombe* ont été micro-disséqués directement à partir d'un mélange de cellules haploïdes, diploïdes et en sporulation. Les ADN totaux ont été extraits selon la méthode décrite dans Hoffman & Winston (1987).

Transformation de *S. pombe*

La levure *S. pombe* est un micro-organisme dont on peut modifier le génome par recombinaison homologue avec des fragments d'ADN introduits par transformation. Il existe principalement deux techniques de transformation, la première est une technique chimique utilisant l'acétate de lithium (Okazaki *et al.*, 1990) dont nous avons modifié plusieurs points : (1) utilisation d'ADN simple brin de sperme de saumon comme carrier, (2) régénération des cellules toute la nuit en milieu complet liquide, et (3) en cas de sélection sur milieu minimum, étalement des cellules sur des boîtes contenant 5% de glucose comme décrit dans Chiron *et al.*, 2007.

La seconde méthode est une technique d'électroporation issue de la synthèse des protocoles décrits dans les articles Suga *et al.*, 2000 ; 2001 ; 2004 ; 2009. Les cellules sont cultivées jusqu'à une DO₆₀₀ de 1 correspondant à environ 10x10⁷ cellules par ml, dans 200 ml de milieu minimum contenant 2% glucose avec des suppléments à 150 µg/ml. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 4500 rpm et resuspendues dans 0,1 volume de 0,6M sorbitol, 25mM DTT, 20mM Hepes pH7,0. Puis les cellules sont incubées 15 minutes à 30°C, lavées 3 fois avec 30 ml de sorbitol 1M froid. Ensuite les cellules sont resuspendues à raison de 10x10⁹ cellules/ml dans du sorbitol 1M. Le mélange est aliquoté en fractions de 50 µl qui seront utilisées directement ou stockées à -80°C après une congélation lente. Les aliquotes congelées sont décongelées rapidement à 30°C puis centrifugées 1 minute à 5000 rpm. Les cellules sont lavées dans 1 ml de sorbitol 1M froid puis resuspendues dans du sorbitol 1M pour un volume final de 50 µl. Les cellules sont transformées avec 1 à 5 µl d'ADN dans une cuve d'électroporation, reprises dans 1 ml de 2M sorbitol, 25mM Hepes pH7,0 et incubées 10 minutes à 30°C. La transformation est soit étalée directement par aliquotes de 200µl sur milieu sélectif si la construction comporte un marqueur d'auxotrophie, soit préalablement cultivée en milieu complet pendant plusieurs heures (2-5 hr) s'il s'agit d'une cassette de résistance à une drogue.

Délétions de gènes

Les délétions de gènes nécessitent la synthèse d'un fragment d'ADN par une technique de PCR en utilisant le plasmide pFA6aKanMX6 conférant la résistance au G418 (Wach *et al.*, 1994, Wach, 1996) ou pAG25 conférant la résistance à la Nourseothricine (Goldstein & McCuster, 1999). Ces constructions sont générées à l'aide d'oligonucléotides hybrides contenant entre 75 et 80 nucléotides d'homologie avec les régions flanquantes du *locus* à déléter ; ensuite des cellules de *S. pombe* sont transformées avec ces fragments selon l'une des techniques présentées ci-dessus. Les transformants sont sélectionnés sur milieux complets contenant la drogue adéquate, puis leur ADN est extrait et la présence de la délétion vérifiée par PCR grâce à des oligonucléotides convergents de part et d'autre du *locus*, couplés à des oligonucléotides divergents dans la cassette de délétion. On vérifie également avec des oligonucléotides convergents au sein de l'ORF sauvage que celle-ci n'a pas été dupliquée.

Étiquetage des protéines ribosomales

Les gènes codant pour les protéines de la petite (Mrp4) ou de la grande (MrpL12, L24, 49) sous-unité du mitoribosome, ont été étiquetés à leur *locus* endogène en utilisant une stratégie proche de celle utilisée pour la disruption de gènes. On synthétise ainsi par PCR un fragment d'ADN qui pourra recombiner avec la fin de l'ORF à étiqueter (Wach, 1996). Ces protéines ont toutes été étiquetées avec un épitope His₇, cependant ne disposant pas de matrice adéquate, la séquence de l'étiquette His₇ a été ajoutée dans la séquence de l'oligonucléotide sens. La matrice pFA6a-13Myc-KanMX6 (Petracek & Longtine, 2002) a été utilisée afin d'incorporer le terminateur du gène *ADHI* de *S. cerevisiae* dans les constructions finales. L'étiquetage a été réalisé dans la souche NBP9-725. Après vérification de l'absence de phénotype respiratoire, les constructions sont contrôlées par séquençage, et finalement l'expression de la protéine de fusion est analysée par western blot sur des extraits totaux de protéines (Yaffe, 1991). Les souches doublement étiquetées ont été obtenues par des techniques génétiques à partir des souches simplement étiquetées.

Étiquetage d'autres protéines

Différents gènes étiquetés ont été achetés auprès du consortium japonais RIKEN (<http://dna.brc.RIKEN.jp>) et fournis sous forme de plasmides contenant l'ORF étiquetée sous contrôle d'un promoteur *nmt1*. Les plasmides sont alors coupés par l'enzyme de restriction *NotI* avant d'être intégrés au *locus leu1* après transformation (Matsuyama *et al.*, 2006). Dans le cas où l'intégration ne permet pas de restaurer un phénotype sauvage dans la souche délétée correspondante, les gènes ont été étiquetés à leur *locus* endogène avec des séquences codant un épitope HA₃ ou 13cMyc, en utilisant la technique présentée ci-dessus avec les matrices pFA6a-HA₃-KanMX6 et pFA6a-13Myc-KanMX6 (Petracek & Longtine, 2002).

Northern blot

Les souches de *S. pombe* à analyser sont cultivées jusqu'à une DO₆₀₀ de 1 en milieu complet avec 2% de glucose. Les ARN totaux sont extraits selon le protocole du phénol acide chaud de Ausubel *et al.* (1993), puis séparés sur un gel d'agarose contenant du formaldéhyde avant d'être transférés sur membrane. Les blots sont ensuite hybridés avec une sonde radio-marquée et lavés en conditions salines standard. L'ADNmt étant riche en AT, les sondes révélant les ARNs mitochondriaux sont marquées avec du dATP-[α P³²] et un kit de « random priming » (Invitrogen). Après décroissance de la radioactivité de la sonde précédente, la membrane peut être hybridée avec une nouvelle sonde.

Southern blot

Les souches de *S. pombe* à analyser sont cultivées jusqu'à saturation en milieu complet avec 2% de glucose. Les ADN totaux sont extraits selon le protocole de Hoffman & Winston, (1987), puis digérés par *Hin*DIII et séparés sur gel d'agarose 1% à 40V durant 18 heures. Les ADN sont ensuite transférés sur une membrane qui est hybridée avec une sonde radio-marquée et lavée dans des conditions standard. La sonde d'ADNmt correspond à 1 μ g du plasmide pDG3 (del Giudice *et al.*, 1983) contenant l'intégralité du génome mitochondrial de *S. pombe* cloné dans un plasmide pBR322 et marqué à l'aide de dATP-[α P³²] et un kit de « nick translation » (Amersham). Le contrôle de charge correspond à une bande d'ADN génomique de 1,8 kb révélée par une sonde radio-marquée contenant le gène *ura4* (Grimm *et al.*, 1988). L'ADNmt de *S. pombe* digéré par *Hin*DIII présente un profil avec sept bandes détectables à 4314, 4077, 3403, 2455, 2114, 1651 et 1156 paires de bases. Le marqueur de poids moléculaires Raoul I (Appligène) contient des séquences communes avec pBR322 qui sont révélées par la sonde pDG3.

Radiomarquage des protéines néo-synthétisées dans la mitochondrie

Les souches de *S. pombe* à analyser sont cultivées jusqu'en début de phase exponentielle en milieu complet ou minimum contenant 5% raffinose et 0,1% glucose. Les protéines néo-synthétisées dans la mitochondrie sont marquées à 30°C pendant 3 heures, par incubation dans un mélange contenant de la méthionine et de la cystéine marquées au [³⁵S], en présence de cycloheximide (10 mg/ml, 5mg par réaction) qui va bloquer spécifiquement la traduction cytoplasmique. Les protéines sont extraites comme décrit par Gouget *et al.* (2008). Les échantillons sont séparés sur gel 16% acrylamide-0,5% bisacrylamide à 7mA pendant 17 heures. Après coloration le gel est séché puis mis en contact avec un film radio-sensible pendant quelques jours à plusieurs mois.

Purification de mitochondries, extraction au carbonate alcalin et western blot

Les mitochondries de *S. pombe* sont purifiées à partir de cultures en milieu complet ou minimum avec 2% de glucose comme décrit dans l'article Chiron *et al.* (2007). Le traitement au carbonate de sodium en condition de pH alcalin permet de séparer les membranes et leurs protéines associées des protéines solubles. La procédure est décrite dans l'article Lemaire & Dujardin (2008). Les échantillons sont séparés sur gel de 12 ou 15 % SDS-PAGE avant analyse par western blot avec différents anticorps primaires. Certains sont des anticorps de souris : Hsp60 humain, 1:1000 (Sigma H3524) ; FLAG, 1:1000 (Sigma

F185) ; HA 1:1000 (Sigma H6908) ; His 1:5000 (THE™ Histag antibody Genscript). Les autres sont des anticorps de lapin : cMyc 1:5000 (Covance PRB-150C) ; *S. cerevisiae* Arg8 1:1000, fourni par T.D. Fox (Steele *et al.*, 1996) ; *S. pombe* Cox2, 1:2500 (Gaisne & Bonnefoy, 2006) ; *S. pombe* Cytb, 1:1000 (Kühl *et al.*, 2012). Tous les anticorps secondaires sont utilisés à une dilution de 1:10000.

Spectres de cytochrome à basse température

Le dithionite de sodium est ajouté à une pâte de cellules fraîches de *S. pombe* pour réduire complètement les cytochromes des complexes respiratoires (Claisse *et al.*, 1970). Le mélange est aussitôt congelé à l'azote liquide avant d'être analysé avec un spectrophotomètre Cary UV400. On observe différents pics d'absorption à 548, 554, 560 et 603 nm correspondant respectivement aux cytochromes *c*, *c1*, *b* et *aa3*. Le cytochrome *c* de *S. pombe* présente également un pic secondaire à 544 nm qui disparaît chez un mutant de cytochrome *c* (Bonnefoy, non publié).

Fractionnement d'extraits mitochondriaux sur coussin de saccharose

Cette expérience est un test simple permettant d'indiquer si une protéine donnée est associée à un complexe de haut poids moléculaire, comme par exemple le mitoribosome. 200 µg de mitochondries purifiées (à 10 µg/µl) sont centrifugés durant 15 minutes à 15000 rpm et à 4°C puis lysés dans un tampon contenant du détergeant, et soit de l'EDTA favorisant la dissociation des sous-unités ribosomales, soit du MgCl₂ qui au contraire prévient cette dissociation. Après une clarification des échantillons par centrifugation pendant 15 minutes à 15000 rpm et à 4°C, la moitié de chaque extrait est directement précipitée au TCA alors que l'autre moitié est centrifugée à 70000 rpm durant 90 minutes à 4°C sur un coussin de 50µl de 40% saccharose ; seules les protéines appartenant à un complexe suffisamment lourd, vont pouvoir former un culot. Les fractions solubles sont précipitées au TCA 100% - 4mg/ml sodium déoxycholate à raison de 100 µl de TCA pour 400 µl d'échantillon avec une incubation de 15 minutes sur glace, puis centrifugées à 15000 rpm pendant 15 minutes à 4°C avant d'être lavées à l'acétone et finalement reprises dans 30 µl de tampon d'échantillon. Les culots de d'ultra-centrifugation sont directement repris dans 30 µl de tampon d'échantillon.

Tampon de lyse EDTA ou MgCl ₂	Solution stock de saccharose conservée à -20°C
1% Triton X-100	40% Saccharose
40mM KCl	0,1% Triton X-100
20mM Hepes pH 7,6	25mM KCl
50mM EDTA ou 50mM MgCl ₂	20mM Hepes pH 7,6
1X inhibiteurs de protéases	50mM EDTA ou 50mM MgCl ₂
« complete EDTA-free » (Roche)	1X inhibiteurs de protéases
1mM PMSF	« complete EDTA-free » (Roche)
	1mM PMSF

Fractionnement de mitoribosome sur gradient de saccharose

Cette expérience est un test permettant d'indiquer une co-sédimentation entre une protéine donnée et une sous-unité du mitoribosome. Des cellules sont cultivées jusqu'à une DO_{600} de 1 dans 200 ml de milieu approprié. Elles sont centrifugées à 5000 rpm pendant 5 minutes puis lavées à l'eau avant d'être reprises dans du tampon de lyse contenant un détergeant additionné soit d'EDTA favorisant la dissociation des sous-unités ribosomales, soit de $MgCl_2$ qui au contraire prévient cette même dissociation, à raison de 2 volumes de tampon pour 1 volume de cellules. Les cellules sont ensuite cassées à l'aide d'une presse de French dans des godets à $-80^\circ C$, puis les extraits obtenus sont clarifiés par une centrifugation de 15 minutes à 15000 rpm et $4^\circ C$. L'équivalent de 10 DO_{260} d'extrait clarifié est déposé et centrifugé sur un gradient de 10 à 45 % de saccharose durant 3h30 à 39000 rpm et $4^\circ C$, permettant de séparer les sous-unités ribosomales et les ribosomes selon leur masse. Différentes fractions de 400 μl chacune sont ensuite récoltées à l'aide d'un fractionnateur de gradients (Isco Foxy R1) puis précipitées au TCA 100% - 4mg/ml de sodium déoxycholate à raison de 100 μl de TCA pour 400 μl d'échantillon avec une incubation de 15 minutes sur glace, suivie d'une centrifugation de 15 minutes à 15000 rpm, $4^\circ C$. Pour finir les échantillons sont lavés à l'acétone et repris dans 30 μl de tampon d'échantillon.

Tampon de lyse EDTA ou $MgCl_2$	Solution stock de saccharose conservée à $-20^\circ C$
1% Triton X-100	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ou 45 % Saccharose
40mM KCl	0,1% Triton X-100
20mM Hepes pH 7,6	25mM KCl
50mM EDTA ou 50mM $MgCl_2$	20mM Hepes pH 7,6
1X inhibiteurs de protéases	50mM EDTA ou 50mM $MgCl_2$
« complete EDTA-free » (Roche)	1X inhibiteurs de protéases
1mM PMSF	« complete EDTA-free » (Roche)
	1mM PMSF

Les gradients de saccharose 10 à 45% sont préparés dans les tubes Beckman polyallomer référence : 331372; 13,2 ml pour rotor Beckman SW41. Ajouter successivement 1,5 ml de solution de saccharose à 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 et 10% en congelant dans l'azote liquide entre chaque couche. Le gradient complet est stocké à $-20^\circ C$ puis décongelé pendant une nuit à $4^\circ C$ avant utilisation.

Résultats

Chapitre I : Etiquetage de sous-unités du ribosome mitochondrial de *S. pombe*

A. Recherche des protéines ribosomales de *S. pombe*

Actuellement, une seule protéine du ribosome mitochondrial de *S. pombe* a été étudiée. Il s'agit d'une protéine essentielle pour la viabilité cellulaire, Bot1, appelée ainsi parce que sa déplétion modifie la forme des cellules, qui ressemblent alors à des bouteilles (« bottle shaped cells », Wiley *et al.*, 2008). Pour approfondir l'étude de la traduction mitochondriale chez *S. pombe*, il nous a semblé important de mieux connaître le ribosome mitochondrial chez cette levure, et notamment de pouvoir suivre les petites et grandes sous-unités du ribosome grâce à des étiquettes.

Comme vu en introduction, la composition du ribosome mitochondrial varie au cours de l'évolution : les mitochondries de levures possèdent des ARNr plus courts que ceux des bactéries et un plus grand nombre de protéines ribosomales. Cette tendance s'accroît encore dans la mitochondrie humaine. Il existe donc deux groupes de protéines ribosomales ; l'un composé de protéines conservées universellement et l'autre est constitué de protéines qui sont spécifiques d'un ou plusieurs organismes. Pour établir une liste de protéines ribosomales prédites de *S. pombe*, nous avons ainsi recherché toutes les séquences présentant des homologies avec les protéines ribosomales d'*E. coli*, de la mitochondrie de *S. cerevisiae* et/ou de l'homme. Il manque donc dans cette liste d'éventuelles protéines ribosomales qui seraient spécifiques à la mitochondrie de *S. pombe*, et qui pourraient être identifiées par exemple en purifiant le ribosome mitochondrial et en faisant une analyse des protéines isolées par spectre de masse.

Les résultats sont présentés dans les Tableaux 12, 13 et 14. Quand il est connu, le phénotype des mutants correspondants chez *S. cerevisiae* est aussi donné.

Tableau 12 : Nombre minimum de protéines ribosomales prédites chez *S. pombe*, *E. coli*, *S. cerevisiae* et l'homme

	<i>S. pombe</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
Petite sous-unité*	33	21	34	30
Grande sous-unité	43	33	44	48

*Les nombres de protéines sont donnés sans compter la protéine Mrps2/Ppe1 et ses homologues (en jaune dans le Tableau 13).

Tableau 13 : Protéines de la petite sous-unité du ribosome bactérien ou mitochondrial

<i>S. pombe</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. sapiens</i>
		ORF	Nom	Phénotype Δ	
-	S1	-	-	-	-
SPAC24C9.10c	S2	YHL004w	MRP4	Gly-	MRP-S2
rps3	S3	Q0140	VAR1	Gly-, mt	-
SPBC13G1.01c	S4	YNL137c	NAM9	Gly-	-
SPAC4G9.17c	S5	YBR251w	MRPS5	Gly-	MRP-S5
SPAC343.08c	S6	YKL003c	MRP17	Gly-	MRP-S6
SPAC16E8.10c	S7	YJR113c	RSM7/MRPS7	?	MRP-S7
SPCC736.10c	S8	YMR158w	MRPS8	Gly-	-
SPAC29A4.03c	S9	YBR146w	MRPS9	Gly-	MRP-S9
SPBC211.01	S10	YDR041w	RSM10	léthal	MRP-S10
SPAC1B3.18c	S11	YNL306w	MRPS18	léthal	MRP-S11
SPAC4F8.06	S12	YNR036c	MRPS12	Gly-	MRP-S12
SPCC1795.07	S13	YNL081c	SWS2	Slow	-
SPAC23H3.07c	S14	YPR166c	MRP2	Gly-	MRP-S14
SPBC11B10.04c	S15	YDR337c	MRPS28	Gly-	MRP-S15
SPBC354.06	S16	YPL013c	MRPS16	Gly-	MRP-S16
SPBC409.14c	S17	YMR188c	MRPS17	Gly-	MRP-S17
SPCC18B5.04	S18	YER050c	RSM18	Gly-	MRP-S18 (1) (2) (3)
SPAC1751.02c	S19	YNR037c	RSM19	Gly-	-
-	S20	-	-	-	-
SPBC839.09c	S21	YBL090w	MRP21	Gly-	MRP-S21
SPBP4H10.17c (Carboxyl esterase)	-	YHR075c	PPE1/MRPS2	Gly+ (PMesterase)	PME1 Protéine ribosomale???
SPBC16A3.04	-	YIL093c	RSM25	Gly-	MRP-S23
SPAC2F7.15	-	YDR175c	RSM24	Gly-	<- ?-> MRP-S28
SPBC29A3.15c	-	YGL129c	RSM23	Gly-	MRP-S29 (DAP3)
SPBC21B10.14	-	YFR049w	YMR31	Gly+	<- ?-> MRP-S36
SPBC14C8.16c (Bot1)	-	YGR165w	MRPS35	Gly-	-
SPAC24C9.13c	-	YDL045w-A	MRP10	Gly-	-
SPAC23A1.18c	-	YPL118w	MRP51	Gly-	-
SPBC2G2.07c	-	YKL155c	RSM22	Gly-	-
SPAC1420.04c	-	YJR101w	RSM26	Gly-	-
SPAC19B12.13	-	YDR347w	MRP1	Gly-	-
SPBC16A3.14	-	YJR101w	RSM26	Gly-	-
SPBC3H7.04	-	YDR347w	MRP1	Gly-	-
SPBC30D10.12c	-	YGR215w	RSM27	?	-
-	-	YGR084c	MRP13	Gly+	-
-	-	YDR494w	RSM28	Gly-	-
- (<i>M. grisea</i>)	-	YOR158w	PET123	Gly-	-
-	-	-	-	-	MRP-S22
-	-	-	-	-	MRP-S24
-	-	-	-	-	MRP-S25
-	-	-	-	-	MRP-S26
-	-	-	-	-	MRP-S27
-	-	-	-	-	MRP-S30
-	-	-	-	-	MRP-S31
-	-	-	-	-	MRP-S32
-	-	-	-	-	MRP-S33
-	-	-	-	-	MRP-S34
-	-	-	-	-	MRP-S35

Mis à jour de Bonnefoy, 2004. Les protéines de *S. pombe* étiquetées au cours de cette thèse et leurs homologues sont notées en rouge. <-?-> signifie que les protéines ont été proposées comme homologues mais que les homologies ne sont pas claires. Rsm26 et Mrp1 sont homologues. Mrp51 et Rsm22 sont codées par deux gènes chez *S. pombe*. Rsm22-1 et -2 sont en fait fusionnées avec Cox11-1 et -2. « mt » : gène mitochondrial. Violet : Protéines de *E. coli* présentant éventuellement des homologues mitochondriaux ; Jaune : Protéines présentes chez l'homme et les levures ; Bleu : Protéines présentes chez les deux levures ; Vert : Protéines spécifiques à *S. cerevisiae* ; Rose : Protéines spécifiques à l'homme.

Tableau 14: Protéines de la grande sous-unité du ribosome bactérien ou mitochondrial

<i>S. pombe</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. sapiens</i>
		ORF	Nom	Phénotype Δ	
SPAC1610.02c	L1	YDR116c	MRPL1	Gly+/-	MRP-L1
SPCC16C4.15	L2	YEL050c	RML2	Gly-	MRP-L2
SPAC644.17c	L3	YGR220c	MRPL9	Gly-	MRP-L3
SPBC2D10.08c	L4	YML025c	YmL6	léthal	MRP-L4
SPBC2F12.02c	L5	YDR237w	MRPL7	?	-
SPAC12G12.08	L6	YHR147c	MRPL6	Gly-	-
SPCC4B3.09c	L7/L12	YGL068w	MNP1	léthal	MRP-L7/L12
SPCC777.17c	L9	YNR022c	MRPL50	Gly+	MRP-L9
SPAC31A2.03	L10	YDL202w	MRPL11	Gly-	MRP-L10
SPAC1486.07c	L11	YNL185c	MRPL19	?	MRP-L11
SPBC16G5.04	L13	YOR150w	MRPL23	Gly-	MRP-L13
SPBC887.07	L14	YKL170w	MRPL38	?	MRP-L14
SPBC9B6.06	L15	YNL284c	MRPL10	?	MRP-L15
SPBC1105.03c	L16	YBL038w	MRPL16	Gly-	MRP-L16
SPBC1271.13	L17	YYJL063c	MRPL8	Gly-	MRP-L17
-	L18	-	-	-	MRP-L18
SPAC343.02	L19	YCR046c	IMG1	Gly-	MRP-L19
-	L20	-	-	-	MRP-L20
SPBP4H10.15	L21	YJL096w	MRPL49	Gly-	MRP-L21
SPCC1739.02c	L22	YNL177c	MRPL22	Gly-	MRP-L22
SPAC31A2.08	L23	YDR405w	MRP20	Gly-	MRP-L23
SPAC4F8.02c	L24	YPL173w	MRPL40	?	MRP-L24
-	L25	-	-	-	-
SPAP19A11.05c	L27	YNL005c	MRP7	Gly-	MRP-L27
SPBC14C8.10	L28	YMR193w	MRPL24	Gly-	MRP-L28
SPCC4G3.06c	L29	YLR439w	MRPL4	Gly-	MRP-L47
SPCC1919.08c	L30	YMR286w	MRPL33	Gly-	MRP-L30
SPBC1711.18	L31	YBR122c	MRPL36	Gly-	-
SPBC1604.13c	L32	YCR003w	MRPL32	?	MRP-L32
SPBC4F6.08c	L33	YML009c	MRPL39	?	MRP-L33
SPBC21C3.04c	L34	YDR115w	-	?	MRP-L34
- (<i>chloroplaste</i>)	L35	-	-	-	MRP-L35
SPBC83.06c	L36	YPL183w-A	RTC6	?	MRP-L36
SPBC2F12.10	-	YDR322w	MRPL35	?	MRP-L38
SPAC4F8.05c	-	YDR462w	MRPL28	?	MRP-L40
SPAC3A12.19	-	YBR282w	MRPL27	Gly-	MRP-L41
SPBC19C2.12	-	YPR100w	MRPL51	Gly-	MRP-L43
SPBC3B9.14c	-	YMR024w	MRPL3	?	MRP-L44
SPCC126.05c	-	YNL252c	MRPL17	Gly-	MRP-L46
SPAC3H8.03	-	YCR071c	IMG2	Gly-	MRP-L49
SPCC645.09	-	YBR268w	MRPL37	Gly-	MRP-L54
SPAC1952.14c	-	YGR076c	MRPL25	Gly-	-
SPCC16A11.11	-	YKL138c	MRPL31	Gly-	-
SPBC1539.01c	-	YLR312w-A	MRPL15	?	-
SPCC1393.11	-	YKR085c	MRPL20	Gly-	-
SPBC56F2.14	-	YMR225c	MRPL44	?	-
SPCC1442.19	-	YKL167c	MRP49	Gly+ cs	-
-	-	YKR006c	MRPL13	Gly +/-	-
-	-	-	-	-	MRP-L37
-	-	-	-	-	MRP-L42
-	-	-	-	-	MRP-L45
-	-	-	-	-	MRP-L48
- (homologie avec Ths1, « thréonine ARNt synthétase »)	-	-	-	-	MRP-L39
-	-	-	-	-	MRP-L50
-	~S10 ?	-	-	-	MRP-L51
-	-	-	-	-	MRP-L52
-	-	-	-	-	MRP-L53
-	-	-	-	-	MRP-L55
CaIp12110p ?	-	-	-	-	MRP-L56 (LACTB)

Mis à jour de Bonnefoy, 2004. Les protéines de *S. pombe* étiquetées au cours de cette thèse et leurs homologues sont notées en rouge. « cs » : cryosensible. Violet : Protéines de *E. coli* présentant éventuellement des homologues mitochondriaux ; Jaune : Protéines présentes chez l'homme et les levures ; Bleu : Protéines présentes chez les deux levures ; Vert : Protéines spécifiques à *S. cerevisiae* ; Rose : Protéines spécifiques à l'homme.

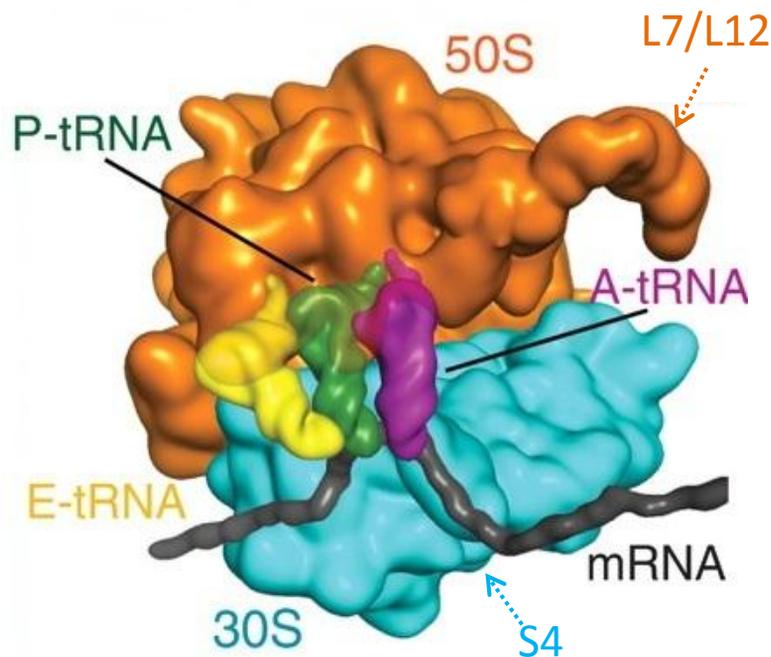


Figure 28 : Structure du ribosome 70S d'*E. coli*. La grande sous-unité du ribosome est représentée en orange alors que la petite sous-unité est représentée en bleu. L'ARNm apparaît ici en noir et les sites A, P et E du ribosome sont respectivement en rose, vert et jaune. La protéine RPL7/12 forme une protubérance sur la grande sous-unité du ribosome. La protéine RPS4 se trouve à la surface de la petite sous-unité ribosomale. Modifié de Schmeing *et al.* (2009).

B. Choix des protéines à étiqueter et construction des souches

L'étiquetage d'une protéine peut perturber sa fonction et/ou sa localisation. Pour choisir des protéines ribosomales à étiqueter parmi la liste trouvée chez *S. pombe*, nous avons recherché dans la littérature des exemples de protéines du ribosome mitochondrial qui avaient pu être étiquetées sans en altérer la fonction. Deux autres critères sont entrés en jeu. Tout d'abord, le fait que l'inactivation de ces protéines présente un phénotype respiratoire chez *S. cerevisiae*, suggère que ces protéines seront aussi essentielles pour la fonction du ribosome mitochondrial de *S. pombe*. Cela permet donc de tester que l'étiquette n'altère pas la fonction. Ensuite quand elle était connue, nous avons privilégié une localisation en surface du ribosome, pour pouvoir éventuellement détecter la protéine assemblée au sein du ribosome natif.

1. La petite sous-unité ribosomale

La première protéine choisie est Mrp4 (Spac24c9.10c, 29,3 kDa), localisée en surface de la petite sous-unité du ribosome (Figure 28). La protéine homologue (Mrp4 ou Yhl004w) a en effet déjà été étiquetée par un épitope S-tag chez *S. cerevisiae* pour purifier le ribosome par affinité et réaliser des analyses de spectre de masse en vue de rechercher de nouvelles protéines ribosomales (Gan *et al.*, 2002). Cette étude a permis de mettre en évidence 27 nouvelles protéines MRPS (Mitochondrial Ribosomal Protein Small subunit) de la petite sous-unité du ribosome, ainsi que 22 MRPL (Mitochondrial Ribosomal Protein Large subunit) de la grande sous-unité ribosomale.

Une autre cible de la petite sous-unité choisie pour l'étiquetage a été la protéine Bot1 (Mrps35/Spbc14c8.16c, 35,5 kDa). Cette protéine a déjà été étiquetée chez *S. pombe* sans que sa fonction soit perturbée (Wiley *et al.*, 2008). Cependant nous n'avons pas pu par la suite obtenir de souche viable étiquetée Bot1-HA₃.

2. La grande sous-unité ribosomale

Pour la grande sous-unité, la première protéine choisie a été MrpL12 (Spcc4b3.09c, 22,6 kDa). Le choix de cette protéine repose sur sa position au sein du ribosome. En effet, elle forme une protubérance sur la grande sous-unité ribosomale, suggérant que si une étiquette est ajoutée à cette protéine, celle-ci se retrouvera en dehors du ribosome et ne devrait pas gêner son fonctionnement (Figure 28). De plus la protéine MrpL12 possède une région très conservée au sein de l'évolution, *via* laquelle le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu interagit avec le ribosome (Terasaki *et al.*, 2004 ; Kothe *et al.*, 2004). Nous avons également décidé d'étiqueter la protéine MrpL24 (Spbc14c8.10, 20 kDa) ainsi que Mrp49 (Spcc1442.19, 15,3 kDa). En effet ces protéines ont été utilisées avec succès chez *S. cerevisiae* pour étiqueter le ribosome (Martin Ott, communication personnelle).

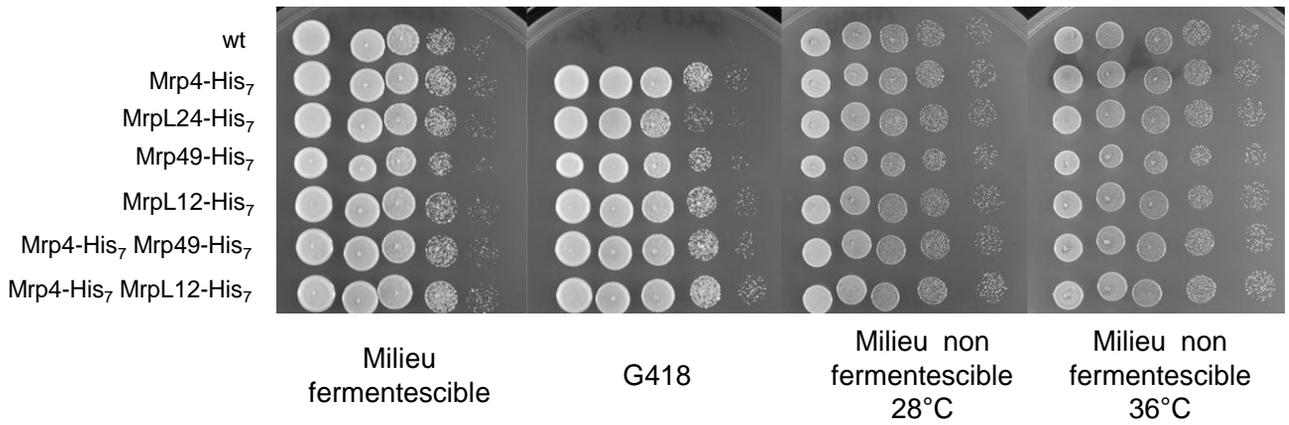


Figure 29 : Phénotypes des souches étiquetées au niveau du mitoribosome. Test en gouttes sur un milieu fermentescible (glucose) et un milieu non fermentescible pour *S. pombe* (galactose 0,1% glucose) de différentes souches simplement ou doublement étiquetées au niveau du mitoribosome. Tous les gènes sont étiquetés au *locus*.

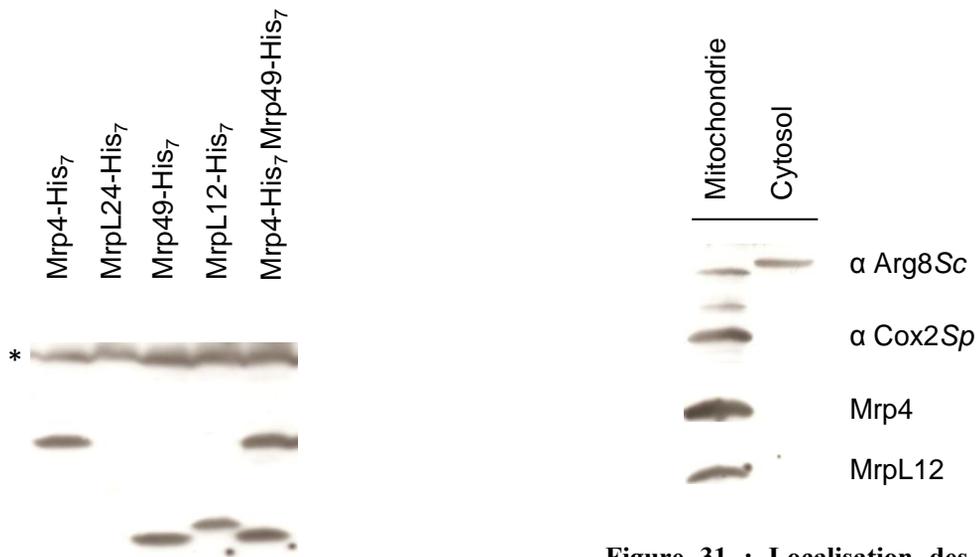


Figure 30 : Protéines totales des souches étiquetées au niveau du mitoribosome. Les protéines Mrp4-His₇, Mrp49-His₇, MrpL12-His₇ et MrpL24-His₇ sont toutes étiquetées au *locus* et révélées avec un anticorps anti-His. L'astérisque (*) marque une protéine qui présente une réaction croisée avec l'anticorps et qui est utilisée comme contrôle de charge.

Figure 31 : Localisation des protéines ribosomales étiquetées. La fraction mitochondrie correspond à des mitochondries purifiées alors que la fraction cytosol correspond au surnageant post-mitochondrial. L'anticorps anti Arg8Sc a une réaction croisée avec la protéine mitochondriale Arg1Sp et une protéine inconnue dans le cytosol. La protéine Cox2 est détectée grâce à un anti-peptide. Les protéines Mrp4 et MrpL12 sont détectées *via* un anticorps anti-His.

3. Stratégie de construction des souches étiquetées

J'ai utilisé les plasmides pFA6a-3HA-KanMX et pFA6a-13Myc-KanMX (Longtine *et al.*, 1998) comme matrice pour générer par PCR des fragments contenant 4 domaines: la fin des ORF à étiqueter, l'épitope en phase, un marqueur de sélection (résistance au G418) et la région aval au codon stop des ORF d'intérêt. Pour l'intégration, ces zones d'homologie aux ORF d'intérêt doivent être d'environ 80 nucléotides. Les fragments ont été transformés dans une souche de *S. pombe* sauvage (NB205-6A ou NBp9-725) et les transformants sélectionnés sur milieu contenant du G418 ont été analysés par PCR et séquençage pour vérifier que l'intégration s'est faite correctement. Les souches étiquetées ont ensuite été croisées avec un sauvage pour vérifier la ségrégation de l'intégration et obtenir une spore de signe opposé, afin de pouvoir effectuer une deuxième série de croisements permettant d'obtenir des souches doublement étiquetées.

4. Souches Mrp4-HA et MrpL12-cMyc

Dans un premier temps nous avons décidé d'étiqueter la protéine Mrp4 de la petite sous unité du ribosome avec un épitope HA et la protéine MrpL12 de la grande sous-unité avec un épitope cMyc dans la souche sauvage NB205-6A. Puis nous avons croisé ces transformants pour changer leur signe sexuel. Cependant à chaque essai de croisement, des spores étaient obtenues mais elles ne germaient pas. Une explication possible est que les souches étiquetées sélectionnées soient en fait des diploïdes homozygotes h-/h-, n'empêchant pas les croisements et la sporulation, mais bloquant la germination des spores. La culture d'origine servant à la transformation pourrait par malchance venir d'une colonie diploïdisée, ou la méthode de transformation mise en œuvre, qui utilise du PEG, pourrait avoir favorisé la diploïdisation des transformants.

5. Etiquetage de Mrp4, MrpL12, MrpL24 et Mrp49 par 7 histidines

Quoi qu'il en soit, ces souches ont été abandonnées et quatre souches étiquetées pour Mrp4, MrpL12, MrpL24 ou Mrp49 ont été reconstruites en utilisant un autre fond génétique, des étiquettes hepta-histidine et la méthode de transformation par électroporation. Certaines d'entre elles ont ensuite été croisées par une souche sauvage afin d'obtenir les gènes marqués dans l'autre signe et au final deux souches doublement étiquetées par un motif hepta-histidine ont été obtenues : Mrp4/MrpL12 et Mrp4/Mrp49, ce qui devrait permettre de révéler les deux sous-unités du mitoribosome avec un seul anticorps.

La croissance de l'ensemble des souches a été testée sur différents milieux (Figure 29) et toutes présentes une croissance comparable à celle de la souche sauvage isogénique. Apparemment les étiquettes n'ont pas perturbé la fonction de ces protéines. On s'attend en effet, par homologie avec la situation chez *S. cerevisiae*, à ce que ces 4 protéines ribosomales soient chacune essentielles chez *S. pombe*.

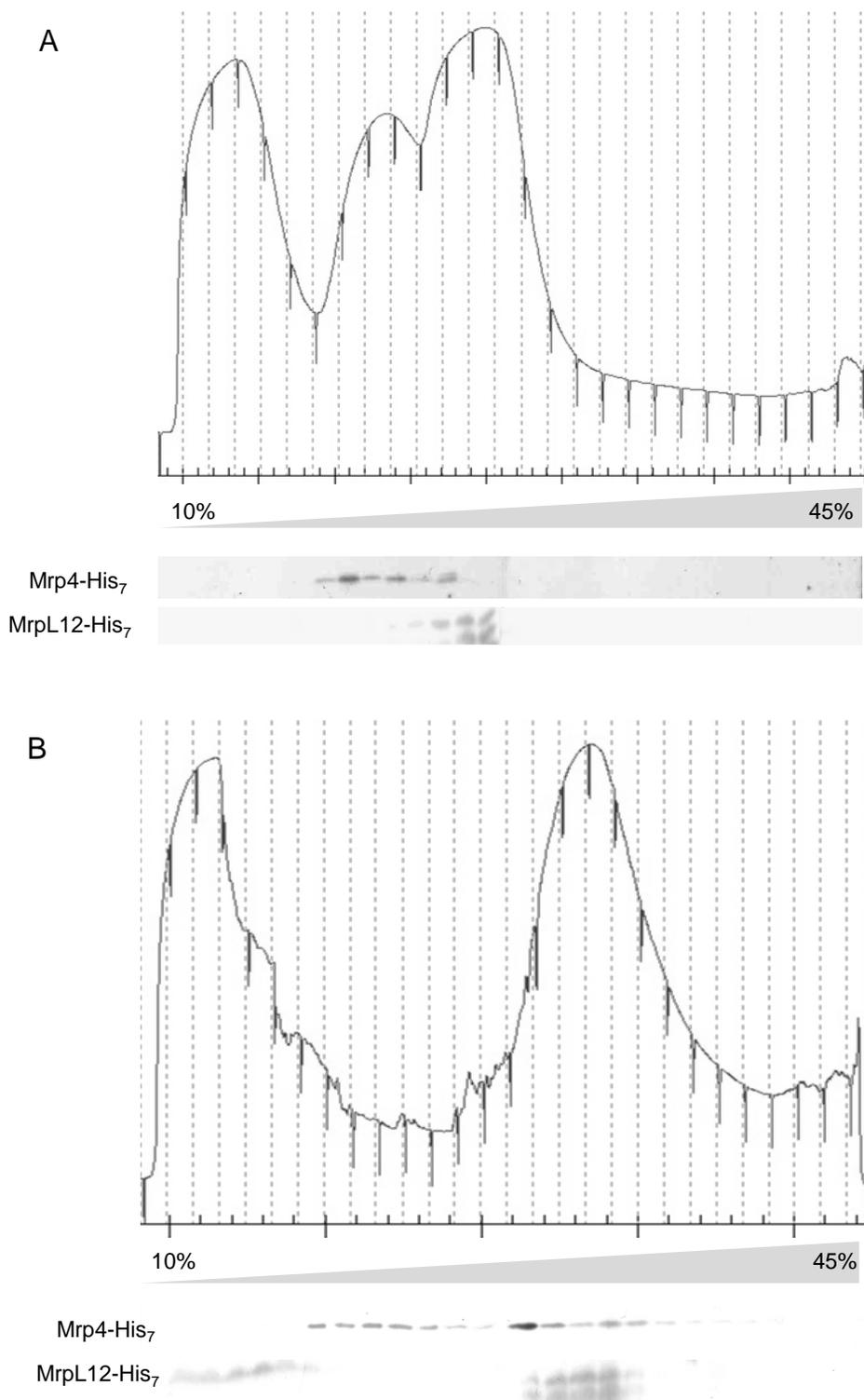


Figure 32: Analyse par gradient de saccharose des protéines ribosomales étiquetées dans une souche sauvage. Des tracés à 254nm représentatifs des ARN totaux sont représentés pour chaque gradient. Les protéines Mrp4 et MrpL12 sont révélées grâce à un anticorps anti-His. La révélation de MrpL12 nécessite une exposition plus longue. A) Extrait total obtenu en présence d'EDTA qui favorise la dissociation des sous-unité ribosomales. B) Extrait total obtenu en présence de MgCl₂ prévenant la dissociation des sous-unités du ribosome.

C. Caractérisation biochimique des protéines ribosomales choisies

1. Expression des constructions

Pour caractériser biochimiquement les nouvelles souches portant une ou deux étiquettes, les protéines totales ont été extraites et repérées avec un anticorps primaire dirigé contre l'étiquette hepta-histidine (Figure 30). Les résultats montrent que toutes les protéines étiquetées sont détectées à la taille attendue à l'exception de MrpL24-His₇, qui ne donne pas de signal. L'étiquette de cette protéine est peut-être dégradée rapidement et nous donc avons abandonné son étude. Par la suite, la protéine Mrp49 s'est avérée difficile à détecter dans les expériences de gradients de saccharose (voir paragraphe 3a), je me suis donc surtout concentré sur la souche étiquetée pour Mrp4 et MprL12.

2. Localisation cellulaire

Pour vérifier si les protéines Mrp4 et MrpL12 se trouvent bien dans la mitochondrie, j'ai réalisé un immunoblot sur des mitochondries purifiées et les fractions cytosoliques correspondantes. J'ai révélé ces blots avec un anticorps dirigé contre l'épitope hepta-histidine pour détecter les protéines ribosomales, et avec les anticorps dirigés contre Cox2 de *S. pombe* et Arg8 de *S. cerevisiae*. Le serum polyclonal anti-Arg8Sc a une réaction croisée avec la protéine homologue de *S. pombe* (Arg1). Cox2 et Arg1 sont des protéines connues pour être strictement mitochondriales, respectivement membranaire et matricielle (Figure 31). Cette expérience montre que Mrp4-His₇ et MrpL12-His₇ se trouvent comme Cox2 et Arg1 dans la fraction mitochondriale, et sont absentes de la fraction cytosolique. Mrp4 et MrpL12 sont donc bien des protéines mitochondriales.

3. Localisation subcellulaire

a. Comportement en gradient de saccharose

Les protéines étiquetées ont été choisies pour leur similarité avec des protéines ribosomales connues, cependant il était important de vérifier qu'elles se comportent bien comme des protéines ribosomales en gradient de saccharose.

J'ai donc utilisé des extraits totaux de protéines natives pour réaliser des fractionnements des sous-unités ribosomales sur un gradient de saccharose de 10 à 45%, en condition d'association (en présence de MgCl₂) ou de dissociation (en présence d'EDTA) du ribosome (Figure 32). Les fractions ont tout d'abord été analysées en mesurant la densité optique (DO) à 254 nm. Les fractions légères présentent dans toutes les conditions un pic correspondant probablement à des petites molécules n'entrant pas dans le gradient comme des ARNt. En présence de MgCl₂, un seul autre pic à 254 nm est observé, alors qu'en présence d'EDTA il existe deux pics à 254 nm. Ces pics de DO correspondent probablement aux ARNr des sous-unités ribosomales cytoplasmiques, qui sont quantitativement majoritaires. Cependant, nous avons émis l'hypothèse que les ARNr mitochondriaux et cytoplasmiques se trouvent essentiellement à la même position, étant donné que les gradients mis en œuvre ne sont pas suffisamment résolutifs pour séparer les ARNr de ces

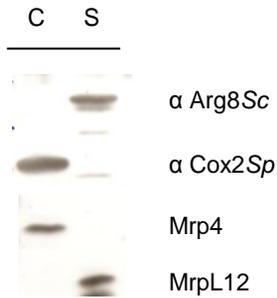


Figure 33 : Etude de l'interaction des protéines ribosomales avec les membranes. Protéines mitochondriales d'une souche doublement étiquetée Mrp4-His₇ MrpL12-His₇ traitées au carbonate en conditions alcalines pour séparer les protéines solubles (S) des protéines en interaction forte avec la membrane mitochondriale (C). L'anticorps anti Arg8Sc a une réaction croisée avec la protéine soluble de la matrice mitochondriale Arg1Sp. La protéine membranaire Cox2 est détectée grâce à un anti-peptide. Les protéines Mrp4 et MrpL12 sont détectées *via* un anti corps anti-His. C: Culot; S: Surnageant.

différents compartiments. Après précipitation des différentes fractions et analyse par Western blot avec l'anticorps anti-His, on observe qu'en présence de $MgCl_2$ Mrp4 et MrpL12 co-purifient dans les fractions correspondant au pic de DO à 254 nm. Mrp4 est également présente dans les fractions plus légères, qui correspondent probablement à la petite sous-unité du ribosome. En présence d'EDTA, Mrp4 est retrouvée dans les fractions correspondant au premier pic à 254 nm (c'est-à-dire les fractions plus légères) alors que MrpL12 co-purifie avec le second pic. Comme Mrp4 et MrpL12 sont mitochondriales, cela suggère fortement que ces pics de sous-unités des ribosomes cytoplasmiques incluent aussi les ribosomes mitochondriaux, et que Mrp4 et MrpL12 appartiennent bien respectivement à la petite et la grande sous-unité du ribosome mitochondrial.

b. Association aux membranes

La plupart des protéines codées par l'ADNmt sont hydrophobes et il est communément admis qu'au moins une partie des ribosomes mitochondriaux est en interaction avec la membrane mitochondriale, ce qui pourrait optimiser une insertion co-translationnelle des protéines mitochondriales néo-synthétisées. Aucune donnée n'existe chez *S. pombe* à ce sujet, il était donc important de tester le lien des protéines ribosomales étiquetées avec la membrane. Pour cela des mitochondries purifiées sont resuspendues dans un tampon contenant le carbonate de sodium en condition de pH alcalin. Pendant ce traitement les mitochondries sont lysées et une centrifugation à haute vitesse permet de séparer d'une part les membranes et les protéines associées qui se retrouvent au fond du tube (comme Cox2), et d'autre part les protéines solubles (comme Arg1) qui sont extraites par le carbonate. La Figure 33 montre que MrpL12 se comporte comme Arg1 et est donc une protéine soluble ou faiblement associée aux membranes, le traitement ayant permis de la décrocher. Par contre Mrp4 présente le même profil que Cox2. Ce résultat suggère une interaction forte entre la petite sous-unité du ribosome mitochondrial de *S. pombe* et la membrane, alors que la grande sous-unité serait plus libre. Ces données sont surprenantes car par exemple chez *S. cerevisiae* on considère plutôt que c'est la grande sous-unité du ribosome mitochondrial qui est en lien avec la membrane, au niveau du site de sortie des protéines néo-synthétisées dit « peptide exit channel », notamment *via* la protéine Oxa1 (Szyrach *et al.*, 2003 ; Jia *et al.*, 2003 ; voire Introduction Section III-A-3-c). Ce résultat a été reproduit plusieurs fois avec la souche Mrp4-His₇ MrpL12-His₇ mais il serait intéressant de voir si on peut le généraliser avec d'autres protéines des petites et grandes sous-unités du ribosome mitochondrial.

Chapitre II : Etude chez *S. pombe* de protéines à motif « peptidyl tRNA hydrolase »

A. Situation du sujet : rôle de Mrf1

La terminaison de la traduction mitochondriale implique la reconnaissance d'un codon stop, généralement UAA ou UAG, par un facteur de relargage ou « release factor », appelé chez les levures Mrf1 (voir Introduction Section III-B-2-d). Cette fonction est essentielle chez la levure *S. cerevisiae*, mais de manière surprenante elle est moins cruciale chez *S. pombe* et l'homme. En effet, alors que l'absence de Mrf1 conduit à un blocage de la traduction mitochondriale et une perte d'ADNmt chez *S. cerevisiae*, elle n'est délétère pour la croissance respiratoire qu'à haute température chez *S. pombe* (Pel *et al.*, 1992 ; Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007). De même, la déplétion du facteur orthologue mtRF1a chez l'homme entraîne un ralentissement de la croissance en milieu galactose mais n'a pas d'effet apparent sur la traduction mitochondriale ou sur l'accumulation des protéines néo-synthétisées dans la mitochondrie (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007).

Comment expliquer cette différence d'importance du facteur Mrf1 entre *S. cerevisiae* d'une part et *S. pombe* ou l'homme d'autre part ? La raison pourrait être liée à la structure même des ARNm mitochondriaux. Ceux de *S. cerevisiae* ont de grandes extensions 3'UTR alors que ceux de l'homme et *S. pombe* ont des extrémités 3'UTR très courtes ou inexistantes (Introduction section II-C-2). On peut donc imaginer que l'absence du facteur de terminaison Mrf1 soit plus drastique chez *S. cerevisiae* si la traduction arrive à se poursuivre de manière aberrante au delà du codon stop et génère de nouvelles et longues extrémités C-terminales sur les protéines en cours de synthèse. Mais il faut pour cela imaginer qu'en l'absence de Mrf1, le ribosome ne reste pas bloqué au niveau du codon stop, c'est-à-dire qu'il arrive à incorporer un ARNt chargé pour poursuivre sa lecture sur la partie 3'UTR de l'ARNm.

De plus, il est possible qu'il existe chez *S. pombe* et l'homme un mécanisme particulièrement efficace permettant de débloquent la traduction mitochondriale, libérer les peptides, et recycler les ribosomes et ARNt en absence du facteur de reconnaissance des codons stop. Ce type de mécanisme pourrait être médié par des facteurs Mrf1-like. Par exemple il a été mis en évidence chez l'homme qu'un facteur appelé mtRF1, qui n'est pas un facteur de terminaison classique (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007), pourrait débloquent la traduction en présence d'ARNm tronqués (Huynen *et al.*, 2012), jouant ainsi fonctionnellement le rôle de l'ARNtm des bactéries (voir Introduction Section IV-C-1). Chez *S. pombe*, il n'existe pas d'équivalent de mtRF1 humain, par contre quatre facteurs du type « peptidyl tRNA hydrolase » (Introduction Section IV-C-2-b) sont présents et pourraient jouer un rôle similaire (Tableau 15).

Tableau 15: Résumé des protéines à motif “peptidyl tRNA hydrolases” de *S. pombe*

Gènes	Taille (acides aminés)	Motif GGQ	Homologue chez <i>S. cerevisiae</i>	Homologue chez l'homme
<i>pth1</i> <i>SPBC2D10.15c</i>	218	-	Pth1	PTRH1
<i>pth2</i> <i>SPAC19A8.14</i>	205	-	Pth2	PTRH2
<i>pth3</i> <i>SPBC1105.18c</i>	162	+	Ylr281c	C12orf65
<i>pth4</i> <i>SPAC589.11</i>	182	+	Yol114c	ICT1

Pth3 et Pth4 semblent particulièrement intéressantes dans ce contexte puisqu'elles possèdent un motif GGQ comme Mrf1, au contraire de Pth1 et Pth2 (Figure 1 article 1). De plus Mauricette Gaisne au laboratoire a construit les délétions de *pth1* et *pth2* et observé qu'elles ne présentent pas de phénotype respiratoire. J'ai donc décidé de me concentrer sur Pth3 et Pth4. Les résultats sont inclus dans un article en préparation (§B, article 1) et sont aussi présentés en français avec des résultats supplémentaires (§C à H).

B. Article 1: Interactions between peptidyl tRNA hydrolase homologs and the ribosomal release factor Mrf1 in *S. pombe* mitochondria. Dujancourt L, Richter R, Chrzanowska-Lightowers Z, Bonnefoy N, Herbert CJ. En préparation.

Interactions between peptidyl tRNA hydrolase homologs and the ribosomal release factor Mrf1 in *S. pombe* mitochondria

Laurent Dujeancourt¹, Ricarda Richter^{2,3}, Zofia Chrzanowska-Lightowlers², Nathalie Bonnefoy¹, Christopher J. Herbert^{1,4}

¹ Centre de Génétique Moléculaire, UPR3404, FRC3115, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

² Mitochondrial Research Group, Institute of Cellular Medicine, Newcastle University, Framlington Place, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK

³ Present address: Institute of Genetics, University of Cologne, Zùlpicher Str. 47b, 50674 Cologne, Germany

Running title: Peptidyl tRNA hydrolases from fission yeast

Key words:

Fission yeast, mitochondria, translation, peptidyl tRNA hydrolase, release factor, mitochondrial ribosome tagging

⁴ Corresponding author:

Christopher J. Herbert

Centre de Génétique Moléculaire,

CNRS Bâtiment 26, 1 Avenue de la Terrasse

91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

Tel: 33 (1) 69 82 31 91 Fax: 33 (1) 69 82 31 60

herbert@cgm.cnrs-gif.fr

Abstract

Mitochondrial translation synthesizes key subunits of the respiratory complexes. In mitochondria of the fission yeast *Saccharomyces pombe*, the loss of Mrf1, the stop codon recognition factor, has a milder phenotype than expected, suggesting that other factors can play a role in translation termination. In *S. pombe* there are two predicted peptidyl tRNA hydrolases, Pth3 and Pth4 with a conserved GGQ motif. We show that high dosage of Pth4 can compensate for the absence of Mrf1 whereas the loss of Pth4 aggravates the lack of Mrf1. We show that Pth4 is a component of the mitochondrial ribosome that could help recycling stalled ribosomes.

Introduction

Mitochondria are essential organelles that are found in almost all eukaryotic cells, it is generally accepted that they arose from the endosymbiosis of a proteobacteria, closely related to *Rickettsia*, into a eukaryotic ancestor (Emelyanov, 2003). Their main function is to provide the cell with energy in the form of ATP, *via* the respiratory chain, a series of multi-protein complexes located in the inner mitochondrial membrane. Mitochondria contain their own genome, which encodes a small number of key subunits of the respiratory complexes, and most or all, of the RNAs needed for mitochondrial translation. The vast majority of the proteins involved in mitochondrial translation are of nuclear origin; thus both the respiratory complexes and the mitochondrial translation machinery are of dual genetic origin.

Due to the endosymbiotic origin of mitochondria, the mechanism of translation resembles the bacterial system; however, there are some differences, *e.g.* variations in the genetic code, the absence of a Shine-Dalgarno type ribosome binding site (sometimes replaced by specific translational activators), and a smaller set of tRNA and translation factors (reviewed in Herrmann *et al.*, 2012).

Another notable difference is that transcription is not an important point of regulation in mitochondria, possibly because in many systems proteins that are required in very different amounts are encoded by polycistronic mRNAs (Deshpande & Patel, 2012). Thus the post-transcriptional steps of mitochondrial RNA metabolism and especially translation are important control points of mitochondrial gene expression. Consequently, mitochondrial translation defects are a frequent cause of human diseases, both because this is a crucial step in respiratory complex biogenesis and because many mitochondrial and nuclear genes are involved in the mechanism and regulation of translation. Mutations causing mitochondrial diseases have been identified in mitochondrial genes encoding ribosomal RNAs (rRNA) and transfer RNAs (tRNA), and also by a number of nuclear mutations affecting mitochondrial ribosomal proteins, aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification enzymes, and translation factors (Ylikallio & Suomalainen 2012). Among the general translation factors, all disease mutations had been found in elongation factors, such as mtEF-Tu, mtEF-Ts and mtEFG1, but recently a mutation was identified in C12orf65, a predicted peptidyl tRNA hydrolase thought to act in translation termination and tRNA recycling (Antonicka *et al.*, 2010).

Peptide release from the ribosome is an essential part of the normal termination of translation, but it is also needed to unblock stalled ribosomes, for example when translation

has been initiated on a 3' truncated mRNA. It is clear that the cell has evolved a variety of release factors and mechanisms to deal with these different situations. Typically, bacteria contain two class I release factor RF1 and RF2 able to recognize the three stop codons (UAA, UAG and UGA), as well as a class II release factor, RF3, that hydrolyzes GTP to stimulate the removal of RF1 and RF2 from the ribosome and initiate ribosome recycling (for review Duarte *et al.*, 2012). In addition, bacteria like *Escherichia coli* contain at least three distinct systems to process stalled ribosomes: the tmRNA encoded by *ssrA* that initiates *trans* translation leading to termination, the peptidyl tRNA hydrolases Pth and YaeJ and finally ArfA, which recruits RF2 to stalled ribosomes (Singh & Varshney, 2004; Chadani *et al.*, 2011; Chadani *et al.*, 2012).

The situation appears to be simpler in mitochondria, for example there is only a single class I mitochondrial release factor (Mrf1 in yeast, mtRF1a in humans) recognizing all stop codons (UAA and UAG in mitochondria) (Pel *et al.*, 1992; Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007). To unblock stalled ribosomes mitochondria appear only to have peptidyl tRNA hydrolases (Antonicka *et al.*, 2010; Richter *et al.*, 2010), although recently mtRF1, a sequence homolog of mtRF1a, has also been proposed to play a role in this process (Huynen *et al.*, 2012).

The yeast *Schizosaccharomyces pombe* shares many characteristics with human cells and is a pertinent unicellular model to study the relationships between mitochondrial translation termination factors and the Pth proteins. First *S. pombe* is a petite-negative yeast, dependent upon mitochondrial function (Bulder, 1964). It has a compact mtDNA, like human cells, and consequently *S. pombe* mitochondrial mRNAs have very short 3'UTR extensions, again similar to human mitochondrial mRNAs. In addition *S. pombe* uses a set of mitochondrial translation factors very similar of that of human mitochondria (Chiron *et al.*, 2005). Among these, the ribosome recycling factor Rrf1 and the stop codon recognition factor Mrf1 can be replaced by their human homologs (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007; Rorbach *et al.*, 2008). Finally, the deletion of the *mrfl* gene in *S. pombe* has a very leaky phenotype, similar to the depletion of the human gene, suggesting that this factor is not essential or that proteins of overlapping function can be found.

We have searched for predicted peptidyl tRNA hydrolases from *S. pombe* and found Pth3 and Pth4, which are sequence homologs for human proteins C12orf65 and ICT1 respectively. In this paper, we have investigated the relationships between the *S. pombe* Pth genes and the Mrf1 release factor, and we find that Pth4 plays an overlapping role with Mrf1.

Materials and methods

Strains, plasmids, media and genetic methods

All the strains used in this study are described in Table 1 and were grown at 28°C or 36°C as indicated. Plasmids used or constructed during this work were derivatives of pGEM-T-easy (Promega), pDUAL-FFH1, pDUAL-YFH1 (Matsuyama *et al.*, 2004), pTG1754/Not (Bonnefoy *et al.*, 1996) and pSC49 (a *leu1* version of pTG1754, Chiron S., unpublished). The human *ICT1* and *C12orf65* ORFs lacking the start codon were cloned into pSC49 in fusion with *Neurospora crassa* F0-ATPase subunit 9 presequence (Rojo *et al.*, 1995). Media and genetic methods were as described in (Bonnefoy *et al.*, 1996 and 2000). *S. pombe* asci were microdissected directly from the mixture of haploid, diploid and sporulating cells.

HEK293-Flp-InTMT-RExTM cells (HEK293T) were from Invitrogen and were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with pyruvate and L-glutamine, supplemented with 1 X non-essential amino acids, 50 µg/ml uridine and 10 % foetal bovine serum; untransfected cells were routinely cultured with 10 µg/ml blasticidin and 100 µg/ml zeocin. Cells were transfected at ~30 % confluency as described in Rorbach *et al.*, (2008).

S. pombe transformation

S. pombe cells were transformed either by a chemical method or by electroporation. The Lithium acetate technique (Okazaki *et al.*, 1990) was improved by (1) using single stranded salmon sperm DNA as carrier, (2) regenerating cells in complete liquid medium overnight, (3) plating onto 5% glucose selective medium as described in Chiron *et al.*, (2007). The electroporation protocol was based on several published procedures (Suga *et al.*, 2000, 2001, 2004 and 2009). Cells were grown in YNB from Difco with 2 % glucose and supplements at 150 µg/ml to a density of about 1×10^7 cells/ml. Cells were harvested by centrifugation at 4 500 rpm for 5 minutes and resuspended in 0.1 volumes of 0.6 M sorbitol, 25 mM DTT, 20 mM HEPES pH 7.0, incubated at 30°C for 15 minutes and washed 3 times with 30 ml of ice cold 1 M sorbitol. The final cell pellet was resuspended at 10×10^9 cells/ml in 1 M sorbitol. At this point aliquots of 50 µl were used directly for electroporation, or 50 µl aliquots were frozen and stored at -80°C. For transformation, aliquots of frozen cells were rapidly thawed in a water bath at 30°C, centrifuged for 1 minute at 5 000 rpm, resuspended in 1 ml of ice cold 1 M sorbitol, centrifuged for 1 minute at 5 000 rpm and resuspended in ice

cold 1 M sorbitol to give 50 μ l. Up to 5 μ l of DNA in H₂O is added to the cell suspension. Immediately after electroporation 1 ml of 2 M sorbitol, 25 mM HEPES pH 7.0 is added and the mixture is incubated at 30°C for 10 minutes, after which 0.2 ml aliquots are plated directly on selective medium. When constructing gene replacements and gene fusions using an antibiotic resistance marker it is preferable to allow 3-5 hours of growth in rich glucose medium before plating on the selective medium. With 10 ng of plasmid DNA the transformation efficiency is routinely $1-2 \times 10^4$ transformants per μ g of DNA.

Construction of gene deletions in *S. pombe*

S. pombe gene deletions were constructed by the PCR method (Wach, 1996) using pFA6a-kanMX4 (carrying the *kan^R* gene that confers G418 resistance, Wach *et al.*, 1994). PCR fragments containing the *kan^R* gene were generated with hybrid oligonucleotides containing 75 to 80 bases of homology with the recipient *locus* on both sides of the gene of interest and transformed into NB205-6A or NB34-21A as described in Chiron *et al.*, (2007). [Kan^R] transformants able to grow in presence of the drug G418 were streaked again on selective medium, and the genomic DNA (Hoffman and Winston, 1987) of single colonies were analyzed by PCR to look both for the correct insertion of the deletion cassette and the absence of the wild type sequences. Colonies carrying the deletion were back-crossed to a wild type strain to verify the co-segregation of the G418 resistance with the gene deletion.

Construction of double mutants

To construct the various double mutants, single mutants were first crossed with a wild type to isolate spores of the opposite mating type: NB349-6D was an *h+* spore from the Δ *mrfl* strain NB329 (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007), NB334-5C was an *h+* spore from the Δ *mrfl ptp1-1* strain NB330 (Bonnefoy, unpublished) and NB338-1D was an *h+* spore from the Δ *pth3* strain KV8-7. Then, NB349-6D was crossed with KV8-7 to generate the LD5-4A Δ *mrfl* Δ *pth3* double mutant, NB334-5C was crossed with MG50-12 and MG50-24 to generate the *ptp1-1* Δ *mrfl* Δ *pth4* strains LD4-3B, 4C, 4D and LD8-9A respectively, and NB338-1D was then crossed with MG49-17 to generate the LD1-2B Δ *pth3* Δ *pth4* double mutant.

Epitope tagging of the mitochondrial ribosomal protein genes

The genes encoding proteins from the small (Mrp4) or large (MrpL12) ribosomal subunits were epitope tagged at their chromosomal locus using a PCR strategy similar to that of the gene deletion (Wach, 1996), except that the reverse primer used for the amplification of the *Kan^R* gene contained an in-frame His₇ tag coding sequence. The initial gene fusions were made in NBP9-725 by integrative transformation of PCR fragments. The constructions were verified by PCR amplification of the 5' section of the gene and the His₇ tag and sequencing. The expression of the tagged protein was then verified by Western blotting of whole cell extracts. CHP056 (producing Mrp4-His₇), was crossed to NB204-14B and sporulated to give CHP056-2A, which has the opposite mating type; CHP060 (producing MrpL12-His₇) and sporulated to give the doubled tagged strain CHP060-2D.

Integration of FLAG versions of the *pth* and *mrf1* genes

Plasmids containing the tagged *S. pombe pth3*, *pth4* and *mrf1* genes under the control of the *nmt1* promoter (Matsuyama *et al.*, 2006) were purchased from the RIKEN consortium and first tested for their ability to complement the corresponding mutants or the double $\Delta pth3$ $\Delta pth4$ mutant by transformation and selection for the *ura4* marker to maintain the plasmid in its replicative form. The tagged genes able to produce Pth3-YFP-FLAG-His₆, Pth4-YFP-FLAG-His₆ both complemented the gene deletions but the *mrf1*-YFP-FLAG-His₆ construct from the RIKEN carried several mutations and did not complement. To circumvent this problem, the *mrf1*-YFP-FLAG-His₆ plasmid was reconstructed by gap-repair, after PCR amplification of the *mrf1* ORF from genomic DNA. The complementing plasmids were cut by *NotI* and transformed into the corresponding $\Delta pth3$, $\Delta pth4$ or $\Delta mrf1$ mutants to integrate the tagged version into the *leu1* locus (see Matsuyama *et al.*, 2004), or in the CHP60-2D strain containing His₇ tagged versions of Mrp4 and MrpL12.

Purification of mitochondria, alkali treatment, immunoprecipitation and western blotting

Mitochondria were purified from *S. pombe* cells grown in complete glucose medium as described previously (Chiron *et al.*, 2007). Alkali carbonate extraction to separate membrane and soluble mitochondrial fractions were performed on purified mitochondria as described in Lemaire and Dujardin (2008). Mitochondria were purified from HEK923T cells as described in Rorbach *et al.*, (2010). For immunoprecipitation purified mitochondrial were treated with

DNase 1 and proteinase K to minimise unspecific contamination from cytosolic proteins, lysed and treated as described in Rorbach *et al.*, (2010). Protein samples were run on 10 or 12% SDS-PAGE before Western blotting. Primary antibodies were: anti-*S. cerevisiae* Arg8: 1/4 000 (Steele *et al.*, 1996); anti-*S. pombe* Cox2, 1/2 500 (Gaisne and Bonnefoy, 2006); anti-Flag, 1/1 000 (Sigma F185); anti-His 1/5 000 (Genscript); anti-MRPL3, 1/2 000, anti-MRPL12 1/1 000, anti-DAP3 1/1 000 (Abcam); anti-MRPS18B 1/4 000, anti-ICT1 1/800 (Proteintech Group). Secondary antibodies were diluted 1/10 000 fold.

Ribosome analysis

For *S. pombe*, cells were grown to an OD₆₀₀ of 1-1.5 in complete or minimal glucose medium as required; the cells were then washed and resuspended in 2x the pellet volume of lysis buffer (1% Triton X 100, 20 mM Hepes pH7.6, 40 mM KCl, 1mM PMSF, 1x protease inhibitors (Roche) and either 50 mM EDTA or 50 mM MgCl₂), then broken under freezing conditions using a French Press. The cell extracts were allowed to thaw on ice and then clarified by centrifugation at 15 000 rpm and 4°C for 10 minutes. The extracts (10 OD₂₆₀ units) were layered onto a 10 to 45% sucrose gradient in lysis buffer (25 mM KCl) containing either EDTA or MgCl₂ and centrifuged 39 000 rpm and 4°C for 3.5 hours in a SW41 rotor (Beckman). Gradient analysis was performed using an Isco Foxy R1 fractionator and continuously monitored at 254 nm. Typically, 30 fractions were collected. For subsequent Western blot analysis the samples were treated as described in Daugeron *et al.*, (2010).

For HEK293T cell line, the cells were harvested and washed once with PBS, resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 130 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 % Nonidet P-40, 1 mM PMSF and Roche EDTA protease inhibitor cocktail), 50 µl of cold lysis buffer for 10 mg of wet cell pellet. Samples were incubated on a rotating wheel for 30 minutes at 4°C prior to centrifugation at 15 000 rpm at 4°C for 10 minutes. The supernatants were used immediately, or stored at -80°C. For the ribosome analysis, 700 µg of protein was run on 10-30 % sucrose gradients.

Southern blot analyses

Total DNAs from cells grown in complete glucose medium were extracted as described previously (Hoffman & Winston, 1987) and run on a 1% agarose gel before transfer onto Hybond-C extra membranes. The blots were hybridized overnight at 65°C under standard saline conditions and after washing were exposed for a few hours, or up to 2 weeks. The

probes were the complete *S. pombe* mtDNA cloned in pBR322 (del Giudice *et al.*, 1983) labelled by Nick-translation with dATP³² (Amersham) and the 1.8 kb *HinDIII* fragment of *ura4* (Grimm *et al.*, 1988) labelled with dCTP³² using a random priming kit (Invitrogen).

³⁵S labeling of mitochondrial proteins

S. pombe cells were grown to early exponential phase in minimal 5% raffinose medium containing 0.1% glucose. Mitochondrial proteins were labeled at 30°C by a 3 hour incubation of whole cells with ³⁵S methionine and cysteine (Bioactif-Hartmann) in the presence of 10mg/ml cycloheximide (5 mg per reaction) which specifically blocks cytoplasmic translation. Proteins were extracted as described in Gouget *et al.*, (2008) and samples were run on 16% acrylamide – 0.5% bisacrylamide SDS gels. After drying, the gel was exposed to a film for one day or up to several weeks at -70°C, or onto a phosphorimager screen at room temperature.

Cytochrome spectra

Low temperature cytochrome spectra of *S. pombe* frozen cell pastes were recorded using a Cary 400 spectrophotometer after addition of sodium dithionite to fully reduce the cytochromes (Claisse *et al.*, 1970). The absorption maxima were 603, 560, 554 and 548 nm for cytochromes *aa3*, *b*, *c1* and *c* respectively. The *S. pombe* cytochrome *c* peak always shows a 544 nm shoulder that disappears in a cytochrome *c* mutant (N. Bonnefoy, unpublished).

Results

Localization of Mrf1, Pth3 and Pth4

In an attempt to further our understanding of the termination of mitochondrial translation in *S. pombe*, we decided to investigate the role of the mitochondrial Pth proteins and their possible interaction with the mitochondrial release factor, Mrf1. Crystallographic studies of the bacterial release factors, RF1 and RF2, in complex with the 70S ribosome show that the glutamine residue in a conserved GGQ motif is positioned in such a way that it can contribute directly to the hydrolysis of the peptidyl-tRNA bond (Laurberg *et al.*, 2008 and Weixlbaumer *et al.*, 2008). Figure 1 shows an alignment of this region of the Pth proteins from *S. pombe* and man, and *S. pombe* Mrf1. It is clear that the GGQ motif is conserved in the human Pth proteins and *S. pombe* Pth3 and 4, but absent from Pth1 and 2. We have deleted *pth1* and *pth2* and been unable to detect any respiratory phenotype (data not shown); these results and the sequence comparisons led us to focus our study on Pth3, Pth4 and Mrf1.

First we decided to determine the localization of the three proteins Mrf1, Pth3 and Pth4; to do this strains carrying triple tagged versions of the corresponding genes under the control of the thiamine repressible *nmt1* promoter were constructed as described in the Materials and Methods. Mitochondria were purified from these strains by cell fractionation and the mitochondria and post-mitochondrial supernatants were analyzed by western blot. The results, in Figure 2A, show that all three proteins were only found in the mitochondrial fraction. To further refine the localizations, purified mitochondria were treated with alkaline carbonate, which will solubilize proteins that are loosely attached to the membrane. Figure 2B shows that like the integral membrane protein Cox2, Pth3 and Pth4 were found uniquely in the membrane fraction, whereas Mrf1 partitioned between the membrane and soluble fraction. Thus Mrf1, Pth3 and Pth4 are all mitochondrial proteins, more-or-less tightly associated with the inner mitochondrial membrane.

Deletion of *pth3* and *pth4*

To determine if Pth3 and Pth4 have an important role in mitochondrial biogenesis the corresponding genes were deleted, the double mutant $\Delta pth3$, $\Delta pth4$ was constructed and the effect of the mutations on respiratory growth was examined. In *S. pombe*, an inability to grow on galactose indicates a strong respiratory deficiency (Chiron *et al.*, 2007), Figure 3A shows that all the deletion strains were able to grow on galactose. On glycerol/ethanol medium, the

deletion of *pht4* had no effect, but the deletion of *pht3* led to a slight reduction in growth, while the double deletion showed a clear reduction in respiratory growth. Low temperature cytochrome spectra of cell pastes (Figure 3B) showed that the $\Delta pht4$ strain had a wild type cytochrome spectrum, the $\Delta pht3$ strain showed a very slight diminution in the level of cytochrome *aa3* and this was accentuated in the $\Delta pht3$, $\Delta pht4$ double mutant. Taken together, these results show that Pth3 and Pth4 are not essential for respiratory growth, but they do have partially overlapping roles in mitochondrial biogenesis, with a particular effect on complex IV.

Interactions between *pht3* and *pht4*, and *mrfl*

In *S. pombe*, the deletion of *mrfl* does not lead to a complete respiratory deficiency (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007), so we decided to see if Pth3 or Pth4 had some functional overlap with Mrf1. To do this we looked at the effect on respiratory growth of deleting or over-expressing *pht3* and *pht4* in a $\Delta mrfl$ background.

The $\Delta pht3$, $\Delta mrfl$ double mutant was constructed by crossing the two single mutants and has the same respiratory phenotype as the $\Delta mrfl$ mutant (data not shown). However, when the $\Delta pht4$ and $\Delta mrfl$ strains were crossed, no viable double mutants were obtained; whenever $\Delta pht4$, $\Delta mrfl$ double mutants were expected in a tetrad, we observed micro-colonies that were unable to grow further, suggesting that $\Delta pht4$ and $\Delta mrfl$ are co-lethal. This phenotype was reminiscent of the deletion of the mitochondrial elongation factor mtEF-Tu, which is essential for mitochondrial translation (Chiron *et al.*, 2005). To circumvent this problem, we introduced the $\Delta pht4$ and $\Delta mrfl$ mutations into a *ptp1-1* background, which allows *S. pombe* to survive the loss of its mitochondrial genome (*rho*^o) and therefore a loss of mitochondrial translation (Haffter and Fox, 1992). The results in Figure 4A and B show that in the *ptp1-1* background we could obtain $\Delta pht4$, $\Delta mrfl$ double mutants, they showed a delayed germination, very slow growth on glucose and an absence of growth on galactose.

In *S. cerevisiae* it is well known that mitochondrial translation is essential for the maintenance of the mitochondrial genome (reviewed in Contamine and Picard, 2000), and in *S. pombe* *ptp1-1* strains lacking mtEF-Tu show a strong depletion in their mitochondrial genome (Chiron *et al.*, 2005). We decided to use Southern blotting to examine the level of the mitochondrial DNA in three independent $\Delta pht4$, $\Delta mrfl$ double mutants in the *ptp1-1* background, and they were compared to the isogenic wild type and the single mutants. Figure 4C shows that the three $\Delta pht4$, $\Delta mrfl$ double mutants present different levels of mitochondrial DNA, varying from essentially wild type to almost undetectable, suggesting

that the $\Delta pth4$, $\Delta mrf1$ double mutation leads to a depletion in the mitochondrial DNA and that the three samples are at different stages of depletion.

As the deletion of *pth4* considerably aggravates the $\Delta mrf1$ phenotype, we decided to determine if over-expression of *pth3* or *pth4* could improve the respiratory competence of the $\Delta mrf1$ strain. From the results in Figure 5A, it is clear that over-expression of *pth3* has no effect on the $\Delta mrf1$ phenotype, but over-expression of *pth4* significantly improves the respiratory growth of the $\Delta mrf1$ strain. To find out if this effect was due to a modification of mitochondrial translation, we looked at *de novo* mitochondrial protein synthesis in the same strains, as described in the Materials and Methods, and the results are shown in Figure 5B. For reasons that are unclear, neo-synthesized Cytb is often low in wild type *S. pombe* strains (Kühl *et al.*, 2011). These results show that with the exception of Cytb, the deletion of *mrf1* causes a severe reduction in all the neo-synthesized mitochondrial proteins. This pattern of synthesis is not affected by the over-expression of *pth3*, but the over expression of *pth4* significantly increases the neo-synthesis of all the mitochondrial translation products, compared to the $\Delta mrf1$ strain.

Taken together, the results in Figures 4 and 5 show that there is an overlap of function between *pth4* and *mrf1* and that this affects the level of the neo-synthesis of the mitochondrial proteins.

Association of the Pth proteins with the ribosome

It is well known that release factors bind to the large subunit of the ribosome (for a review see Youngman *et al.*, 2008). So considering the interactions between *pth3* and *pth4*, and *pth4* and *mrf1* we decided to see if the Pth proteins are associated with the mitochondrial ribosome. To do this triple tagged versions of *pth3* and *pth4* (YFP-FLAG-His₆) under the control of the thiamine repressible promoter *nmt1* were integrated into CHP060-2D (*mrp4-His₇*, *mrpl12-His₇*) at the *leu1* locus as described in the Materials and Methods. Whole cell extracts were fractionated on sucrose gradients (10-45 %) in the presence of EDTA, which will favorize the dissociation of the ribosomal subunits, or MgCl₂, which will stabilize the assembled ribosome; samples were collected and western blots were probed with anti-His₆ antibodies to reveal Pth4 as well as Mrp4 and MrpL12, which are markers of the small and large ribosomal subunits respectively. As the experiments were performed on whole cell extracts, the absorbance peaks at 254 nm are due to the cytoplasmic rRNAs, which are far more abundant than the mitochondrial rRNAs; however, because of the level of resolution of the gradients we would expect the cytoplasmic and mitochondrial rRNAs to be present in

essentially the same fractions, as indicated by the ribosomal marker proteins. In the presence of EDTA, we cannot detect any assembled ribosomes and Pth4 co-sediments with the large ribosomal subunit, indicated by the presence of MrpL12. In the presence of MgCl₂, we see some unassembled small ribosomal subunits, no unassembled large subunits and assembled ribosomes, indicated by the presence of Mrp4 and MrpL12; in this case, Pth4 co-sediments with the assembled ribosomes. Similar results were obtained for Pth3 (Figure S1). Thus both Pth3 and Pth4 co-sediment with the large ribosomal subunit and assembled ribosomes, suggesting that like release factors, they are associated with the large ribosomal subunit.

Are the functions of the Pth proteins conserved through evolution?

In man there are homologues of Pth3 and Pth4, called C12orf65 and ICT1 respectively. Initially, we decided to see if *C12orf65* and *ICT1* could alleviate the phenotype of the $\Delta mrfl$ mutant, to do this the ORFs were fused to the *N. crassa* F0-ATPase subunit 9 presequence and cloned into a yeast expression vector and then transformed into a $\Delta mrfl$ strain. The results in Figure 5A show that neither construction was able to improve the respiratory growth of the $\Delta mrfl$ strain.

Next we decided to determine if Pth4 is able to associate with the human mitochondrial ribosome. For this, the *pth4* ORF was cloned into a tetracycline inducible transfection vector, either with, or without the *N. crassa* F0-ATPase subunit 9 presequence and with a C-terminal FLAG epitope. These constructions were used to transfect HEK293 cells, transfectants were induced with tetracycline and tested for the expression of the FLAG epitope. Cells carrying the construction without the *N. crassa* F0-ATPase subunit 9 presequence showed a very low level of Pth4-FLAG expression and no mitochondrial import, but cells carrying the construction with the *N. crassa* F0-ATPase subunit 9 presequence showed a high level of Pth4-FLAG expression. A fraction of this Pth4-FLAG protein was imported into mitochondria and the size of the detected protein suggested that the presequence had been cleaved (see Figure S2).

The cell line expressing Pth4-FLAG was used to determine if the protein was associated with the human mitochondrial ribosome. HEK293T cells carrying either the Pth4-FLAG, or ICT1-FLAG were induced for three days, mitochondria were purified and treated with DNase 1 and proteinase K to minimise unspecific contamination from cytosolic proteins. The mitochondria were lysed and immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies; the eluates were then analysed by PAGE, silver staining and western blot. The results in Figure 7A show that the elution patterns are different and lower amounts of proteins are

eluted from the Pth4-FLAG immunoprecipitates. When examined by western blot (Figure 7B), proteins of the large ribosomal subunit (MRPL3 and MRPL12) and the small ribosomal subunit (DAP3 and MRPS18B) were detected in both eluates. The levels of the FLAG tagged proteins were similar in both eluates, but the levels were lower in the Pth4-FLAG eluate and native ICT1 was not detectable. This strongly suggests that Pth4 from *S. pombe* can interact with the human mitochondrial ribosome, but that the interaction is weaker than that of the native ICT1.

In human mitochondria, when ICT1 is depleted there is a conformational change in the 39S large ribosomal subunit, resulting in a shift of MRPL3 (a protein of the large ribosomal subunit) from fractions 6/7, to 5/6 in sucrose gradients (Richter *et al.*, 2010). To determine if Pth4-FLAG can suppress this phenotype, HEK293T-wt and HAK293T-Pth4-FLAG cells were treated with either a control (si-NT) or an ICT1 knockdown (si-ICT1) construction for three days, the cells were also induced with tetracycline. Cells were then harvested, lysed and 700 µg of each sample was run on 10-30 % sucrose gradients. The isolated fractions were analysed by western blot. In the HEK293T-wt cells treated with si-NT (Figure 8A), ICT1 was present principally in fraction 6, co-sedimenting with MRPL3 (fractions 6/7), whereas DAP3 a member of the small ribosomal subunit was present in fractions 4 and 5. The si-NT treated HAK293T-Pth4-FLAG cells showed a similar result. Upon depletion of ICT1 (Figure 8B), ICT1 was no longer detectable and MRPL3 was detected in fraction 5, and there was no difference between the HEK293T-wt and HAK293T-Pth4-FLAG cells; thus Pth4-FLAG is not able to suppress the ICT1 depletion phenotype. Significantly, in both experiments Pth4-FLAG was mainly detected in fractions 1-3 and not fractions 5 or 6, suggesting that under these conditions Pth4-FLAG is not associated with the large ribosomal subunit, even when ICT1 is depleted.

Discussion

The orderly termination of translation is a key step in the overall process of protein synthesis. In the *S. pombe* mitochondrial system, homology searches have identified a single class I release factor, Mrf1, but deletion of the corresponding gene only leads to a partial respiratory deficiency (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007 and Figure 4B). At present, it has not been definitively demonstrated that Mrf1 is a release factor, but we have shown that it is important for mitochondrial translation (Figure 5B) and Soleimanpour-Lichaei *et al.*, (2007) have shown that human mtRF1a, which recognizes the stop codons UAA and UAG, is able to complement the $\Delta mrf1$ mutation in *S. pombe*. Thus, the evidence strongly suggests that Mrf1 is a mitochondrial release factor; however, the partial phenotype of the $\Delta mfr1$ strain implies that despite the absence of sequence homologues, another protein can also act as a release factor.

Class I release factors are essentially tRNA mimics (Moffat and Tate, 1994) with conserved GGQ and PXT motifs that interact with the same centers in the A site of the ribosome as the CCA and anticodon loop of the tRNA (see Youngman *et al.*, 2008 for a review). Pth3 and 4 also contain the conserved GGQ motif and modeling of this domain indicates that it has a similar structure to the equivalent domain in Mrf1 (shown for Pth4 in Figure S3). However, both proteins are considerably smaller than Mrf1 and notably do not contain an equivalent to the PXT “anticodon” domain found in Mrf1. We have undertaken a preliminary investigation of Pth3 and 4 and their possible functional overlap with Mrf1.

We have shown that both Pth3 and Pth4 are mitochondrial proteins that co-sediment with the large ribosomal subunit and the assembled ribosome. The deletion of *pth4* gives no obvious phenotype, while the deletion of *pth3* gives a weak respiratory phenotype that is aggravated in the double deletion strain. However, the respiratory phenotype of the $\Delta pth3$, $\Delta pth4$ double mutant is still relatively mild (see Figure 4). Although it is tempting to speculate that this indicates some sort of functional over-lap between Pth3 and Pth4, in reality, this is far from clear considering that the phenotype is so weak and that over-expression of *pth4* in the $\Delta pth3$ strain does not improve the respiratory phenotype (data not shown).

The situation is more straightforward when we examine the interactions between the *pth* genes and *mrf1*. Our results give no indication of an interaction between *pth3* and *mrf1*; however, it is clear that there is some interaction between *pth4* and *mrf1*. Over-expression of *pth4* in a $\Delta mfr1$ strain increases the level of *de novo* translation and results in considerably improved respiratory growth, whilst deletion of *pth4* significantly aggravates the $\Delta mfr1$

phenotype. In a wild type *ptp1-1* background the $\Delta pth4$, $\Delta mrf1$ double mutant is essentially unviable and in a *ptp1-1* background it undergoes a depletion of its mitochondrial DNA (Figures 4 and 5), which indicates that the double mutant is deficient for mitochondrial translation (Chiron *et al.*, 2005). Thus in the absence of Mfr1, Pth4 is able to act as a release factor.

In man, C12orf65 and ICT1 are the sequence homologues of Pth3 and Pth4 respectively, and both important for mitochondrial translation. Knockdown of C12orf65 reduces complex IV activity by about 50 % but has a less drastic effect than knockdown of ICT1 (Kogure *et al.*, 2012). ICT1 has been shown to be a constituent of the large ribosomal subunit and intact ribosomes and to have a codon independent Pth activity (Richter *et al.*, 2010). We have shown that in *S. pombe* neither C12orf65 nor ICT1 can complement the respiratory deficiency of a $\Delta mrf1$ strain, (the phenotype of the $\Delta pth3$ strain is not sufficiently strong to allow meaningful complementation experiments). Also, when Pth4 is produced in HEK923T cells it is able to immunoprecipitate a small fraction of the mitochondrial ribosome; interestingly, native ICT1 cannot be detected in this immunoprecipitate suggesting that Pth4 may have displaced the native protein. If this is the case, it is probable that the interaction of Pth4 with the human mitochondrial ribosome is not fully active as it is not able to suppress the conformation change that occurs in the large ribosomal subunit upon ICT1 depletion (Figures 7 and 8).

In *Saccharomyces cerevisiae*, Mrf1 is essential for mitochondrial translation and the maintenance of the mitochondrial genome even though *S. cerevisiae* contains a sequence homologue of Pth4 (Yol114c). The reason for this difference between *S. cerevisiae* on the one hand and *S. pombe* and man, on the other is not clear. However, *S. cerevisiae* mitochondrial mRNAs have long 3' UTRs, while both *S. pombe* and man have very short, or nonexistent 3' UTRs; in *S. pombe* we have tried to construct a double mutant that is deficient for 3' processing of the mitochondrial mRNAs (and therefore has long 3' UTRs) and $\Delta mrf1$, but these functions are co-lethal (data not shown). This could suggest that the presence of a long 3' UTR somehow reduces the efficiency of Pth4.

We have shown that in the absence of Mrf1, Pth4 is able to act as a release factor, but it is not clear if this is part of the normal role of Pth4 in the wild type cell. Also, Pth3, Pth4 and Mrf1 all appear to be associated with the large ribosomal subunit and the associated ribosome, but it is not known whether different factors can be present on the same ribosome, or if the different factors define subpopulations of “different” ribosomes. Further experiments will be necessary to clarify the roles of the different release factors.

Acknowledgments

We are grateful to Mauricette Gaisne and Kelly Vasileiadou for the initial construction of the $\Delta pth4$ and $\Delta pth3$ mutants respectively and to Stéphane Chiron for the construction of the plasmid pSC49. We thank Geneviève Dujardin, Cristina Panozzo and Robert N. Lightowlers for fruitful discussions and critical reading of the manuscript, G.D. and Thomas D. Fox for the gift of antibodies. FLAG-tagged versions of the *pth3*, *pth4* and *mrf1* genes were distributed by the RIKEN Bioresource Center. This work was supported by the “Centre National de la Recherche Scientifique” and by grants to NB from the “Agence Nationale pour la Recherche” (JCJC06-0163) and the “Association Française contre les Myopathies” (MNM1-2012-15680). ZMACL would like to thank The Wellcome Trust (096919/Z/11/Z) for continuing support.

Litterature cited

- Antonicka, H., Ostergaard, E., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Wibrand, F., Pedersen, A.M., Rodenburg, R.J., van der Knaap, M.S., Smeitink, J.A., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Shoubridge, E.A., 2010. Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect. *American journal of human genetics* 87, 115-122.
- Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Brivet-Chevillotte, P., Dujardin, G., 1996. Cloning by functional complementation, and inactivation, of the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* gene ABC1. *Mol Gen Genet* 251, 204-210.
- Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O., Dujardin, G., 2000. The respiratory gene OXA1 has two fission yeast orthologues which together encode a function essential for cellular viability. *Molecular microbiology* 35, 1135-1145.
- Bulder, C.J., 1964. Lethality of the Petite Mutation in Petite Negative Yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 30, 442-454.
- Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., Abo, T., 2012. ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 86, 37-50.
- Chadani, Y., Ono, K., Kutsukake, K., Abo, T., 2011. *Escherichia coli* YaeJ protein mediates a novel ribosome-rescue pathway distinct from SsrA- and ArfA-mediated pathways. *Molecular microbiology* 80, 772-785.
- Chiron, S., Suleau, A., Bonnefoy, N., 2005. Mitochondrial translation: elongation factor tu is essential in fission yeast and depends on an exchange factor conserved in humans but not in budding yeast. *Genetics* 169, 1891-1901.
- Chiron, S., Gaisne, M., Guillou, E., Belenguer, P., Clark-Walker, G.D., Bonnefoy, N., 2007. Studying mitochondria in an attractive model: *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J) 372, 91-105.
- Claisse, M.L., Pere-Aubert, G.A., Clavilier, L.P., Slonimski, P.P., 1970. Method for the determination of cytochrome concentrations in whole yeast cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 16, 430-438.

- Contamine, V., Picard, M., 2000. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 281-315.
- Daugeron, M.C., Prouteau, M., Lacroute, F., Seraphin, B., 2010. The highly conserved eukaryotic DRG factors are required for efficient translation in a manner redundant with the putative RNA helicase Slh1. *Nucleic acids research* 39, 2221-2233.
- Del Giudice, L., Wolf, K., Manna, F., Massardo, D.R., 1983. Expression of cloned mitochondrial DNA from the petite negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* in *E. coli* minicells. *Mol Gen Genet* 191, 91-98.
- Deshpande, A.P., Patel, S.S., 2012. Mechanism of transcription initiation by the yeast mitochondrial RNA polymerase. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 930-938.
- Duarte, I., Nabuurs, S.B., Magno, R., Huynen, M., 2012. Evolution and diversification of the organellar release factor family. *Molecular biology and evolution* 29, 3497-3512.
- Emelyanov, V.V., 2003. Common evolutionary origin of mitochondrial and rickettsial respiratory chains. *Archives of biochemistry and biophysics* 420, 130-141.
- Gaisne, M., Bonnefoy, N., 2006. The COX18 gene, involved in mitochondrial biogenesis, is functionally conserved and tightly regulated in humans and fission yeast. *FEMS yeast research* 6, 869-882.
- Gouget, K., Verde, F., Barrientos, A., 2008. In vivo labeling and analysis of mitochondrial translation products in budding and in fission yeasts. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J) 457, 113-124.
- Grimm, C., Kohli, J., Murray, J., Maundrell, K., 1988. Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. *Mol Gen Genet* 215, 81-86.
- Haffter, P., Fox, T.D., 1992. Nuclear mutations in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* allow growth of cells lacking mitochondrial DNA. *Genetics* 131, 255-260.
- Herrmann, J.M., Woellhaf, M.W., Bonnefoy, N., 2012. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochimica et biophysica acta*.
- Hoffman, C.S., Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.
- Huynen, M.A., Duarte, I., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Nabuurs, S.B., 2012. Structure based hypothesis of a mitochondrial ribosome rescue mechanism. *Biology direct* 7, 14.
- Ikeuchi, H., Sando, Y., Tajima, S., Sato, M., Hosono, T., Maeno, T., Maeno, Y., Suga, T., Kurabayashi, M., Nagai, R., 2000. PL granule-induced pneumonia requiring mechanical ventilation. *Nihon Kokyuki Gakkai zasshi = the journal of the Japanese Respiratory Society* 38, 682-686.
- Iwai, K., Adachi, S., Takahashi, M., Moller, L., Udagawa, T., Mizuno, S., Sugawara, I., 2000. Early oxidative DNA damages and late development of lung cancer in diesel exhaust-exposed rats. *Environmental research* 84, 255-264.
- Kogure, H., Hikawa, Y., Hagihara, M., Tochio, N., Koshihara, S., Inoue, Y., Guntert, P., Kigawa, T., Yokoyama, S., Nameki, N., 2012. Solution structure and siRNA-mediated knockdown analysis of the mitochondrial disease-related protein C12orf65. *Proteins* 80, 2629-2642.
- Kuhl, I., Dujeancourt, L., Gaisne, M., Herbert, C.J., Bonnefoy, N., 2011. A genome wide study in fission yeast reveals nine PPR proteins that regulate mitochondrial gene expression. *Nucleic acids research* 39, 8029-8041.
- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., Noller, H.F., 2008. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* 454, 852-857.

- Lemaire, C., Dujardin, G., 2008. Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria : activity measurement and subunit composition analysis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 432, 65-81.
- Matsuyama, A., Shirai, A., Yashiroda, Y., Kamata, A., Horinouchi, S., Yoshida, M., 2004. pDUAL, a multipurpose, multicopy vector capable of chromosomal integration in fission yeast. *Yeast* (Chichester, England) 21, 1289-1305.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., Yoshida, M., 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature biotechnology* 24, 841-847.
- Moffat, J.G., Tate, W.P., 1994. A single proteolytic cleavage in release factor 2 stabilizes ribosome binding and abolishes peptidyl-tRNA hydrolysis activity. *The Journal of biological chemistry* 269, 18899-18903.
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K., Okayama, H., 1990. High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research* 18, 6485-6489.
- Pearson, C., Rinehart, K.L., Sugano, M., Costerison, J.R., 2000. Enantiospecific synthesis of N-Boc-Adda: a linear approach. *Organic letters* 2, 2901-2903.
- Pel, H.J., Rep, M., Grivell, L.A., 1992. Sequence comparison of new prokaryotic and mitochondrial members of the polypeptide chain release factor family predicts a five-domain model for release factor structure. *Nucleic acids research* 20, 4423-4428.
- Rasweiler, J.J.t., Badwaik, N.K., Sugarbaker, T.A., 2000. Unusual patterns of intermediate filament protein expression by the trophoblast and decidual cells of the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata*. *Placenta* 21, 853-869.
- Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P.M., Wessels, H.J., Huynen, M.A., Smeitink, J.A., Lightowlers, R.N., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., 2010. A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *The EMBO journal* 29, 1116-1125.
- Rojo, E.E., Stuart, R.A., Neupert, W., 1995. Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP. *The EMBO journal* 14, 3445-3451.
- Rorbach, J., Richter, R., Wessels, H.J., Wydro, M., Pekalski, M., Farhoud, M., Kuhl, I., Gaisne, M., Bonnefoy, N., Smeitink, J.A., Lightowlers, R.N., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., 2008. The human mitochondrial ribosome recycling factor is essential for cell viability. *Nucleic acids research* 36, 5787-5799.
- Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., 2000. The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO reports* 1, 282-286.
- Singh, N.S., Varshney, U., 2004. A physiological connection between tmRNA and peptidyl-tRNA hydrolase functions in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 32, 6028-6037.
- Soleimanpour-Lichaei, H.R., Kuhl, I., Gaisne, M., Passos, J.F., Wydro, M., Rorbach, J., Temperley, R., Bonnefoy, N., Tate, W., Lightowlers, R., Chrzanowska-Lightowlers, Z., 2007. mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG. *Molecular cell* 27, 745-757.
- Steele, P.A., Aromataris, E.C., Riederer, B.M., 1996. Endogenous opioid peptides in parasympathetic, sympathetic and sensory nerves in the guinea-pig heart. *Cell and tissue research* 284, 331-339.

- Suga, M., Isobe, M., Hatakeyama, T., 2000. Cryopreservation of competent intact yeast cells for efficient electroporation. *Yeast (Chichester, England)* 16, 889-896.
- Suga, M., Hatakeyama, T., 2001. High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* pretreated with thiol compounds by electroporation. *Yeast (Chichester, England)* 18, 1015-1021.
- Suga, M., Kusanagi, I., Hatakeyama, T., 2004. Electroporation of *Schizosaccharomyces pombe* by hyperosmotic post-pulse incubation. *BioTechniques* 36, 218-220.
- Suga, M., Hatakeyama, T., 2009. Gene transfer and protein release of fission yeast by application of a high voltage electric pulse. *Analytical and bioanalytical chemistry* 394, 13-16.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., Philippsen, P., 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 10, 1793-1808.
- Wach, A., 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 12, 259-265.
- Weixlbaumer, A., Jin, H., Neubauer, C., Voorhees, R.M., Petry, S., Kelley, A.C., Ramakrishnan, V., 2008. Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome. *Science (New York, N.Y)* 322, 953-956.
- Yahata, K., Mori, K., Arai, H., Koide, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Sugawara, A., Ozaki, S., Tanaka, I., Nabeshima, Y., Nakao, K., 2000. Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 78, 389-394.
- Ylikallio, E., Suomalainen, A., 2012. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of medicine* 44, 41-59.
- Youngman, E.M., McDonald, M.E., Green, R., 2008. Peptide release on the ribosome: mechanism and implications for translational control. *Annual review of microbiology* 62, 353-373.

Figure legends

Figure 1 Multiple alignment of part of Mrf1 from *S. pombe* with all the *S. pombe* Pth proteins (Pth1 to 4) and two human Pth proteins, C12orf65 and ICT1

The alignment was performed using the full length protein sequences and the BCM Launcher algorithm but only the region containing Mrf1 GGQ motif is shown. Pth1: Spbc2D10.15c; Pth2: Spac19a8.14; Pth3: Spbc1105.18c; Pth4: Spac589.11.

Figure 2 Mitochondrial localization and membrane association of Pth3, Pth4 and Mrf1

Mitochondria were purified from cells tagged to produce His₆-tagged versions of Pth3, Pth4 or Mrf1 (LD63-1, LD64-1 and LD65-1 respectively) at their chromosomal *loci*. **A.** The post-mitochondrial supernatant corresponding to the cytosolic fraction (C) and purified mitochondria (M) were loaded on a 15% polyacrylamide gel and analyzed by western blotting with antibodies recognizing the His₆-tag, the *S. pombe* Cox2 protein and the *S. cerevisiae*

Arg8 protein. In *S. pombe* anti-Arg8 detects both Arg1, the *S. pombe* mitochondrial Arg8 homolog, and an unknown cytosolic protein. An equal amount of protein was loaded in each lane. **B.** Purified mitochondria were alkali-treated to separate the soluble (S) and membrane fraction (P), the total protein in each fraction was loaded on a 15 % polyacrylamide gel and analyzed by western blot as in panel A.

Figure 3 Phenotypic and spectral analysis of the *pth* gene deletions

The growth and cytochrome spectra were analyzed for a tetratype issued from the cross between a $\Delta pth3$ and a $\Delta pth4$ mutant. **A.** Serial ten-fold dilutions of overnight cultures were spotted onto complete medium containing the indicated carbon sources. Galactose and glycerol are both used to reveal respiratory growth defects in *S. pombe*. Photographs were taken after 5 (glucose), 8 (galactose) and 10 (glycerol/ethanol) days. **B.** Cells grown for 2 days on complete glucose medium were used to record low-temperature cytochrome spectra after fully reducing the cytochromes with dithionite. The peaks corresponding to cytochrome *aa*₃, *b*, *c*₁ and *c* are indicated.

Figure 4 Genetic interactions between *mrf1* and *pth4*

$\Delta mrf1$ and $\Delta pth4$ cells carrying the *ptp1-1* mutation, which allows the loss of the mitochondrial DNA, were crossed and tetrads were dissected to isolate double mutants. **A.** Photograph of the germination of a tetrad corresponding to a tetratype. **B.** Serial ten-fold dilutions of cultures from the tetrad in A were spotted on complete medium containing glucose or galactose as main carbon source. **C.** Southern blot analysis of various *ptp1-1* strains: wild type, single mutations and three $\Delta mrf1$, $\Delta pth4$ double mutations. Genomic DNAs were extracted, digested with *Hin*DIII and hybridized successively with the full mitochondrial DNA cloned in pBR322, or with the nuclear gene, *ura4*. The right panel corresponds to an overexposure of the blot probed with the mitochondrial DNA. The DNA marker (Raoul I, Appligène, Strasbourg, France) hybridizes with pBR322 sequences. Sizes of the detected mtDNA fragments are the following: 4314, 4077, 3403, 2455, 2114, 1651 and 1156 bp. The *Hin*DIII *ura4* gene fragment is 1.8 kb long.

Figure 5 *Pth4* is a high copy suppressor of $\Delta mrf1$

A. $\Delta mrf1$ cells were transformed with leucine plasmids expressing either the *S. pombe pth* genes (*pth3*, *pth4*) or their human sequence homologs (*C12orf65*, *ICT1*), or with the empty vector pSC49. The growth of the transformants was compared to that of the wild type by

spotting ten-fold serial dilutions of each strain onto minimal medium lacking leucine or complete galactose medium supplemented with 0.1% glucose. The plates were incubated for 7 and 10 days respectively. **B.** Mitochondrial proteins from the four first strains of panel A were labeled with [³⁵S] cysteine and methionine in presence of cycloheximide and separated on a 16% polyacrylamide gel. An autoradiograph of the full dried gel is presented, as well as a portion of the coomassie blue stained gel to serve as a loading control.

Figure 6 Sucrose gradient analysis of Pth4 in whole cell extracts

Whole cell extracts from the strain LD64-1 producing Pth4-His₆, as well as Mrp4-His₇ and MrpL12-His₇ were made in the presence of EDTA, which favors ribosome dissociation (**A**) and in the presence of MgCl₂, which favors ribosome association (**B**). These extracts were layered onto 10 to 45 % sucrose gradients. Thirty fractions were collected after centrifugation. The absorbance trace at 254 nm, corresponding to RNA is shown, as well as a western blot analysis of the fractions with an anti-His₆ epitope antibody, which can recognize all three tagged proteins. Note that a longer exposure is generally needed to detect MrpL12-His₇.

Figure 7 Yeast Pth4-FLAG is able to immunoprecipitate human mitochondrial ribosomal proteins

HEK923T-ICT1-FLAG and HEK293T-Pth4-FLAG cell lines were induced for 3 days with 1 µg/ ml tetracycline. Mitochondria were purified and lysed, the lysates were then used for immunoprecipitation *via* the FLAG tag. 10 % of the elution fractions were analysed PAGE and western blot. **A.** Silver staining of the PAGE of the elution fractions, * indicates the FLAG tagged protein. **B.** Western blot using antibodies against MRPL3, MRPL12, ICT1, DAP3 and MRPS18B to determine the relative level of ribosomal proteins immunoprecipitated by Pth4-FLAG and ICT1-FLAG. To verify the presence of the FLAG tagged protein in each elution fraction FLAG antibodies were also applied.

Figure 8 Pth4-FLAG cannot suppress the mitochondrial ribosomal defect caused by ICT1 depletion

HEK293T-WT and HEK293T-Pth4-FLAG cells were treated with si-NT (**A**), or si-ICT1 (**B**), respectively, for 3 days; at the same time the cultures were treated with tetracycline to induce the FLAG tagged protein. Cells were then harvested and lysed. Lysates (700 µg) were run on 10-30 % to sucrose gradients. The fractions 1-10 were analyzed

by western blotting using anti-ITC1 antibodies to ensure ICT1 depletion in the siRNA targeting samples. The ribosomal profile in each sample was determined using anti-MRPL3 and anti-DAP3 antibodies and the distribution of Pth4-FLAG was determined by using anti-FLAG antibodies.

Supplementary Figures

Figure S1 Sucrose gradient analysis of Pth3 in whole cell extracts

Whole cell extracts from the strain LD63-1 producing Pth3-His₆ protein, as well as Mrp4-His₇ and MrpL12-His₇ were made in the presence of EDTA, which favors ribosome dissociation (**A**) and in the presence of MgCl₂, which favors ribosome association (**B**). These extracts were layered onto 10 to 45 % sucrose gradients. Thirty fractions were collected after centrifugation. The absorbance trace at 254 nm, corresponding to RNA is shown. A western blot analysis of every other fraction with an anti-His₆ epitope antibody, which can recognize all three tagged proteins is presented under the OD trace. Note that a longer exposure is generally needed to detect MrpL12-His₇.

Figure S2 Cellular localization of Pth4-FLAG within human cells HEK293T

Production of the *N. crassa* F0-ATPase subunit 9 presequence fused to Pth4-FLAG was induced in HEK293T cells for 3 days. Cell lysate (50 µg, lane 1) and 10 µg of isolated mitochondria, untreated (lane 2) or treated with proteinase K, in the absence (lane 3) or presence of 1% Triton X-100 (lane 4) were analyzed by western blot. Pth4-FLAG was identified using anti-FLAG antibodies and antibodies against MRPS18B, a member of the human mitochondrial ribosomal small subunit were used as a positive control. The expected molecular weight of the Pth4-FLAG fusion protein is 29 kDa, the observed molecular weight is ~21.5 kDa, suggesting that the N-terminal presequence has been removed by proteolytic cleavage.

Figure S3 Comparison of the predicted secondary structure of Mrf1 and Pth4

Predicted secondary structures for residues 68 to 385 from Mrf1 (blue) and 47 to 137 from Pth4 (red) were retrieved from the Modbase databank under accession numbers Q09691 and Q9HDZ3 respectively. Beta sheets are indicated as arrows and alpha helices as helicoïdal structures, the conserved GGQ motif is in green. When the structures are merged, residues 285 to 321 of Mrf1 overlaps residues 77 to 137 of Pth4. The C-terminal region of Pth4

appears unstructured in all predictions, so for the sake of clarity we have used partial sequences for the modelization.

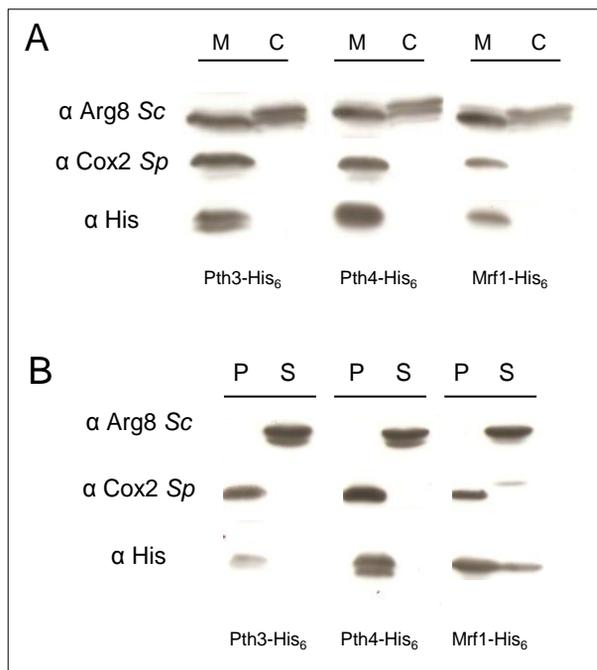
Tables

Table 1: *S. pombe* strains used in this work

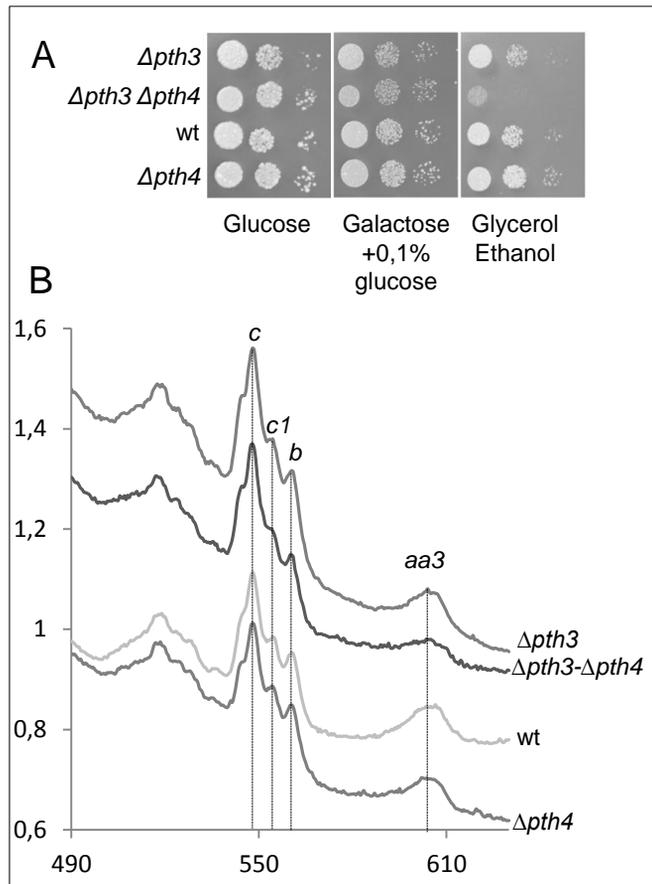
Strain name	Genotype	Reference
NB205-6A	<i>h- ade6-M216 ura4-D18 his3Δ leu1-32</i>	Chiron <i>et al.</i> , 2005
NB34-21A	<i>h- ade6-M216 ura4-D18 his3Δ leu1-32 ptp1-1</i>	Chiron <i>et al.</i> , 2005
NBp9-725	<i>h+ ade6-M216 leu1-32</i>	Bonnefoy, unpublished
NB204-14B	<i>h- ade6M-210, his3Δ</i>	Bonnefoy, unpublished
CHP056	<i>h+ ade6-M216 leu1-32 mrp4-His7::kan^R</i>	This work
CHP056-2A	<i>h- ade6M-210 his3Δ mrp4-His7::kan^R</i>	This work
CHP060	<i>h+ ade6-M216 leu1-32 mrpl12-His7::kan^R</i>	This work
CHP060-2D	<i>h+ ade6 leu1-32 mrp4-His7::kan^R mrpl12-His7::kan^R</i>	This work
LD63-1	<i>h+ ade6 leu1-32 mrp4-His7::kan^R mrpl12-His7::kan^R pth3-YFP-FLAG-His₆</i>	This work
LD64-1	<i>h+ ade6 leu1-32 mrp4-His7::kan^R mrpl12-His7::kan^R pth4-YFP-FLAG-His₆</i>	This work
LD65-1	<i>h+ ade6 leu1-32 mrp4-His7::kan^R mrpl12-His7::kan^R mrfl-YFP-FLAG-His₆</i>	This work
KV8-7	<i>h- ade6-M216 ura4-D18 his3Δ leu1-32 pth3::kan^R</i>	This work
NB338-1D	<i>h+ ura4-D18 leu1-32 pth3::kan^R</i>	This work
MG49-17	<i>h- ade6-M216 his3Δ leu1-32 ura4-D18 pth4::kan^R</i>	This work
MG50-12	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4 ptp1-1 pth4::kan^R</i>	This work
MG50-24	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4 ptp1-1 pth4::kan^R</i>	This work
LD1-2A	<i>h? ade6 ura4-D18 leu1-32 pth3::kan^R</i>	This work
LD1-2B	<i>h? ura4-D18 his3Δ leu1-32 pth3::kan^R pth4::kan^R</i>	This work
LD1-2C	<i>h? ade6 ura4-D18 leu1-32</i>	This work
LD1-2D	<i>h? ura4-D18 his3Δ leu1-32 pth4::kan^R</i>	This work
NB329-1	<i>h- ade6-M216 his3Δ leu1-32 ura4-D18 mrfl::Kan^R</i>	Soleimanpour-Lichaei <i>et al.</i> , 2007
NB349-6D	<i>h+ leu1-32 his3Δ mrfl::kan^R</i>	This work
NB334-5C	<i>h+ ade6 ura4 leu1-32 ptp1-1 mrfl::kan^R</i>	This work
LD5-4A	<i>h? leu1-32 his3Δ pth3::kan^R mRF1::kan^R</i>	This work
LD7-1B	<i>h? ura4 leu1-32 pth4::kan^R mRF1::kan^R ptp1-1</i>	This work
LD7-3B	<i>h? ura4 leu1-32 pth4::kan^R mRF1::kan^R ptp1-1</i>	This work
LD7-4A	<i>h? ura4 leu1-32 mRF1::kan^R ptp1-1</i>	This work
LD7-4B	<i>h? ade-M216 ura4 leu1-32 ptp1-1</i>	This work
LD7-4C	<i>h? ade-M216 ura4 leu1-32 pth4::kan^R ptp1-1</i>	This work
LD7-4D	<i>h? ura4 leu1-32 pth4::Kan^R mRF1::Kan^R ptp1-1</i>	This work
LD8-9A	<i>h? ura4 leu1-32 pth4::kan^R mRF1::kan^R ptp1-1</i>	This work

All strains contain 3 mitochondrial introns

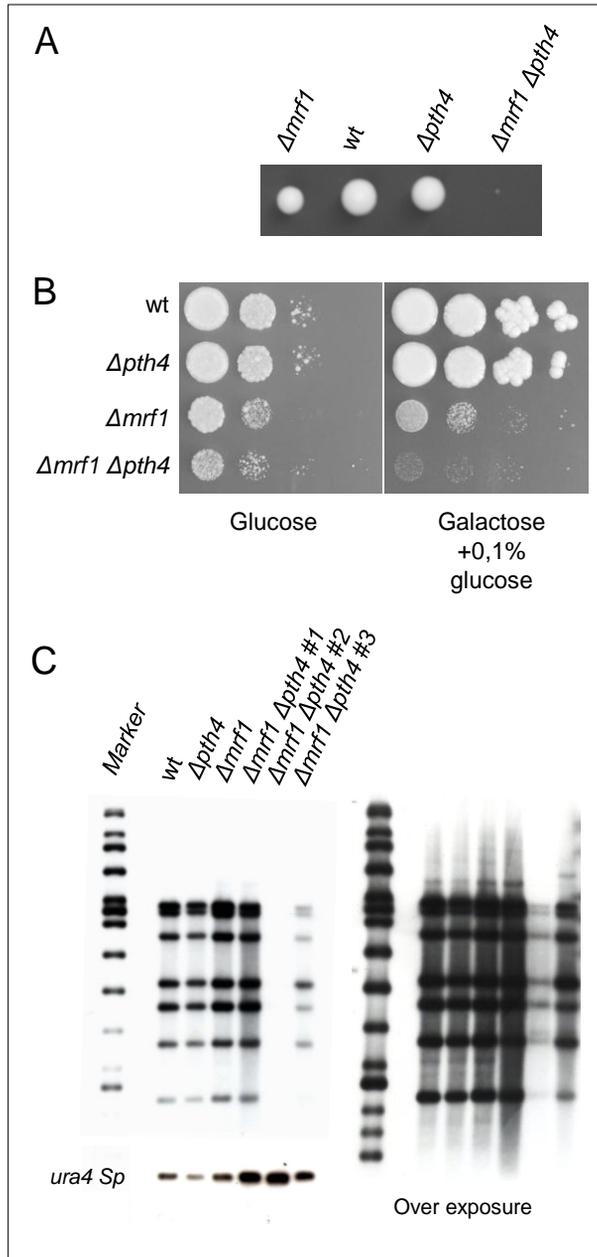
<i>Sp</i> Mrf1	257	K	I	E	V	M	R	S	R	G	A	G	Q	H	V	N	R	T	E	S	277	
<i>Sp</i> Pth1	118	D	L	G	K	V	K	L	R	L	P	G	G	S	H	R	G	H	N	G	I	138
<i>Sp</i> Pth2	179	G	S	A	T	V	L	G	I	G	P	G	P	V	S	V	I	N	E	V	T	199
<i>Sp</i> Pth3	53	E	E	T	F	I	C	G	K	G	P	G	G	Q	K	I	N	K	T	S	I	73
<i>Sp</i> Pth4	49	Q	I	S	F	S	R	S	S	G	P	G	G	Q	N	V	N	K	L	N	T	69
<i>Hs</i> C12orf65	60	E	E	Q	F	V	K	G	H	G	P	G	G	Q	A	T	N	K	T	S	N	80
<i>Hs</i> ICT1	77	T	I	S	Y	C	R	S	S	G	P	G	G	Q	N	V	N	K	V	N	S	95



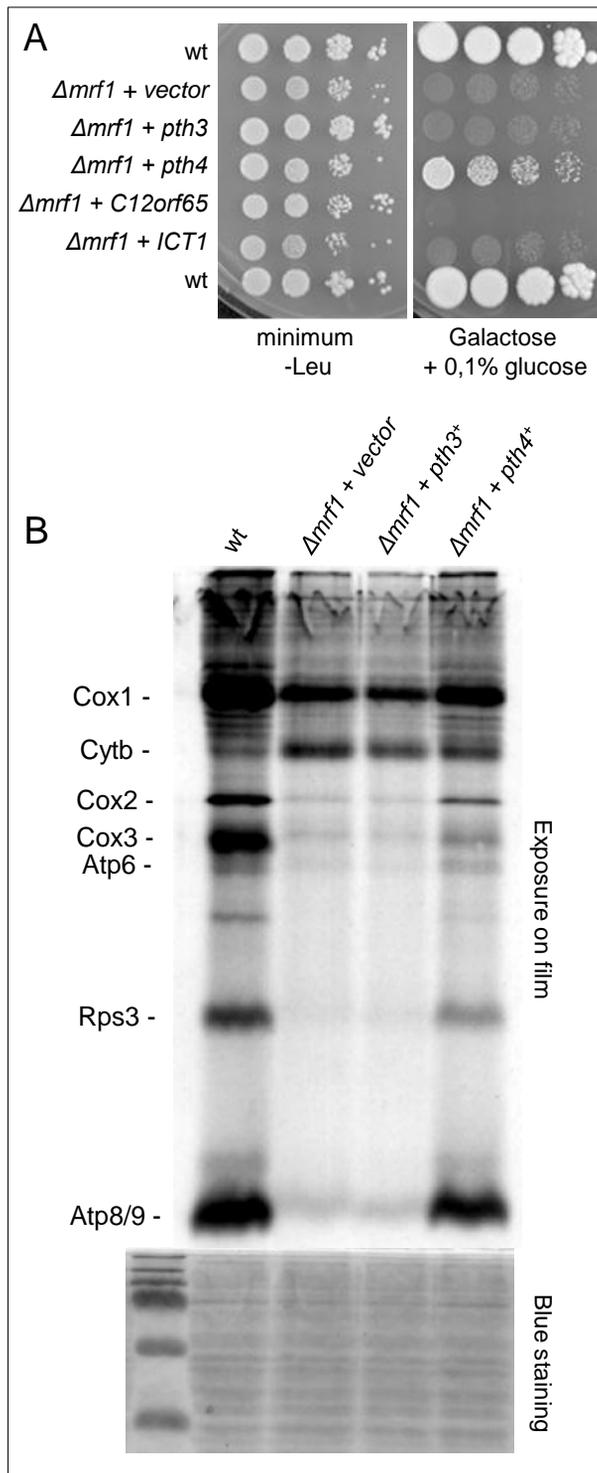
Dujeancourt et al., Figure 2



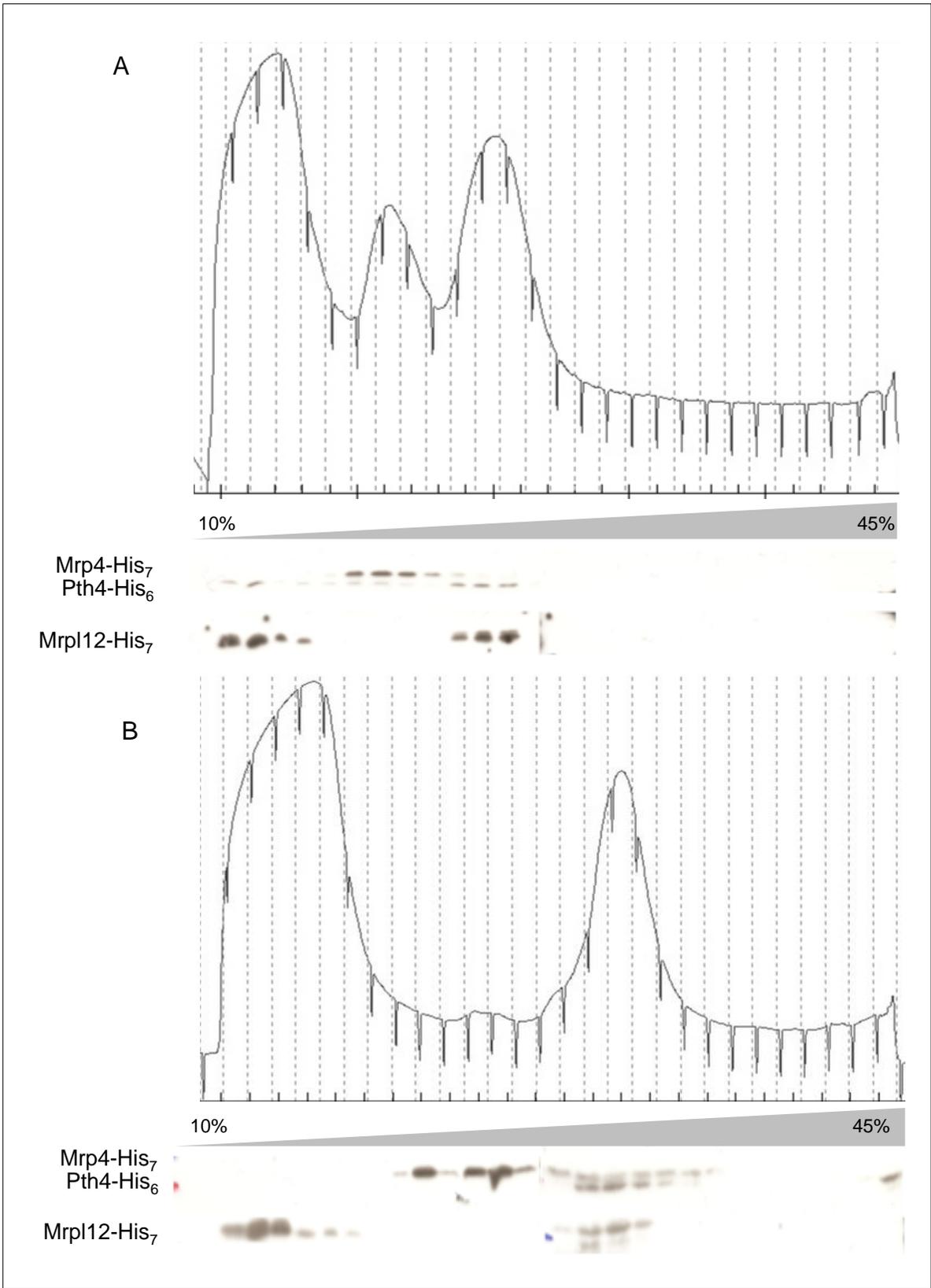
Dujeancourt et al., Figure 3



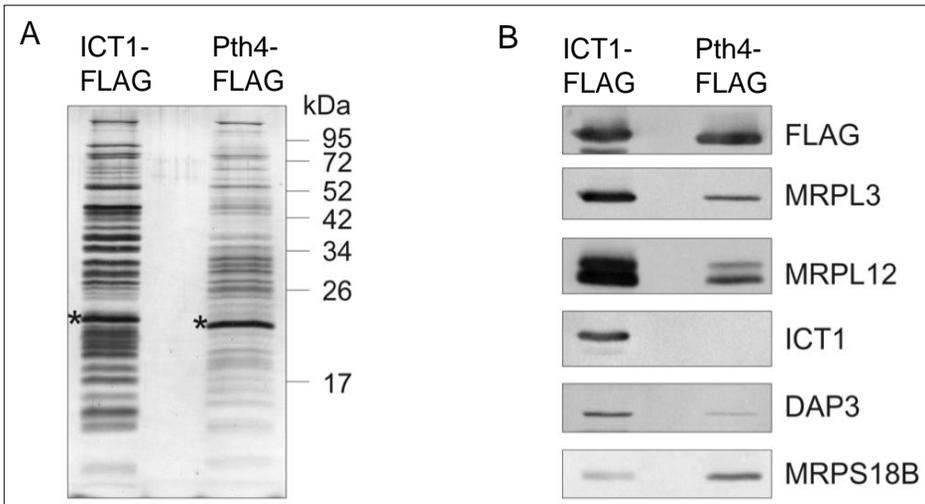
Dujeancourt et al., Figure 4



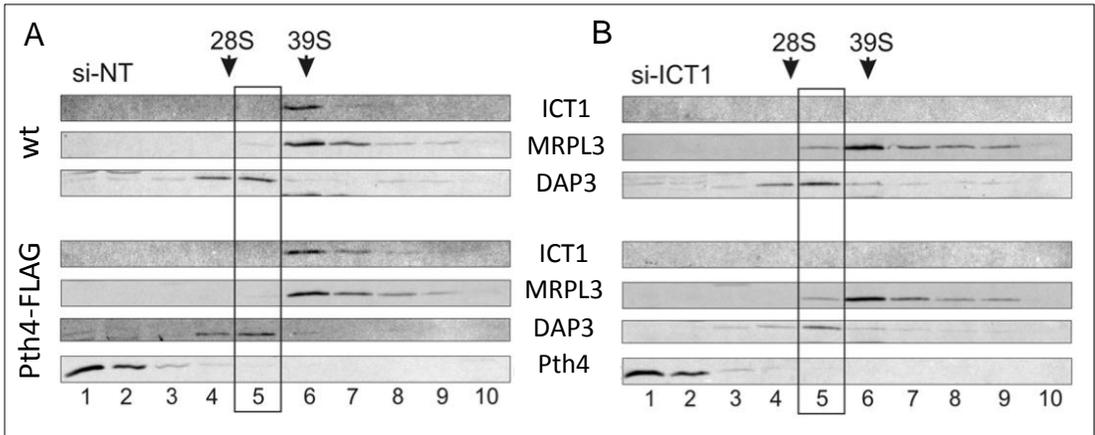
Dujeancourt et al., Figure 5



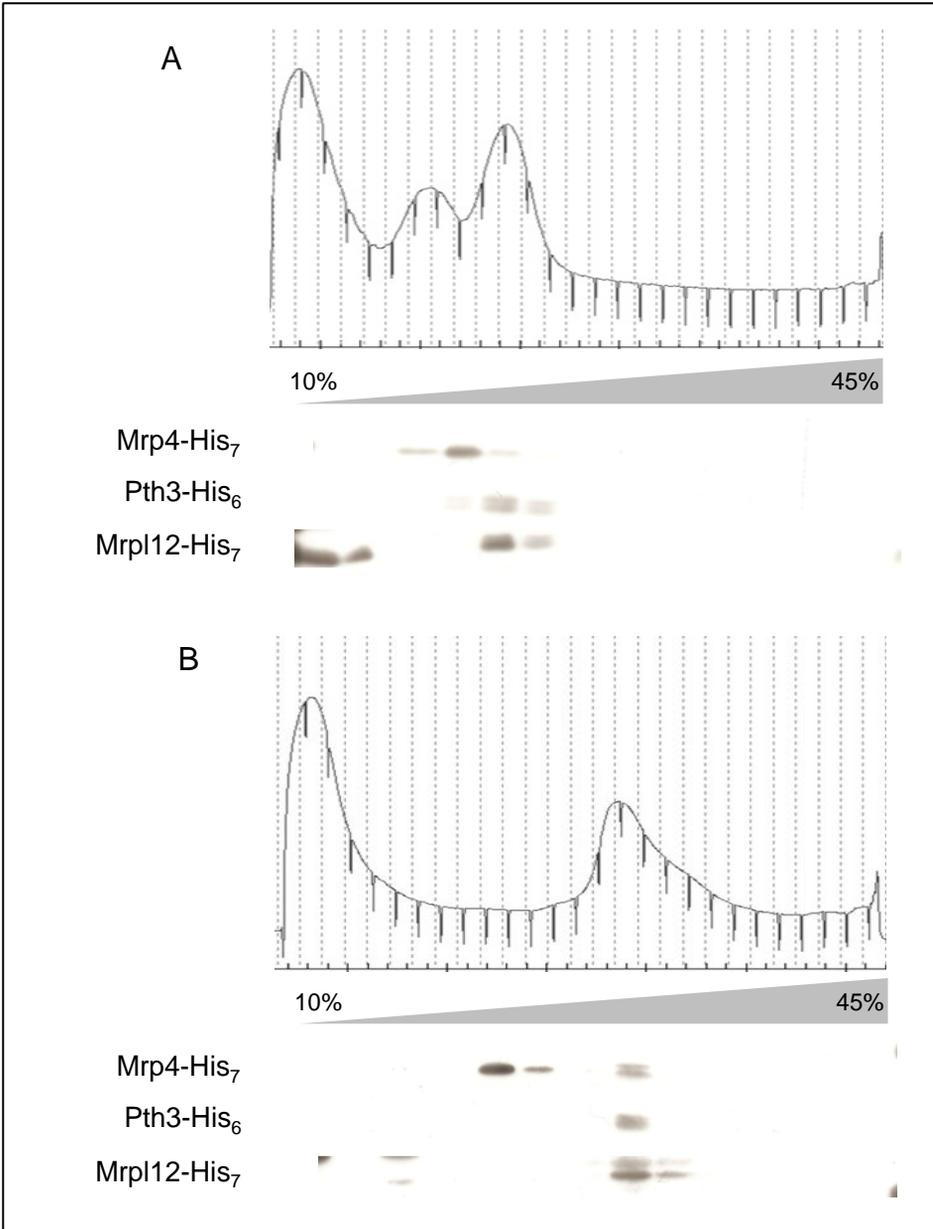
Dujeancourt et al., Figure 6



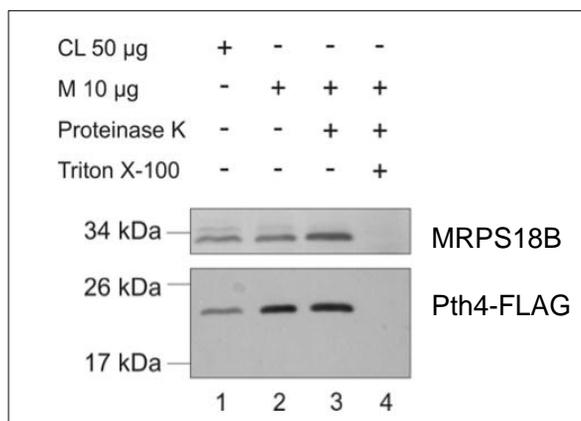
Dujeancourt et al., Figure 7



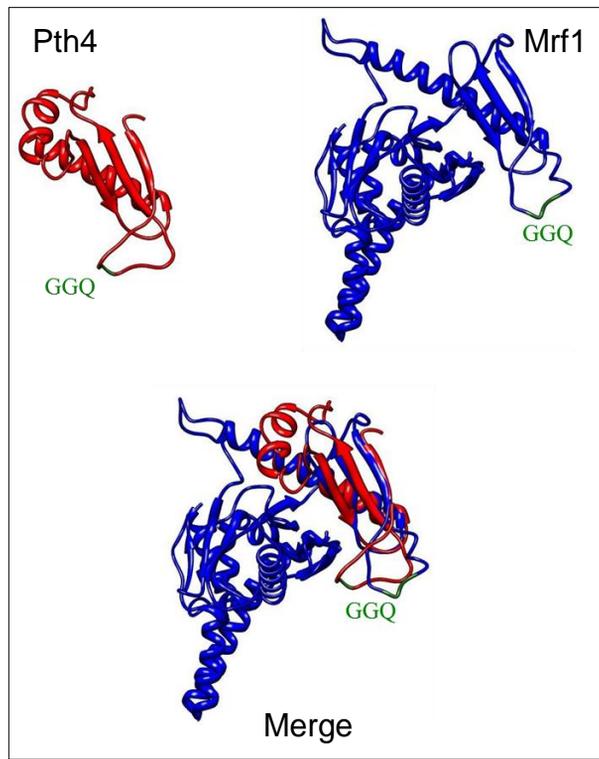
Dujeancourt et al., Figure 8



Dujeancourt et al., Figure S1



Dujeancourt et al., Figure S2



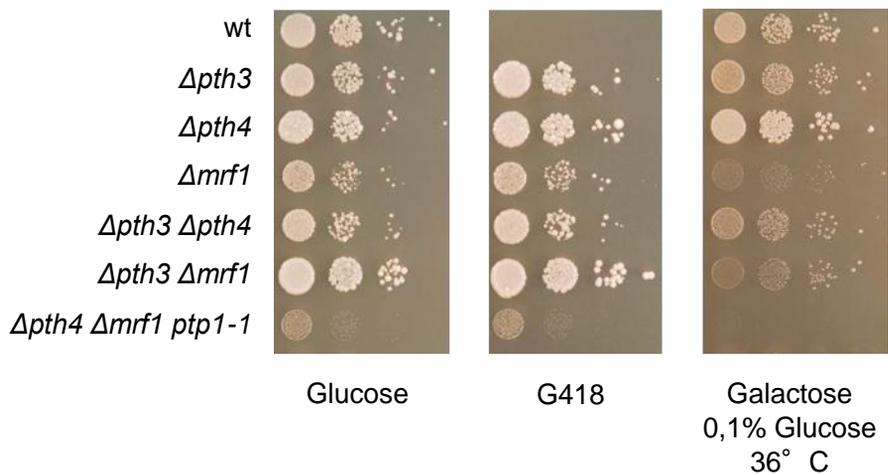


Figure 34 : Comparaison des phénotypes des simples ou double mutants $\Delta pth3$, $\Delta pth4$, $\Delta mrf1$. Des cultures des différentes souches ont été diluées de 10 en 10 et déposées sur milieu fermentescible additionné ou non de G418 (5 jours d'incubation) et sur milieu non fermentescible (7 jours d'incubation); le double mutant $\Delta mrf1 \Delta pth4$ ne survit qu'en présence de la mutation $ptp1-1$.

C. Localisation de Pth3 et Pth4

1. Localisation cellulaire

Pour déterminer cette localisation j'ai tout d'abord construit des souches étiquetées pour Pth3, Pth4 et en contrôle Mrf1, *via* des plasmides dérivés du vecteur pDUAL, achetés auprès du consortium japonais RIKEN et créés lors d'un programme de localisation à grande échelle (Matsuyama *et al.*, 2004). Ces plasmides contiennent sous le contrôle du promoteur sensible à la thiamine *nmt1* les ORFs d'intérêt en fusion avec les séquences codant une extension YFP-FLAG-His₆. Comme la construction contenant l'ORF de Mrf1 présentait plusieurs mutations dont un décalage de phase, elle a été refaite au laboratoire grâce à la technique du « GAP repair ». Après linéarisation, les plasmides ont été intégrés au *locus leu1* dans des souches délétées pour le gène sauvage correspondant (voir paragraphe suivant D) afin de posséder uniquement la copie étiquetée du gène dans chaque souche.

J'ai extrait les fractions mitochondriales et cytosoliques de ces différentes souches et réalisé un immunoblot avec des anticorps reconnaissant l'étiquette 6 histidines ou des protéines mitochondriales contrôles comme au Chapitre I: Cox2 qui est membranaire, ou Arg1 qui est dans la matrice mais pour laquelle l'anticorps utilisé présente une réaction croisée dans le cytoplasme. Comme on peut le voir (Figure 2A article 1), les protéines Pth3, Pth4 et Mrf1 se retrouvent dans la même fraction que Cox2 et Arg1 et sont absentes dans la fraction cytosolique, indiquant que Pth3 et Pth4 sont bien des protéines mitochondriales.

2. Localisation subcellulaire

Des mitochondries purifiées des trois souches étiquetées ont ensuite été incubées dans un tampon contenant du carbonate de sodium à pH alcalin, ce traitement solubilisant les protéines associées aux membranes ou aux protéines membranaires par les interactions électrostatiques, sans solubiliser les protéines membranaires. Une centrifugation à haute vitesse aboutit à la formation d'un culot contenant la fraction membranaire et d'un surnageant qui représente la fraction soluble. Les échantillons sont analysés par Western blot comme ci-dessus. Les protéines Pth3, Pth4 et Mrf1 présentent le même profil que Cox2 (Figure 2B article 1), elles sont donc associées aux membranes mitochondriales contrairement à Arg1 qui est une protéine soluble.

D. Phénotype des mutants Δpth chez *S. pombe*

Pour tester un rôle possible de Pth3 et Pth4 dans la biogenèse mitochondriale, les gènes correspondants ont été délétés au laboratoire par Kelly Vasileiadou et moi-même. La délétion du gène *pth4* ne présente aucun phénotype respiratoire, alors que celle de *pth3* induit un faible défaut de croissance sur milieu glycérol. Par contre la souche doublement délétée présente un phénotype respiratoire plus grave que celui des deux simples mutants, suggérant que *pth3* et *pth4* peuvent se remplacer partiellement quand l'un fait défaut (Figure

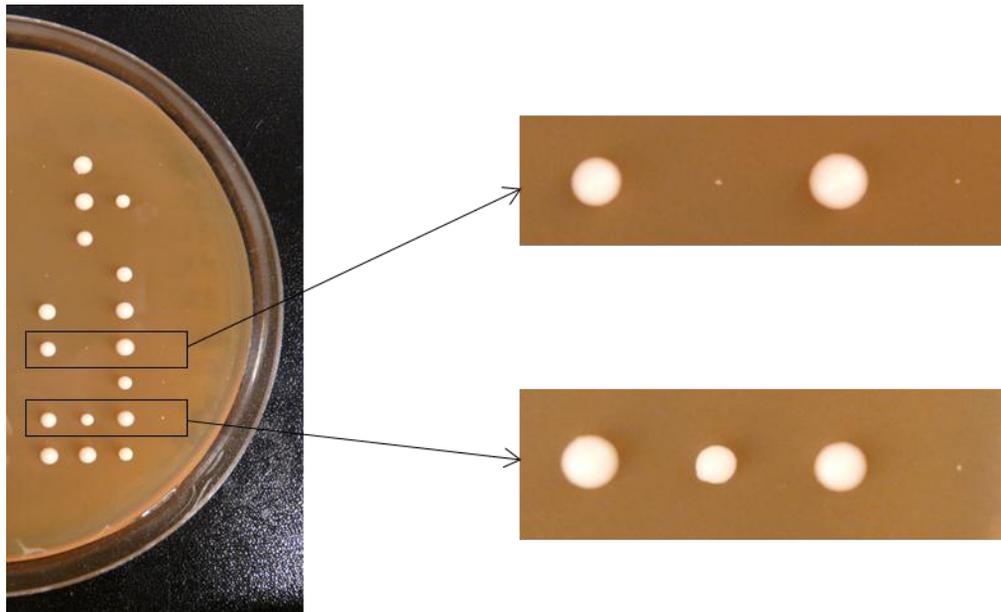


Figure 35: Résultat de croisement des simples mutants $\Delta pth4$ et $\Delta mrf1$. Un grossissement est montré pour deux tétrades comprenant des microcolonies, un ditype recombiné (en haut) et un tétratypé (en bas). Les génotypes des spores se développant ont été déterminés par PCR sur l'ADN génomique.

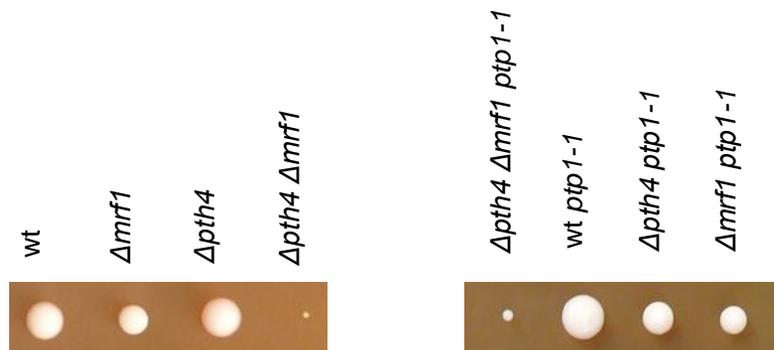


Figure 36: Comparaison de tétratypes issus de croisement des simples mutants $\Delta pth4$ et $\Delta mrf1$ en présence ou absence de la mutation $ptp1-1$. Les micro-colonies doubles mutantes $\Delta pth4 \Delta mrf1$ arrivent à évoluer si elles sont combinées à la mutation $ptp1-1$. Les génotypes des spores se développant ont été déterminés par PCR sur l'ADN génomique.

34 et Figure 3A, article 1). Un spectre des cytochromes réalisé à basse température sur ces différentes souches permet de mettre en évidence les pics d'absorptions correspondant aux cytochromes *c*, *b*, *c1* et *aa3*. Ces différents pics sont bien visibles dans le mutant $\Delta pth4$. Le pic correspondant au cytochrome *aa3* est très légèrement diminué en absence de *pth3*. Cette baisse est accentuée dans une souche double mutante (Figure 3B, article 1). La double délétion $\Delta pth3 \Delta pth4$ entraîne donc un défaut de croissance respiratoire corrélé avec une diminution d'assemblage bien visible au niveau du complexe IV, ces deux gènes ont donc un rôle dans la biogenèse de la chaîne respiratoire.

E. Interactions entre les gènes *pth* et *mrfl*

1. Construction de doubles mutants

Pour tester si les gènes *pth3* et *pth4* interagissent avec *mrfl*, des doubles mutants $\Delta pth3 \Delta mrfl$ et $\Delta pth4 \Delta mrfl$ ont été construits par croisement des simples mutants. Nous avons observé que la souche $\Delta pth3 \Delta mrfl$ présente le même phénotype respiratoire que celui de la délétion de *mrfl* seule, $\Delta mrfl$ est donc épistatique sur $\Delta pth3$ (Figure 34). Par contre certaines des spores issues du croisement entre une souche $\Delta mrfl$ et une souche $\Delta pth4$, donnaient sur milieu complet glucose des micro-colonies incapables d'évoluer (Figure 35). Par analyse des autres spores de ces tétrades, nous avons mis en évidence que les micro-colonies correspondaient aux doubles mutants $\Delta pth4 \Delta mrfl$. Ce phénotype létal ou subléthal était réminiscent du phénotype de mutants tels que $\Delta tuf1$, délété pour le gène du facteur d'élongation mtEF-Tu, qui est essentiel pour la traduction mitochondriale (Chiron *et al.*, 2005). Nous avons donc comme pour $\Delta tuf1$ reconstruit les doubles mutants $\Delta pth4 \Delta mrfl$ dans un contexte *ptp1-1*, en croisant chaque simple mutant recréé dans une souche *ptp1-1*. Comme cité en Introduction (Section VI), cette mutation permet en effet la survie de cellules de *S. pombe rho*^o (Haffter & Fox, 1992) et donc *a fortiori* de cellules dont la traduction mitochondriale est bloquée (Chiron *et al.*, 2005). Nous avons pu ainsi isoler des spores $\Delta pth4 \Delta mrfl$, qui présentent un fort retard de germination et croissance sur milieu complet glucose ou galactose comparées aux différents simples mutants (Figure 34 et 36, Figures 4A et 4B, article 1). Ce résultat montre qu'il existe une forte interaction génétique entre *pth4* et *mrfl*, et que *pth4* permet la survie du mutant $\Delta mrfl$.

2. Etat de l'ADNmt dans le mutant $\Delta pth4 \Delta mrfl$ dans un contexte *ptp1-1*

Le mutant $\Delta tuf1$, dont le phénotype de croissance est comparable à celui du double mutant $\Delta pth4 \Delta mrfl$, présente une forte déplétion d'ADNmt (Chiron *et al.*, 2005). J'ai donc réalisé un Southern blot en utilisant comme sonde l'ADNmt entier pour tester si le double mutant $\Delta pth4 \Delta mrfl$ avait aussi des défauts de quantité de l'ADNmt (Figure 4C, article 1). Les simples mutants *mrfl* ou *pth4* présentent un profil de digestion de l'ADNmt normal et ce dans des quantités similaire au sauvage. Par contre les 3 clones doubles mutants testés lors de cette expérience ont un profil de digestion sauvage, mais des quantités d'ADNmt variables, allant de la quasi-normalité à moins de 10% de la quantité trouvée chez le

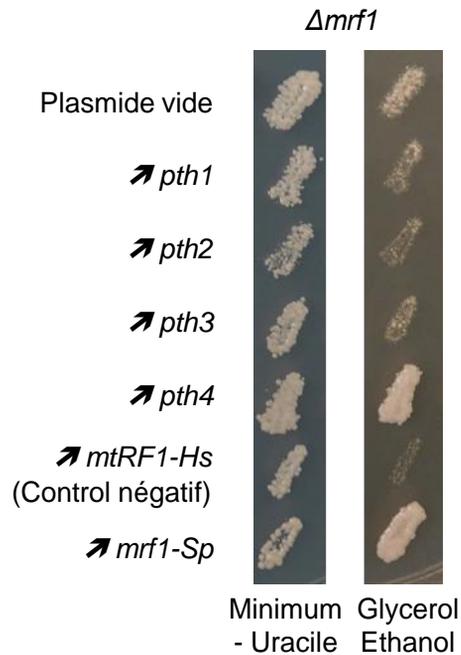


Figure 37 : Suppression en copies multiples d'un mutant $\Delta mrf1$. Le mutant $\Delta mrf1$ (NB329) a été transformé par divers plasmides d'expression réplicatifs, dérivés de pDUAL-FFH sauf pour le contrôle négatif, qui est dérivé de pTG1754/*NotI*. Les transformants cultivés sur milieu fermentescible sélectionnant les plasmides (glucose sans uracile) ont été répliqués sur un milieu non fermentescible (glycérol-éthanol). Le contrôle négatif correspond au gène *mtRF1* humain, qui n'a pas une activité de facteur de relargage classique et ne complète pas la délétion de *mrf1* (Soleimanpour-Lichaë *et al.*, 2007).

sauvage. Ces disparités suggèrent que ces 3 clones sont en train de subir une déplétion de leur ADNmt, mais se trouvent à des stades différents de cette déplétion. La double délétion $\Delta pth4 \Delta mrf1$ déstabilise donc l'ADNmt, tout comme un blocage complet de l'élongation de la traduction mitochondriale. Les souches $\Delta pth4 \Delta mrf1$ étant très affectées en croissance, une étude plus poussée de leur phénotype n'est pas envisageable.

3. Surexpression de *pth4*

Etant donné que la perte de Pth4 aggrave fortement le phénotype de l'absence de Mrf1, nous avons testé l'expérience inverse, à savoir surexprimer *pth4* dans un mutant $\Delta mrf1$. La surexpression de *pth1*, *pth2* ou *pth3* (Figure 37 et Figure 5A, article 1) ne modifie pas le phénotype de la souche $\Delta mrf1$. Par contre, dans les mêmes conditions, la surexpression de *pth4* permet une restauration importante de la croissance respiratoire du mutant $\Delta mrf1$ (Figure 37 et Figure 5A, article 1), corrélée à une augmentation des protéines mitochondriales néo-synthétisées marquées au [³⁵S] (Figure 5B, article 1). Ce marquage est un reflet de l'efficacité de la traduction mitochondriale. Au contraire, la surexpression de *pth3* ne modifie pas le marquage mitochondrial qui reste faible comme dans un mutant $\Delta mrf1$ transformé avec un vecteur vide. Cela conforte l'idée que seul Pth4 peut au moins partiellement remplacer Mrf1 quand celui-ci est défectueux, et cela de manière dose-dépendante.

F. Association avec le ribosome mitochondrial

Vu les liens fonctionnels entre Pth4 et Mrf1 d'une part, et Pth3 et Pth4 d'autre part, nous avons testé si ces deux peptidyl hydrolases interagissent avec le ribosome mitochondrial. Pour cela j'ai tout d'abord réalisé un test rapide de fractionnement d'extraits mitochondriaux sur un coussin de saccharose à 40%. Ce test consiste à lyser des mitochondries purifiées dans un tampon contenant du Triton X-100, ce détergent permettant de solubiliser les membranes mitochondriales sans solubiliser les complexes protéiques comme le ribosome. Cette lyse est suivie d'une clarification pour supprimer les débris membranaires, et les extraits clarifiés sont déposés sur coussin de saccharose puis centrifugés à haute vitesse pour faire tomber les gros complexes dans le fond du tube, alors que les protéines solubles restent en surface. Les résultats de ces expériences (non présentés) montrent que Pth3, Pth4 et Mrf1 présentent un profil similaire, les protéines sont détectées dans la fraction soluble et dans le culot. Ceci suggère qu'au moins une fraction de ces protéines est susceptible d'interagir avec le mitoribosome.

Pour analyser plus précisément l'interaction de Pth3 et Pth4 avec le ribosome, j'ai ensuite réalisé des fractionnements sur gradient de saccharose de 10 à 45%. Cette expérience consiste à incuber un extrait total de cellules obtenu avec une presse de French dans un tampon contenant du Triton X-100. Cette incubation est suivie d'une étape de clarification avant de déposer les échantillons en haut d'un gradient de saccharose de 10 à 45% et de les centrifuger. Cette manipulation permet de mettre en évidence une co-sédimentation entre les Pth et le mitoribosome (Figure 6 et Figure S1, article 1). Ainsi Pth3 et Pth4 co-sédimentent

avec la grande sous-unité ribosomale qu'elle soit associée ou non à la petite sous-unité du ribosome. Pth3 et Pth4 pourraient donc être considérées comme des protéines accessoires de la grande sous-unité. En présence d'EDTA comme de $MgCl_2$, Pth4 et Pth3 co-sédimentent avec la grande sous-unité du ribosome. Par contre les résultats concernant Mrf1 ne sont pas concluants. En effet, dans les conditions où le gène est peu exprimé, je n'ai pas pu détecter la protéine de façon fiable, et quand le gène est surexprimé, Mrf1 est détectée tout le long du gradient. Il n'a donc pas été possible de trouver des conditions d'expression de Mrf1 qui montrent une co-sédimentation claire avec le ribosome.

De plus, dans le laboratoire de Z. Chrzanowska-Lightowlers, Ricarda Richter a montré que le gène *pth4* peut être exprimé dans des cellules humaines et la protéine importée dans les mitochondries (Figure S2 article 1) et qu'elle se lie au ribosome mitochondrial assemblé, qu'elle peut même immunoprécipiter (Figure 7 article 1). Cela confirme l'affinité entre Pth4 et le ribosome mitochondrial, qu'il soit de *S. pombe* ou de l'homme. Cette interaction se fait donc probablement *via* des éléments ribosomaux conservés entre ces deux organismes. Il n'a pas été déterminé dans les cellules humaines si Pth4 interagit avec une ou les deux sous-unités ribosomales isolées.

G. Ces fonctions sont-elles conservées au cours de l'évolution?

Il existe chez l'homme des protéines Pth homologues à Pth3 et Pth4, nommées respectivement C12orf65 et ICT1. Nous nous sommes demandé si ces protéines pouvaient, comme Pth4, compenser l'absence de Mrf1. J'ai utilisé pour cela un vecteur d'expression pour *S. pombe* comportant les nucléotides spécifiant la séquence d'adressage mitochondriale de la sous-unité 9 de l'ATP synthase (pré-Su9) chez *Neurospora crassa*, afin de cloner les cDNAs humains en fusion derrière cette séquence. En effet, les séquences d'adressage mitochondrial humaines ne sont pas toujours bien reconnues par la machinerie d'importation mitochondrial des levures, alors que pré-Su9 est très efficacement utilisée par les levures pour l'importation. Les ORF sont également suivie d'une étiquette FLAG pour permettre de détecter la protéine en cas de besoin.

Ces constructions ont été introduites dans une souche $\Delta mrf1$ et les phénotypes des transformants ont été testés sur milieu non fermentescible (galactose supplémenté avec 0,1% glucose) à 36°C (Figure 5A article 1). La surexpression des Pth humaines ne permet pas de compenser l'absence du facteur de terminaison de la traduction Mrf1. La présence de *C12orf65* semble même être toxique car les clones poussent moins bien que la souche contrôle. Les gènes de *S. pombe* et les gènes humains ne sont donc pas interchangeable. Dans le laboratoire de Z. Chrzanowska-Lightowlers, Ricarda Richter a réalisé une expérience de complémentation inverse, c'est-à-dire qu'elle a testé si *pth4* peut compenser les effets de l'extinction de *ICT1* par siRNA. Aucun effet n'est observé (Figure 8 article 1), montrant à nouveau que ces gènes, même s'ils sont homologues en séquence, ne sont pas interchangeables.

H. D'autres gènes de *S. pombe* peuvent-ils compenser l'absence de Pth3 et Pth4?

La double absence de Pth3 et Pth4 chez *S. pombe* entraîne un phénotype respiratoire partiel, mais tout de même visible sur milieu glycérol. Nous nous sommes demandé s'il pourrait exister chez *S. pombe* des gènes capables d'améliorer la croissance du mutant $\Delta pth3 \Delta pth4$ lorsqu'ils sont surexprimés. Pour répondre à cette question j'ai transformé un double mutant $\Delta pth3 \Delta pth4$ par une banque d'ADN génomique pour rechercher des suppresseurs en copies multiples de ces délétions qui optimiseraient la croissance sur glycérol (Tableau 16).

Tableau 16: Résumé du criblage de suppresseurs en copies multiples dans le double mutant $\Delta pth3 \Delta pth4$

Plasmide	Nombre de clones obtenus	Gènes dans l'insert	Candidat
a ¹	≈ 70	<i>SPCC330.04c</i> → <i>SPCC330.07c</i> ²	Ura4
b ¹	8	<i>SPBC1683.05</i> , <i>SPBC1683.06c</i>	Uridine ribohydrolase
c ¹	1	<i>SPBC1105.16c</i> → <i>SPBC887.03c</i>	Pth3
d	1	<i>SPBC13G1.09</i> , <i>SPBC13G1.10c</i>	ARN helicase Slh1 <i>U3 U14</i> snoRNA
e	1	<i>SPCC297.06c</i> <i>SPCC737.02c</i>	<i>SPCC297.06c</i> , Qcr7 ?
f	2	Plasmide recombinant chIII/chI	?

1: plasmides donnant un avantage de croissance clair après re-transformation

2 : Seuls quelques inserts ont été séquencés aux extrémités, les autres ont été identifiés par réplique sur milieu sans uracile.

En fait 70% des clones obtenus dans un premier crible contenaient soit le gène *ura4*, délété dans la souche double mutante, et codant pour un enzyme de biosynthèse de l'uracile, soit un gène codant pour une uridine-ribo-hydrolase, enzyme également impliquée dans le métabolisme de l'uracile, indiquant que ce métabolisme est limitant chez nos mutants. Il a déjà été montré que des mutants *ura4* poussent difficilement sur milieu glycérol (Chiron et al, 2007) et il est probable que la mutation *ura4* intensifie les difficultés de croissance de la souche $\Delta pth3 \Delta pth4$ sur glycérol. D'autres inserts ont pu être isolés dans un premier temps mais parmi ceux-ci, seul un plasmide portant le gène *pth3* pouvait vraiment compléter le mutant $\Delta pth3 \Delta pth4$ après retransformation. Nous n'avons donc pas isolé de suppresseurs multicopies, mis à part les suppresseurs « métaboliques » impliqués dans le métabolisme de l'uracile.

Chapitre III : Etude chez *S. pombe* de la famille des protéines à motif Penta-tricoPeptide Repeat (PPR)

A. Article 2 : A genome wide study in fission yeast reveals nine PPR proteins that regulate mitochondrial gene expression. Kühl I, Dujeancourt L, Gaisne M, Herbert CJ, Bonnefoy N. *Nucleic Acids Res.* 2011 Oct;39(18):8029-41. PubMed ID: 21727087

A genome wide study in fission yeast reveals nine PPR proteins that regulate mitochondrial gene expression

Inge Köhl, Laurent Dujeancourt, Mauricette Gaisne, Christopher J. Herbert and Nathalie Bonnefoy*

Centre de Génétique Moléculaire du CNRS, UPR3404, FRC3115, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Received April 19, 2011; Revised May 19, 2011; Accepted June 6, 2011

ABSTRACT

Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are particularly numerous in plant mitochondria and chloroplasts, where they are involved in different steps of RNA metabolism, probably due to the repeated 35 amino acid PPR motifs that are thought to mediate interactions with RNA. In non-photosynthetic eukaryotes only a handful of PPR proteins exist, for example the human LRPPRC, which is involved in a mitochondrial disease. We have conducted a systematic study of the PPR proteins in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and identified, in addition to the mitochondrial RNA polymerase, eight proteins all of which localized to the mitochondria, and showed some association with the membrane. The absence of all but one of these PPR proteins leads to a respiratory deficiency and modified patterns of steady state mt-mRNAs or newly synthesized mitochondrial proteins. Some cause a general defect, whereas others affect specific mitochondrial RNAs, either coding or non-coding: *cox1*, *cox2*, *cox3*, *15S rRNA*, *atp9* or *atp6*, sometimes leading to secondary defects. Interestingly, the two possible homologs of LRPPRC, *ppr4* and *ppr5*, play opposite roles in the expression of the *cox1* mt-mRNA, *ppr4* being the first mRNA-specific translational activator identified in *S. pombe*, whereas *ppr5* appears to be a general negative regulator of mitochondrial translation.

INTRODUCTION

The pentatricopeptide repeat (PPR) protein family is characterized by repeats of a degenerate 35 amino acid

sequence, related to the tetratricopeptide repeat (TPR), which is a 34 amino acid motif involved in protein–protein interactions (1). The PPR family is one of the largest protein families known in plants, with over 450 members in *Arabidopsis thaliana* and even more in other land plants. However, PPR proteins are found in limited numbers in animals and fungi, and are extremely rare in bacteria, they have only been found in a few bacterial pathogens of eukaryotes. It is particularly striking that the bacterial ancestors of mitochondria and chloroplasts lack PPR proteins, because the available experimental data and protein localization predictions suggest that PPR proteins are almost exclusively located in organelles (2). This implies that the current PPR proteins are the result of rapid evolution. Nearly 70% of plant PPR proteins are predicted to be mitochondrial (2), but the majority of PPR proteins studied so far have been chloroplastic, possibly because mitochondrial PPR mutants in plants are often embryo-lethal.

All PPR proteins are thought to bind RNA via the PPR motif. Models of this motif based on the TPR anti-parallel helical structure, suggest that contrary to the TPR motif, the side chains in the central groove of the PPR repeats tend to be hydrophilic and positively charged (1), consistent with an interaction with RNA molecules rather than proteins. In some cases, RNA binding has now been directly demonstrated, and the sequences of the *cis*-elements recognized by the PPR motif are known (3). However, with the exception of some proteins that contain additional domains involved in RNA editing, PPR proteins do not carry an enzymatic activity and probably act as adaptors that mediate the interaction between their target RNA and other proteins (4). This gives PPR proteins great functional flexibility, and explains how they can participate in all the steps of RNA metabolism from transcription to degradation, affecting diverse processes such as development, organelle biogenesis, energetic regulation and cytoplasmic male sterility [for a review see (5)].

*To whom correspondence should be addressed. Tel: 33 (1) 69 82 31 75; Fax: 33 (1) 69 82 31 60; Email: bonnefoy@cgm.cnrs-gif.fr

Concerning mitochondrial PPR proteins, one, the human RNA polymerase POLRMT, is clearly required for transcription, although the function of its single PPR motif is unknown (6). Other PPR proteins are involved in post-transcriptional steps. In plants a large number of these proteins are involved in mitochondrial transcript editing [for review see (7) and references therein]. Mitochondrial PPR proteins are also involved in RNA processing: tRNA excision, precursor mRNA cleavage and transcript end maturation e.g. (8–10). This can lead to RNA degradation, for example the targeted degradation of the human mitochondrial leucine tRNA by the PPR protein PTC1 (11). Many mitochondrial PPR proteins in fungi and animals appear to stabilize both coding and non-coding RNA, e.g. the yeast *ATP6/8* co-transcript which is protected by Aep3 (12), and the *12S* or *15S* rRNAs which are protected from degradation by the human PTC3 or yeast Dmr1 (13,14). The relationships between transcript stabilization and translation are often very tight, and several factors appear to affect both, but in reality it is often difficult to distinguish between the two. For example in budding yeast, Rmd9 is thought to convey mRNAs to their site of translation and also loosely interacts with the ribosome (15,16), while Pet309 stabilizes the intron-containing *cox1* transcript, and activates translation of the mature *cox1* mRNA (17). In the case of Pet309 it has been shown that the PPR motifs are not required for the stability function (18). Several other mitochondrial PPR proteins are involved in general translation, and in *Trypanosoma*, numerous PPR proteins are *bona fide* ribosomal proteins (19,20).

Given the variety of RNA-linked functions mediated by PPR proteins, it is not surprising that a PPR protein, LRPPRC/LRP130, has been implicated in a human disease. Mutations in LRPPRC are responsible for a French-Canadian Leigh syndrome; however, the precise role of LRPPRC is far from clear. It has been proposed to regulate mitochondrial transcription (21), the stability and/or translation of the *cox1* and *cox3* mRNAs (22–24) and to be a general regulator of the stability and handling of all human mitochondrial mRNAs (25,26). In addition LRPPRC is present in the nucleus where it seems to play a role in the regulation of gluconeogenesis and mitochondrial biogenesis (27,28), thus contributing to the coordination of nucleo-mitochondrial interactions.

To further our understanding of the functions of the PPR protein family, we have used classical blast searches and the fungal specific SCIPHER algorithm developed by the Golik laboratory (29) to identify all the PPR proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. Apart from the mitochondrial RNA polymerase, we have identified eight proteins, containing three to sixteen predicted PPR motifs, and we have undertaken a study of these proteins. The fission yeast, *S. pombe*, has several particularities that make it a very attractive model for the study of mitochondrial PPR proteins. First, it is a petite-negative yeast, so most mutants that compromise mitochondrial gene expression maintain their mitochondrial genome, unlike budding yeast, where mutants deficient in mitochondrial gene expression often lose their mitochondrial DNA (mtDNA),

making any further study of their function very difficult. Second, the mtDNA of *S. pombe* resembles that of mammalian cells as it is very compact and uses similar transcription and processing features. Three of the respiratory complexes (III, IV and V) are of dual genetic origin, both nuclear and mitochondrial. In *S. pombe*, the mitochondrial genome contains eight major protein coding genes (*cox1*, 2, 3, *cytb*, *atp6*, 8, 9, *rps3*), the two rRNAs *rnl* and *rns*, the predicted RNase P RNA *rnpB*, and 25 tRNAs (Figure 1). In most strains, only *cytb* and *cox1* contain introns (one and two, respectively), and an intron-less strain has been constructed (30). Efficient transcription of the *S. pombe* mtDNA requires both the mitochondrial transcription factor (Mft1) and RNA polymerase (Rpo41) (31). The mtDNA contains two principal promoters of different strengths, yielding two overlapping primary transcripts that are generally processed by tRNA excision and cleavage downstream of a CC-rich motif to generate the rRNAs and mRNAs that contain short flanking regions (32). Consequently, *S. pombe* mitochondrial mRNAs resemble those of human mitochondria, which mostly lack untranslated

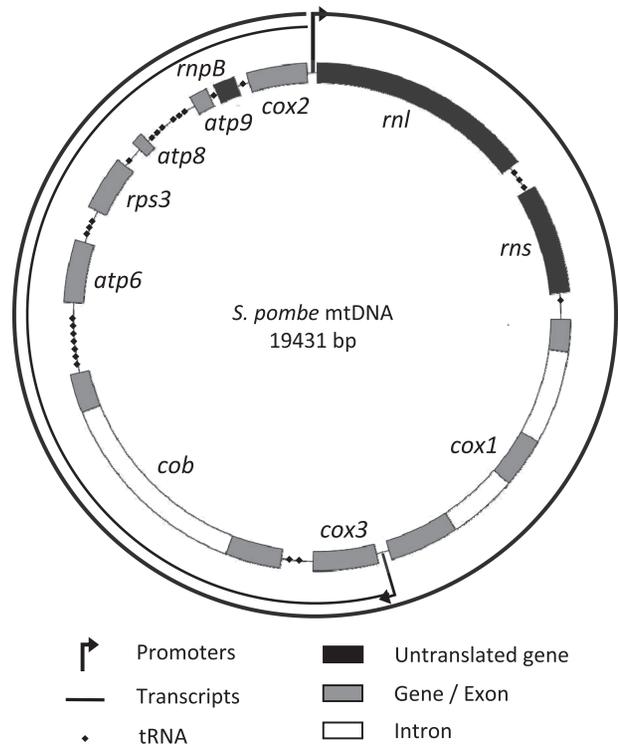


Figure 1. Map of the *S. pombe* mtDNA. The promoter located in front of the large rRNA gene *rnl* is the major promoter that yields a 19.4 kb transcript corresponding to the full mtDNA. A second minor promoter is located between the *cox1* and *cox3* genes and drives the transcription of a 10.5 kb RNA containing the genes from *cox3* to *cox2*. The 5'-end of mature RNAs are processed through tRNA punctuation, except for *rnl* and *cox3* whose 5'-ends are determined by the start of transcription. The 3'-end processing occurs at a C-rich motif located a few nucleotides after each open reading frame. However the 3'-end of the RNase P RNA (*rnpB*) is produced by tRNA processing and the processing signal of *rnl* is unknown (32). Genes coding RNAs are depicted in black, protein encoding genes are in gray and introns in white. In our intron-containing strain, *cox1* contains two introns and *cytb* one intron.

regions (33), suggesting that they might be stabilized and translated using similar mechanisms and factors.

Here we present a genome-wide study of all the PPR proteins of a single organism, *S. pombe*. Previously, nothing was known about the function of these eight PPR proteins. We have shown that they are all mitochondrial proteins and they are involved in mitochondrial biogenesis, although they target different steps in RNA metabolism and have different substrates.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, media and genetic methods

All strains are described in Supplementary Table S1 and were grown at 28 or 36°C as indicated. The different wild-type strains used were NB205-6A (*h⁻ ade6-M216 ura4-D18 his3Δ leu1-32 rho⁺* [three mitochondrial introns], (34), P3 (*h⁺ ade7-50 rho⁺* [no mitochondrial introns], (30), and the *Δpku70* and *Δpku80* strains FY14145 and FY14191 (a gift from the National BioResource Program in Japan). Plasmids used or constructed during this work were derivatives of pGEM-T-easy (Promega), pDUAL-FFH1, pDUAL-YFH1 (35) and pTG1754/Not (36). Media and genetic methods were as described in (36,37). *Schizosaccharomyces pombe* asci were microdissected directly from the mixture of haploid, diploid and sporulating cells. *Schizosaccharomyces pombe* transformation (38) was improved by (i) using single stranded salmon sperm DNA as carrier, (ii) regenerating cells in complete liquid medium overnight, (iii) plating onto 5% glucose selective medium as described in (39). Yeast genomic DNA was extracted according to (40).

Deletion of the PPR genes

Gene deletions were constructed by the PCR method (41) using pFA6a-kanMX6 (carrying the *kan^R* gene that confers G418 resistance) (42), or pAG25 (carrying the *nat^R* gene that confers Nourseotricin resistance) (43). PCR fragments containing the resistance gene were generated using hybrid oligonucleotides containing 75–80 bases of homology with the recipient locus flanking the gene of interest and transformed into NB205-6A, P3 and/or FY14145/FY14191. Transformants, able to grow in the presence of the appropriate drug, were streaked on selective medium, and the genomic DNA of single colonies was analyzed by PCR to look both for the correct insertion of the deletion cassette and the absence of the wild-type sequence. Colonies carrying the expected deletion were back-crossed to a wild-type strain to verify the cosegregation of the resistance marker with the gene deletion and in some cases to segregate away the *pku70* or *pku80* mutation.

Epitope tagging of the *ppr* genes

Plasmids containing the different tagged *ppr* genes under the control of the *nmt1* promoter (44) were purchased from the RIKEN consortium and tested for their ability to complement the corresponding mutants; with the

exception of *ppr1*, all tagged genes complemented the gene deletion (data not shown). For the seven *ppr* plasmids that showed a good complementation, the plasmids were cut by *NotI* and transformed into the corresponding *Δppr* mutants to integrate the tagged version into the *leu1* locus (44). Sequence analysis of the *ppr1* insert obtained from the RIKEN showed that it contained three mutations. Thus the wild-type *ppr1* gene together with some other *ppr* genes were epitope tagged at their chromosomal locus using a PCR strategy (41), and the plasmids pFA6a-3HA-kanMX6, pFA6a-13Myc-KanMX6 (45), and pBS7 (YFP-Venus, NCRR Yeast Resource Centre, University of Washington). After integration, these constructions were verified by PCR amplification of the fusion site and epitope tag, followed by sequencing.

Northern blot analyses

Schizosaccharomyces pombe cells were grown to exponential phase (100 Klett units or 1 OD₆₀₀) in complete glucose medium, total RNAs were extracted using the hot phenol protocol (46) and run on a formaldehyde gel before transfer onto Hybond-C extra membranes. The blots were successively hybridized with various probes at 65°C under standard saline conditions. After overnight hybridization, the blots were washed briefly several times with 6xSSPE before exposure (from a few hours up to 1 week at –70°C). Mitochondrial probes were PCR or restriction fragments labeled with [α -³²P]dATP and a random priming kit (Invitrogen).

³⁵S labeling of mitochondrial proteins

Schizosaccharomyces pombe cells were grown to early exponential phase in minimal, or complete, 5% raffinose medium containing 0.1% glucose. Mitochondrial proteins were labeled at 30°C by a 3 h incubation of whole cells with ³⁵S methionine and cysteine (Bioactif-Hartmann) in the presence of cycloheximide (10 mg/ml), which specifically blocks cytoplasmic translation. Proteins were extracted as described in (47) and samples were run on 16% acrylamide—0.5% bisacrylamide SDS gels, after drying, the gel was exposed to a film for 1 day, or up to several weeks, or onto a phosphorimager screen at room temperature.

Purification of mitochondria, alkali treatment and western blotting

Mitochondria were purified from *S. pombe* cells grown in complete glucose medium as described previously (39). Alkali treatment of isolated membrane and soluble mitochondrial fractions was performed as described in (48). Samples were run on 10 or 12% SDS-PAGE before western blotting. Primary antibodies were: anti-human Hsp60, 1/1000, (Sigma H3524); anti-*Saccharomyces cerevisiae* Arg8: 1/4000, a gift from T.D. Fox (49); anti-*S. pombe* Cox2, 1/2500 (50); anti-*S. pombe* Cytb, 1/1000 (I. Kühl and N. Bonnefoy, unpublished data); anti-Flag, 1/1000 (Sigma F185); anti-HA 1/1000 (Sigma H6908); anti-cMyc 1/5000 (Covance PRB-150C); Secondary antibodies were diluted 1/10 000-fold.

Cytochrome spectra

Low temperature cytochrome spectra of *S. pombe* cell paste were recorded using a Cary 400 spectrophotometer after addition of sodium dithionite to fully reduce the cytochromes (51). The absorption maxima were 603, 560, 554 and 548 nm for cytochromes *aa3*, *b*, *c1* and *c*, respectively. The *S. pombe*, the cytochrome *c* peak always shows a 544 nm shoulder that disappears in a cytochrome *c* mutant (N. Bonnefoy, unpublished data).

RESULTS AND DISCUSSION

Homology searches for *S. pombe* PPR proteins uncover a nine-member family

In the nucleus, the regulation of transcription is an important factor in the overall control of gene expression; in contrast, the regulation of mitochondrial gene expression appears to occur principally at the post-transcriptional level. Thus it is perhaps surprising that only a few motifs typical of RNA manipulating proteins, such as the PPR motif, have been identified in mitochondrial proteins (2). We have conducted a systematic genome-wide analysis to identify and partially characterize the fission yeast proteins containing PPR motifs.

Our initial survey for *S. pombe* PPR proteins used blast comparisons starting with known fungal or animal PPR proteins, such as Pet309 (17) or LRPPRC (22). Searches were then repeated using the newly identified *S. pombe* PPR proteins as baits. In this way, we were able to detect eight PPR proteins, which we have named Ppr1 to 8 (Figure 2). In parallel, the SCIPHER algorithm, which was specifically designed by the Golik Laboratory to find fungal PPR motifs (29), was run on the complete *S. pombe* genome. This identified the same 8 PPR proteins and the mitochondrial RNA polymerase, Rpo41, which like its human counterpart POLRMT, is a PPR protein (6,29) (Figure 2). Thus, as in other fungi and in animals, we found that the fission yeast PPR family is rather small: nine PPR proteins have been identified, amongst which four had not been annotated as PPR proteins in databases such as Uniprot. According to the SCIPHER algorithm, the *S. pombe* proteins contain between 2 (Rpo41) and 16 (Ppr5) PPR motifs and are between 432 (Ppr2) and 1261 (Ppr5) amino acids long (Table 1).

Five of the nine *S. pombe* proteins shared clear structural homologies with *S. cerevisiae* proteins (Table 1), all of which have mitochondrial functions: Ppr3 with Dmr1, involved in 15S rRNA stability (14), Ppr4 and Ppr5 with Pet309, required for translation of the *cox1* mRNA (18), Ppr6 with Atp13/Aep2, necessary for the stability of the *atp9* mRNA (52,53), and Rpo41 with the other mtRNA polymerases. The four other *S. pombe* PPR proteins did not present any significant homology to proteins in other organisms outside the PPR motif. As the aim of our study of the *S. pombe* PPR proteins was to characterize new factors involved in mitochondrial gene expression, we decided to exclude Rpo41 and focus on the eight new PPR proteins.

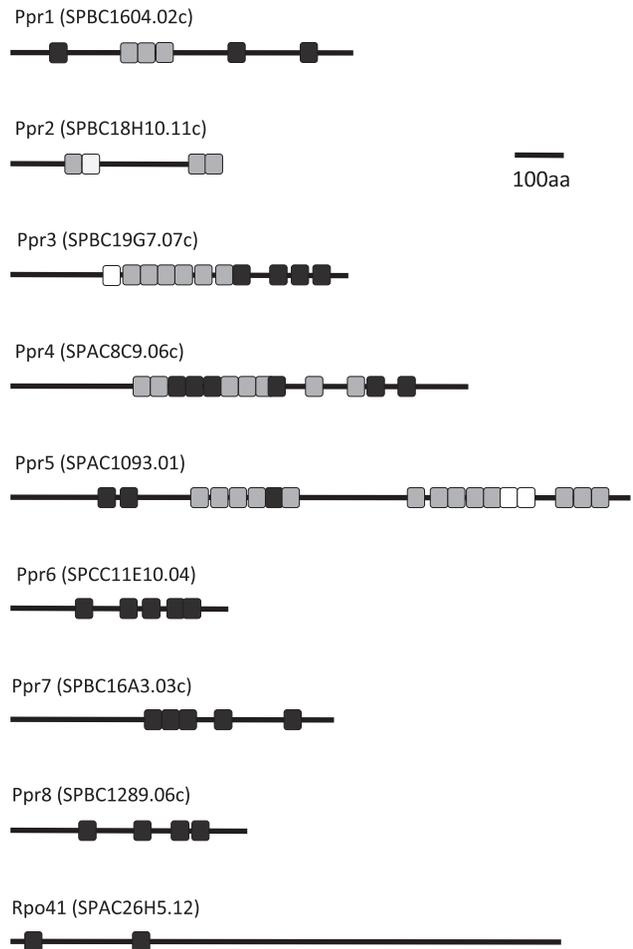


Figure 2. The PPR proteins of *S. pombe*. Gray boxes show the PPR motifs annotated in Uniprot and detected by the SCIPHER algorithm, black boxes show PPR motifs that were only found with the SCIPHER algorithm and white boxes are PPR motifs that are annotated in the UniProt database but were not found using the SCIPHER algorithm. In Ppr4, the boundaries of the predicted motifs eight and nine are unclear, and they may correspond to a single motif. The ninth *S. pombe* PPR protein is the mitochondrial RNA polymerase.

All predicted PPR proteins are mitochondrial proteins

The previously characterized PPR proteins are almost exclusively specific to organelles (2). Consistent with this observation, six of the eight *S. pombe* PPR proteins were clearly proposed to be mitochondrial, based on the analysis of YFP gene fusions under the control of the thiamine sensitive promoter *nmt1* that were constructed and analyzed in the framework of the *S. pombe* proteome localization program (44). The two exceptions were Ppr4 and Ppr5, where the data were unclear; we tagged the corresponding genes with YFP at their chromosomal locus and saw an overlap with the mitochondrial marker mitotracker for Ppr5 (Figure 3A). However, for Ppr4 the signal was weak, leading to high background probably due to auto-fluorescence of vacuoles. FLAG-versions of both Ppr4 and Ppr5 were then generated and the tagged strains were subjected to cell fractionation and western blot (Figure 3B) that

Table 1. Summary of the *S. pombe* Ppr protein features and mutant phenotypes

	Ppr								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Protein features									
Length (amino acid)	697	432	687	931	1261	443	658	481	
No. of PPR motifs	6	≥3	≥10	13	≥16	5	5	4	
Membrane (%)	30	80	100	100	100	100	50	40	
Possible homologs									
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			Dmr1	Pet309	^a	Aep2			
<i>Homo sapiens</i>			PTCD3						
	<i>Appr</i>								
	<i>Δ1</i>	<i>Δ2</i>	<i>Δ3</i>	<i>Δ4</i>	<i>Δ5</i>	<i>Δ6</i>	<i>Δ7</i>	<i>Δ8</i>	wt
Phenotype of <i>Appr</i> mutants									
Growth on galactose	–	±	–	–	++++	–	–	++	+++
Growth on antimycin	+++	+	++	+	+++	–	–	+	+
Spectra									
Cytochrome <i>aa3</i>	–	–	–	–	+	–	–	±	+
Cytochrome <i>bc1</i>	±	±	±	±	+	±	±	+	+
RNAs most affected	<i>cox2</i> <i>cox3</i>	None	<i>15S</i> <i>cytb</i>	<i>cox1</i> if Σ^b	None	<i>atp9</i>	<i>atp6</i>	<i>cox1</i> if Σ^b	None
Proteins most affected	Cox2 Cox3	All	All	Cox1	All up	All esp Atp9	All	Cox1	None
Mt protein level									
Cox2	–	–	–	–	++++	±	±	+	+++
Cytb	±	–	–	±	++++	+	+	+++	+++

^aPet309 is identified by Blast searches using Ppr5 as a bait, however from our study it does not appear to be a functional homolog.

^b Σ^b : mitochondrial genome where *cox1* contains two introns; 'esp': especially.

The mutant phenotypes are described qualitatively by comparison to the wild-type, the number of + signs indicates the strength of the phenotype, +/– just detectable and – not detected.

showed a clear localization into the mitochondrial fraction. Thus all eight *S. pombe* PPR proteins are mitochondrial.

To validate the mitochondrial localization of the different proteins, *ppr2-ppr8* were FLAG-tagged at the *leu1* locus under the control of the *nmt1* promoter using the Riken consortium plasmid resources (44) and *ppr1* was tagged with a cMyc₁₃ epitope. Mitochondria were purified by cell fractionation and in all cases, a clear signal was obtained for the tag in the mitochondrial fraction and not in the post-mitochondrial supernatant (data not shown), thus confirming that all eight PPR proteins from *S. pombe* are located in the mitochondria.

To further refine the mitochondrial localization of the PPR proteins, carbonate extractions were performed on purified mitochondria to test the association of each of the eight PPR proteins with the mitochondrial membranes (Figure 3C). In our initial experiments, Ppr3, 4 and 5 remained fully associated with the mitochondrial membranes upon carbonate extraction, like the Cox2 control, showing that they are integral membrane proteins. The other proteins were seen to partition between the soluble and membrane fraction. As all these constructions except *ppr1* were expressed from the *nmt1* promoter, we were concerned that the partition between the soluble and membrane fractions might be due to the over-expression of the proteins. To overcome this problem the carbonate fractionation was repeated using 3'HA₃ or

cMyc₁₃ *ppr fusions* integrated at the chromosomal locus under the control of the endogenous promoter. In these experiments Ppr6 remained fully associated with the mitochondrial membranes while Ppr1, 2, 7 and 8 were found in both the soluble and membrane fractions, suggesting that they might be peripheral proteins.

Thus all *S. pombe* PPR proteins are mitochondrial and interact more or less strongly with the mitochondrial membranes. This is consistent with the idea that all RNA metabolism and translation events in mitochondria occur in close proximity to the membrane, the final destination of the mitochondrially-encoded proteins.

A phenotypic and molecular analysis of the *Appr* mutants identifies two functional classes

To investigate the function of the different PPR proteins, each gene was disrupted in a mitochondrial intron-containing and intron-less background; this latter background facilitates the interpretation of some experiments and also allows the detection of RNA splicing defects. For reasons of clarity, the analysis of each mutant will be presented individually, although all mutants were studied in parallel using the following techniques.

Growth characteristics were tested on various media, including galactose, and glucose containing antimycin (Figure 4A and B). In *S. pombe*, an inability to grow on galactose is indicative of a strong defect in the

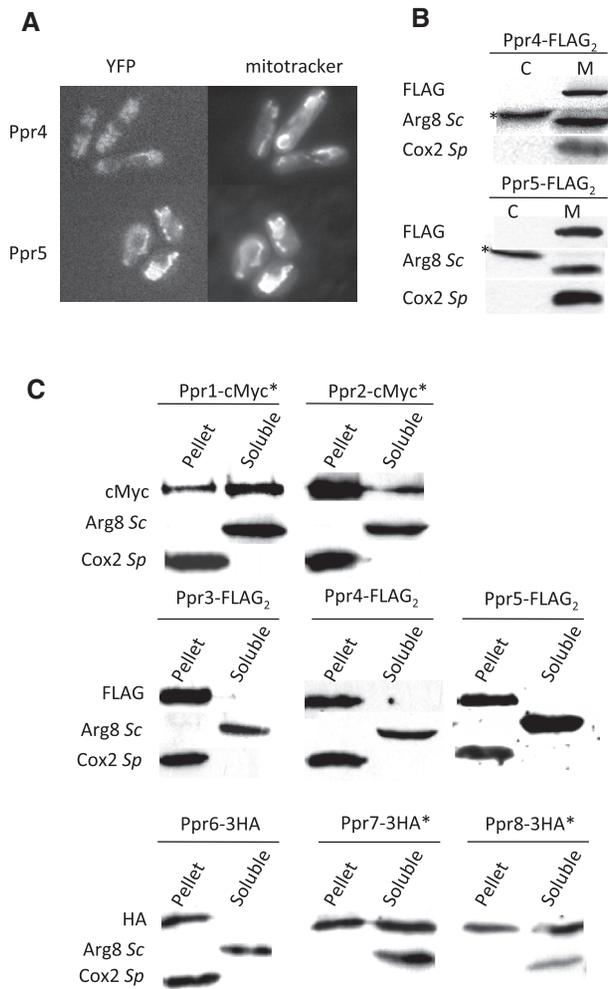


Figure 3. Cellular localization of the *S. pombe* Ppr proteins. (A) Fluorescent imaging of Ppr4-YFP and Ppr5-YFP. The *ppr4* and *ppr5* genes were fused to YFP-Venus. Cells were grown on YPGA 2% glucose with an excess of adenine, and observed with a Zeiss Axioplan 2 microscope linked to a Cool Snap camera (Princeton Instruments). Mitotracker was obtained from Molecular Probes. The signal for Ppr4-YFP was considerably weaker than for Ppr5-YFP. As a consequence the Ppr4-YFP image also shows autofluorescence from the vacuoles. (B) Purification of mitochondria from Ppr4-FLAG₂ and Ppr5-FLAG₂. Cells producing FLAG-tagged Ppr4 or Ppr5 proteins were fractionated to separate the mitochondria (M) from the cytosolic fraction (C). Protein samples were subjected to western blot analysis with the anti-FLAG antibody and with two control antibodies: anti-Cox2Sp, that labels the inner mitochondrial membrane protein Cox2, and anti-Arg8Sc, that labels the soluble *S. pombe* mitochondrial protein Arg1 as well as a cross-reacting cytosolic protein (marked with an asterisk). An equal amount of protein was loaded in each lane. (C) Subcellular localization of all Ppr proteins. Mitochondria containing cMyc, FLAG or 3HA-tagged versions of the different Ppr proteins were alkali-treated to separate the soluble and membrane fraction, the total quantity of protein in each fraction was loaded on a 10 or 12% gel and analyzed with the appropriate anti-tag antibodies. Control antibodies are as in panel B anti-Arg8Sc for the soluble fraction and anti-Cox2Sp for the membrane fraction. The proteins marked with an asterisk were tagged at their chromosomal locus. FLAG versions were integrated at the *leu1* locus in a background where the endogenous *ppr* gene was deleted.

mitochondrial respiratory chain (39) whereas sensitivity to antimycin under fermentation reflects an ATP synthase deficiency (37). When electron transfer is blocked by antimycin A, ATP synthase activity becomes essential for viability by generating a membrane potential. Antimycin sensitivity could only be tested in the intron-containing background because the intron-less strain is antimycin resistant (30). Cytochrome spectra were recorded to determine whether the heme containing respiratory enzymes (complex III, containing cytochrome *b* and *c1*, and complex IV, containing cytochrome *aa3*), were affected in the mutants (Figure 4C).

In addition, molecular studies were undertaken to analyze mitochondrial gene expression, because PPR proteins are expected to act on organelle RNAs to modulate transcriptional, post-transcriptional and/or translational steps. Experiments were performed both in the mitochondrial intron-less and intron-containing backgrounds to measure the steady state levels of all mitochondrial rRNAs and mRNAs in the Δppr mutants (Figure 5), as well as the *in vivo* labeling of newly synthesized mitochondrial proteins with ³⁵S amino acids, in presence of cycloheximide that blocks cytoplasmic translation (Figure 6A). For reasons that are not clear, *in vivo* labeling experiments are much less efficient in *S. pombe* than in *S. cerevisiae*; therefore, experiments were repeated three to six times. Qualitatively, the results appeared similar whatever the mitochondrial intron content, although labeling in the intron-less context was generally more efficient and thus more reliable. Thus a representative result in the intron-less background comparing all eight mutants is presented (Figure 6A). Western blotting with the few antibodies available against mitochondrially-encoded proteins from *S. pombe* (i.e. Cox2 and Cytb) was also performed to analyze the steady state levels of these mitochondrial proteins (Figure 6B).

We found that none of the Δppr strains showed a general decrease in all the transcripts belonging to one or both of the two transcription units of the *S. pombe* mitochondrial genome. Thus apart from the polymerase Rpo41, none of the PPR proteins appear to be involved in general transcription. Similarly, none of the PPR proteins are involved only in mitochondrial intron splicing, as the intron-less genome does not restore growth on non-fermentable medium to any of the respiratory-deficient mutants. In addition, processing does not seem to be affected since none of mutants accumulated aberrant RNA intermediates, contrary to the observations of Hoffmann *et al.* (54) who examined the processing mutants *pahl* and *par1*. *In fine*, the Δppr mutants appear to fall in two classes: those that seem to primarily affect mRNA stability (Ppr1, 3, 6, 7), and those that seem to act downstream, at a translational step (Ppr2, 4, 5, 8), for a summary see Table 1.

Ppr1 and Ppr3 appear to stabilize a limited number of mitochondrial RNAs

Among the PPR proteins playing an RNA stability role, Ppr1 and Ppr3 appeared to be the most specific. $\Delta ppr1$ cells could not grow on galactose (Figure 4A), and

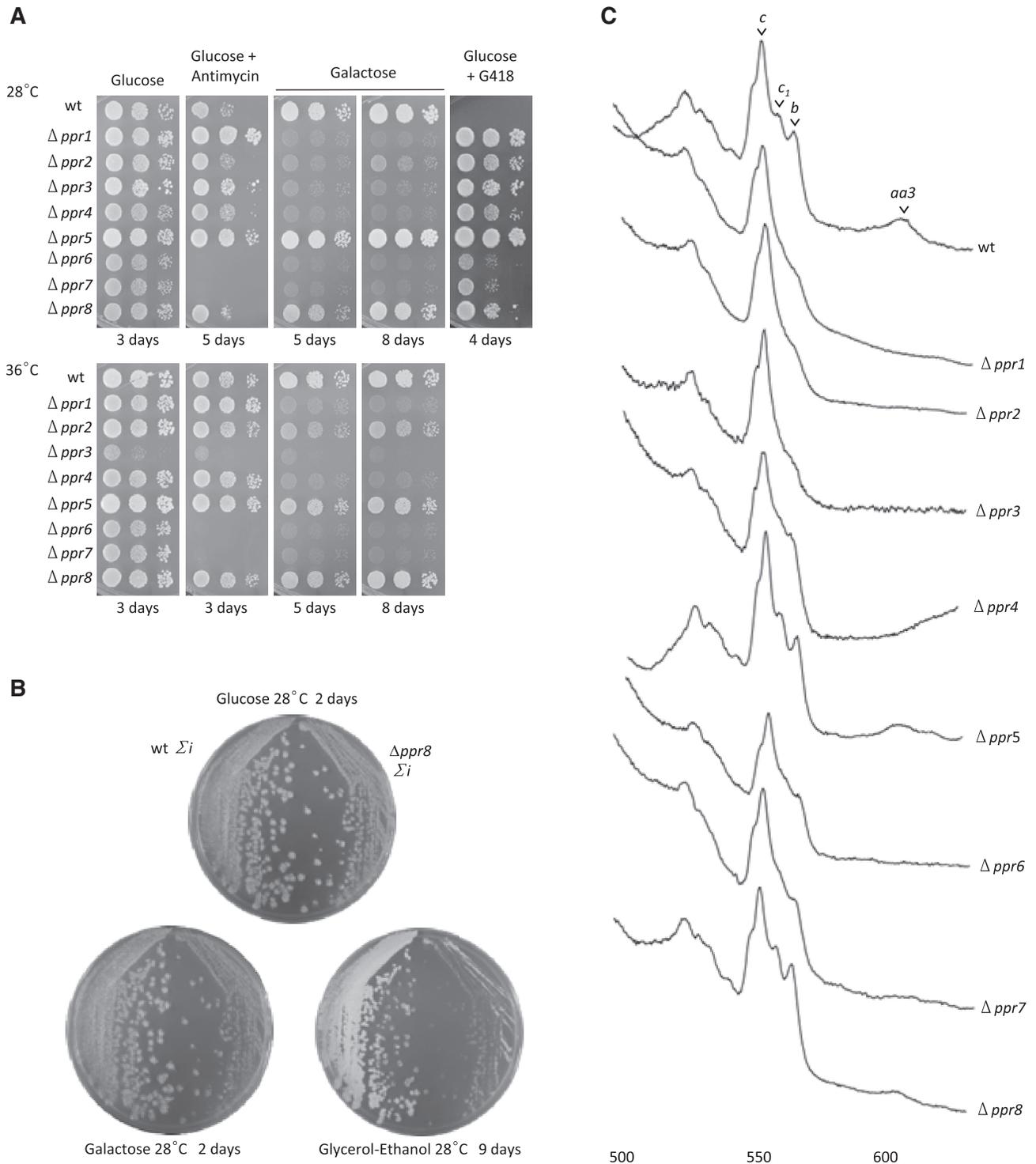


Figure 4. (A) Growth phenotypes of the Δppr mutants. Ten-fold serial dilutions of freshly grown Δppr mutants in the intron-containing background were spotted onto complete medium containing either galactose, which is used as a non-fermentable carbon source in *S. pombe*, glucose or glucose supplemented with G418 (indicative of the deletion) or antimycin A (to test for a possible complex V deficiency). Plates were incubated at 28 or 36°C for the indicated time. (B) Phenotype of the deletion of *ppr8* in both intronic backgrounds. Intron-containing (Σi) $\Delta ppr8$ ($\Delta 8$) cells and the isogenic wild-type NB205-6A were streaked on complete glucose medium and replica-plated onto complete medium containing 2% glucose, 2% galactose + 0.1% glucose, or 3% glycerol, 3% ethanol and incubated as indicated before taking photographs. (C) Cytochrome spectra of Δppr mutants. Cells of the Δppr mutants in the intron-containing background were grown for 2–3 days on glucose medium and low temperature cytochrome spectra were recorded after the addition of dithionite to fully reduce the cytochromes. The peaks corresponding to cytochromes *aa3*, *b*, *c1* and *c* are indicated.

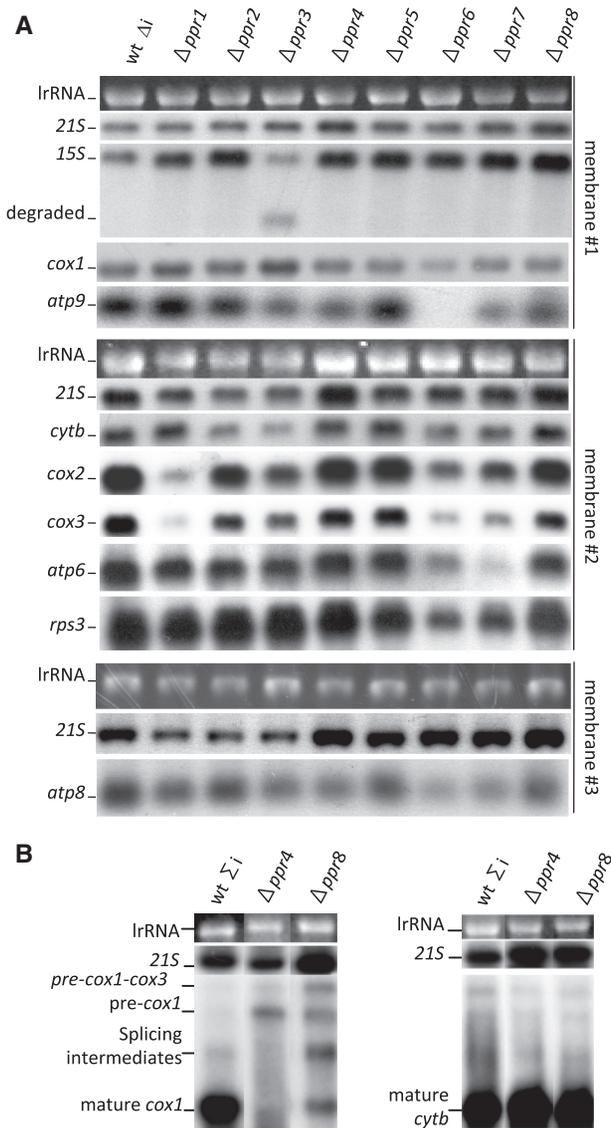


Figure 5. (A) Analysis of the steady state mtRNA levels in the Δppr mutants in the intron-less background. Total RNA from the intron-less P3 wild-type and isogenic Δppr mutants were hybridized to different probes as indicated. Three representative membranes are presented with the UV photograph of the cytoplasmic large rRNA and a control hybridization with the 21S large mitochondrial RNA. All hybridizations have been repeated two or three times and only the changes consistently observed in all experiments are described in the text. For unknown reasons, there is slightly less 21S RNA in the mutants $\Delta ppr1$, 2 and 3. The same RNA sample was used in preparation for each membrane, but in membrane 1, the wild-type sample appears to have transferred less efficiently. (B) Northern blot of the mosaic genes *cox1* and *cytb* in the $\Delta ppr4$ and $\Delta ppr8$ mutants in an intron-containing background. Total RNA from the intron-containing NB205-6A wild-type and isogenic $\Delta ppr4$ and $\Delta ppr8$ mutants and hybridized to the intron-containing *cox1* and *cytb* probes as indicated. Precursor and mature RNAs are marked. The membranes are presented with the UV photograph of the cytoplasmic large rRNAs and a control hybridization with the 21S large mitochondrial RNA.

lacked cytochrome *aa3* in spectra, whilst cytochrome *b* and *c1* were significantly decreased. Conversely, the mutant grew better than the wild-type on medium containing antimycin, suggesting that the ATP synthase functioned very efficiently. At the molecular level, deletion of

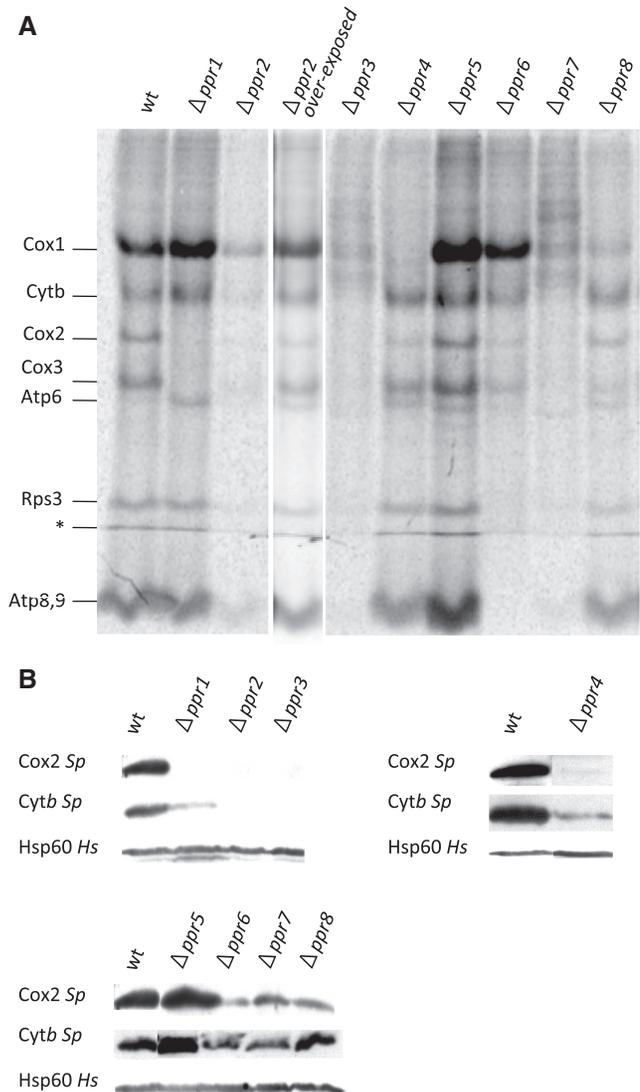


Figure 6. (A) *In vivo* ^{35}S labeling of Δppr mutants. The various Δppr mutants were labeled *in vivo* with ^{35}S methionine/cysteine in the presence of cycloheximide, which blocks cytoplasmic translation, and similar amounts of total proteins were loaded on an SDS-PAGE gel, as verified by coomassie blue staining (not shown). A typical result in the intron-less background is presented after a 3 day phosphorimager exposure, however, similar patterns have been obtained whatever the mitochondrial intron content. For the $\Delta ppr2$ strain that showed a very weak signal, a 3-month exposure of the gel onto a film is also shown. The band marked with the asterisk is a migration artifact. For reasons that are unknown, Atp6 is often more efficiently labeled in respiratory mutants (especially cytochrome oxidase mutants) compared to the wild-type. (B) Steady state level of mitochondrial proteins in the various Δppr mutants. Purified mitochondria from the eight Δppr mutants in the intron-less background were analyzed by SDS-PAGE and western blot. Transferred proteins were hybridized to *S. pombe* antibodies raised against Cox2 and Cytb. The loading control is Hsp60 that recognizes a mitochondrial matrix protein.

ppr1 led to a strong reduction in the levels of the *cox2* and *cox3* mRNAs (Figure 5A), as a consequence, Cox2 and Cox3 were absent in the *in vivo* labeling experiments (Figure 6A) and Cox2 was lacking in western blot (Figure 6B). These data show that Ppr1 increases the

stability of both the *cox2* and *cox3* mRNAs, which explains the lack of Cox2 and Cox3 proteins. However, the stability function of Ppr1 does not exclude a supplementary role in mRNA translation. In maize chloroplasts, PPR10 stabilizes the *atpH* mRNA by binding 5'-UTR and blocking the action of exoribonucleases, but the binding of PPR10 also uncovers a ribosome binding site allowing translation of the *atpH* mRNA (55,56). The *cox1* mRNA is stable in the absence of Ppr1, suggesting that the effects on *cox2* and *cox3* are specific and not part of a general defect in all the subunits of complex IV. In addition, the decrease of steady state Cytb is probably due to a partial destabilization of complex III due to the absence of complex IV.

The *Δppr3* mutant could not grow on galactose, and it also showed a clear thermosensitivity on glucose containing media (Figure 4A). In addition cytochrome *aa3*, *b* and *c1* were strongly decreased (Figure 4C). Deletion of *ppr3* led to a strong reduction in the 15S-rRNA associated with the appearance of shorter RNAs that are probably degradation products. There is also a reduction in *cytb* mRNA (Figure 5A). In addition there was a general decrease in the synthesis of all the mitochondrial proteins and the tested proteins could not be detected by western blot.

These results suggest that Ppr3 is primarily required for the stability of the small rRNA, and that the severe reduction in the level of the small rRNA in the *Δppr3* mutant will perturb protein synthesis, leading to a general mitochondrial translation defect. Ppr3 is structurally homologous to Dmr1 from *S. cerevisiae* (14) and the human PTC3 (13), both of which are involved in the maintenance of the small mitochondrial rRNA. However, it is possible that the *S. pombe* protein has acquired another function, as the deletion of *ppr3* also leads to a reduction in the level of *cytb* mRNA and apart from Ppr3, no PPR protein specifically targeting the *cytb* mRNA has been identified so far in *S. pombe*.

Ppr6 and 7 appear to target primarily the *atp9* and 6 mRNAs, respectively

The *Δppr6* and *Δppr7* strains, could not grow on galactose, but also showed low viability on glucose containing G418 and were strongly sensitive to antimycin A on glucose medium (Figure 4A), thus revealing a defect in the ATP synthase (complex V). In addition, the peaks for cytochromes *aa3*, *b* and *c1* were decreased although not absent (Figure 4C). The deletion of *ppr6* and *ppr7* caused a more or less pronounced reduction in the levels of all the protein coding RNAs, the most dramatic being the absence of *atp9* in *Δppr6* and the very strong decrease of *atp6* in *Δppr7* (Figure 5A). As expected, Atp9 and Atp6 appeared to be absent from *Δppr6* and *Δppr7*, respectively, and there was a generalized reduction in mitochondrial protein synthesis, which was more pronounced for *Δppr7*. In the *in vivo* labeling experiments, a band below the level of Atp6 could be seen in *Δppr7* cells, but the origin of this band is unknown. However, the steady state levels of Cox2 and Cytb appeared to be normal;

unfortunately no antibodies are available to test mitochondrially-encoded subunits of the ATP synthase.

The *Δppr6* and *Δppr7* mutants seem to have a general effect on the stability of many mRNAs as well as translation. However, the most specific consequence of the *Δppr6* and *Δppr7* mutations appears to be a strong decrease in the level of the *atp9* and *atp6* mRNAs, respectively, this is consistent with the ATP synthase defect that is indicated by the antimycin sensitivity. It is possible that the more general problems in translation and complex assembly could be secondary effects of the ATP synthase F0 defect. In *S. cerevisiae*, complex V mutants often have a long-range effect by destabilizing the mtDNA, impairing mitochondrial translation and leading to wider pleiotropic effects [for review (57)]. However, we cannot exclude that Ppr6 and Ppr7 could be general mRNA stability factors with multiple targets, some such as *atp9* and *atp6* being more sensitive. This could be similar to LRPPRC that has multiple RNA targets, amongst which *COX1* and *COX3* are more sensitive to degradation when LRPPRC is mutated or silenced (25,26). Ppr6 is a sequence homolog of Atp13/Aep2 from *S. cerevisiae*, which is specifically required for the stability of *atp9* (52,53), and was also recently identified as a PPR protein (29). Our results show that Ppr6 is similar to Aep2, but may have acquired other functions.

Ppr4 is a specific translational activator with a single target

Amongst the PPR proteins that affect translation, Ppr4 is the most specific. Cells devoid of Ppr4 could not grow on galactose (Figure 4A) and cytochrome spectra showed that cytochrome *aa3* was lacking whilst cytochrome *b* and *c1* were somewhat decreased (Figure 4C). In the intron-less mitochondrial background (Figure 5A), deletion of *ppr4* did not seem to cause an obvious change in the steady state levels of the mitochondrial RNAs, however in an intron-containing background, we could not detect any mature *cox1* mRNA and there was an accumulation of the unspliced pre-mRNA containing the two *cox1* introns, these introns encode maturases that are necessary for their own excision (Figure 5B). Significantly, the expression of the intron-containing *cytb* mRNA was not affected. In accordance, the *Δppr4* strain showed a specific absence of Cox1 synthesis and a reduction in Cox2 synthesis (Figure 6A) and Cox2 was barely detectable in the steady state (Figure 6B).

These observations strongly suggest that the only function of Ppr4 is to specifically activate the translation of the *cox1* mRNA, and that a deficiency in the synthesis of the maturases encoded by the *cox1* introns is responsible for the splicing defect rather than an additional function of Ppr4 as a splicing factor. The reduced level in the Cox2 protein labeling despite normal *cox2* mRNA levels in *Δppr4* cells is probably a secondary defect of the absence of the Cox1 protein. In *S. pombe*, *in vivo* protein synthesis experiments require rather long incorporation times (3h as opposed to 5–15 min in *S. cerevisiae*), so the result is a combination of synthesis and stability and

in *S. cerevisiae*, it is known that the absence of Cox1, Cox2 is particularly unstable (58).

Ppr4 shares significant similarities with Pet309 from *S. cerevisiae* (17), which specifically activates the translation of the *cox1* mRNA and helps to stabilize intron-containing *cox1* transcripts. It is difficult to ascertain whether Ppr4 is also important for the stability of the intron-containing *cox1* transcript, as *S. pombe* has fewer introns in *cox1* than *S. cerevisiae*. Thus, Ppr4 is the first mRNA-specific translational activator discovered in fission yeast. It is striking that *cox1* translational activators have been found in *S. cerevisiae*, Pet309 and Mss51 [(18,59,60) and references therein], in humans, Taco1 (61) and now in *S. pombe*. This emphasizes the crucial role played by *cox1* translation in the regulation of mitochondrial biogenesis, as demonstrated by the feedback regulatory loop mediated by Mss51 and other factors in *S. cerevisiae* (62–64). It will be of great interest to determine the precise target sequence of Ppr4 on the *cox1* mRNA.

Ppr8 modestly affects mitochondrial translation

In contrast to $\Delta ppr4$, $\Delta ppr8$ cells only showed a slight growth defect on galactose medium compared to the wild-type whatever the temperature (Figure 4A), but exhibited a clear growth arrest on glycerol medium (Figure 4B). The cytochrome spectrum of $\Delta ppr8$ cells was only slightly affected, with less cytochrome *aa3* (Figure 4C). In the intron-less mitochondrial background (Figure 5A), $\Delta ppr8$ did not seem to cause an obvious change in the steady state levels of the mitochondrial RNAs. In the intron-containing background, the deletion of *ppr8* led to a reduction in the level of the mature *cox1* mRNA and an accumulation of all the splicing intermediates and the pre-*cox1-cox3* intermediate; again *cytb* was not affected (Figure 5B). Finally, there was a general but limited reduction in mitochondrial protein synthesis with a specific drop in the synthesis of Cox1 (Figure 6A), but for the proteins tested, the steady state levels seem normal (Cytb) or only slightly decreased (Cox2) (Figure 6B). Thus the absence of Ppr8 seems to cause a general but rather limited decrease in translation, which appears more pronounced for Cox1; however, it is not possible to conclude if it has a single, or multiple targets.

Ppr2 is a general translation factor

Cells deleted for *ppr2* were defective for growth on galactose (Figure 3A) although some weak growth was visible upon longer incubation, and in cytochrome spectra, cytochromes *aa3*, *b* and *c1* were strongly decreased. The steady state of mitochondrial RNA was wild-type, except for a modest reduction in the *cytb* mRNA. However there was a large generalized reduction in the synthesis of all the mitochondrial proteins, although all bands were visible after a long exposure, and the tested proteins could not be detected in western blots. This shows that the deletion of *ppr2* leads to a drastic reduction in the synthesis of all the mitochondrially synthesized proteins and an absence of steady state Cytb and Cox2, possibly because the level

of synthesis is too low to allow efficient assembly of the complexes and the subunits are degraded. Thus Ppr2 appears to be a general translation factor.

Ppr5 is a negative regulator of mitochondrial gene expression

Finally, the results in Figure 4A (intron-containing mitochondrial background), showed that deletion of *ppr5* did not affect growth under these conditions, indeed the $\Delta ppr5$ strain appears to grow even better than the wild-type, especially on glucose medium. In accordance with the growth data, the $\Delta ppr5$ cytochrome spectrum was wild-type (Figure 4C) and there was no obvious change in the steady state levels of the mitochondrial RNAs (Figure 5A). The most striking result is that the deletion of *ppr5* led to a clear increase in the synthesis, but not the steady state level, of the mitochondrial proteins (compare Figure 6A and B). Thus, Ppr5 is the only *S. pombe* PPR protein whose absence seems to stimulate, rather than impair, mitochondrial biogenesis and especially mitochondrial protein synthesis. This suggests that Ppr5 could be a general negative regulator of translation. In addition, a YFP tagged version of Ppr5 seemed more highly expressed during growth on glucose rather than galactose, which would be consistent with a role as a repressor of mitochondrial biogenesis during fermentation (data not shown).

To further analyze the function of Ppr5, we determined the effect of *ppr5* over-expression on growth and mitochondrial translation. A FLAG version of *ppr5* under the control of the inducible *nmt1* promoter was integrated at the *leu1* locus in the wild-type NB205-6A and isogenic $\Delta ppr5$ and $\Delta ppr4$ (which does not synthesize Cox1) strains. Controls were either integrations of the vector or of a linearized plasmid producing Ppr4-FLAG in the same three strains. The transformants were tested for growth on non-fermentable medium (Figure 7A). Whereas the FLAG versions of Ppr5 or Ppr4 complemented the corresponding mutants they compromised growth of the wild-type on ethanol-glycerol medium, Ppr5 over-expression was particularly deleterious. Next, we looked at *in vivo* labeling of mitochondrial proteins in these strains (Figure 7B). Whereas over-expression of Ppr4 had a mild effect, the labeling of mitochondrially-synthesized proteins was decreased when Ppr5 was over-produced, consistent with Ppr5 being a negative regulator of translation.

If the deletion of Ppr5 relieves an inhibition of translation, we would predict that it might be able to counteract a mutation that decreases Cox1 synthesis, unless the mutated component is essential for *cox1* translation. To test this hypothesis, *ppr5* was deleted in the $\Delta ppr4$ mutant that specifically abolishes Cox1 synthesis. In the $\Delta ppr4 \Delta ppr5$ double mutant, Cox1 is not synthesized as in the $\Delta ppr4$ single mutant; however, other mitochondrial proteins such as Cytb, Cox3 and Atp9 are more strongly labeled as in the single $\Delta ppr5$ mutant (Figure 7C). Thus the deletion of *ppr5* increases the general translation efficiency but cannot overcome the *cox1* translation defect in

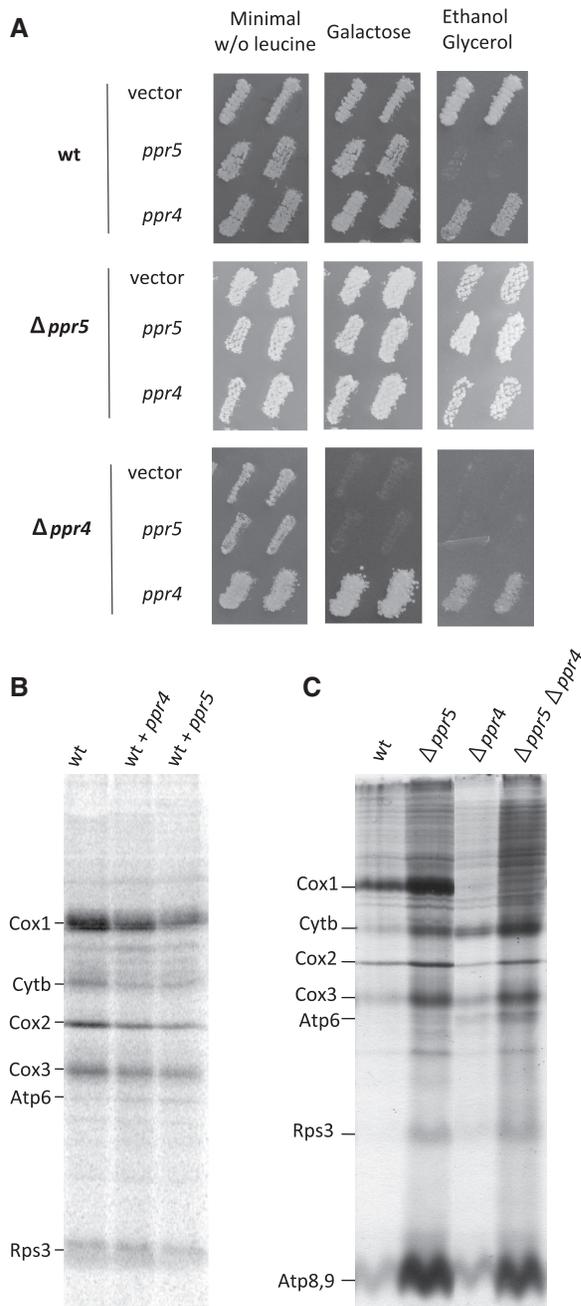


Figure 7. Effect of *ppr4* and *ppr5* over-expression or deletion in different strain backgrounds. **(A)** Effect of *ppr4* and *ppr5* over-expression on growth. Wild-type (NB205-6A), $\Delta ppr4$ or $\Delta ppr5$ cells were transformed with integrative *leu1* plasmids expressing functional tagged versions of *ppr4* or *ppr5* under the control of the *nmt1* promoter (from the Riken consortium), or with the control vector. [Leu^+] transformants were patched on minimal glucose medium lacking leucine, replica-plated onto complete galactose or ethanol glycerol medium and incubated at 28°C for 3–7 days. **(B)** ^{35}S labeling of mitochondrial proteins in cells overexpressing *ppr4* or *ppr5*. Wild-type strains transformed with the control plasmid or functional tagged versions of *ppr4* or *ppr5* under the control of the *nmt1* promoter from the upper part of panel A were labeled with ^{35}S amino acids in presence of cycloheximide. Similar amounts of protein were loaded in each lane as verified by coomassie blue staining (data not shown). **(C)** ^{35}S labeling of mitochondrial proteins of the wild-type (NB205-6A) and of single or double *Appr4* and 5 mutants in the mitochondrial intron containing background were labeled as in panel B. Similar amounts of protein were loaded in each lane as verified by coomassie blue staining (data not shown).

a *Appr4* mutant, showing that the deletion of *ppr4* causes a specific block in *cox1* translation that is epistatic to $\Delta ppr5$.

These data are consistent with Ppr5 being a general negative regulator of mitochondrial translation, and confirm that Ppr4 plays an essential role in *cox1* translation. In humans, another PPR protein PTC1, has been proposed to inhibit mitochondrial translation by decreasing the stability of the mitochondrial leucine tRNAs (11). We have probed several mitochondrial tRNAs from *S. pombe* including the two leucine tRNAs but did not detect any increase in the steady state levels in cells lacking Ppr5 (data not shown). Thus even though Ppr5 might play a similar role to PTC1 in humans, the mechanism by which it represses translation is probably different.

CONCLUSION

In summary, this study is a systematic functional analysis of all the identified PPR proteins in a given organism. The fact that the PPR motif is highly degenerate raises the question of whether we have indeed identified all the members of the family present in the *S. pombe* genome. We expected to find a PPR protein involved in *S. pombe* tRNA processing, since in both the yeast *S. cerevisiae* (29) and Man (8), one subunit of RNase P contains PPR motifs, irrespective of whether an RNA component is present (*S. cerevisiae*) or not (human). However no sequence homolog can be found in *S. pombe*, suggesting that either RNase P is too divergent to be detected by sequence comparison, or that tRNA processing occurs via a different system despite the presence of a possible gene for an RNase P RNA in the *S. pombe* mtDNA. Possible candidates could be the Suv3 and Dss1 homologs Pah1 and Par1, which have been implicated in the 3'-end processing of fission yeast mRNAs (54).

While it is clear that *S. pombe* PPR proteins act at different levels and that some have general effects, whereas others have very specific effects on individual RNAs, no correlation could be made between the obvious structural characteristics of the proteins and these two general classes of function, RNA stability or translation. Both contain PPR proteins that are 100% membrane bound and others that partition between the membrane and the mitochondrial matrix when extracted with carbonate. Although the number of PPR motifs in a given protein varies considerably in both groups, there is a tendency for the specificity to increase with the number of PPR motifs. For example, *ppr4*, which appears to have the most specific phenotype when deleted, has 13 PPR motifs, whilst *ppr2*, which gives a general phenotype when deleted, only has three. If this is the case, the negative regulator Ppr5 does not seem to follow this scheme as it contains the highest number of PPR motifs but has a general effect; however, at present the mode of action of Ppr5 is unknown and its target could be highly specific, yet result in a general reduction in translation. Thus further studies will be necessary to define the structure function relationship of the different PPR proteins, analyze their interaction with their target RNAs and clarify the

different roles of this fascinating family of proteins in mitochondrial biogenesis.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Pawel Golik for providing unpublished results of the bioinformatic identification of *S. pombe* PPR proteins. We thank Geneviève Dujardin and Thomas D. Fox both for fruitful discussions and for the gift of antibodies and G.D. for critical reading of the article. Laurence Maréchal-Drouard gave advice on tRNA hybridizations and B. Schäfer provided the P3 *S. pombe* intron-less strain. The *Δku* strains were gifts from the National Bio Resource Program in Japan. FLAG-tagged versions of the *ppr* genes were distributed by the RIKEN Bioresource Center.

FUNDING

The Agence Nationale pour la Recherche (ANR) (JCJC06-0163 to N.B. and I.K.); the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20091217787 to N.B. and I.K.). L.D. is recipient of a PhD fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et la Technologie. Funding for open access charge: ANR.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Small,I.D. and Peeters,N. (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 46–47.
- Lurin,C., Andres,C., Aubourg,S., Bellaoui,M., Bitton,F., Bruyere,C., Caboche,M., Debast,C., Gualberto,J., Hoffmann,B. *et al.* (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, **16**, 2089–2103.
- Hayes,M.L. and Mulligan,R.M. (2011) Pentatricopeptide repeat proteins constrain genome evolution in chloroplasts. *Mol. Biol. Evol.*, **7**, 2029–2039.
- Delannoy,E., Stanley,W.A., Bond,C.S. and Small,I.D. (2007) Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 1643–1647.
- Schmitz-Linneweber,C. and Small,I. (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.*, **13**, 663–670.
- Lightowlers,R.N. and Chrzanowska-Lightowlers,Z.M. (2008) PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression. *Biochem. J.*, **416**, e5–e6.
- Zehrmann,A., Verbitskiy,D., Hartel,B., Brennicke,A. and Takenaka,M. (2011) PPR proteins network as site-specific RNA editing factors in plant organelles. *RNA Biol.*, **8**, 67–70.
- Holzmann,J., Frank,P., Löffler,E., Bennett,K.L., Gerner,C. and Rossmanith,W. (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*, **135**, 462–474.
- Xu,F., Ackerley,C., Maj,M.C., Addis,J.B., Levandovskiy,V., Lee,J., Mackay,N., Cameron,J.M. and Robinson,B.H. (2008) Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome *b* expression and a marked reduction in ubiquinol-cytochrome *c* reductase activity in mouse heart mitochondria. *Biochem. J.*, **416**, 15–26.
- Hattori,M. and Sugita,M. (2009) A moss pentatricopeptide repeat protein binds to the 3' end of plastid *clpP* pre-mRNA and assists with mRNA maturation. *FEBS J.*, **276**, 5860–5869.
- Rackham,O., Davies,S.M., Shearwood,A.M., Hamilton,K.L., Whelan,J. and Filipovska,A. (2009) Pentatricopeptide repeat domain protein 1 lowers the levels of mitochondrial leucine tRNAs in cells. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5859–5867.
- Ellis,T.P., Helfenbein,K.G., Tzagoloff,A. and Dieckmann,C.L. (2004) Aep3p stabilizes the mitochondrial bicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 of the H⁺-translocating ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 15728–15733.
- Davies,S.M., Rackham,O., Shearwood,A.M., Hamilton,K.L., Narsai,R., Whelan,J. and Filipovska,A. (2009) Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. *FEBS Lett.*, **583**, 1853–1858.
- Puchta,O., Lubas,M., Lipinski,K.A., Piatkowski,J., Malecki,M. and Golik,P. (2010) *DMRI (CCM1/YGR150C)* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an RNA-binding protein from the pentatricopeptide repeat family required for the maintenance of the mitochondrial 15S ribosomal RNA. *Genetics*, **184**, 959–973.
- Nouet,C., Bourens,M., Hlavacek,O., Marsy,S., Lemaire,C. and Dujardin,G. (2007) Rmd9p controls the processing/stability of mitochondrial mRNAs and its overexpression compensates for a partial deficiency of Oxa1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **175**, 1105–1115.
- Williams,E.H., Butler,C.A., Bonnefoy,N. and Fox,T.D. (2007) Translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: functional interactions among mitochondrial ribosomal protein Rsm28p, initiation factor 2, methionyl-tRNA-formyltransferase and novel protein Rmd9p. *Genetics*, **175**, 1117–1126.
- Manthey,G.M. and McEwen,J.E. (1995) The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **14**, 4031–4043.
- Tavares-Carreón,F., Camacho-Villasana,Y., Zamudio-Ochoa,A., Shingu-Vazquez,M., Torres-Larios,A. and Perez-Martinez,X. (2008) The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial *COX1* mRNA in yeast. *J. Biol. Chem.*, **283**, 1472–1479.
- Mingler,M.K., Hingst,A.M., Clement,S.L., Yu,L.E., Reifur,L. and Koslowsky,D.J. (2006) Identification of pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **150**, 37–45.
- Pusnik,M., Small,I., Read,L.K., Fabbro,T. and Schneider,A. (2007) Pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei* function in mitochondrial ribosomes. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 6876–6888.
- Sondheimer,N., Fang,J.K., Polyak,E., Falk,M.J. and Avadhani,N.G. (2010) Leucine-rich pentatricopeptide-repeat containing protein regulates mitochondrial transcription. *Biochemistry*, **49**, 7467–7473.
- Mootha,V.K., Lepage,P., Miller,K., Bunkenborg,J., Reich,M., Hjerrild,M., Delmonte,T., Villeneuve,A., Sladek,R., Xu,F. *et al.* (2003) Identification of a gene causing human cytochrome *c* oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 605–610.
- Xu,F., Morin,C., Mitchell,G., Ackerley,C. and Robinson,B.H. (2004) The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of *COX* (cytochrome *c* oxidase) I and *COX III* mRNA. *Biochem J.*, **382**, 331–336.
- Debray,F.G., Morin,C., Janvier,A., Villeneuve,J., Maranda,B., Laframboise,R., Lacroix,J., Decarie,J.C., Robitaille,Y., Lambert,M. *et al.* (2011) LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome *c* oxidase deficiency. *J. Med. Genet.*, **48**, 183–189.
- Gohil,V.M., Nilsson,R., Belcher-Timme,C.A., Luo,B., Root,D.E. and Mootha,V.K. (2010) Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression. *J. Biol. Chem.*, **285**, 13742–13747.

26. Sasarman, F., Brunel-Guitton, C., Antonicka, H., Wai, T. and Shoubridge, E.A. (2010) LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 1315–1323.
27. Cooper, M.P., Uldry, M., Kajimura, S., Arany, Z. and Spiegelman, B.M. (2008) Modulation of PGC-1 coactivator pathways in brown fat differentiation through LRP130. *J. Biol. Chem.*, **283**, 31960–31967.
28. Topisirovic, I., Siddiqui, N., Lapointe, V.L., Trost, M., Thibault, P., Bangeranye, C., Pinol-Roma, S. and Borden, K.L. (2009) Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J.*, **28**, 1087–1098.
29. Lipinski, K.A., Puchta, O., Surandranath, V., Kudla, M. and Golik, P. (2011) Revisiting the yeast PPR proteins - application of an iterative hidden markov model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Mol. Biol. Evol.* (in press).
30. Schäfer, B., Merlos-Lange, A.M., Anderl, C., Welsch, F., Zimmer, M. and Wolf, K. (1991) The mitochondrial genome of fission yeast: inability of all introns to splice autocatalytically, and construction and characterization of an intronless genome. *Mol. Gen. Genet.*, **225**, 158–167.
31. Jiang, H., Sun, W., Wang, Z., Zhang, J., Chen, D. and Murchie, A.I. (2011) Identification and characterization of the mitochondrial RNA polymerase and transcription factor in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* (in press).
32. Schäfer, B. (2005) RNA maturation in mitochondria of *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Gene*, **354**, 80–85.
33. Temperley, R.J., Wydro, M., Lightowlers, R.N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010) Human mitochondrial mRNAs—like members of all families, similar but different. *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1081–1085.
34. Chiron, S., Suleau, A. and Bonnefoy, N. (2005) Mitochondrial translation: elongation factor tu is essential in fission yeast and depends on an exchange factor conserved in humans but not in budding yeast. *Genetics*, **169**, 1891–1901.
35. Matsuyama, A., Shirai, A., Yashiroda, Y., Kamata, A., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (2004) pDUAL, a multipurpose, multicopy vector capable of chromosomal integration in fission yeast. *Yeast*, **21**, 1289–1305.
36. Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Brivet-Chevillotte, P. and Dujardin, G. (1996) Cloning by functional complementation, and inactivation, of the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *ABC1*. *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 204–210.
37. Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O. and Dujardin, G. (2000) The respiratory gene *OXA1* has two fission yeast orthologues which together encode a function essential for cellular viability. *Mol. Microbiol.*, **35**, 1135–1145.
38. Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. and Okayama, H. (1990) High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6485–6489.
39. Chiron, S., Gaisne, M., Guillou, E., Belenguer, P., Clark-Walker, G.D. and Bonnefoy, N. (2007) Studying mitochondria in an attractive model: *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Mol. Biol.*, **372**, 91–105.
40. Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267–272.
41. Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 259–265.
42. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793–1808.
43. Goldstein, A.L. and McCusker, J.H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 1541–1553.
44. Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y. et al. (2006) ORFome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 841–847.
45. Petracek, M.E. and Longtine, M.S. (2002) PCR-based engineering of yeast genome. *Methods Enzymol.*, **350**, 445–469.
46. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. and Struhl, K. (1993) *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & sons, Boston, Mass.
47. Gouget, K., Verde, F. and Barrientos, A. (2008) *In vivo* labeling and analysis of mitochondrial translation products in budding and in fission yeasts. *Methods Mol. Biol.*, **457**, 113–124.
48. Lemaire, C. and Dujardin, G. (2008) Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria: activity measurement and subunit composition analysis. *Methods Mol. Biol.*, **432**, 65–81.
49. Steele, D.F., Butler, C.A. and Fox, T.D. (1996) Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 5253–5257.
50. Gaisne, M. and Bonnefoy, N. (2006) The *COX18* gene, involved in mitochondrial biogenesis, is functionally conserved and tightly regulated in humans and fission yeast. *FEMS Yeast Res.*, **6**, 869–882.
51. Claisse, M.L., Pere-Aubert, G.A., Clavilier, L.P. and Slonimski, P.P. (1970) Method for the determination of cytochrome concentrations in whole yeast cells. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 430–438.
52. Ackerman, S.H., Gatti, D.L., Gellefors, P., Douglas, M.G. and Tzagoloff, A. (1991) *ATP13*, a nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase. *FEBS Lett.*, **278**, 234–238.
53. Ellis, T.P., Lukins, H.B., Nagley, P. and Corner, B.E. (1999) Suppression of a nuclear *aep2* mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by a base substitution in the 5'-untranslated region of the mitochondrial *olil* gene encoding subunit 9 of ATP synthase. *Genetics*, **151**, 1353–1363.
54. Hoffmann, B., Nickel, J., Speer, F. and Schafer, B. (2008) The 3' ends of mature transcripts are generated by a processosome complex in fission yeast mitochondria. *J. Mol. Biol.*, **377**, 1024–1037.
55. Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G. and Barkan, A. (2011) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**, 415–420.
56. Barkan, A. (2011) Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. *Plant physiology*, **155**, 1520–1532.
57. Ackerman, S.H. and Tzagoloff, A. (2005) Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **80**, 95–133.
58. Lemaire, C., Robineau, S. and Netter, P. (1998) Molecular and biochemical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* *cox1* mutants. *Curr. Genet.*, **34**, 138–145.
59. Perez-Martinez, X., Broadley, S.A. and Fox, T.D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.*, **22**, 5951–5961.
60. Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R.L., Fox, T.D., Tzagoloff, A. and Barrientos, A. (2007) Aberrant translation of cytochrome *c* oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 523–535.
61. Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J.E., Lochmuller, H., Chevrette, M., Kaufman, B.A., Horvath, R. et al. (2009) Mutation in *TACO1*, encoding a translational activator of *COXI*, results in cytochrome *c* oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat. Genet.*, **41**, 833–837.
62. Pierrrel, F., Bestwick, M.L., Cobine, P.A., Khalimonchuk, O., Cricco, J.A. and Winge, D.R. (2007) Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J.*, **26**, 4335–4346.
63. Fontanesi, F., Soto, I.C., Horn, D. and Barrientos, A. (2010) Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome *c* oxidase biogenesis. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 245–259.
64. Perez-Martinez, X., Butler, C.A., Shingu-Vazquez, M. and Fox, T.D. (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4371–4380.

B. Résumé de l'article 2 en français

Comme vu dans l'Introduction, les protéines à motifs PPR jouent en général un rôle important dans le métabolisme des ARNs des organelles, et il existe chez *S. cerevisiae* plusieurs protéines PPR qui sont impliquées dans la traduction mitochondriale (Introduction Section IV-A et -B). Nous avons donc recherché les protéines de *S. pombe* présentant des motifs PPR, dans l'espoir que certaines d'entre elles soient impliquées dans la traduction mitochondriale, ou tout du moins dans le métabolisme des ARN mitochondriaux.

Ces protéines ont toutes pu être identifiées en couplant des recherches en BLAST classiques et l'utilisation de l'algorithme SCIPHER, développé spécialement pour détecter les motifs PPR chez les levures par l'équipe de Pawel Golik (Lipinski *et al.*, 2011). Au total 9 protéines PPR de *S. pombe* ont été détectées et appelées Ppr1 à Ppr9. Cette dernière protéine étant l'ARN polymérase mitochondriale, Rpo41, elle est relativement bien caractérisée, nous l'avons donc écartée de notre analyse. L'article Kühl *et al.*, 2011 (article 2) relate l'étude des 8 autres protéines PPR, Ppr1 à Ppr8. Ces protéines PPR de *S. pombe* sont de tailles variables, allant de 432 (Ppr2) à 1261 acides aminés (Ppr5) et possèdent des nombres variés de motifs allant d'au moins 2 (Ppr6 et Ppr8) à 14 (Ppr5) (Figure 2 article 2).

Les protéines PPR sont connues pour être des protéines spécifiques des organelles et effectivement nous avons montré que les protéines Ppr1 à Ppr8 de *S. pombe* sont des protéines mitochondriales, qui présentent toutes une interaction avec la membrane, soit partielle soit totale (Figure 3 article 2). La plupart de ces huit protéines est nécessaire à la fonction respiratoire : les délétions des gènes codant pour Ppr1 à Ppr4 ainsi que Ppr6 et Ppr7 engendrent des phénotypes respiratoires alors que l'absence de Ppr8 affecte très faiblement la croissance sur glycérol et que la perte de Ppr5 n'a pas d'effet voire améliore la capacité de croître sur milieu non-fermentescible (Figure 5 article 2).

Ces phénotypes se traduisent au niveau moléculaire par des défauts de la quantité de certains ARNs à l'état stationnaire pour la plupart des mutants (Figure 4 article 2). Seul le mutant $\Delta ppr5$ ne présente pas de différence d'abondance des ARNs par rapport à une souche sauvage, et $\Delta ppr2$ est aussi quasiment sauvage. Par contre, dans les souches $\Delta ppr1$, $\Delta ppr3$, $\Delta ppr6$, et $\Delta ppr7$, il existe des ARNs très instables, respectivement les ARNm *cox2* et *cox3*, *15S*, *atp9*, et *atp6*. Enfin pour les mutants $\Delta ppr4$ et $\Delta ppr8$, c'est l'ARNm mature *cox1* qui est affecté dans un contexte comprenant des introns mitochondriaux, avec accumulation de l'ARN précurseur. Cela suggère que ces deux gènes sont impliqués soit dans l'épissage du précurseur de *cox1*, soit dans sa traduction ; en effet chacun des deux introns de *cox1* code pour une maturase, nécessaire à leur propre excision. Cependant, comme les phénotypes de croissance de $\Delta ppr1$ et $\Delta ppr8$ sont les mêmes en absence ou présence d'introns, le défaut majeur de ces mutants n'est donc pas un défaut d'épissage mais plutôt de traduction.

Ces phénotypes se répercutent au niveau de la synthèse des protéines mitochondriales dans des proportions plus ou moins importantes (Figure 6 article 2). Par exemple les délétions de *ppr1*, *ppr4*, ou *ppr6* entraînent un défaut de traduction spécifique respectivement de *cox2* et *cox3*, *cox1*, ou *atp6*. Les délétions de *ppr2*, *ppr3* ou encore *ppr7* sont corrélées à un défaut général de traduction mitochondriale. $\Delta ppr8$ cause une diminution générale de traduction plus marquée pour *cox1*. Par contre la perte de la protéine Ppr5 conduit à une meilleure synthèse

de l'ensemble des protéines codées par l'ADNmt (Figure 6 article 2), suggérant que Ppr5 est un répresseur général de la traduction ; cette hypothèse est renforcée par le fait que la surexpression de *ppr5* dans une souche sauvage entraîne l'apparition d'un phénotype respiratoire et diminue le marquage des protéines mitochondriales (Figure 7 article 2).

Les protéines PPR de *S. pombe* possèdent donc des cibles très variées pouvant être uniques comme pour Ppr4 ou multiples comme pour Ppr1. Certaines de ces protéines sont impliquées dans la stabilité de transcrits mitochondriaux comme Ppr1 ou Ppr3, d'autres dans la traduction: par exemple l'activation traductionnelle spécifique d'un ARNm comme pour Ppr4, générale comme pour Ppr2, ou la répression traductionnelle comme pour Ppr5. De plus, cette étude montre que certaines des protéines PPR de *S. pombe* apparaissent clairement conservées en structure et fonction avec des protéines PPR de *S. cerevisiae* ou humaines. Ppr3 pourrait ainsi être l'orthologue de Dmr1 et PTC3, impliquées dans la stabilité de l'ARN *15S* (Putchala *et al.*, 2010) et *12S* (Davies *et al.*, 2009) respectivement ; Ppr4 serait l'équivalent de Pet309, nécessaire à la traduction de *cox1* (Tavares-Carreón *et al.*, 2008), et Ppr6 jouerait le rôle de Aep2, nécessaire à la stabilité du transcrit d'*atp9* (Ackerman & Tzagoloff, 1990 ; Ellis *et al.*, 1999). Les ARN polymérases mitochondriales des deux levures et de l'homme sont également toutes des protéines PPR homologues en séquence. Les autres protéines PPR de *S. pombe* sont moins clairement conservées fonctionnellement, ou semblent clairement spécifiques de cet organisme (Ppr7, Ppr8).

L'ensemble de ces résultats et propositions est résumé dans le Tableau 17, qui inclut aussi l'ARN polymérase Rpo41/Ppr9, ainsi qu'une autre protéine qui a récemment été détectée par l'équipe de Pawel Golik comme pouvant être la dixième (et dernière ?) protéine PPR de *S. pombe*. Une hypothèse intéressante qui va être testée au laboratoire est que cette dixième protéine pourrait être une sous-unité de la RNase P, enzyme qui n'a pas encore été mise en évidence chez *S. pombe* bien que le gène de son cofacteur ARN (Introduction Section II-C-2) soit présent dans l'ADNmt.

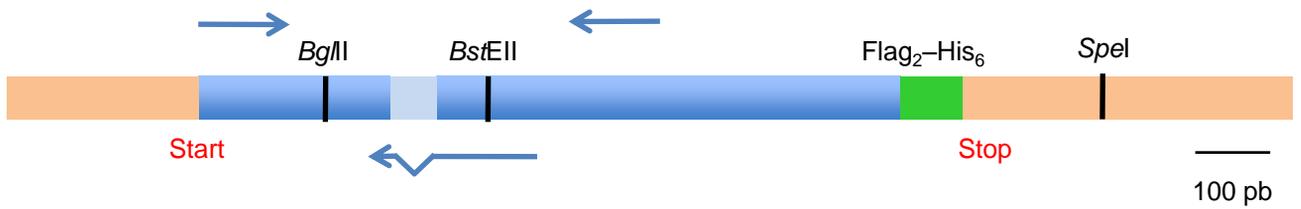


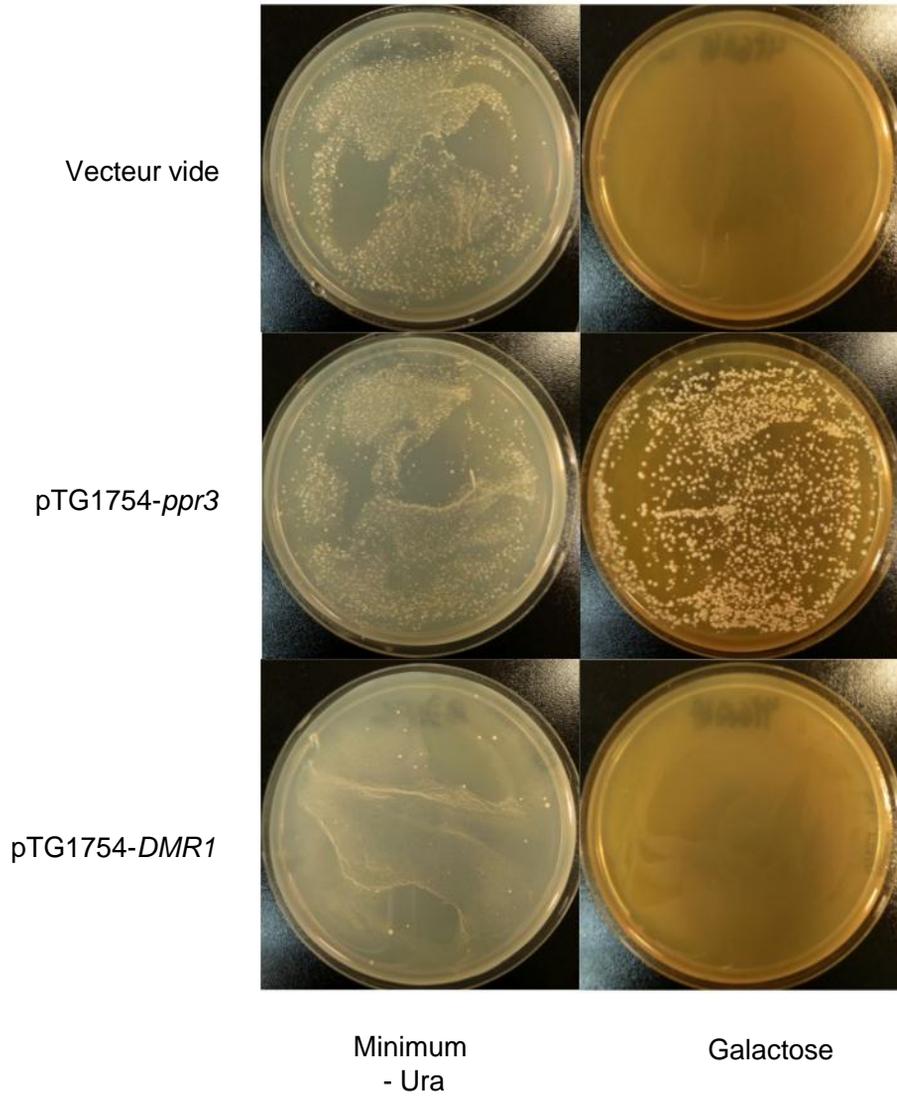
Figure 38 : Représentation schématique de la construction *ppr3-Di*. Dans un premier temps, le début de l'ORF est cloné par PCR, puis *via* une seconde PCR, la région de l'intron est synthétisée de manière à supprimer celui-ci, avant d'être clonée à sa place *via* les sites *Bgl*II et *Bst*EII. Ensuite le reste de l'ORF est cloné à partir du plasmide 46/F02-6106 issu du RIKEN entre les sites *Bst*EII et *Spe*I. L'ORF est représentée en bleu avec son intron en bleu pâle. L'étiquette FLAG₂-His₆ est représentée en vert.

Tableau 17 : Résumé des données sur les protéines PPR de *S. pombe*

Nom	Nom Générique	Croissance respiratoire du mutant	Association membranaire (%)	ARNmt les plus affectés	Fonction proposée	Orthologues possibles (<i>S. cerevisiae</i> /Homme)
<i>ppr1</i>	SPBC1604.02c	-	30	<i>cox2, cox3</i>	Stabilité ARN	LRPPRC
<i>ppr2</i>	SPBC18H10.11c	+/-	80	?	Traduction ou post-traduction	MRPS27
<i>ppr3</i>	SPBC19G7.07c	-	100	ARNr 15S	Stabilité ARN	Dmr1/PTCD3
<i>ppr4</i>	SPAC8C9.06c	-	100	<i>cox1</i>	Traduction	Pet309/LRPPRC
<i>ppr5</i>	SPAC1093.01	++++	100	<i>cox1</i>	Régulateur traductionnel négatif	PTCD1
<i>ppr6</i>	SPCC11E10.04	-	100	<i>atp9</i>	Stabilité ARN	Aep2
<i>ppr7</i>	SPBC16A3.03c	-	50	<i>atp6</i>	Stabilité ARN	
<i>ppr8</i>	SPBC1289.06c	++	40	<i>cox1</i>	Traduction	
<i>ppr9</i>	SPAC26H5.12	léthal?	?	tous	Transcription	Rpo41/POLMRT
<i>ppr10</i>	SPBC106.19	?	?	ARNt?	Maturation ARNt?	Rpm2/MRPP3

Les cibles primaires de ces protéines ainsi que leurs partenaires n'ont pour l'heure pas été identifiées moléculairement, mais sont seulement suggérées par les analyses phénotypiques. De nombreuses questions se posent donc sur les mécanismes d'action des protéines PPR. Par exemple est ce que Ppr1 interagit indépendamment avec les transcrits de *cox2* et de *cox3* ou plutôt avec le grand transcrit « mineur » dont les ARN *cox2* et *cox3* forment les bornes avant maturation ? Est-ce que Ppr2 interagit avec tous les ARNm mitochondriaux pour activer leur traduction ou ne se lie qu'à un ARN jouant un rôle central comme par exemple un ARNt ? La réponse à ces questions ainsi que l'identification des partenaires de ces facteurs nécessiteront de nouvelles investigations que j'ai commencé à mener au laboratoire en me focalisant principalement sur deux protéines PPR, l'une, Ppr3, apparaissant bien conservée dans l'évolution, et l'autre, Ppr2, ne présentant pas d'homologue clair en particulier chez *S. cerevisiae*. J'ai ainsi tenté de mettre en évidence l'homologie fonctionnelle entre Ppr3 et Dmr1, de rechercher si Ppr2 interagit avec le ribosome mitochondrial, et de tester si tous les motifs de Ppr2 sont nécessaires ou non à sa fonction.

A

 $\Delta ppr3$ 

B



Figure 39 : Expression de *DMR1* dans une souche $\Delta ppr3$. Des plasmides permettant d'exprimer *DMR1* ou *ppr3*, ainsi que le vecteur vide correspondant ont été transformés dans une souche $\Delta ppr3$; A) les transformants ont été sélectionnés sur milieu minimum sans uracile et répliqués sur milieu non-fermentescible (Galactose). B) Des transformants individuels ont aussi été repiqués sur milieu minimum et milieu galactose.

C. Résultats complémentaires concernant Ppr3

Comme précisé ci-dessus, la protéine Ppr3 pourrait remplir une fonction bien conservée dans l'évolution. En effet, tout comme Ppr3, les protéines Dmr1 de *S. cerevisiae* (Puchta *et al.*, 2010) et PTC3 de l'homme (Davies *et al.*, 2009) semblent protéger les ARN ribosomiaux 15S ou 12S de la dégradation. En conséquence, les défauts de ces trois protéines ont tous un effet drastique sur la traduction mitochondriale. Il serait donc possible que ces protéines soient interchangeables, d'autant plus que leur cible est un des ARN mitochondriaux les mieux conservés.

En partenariat avec l'équipe de Pawel Golik, *DMR1* a été cloné dans un vecteur d'expression pour *S. pombe*, pTG1754 (Bonney *et al.*, 1996). En parallèle j'ai cloné *ppr3*, sans intron, dans le même vecteur, mais aussi dans un vecteur d'expression pour *S. cerevisiae*, pFL61 (Minet *et al.*, 1992).

Comme Ppr3 était difficile à amplifier directement à partir d'une banque de cDNA, le clonage a été réalisé en plusieurs étapes afin d'éliminer l'intron (Figure 38). En effet les systèmes d'épissage ont beaucoup divergé entre *S. pombe* et *S. cerevisiae* (Kaüfer & Potashkin, 2000), et *S. cerevisiae* ne peut pas toujours exciser les introns des gènes de *S. pombe*. Tout d'abord, le début de l'ORF (du codon « start » jusqu'à 200 pb après l'intron) a été cloné par PCR dans le vecteur pGEMT-easy. Ensuite, la région encadrant l'intron a été amplifiée par PCR de façon à éliminer ce dernier, et reclonee dans les sites uniques *BglII/BstEII*, se trouvant de part et d'autre de l'intron. Enfin, la fin de l'ORF a été clonée après amplification à partir du plasmide 46/F02 obtenu auprès du consortium RIKEN, qui contient l'ORF de *ppr3* étiquetée par les séquences codant FLAG₂-His₆. La construction finale transférée dans les vecteurs d'expression contient donc l'ORF sans intron et étiquetée.

Les différents plasmides dérivés de pTG1754 ont ensuite été introduits dans une souche de *S. pombe* délétée pour le gène *ppr3*. A chaque tentative, le plasmide comportant *DMR1* ne générant que très peu de transformants comparé au vecteur vide ou au vecteur exprimant *ppr3*, suggérant que ce gène serait toxique chez *S. pombe*, et les quelques transformants capables de repousser sur milieu minimum ne pouvaient pas pousser sur milieu galactose (Figure 39). En l'absence d'autres résultats, l'hypothèse la plus simple est que Dmr1 interagit peut-être avec l'ARNr 15S mitochondrial de *S. pombe*, mais d'une manière imparfaite qui bloque le fonctionnement de cet ARN et donc la traduction mitochondriale, entraînant la mort des transformants produisant Dmr1.

L'expérience inverse (l'introduction de *ppr3* cloné dans pFL61 dans un mutant $\Delta dmr1$ de *S. cerevisiae*) a été menée à Varsovie dans le laboratoire de Pawel Golik. Le mutant $\Delta dmr1$ perdant l'ADNmt, les plasmides ont été introduits dans une souche diploïde hétérozygote pour $\Delta dmr1$ dont la sporulation a ensuite été induite. Cependant aucune spore $\Delta dmr1$ possédant le plasmide *ppr3* n'était capable de maintenir son ADNmt, montrant que Ppr3 (en tout cas sous sa forme étiquetée) ne peut pas remplacer Dmr1.

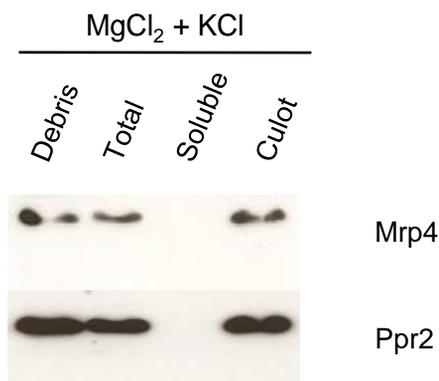


Figure 40 : Etude de la co-sédimentation de Ppr2 avec le ribosome en coussin de saccharose. Le MgCl₂ prévient la dissociation des sous-unités ribosomales alors que le KCl limite les interactions faibles en décrochant les protéines trop périphériques. Ppr2 est étiquetée et intégrée au *locus leu1*. La protéine Mrp4 est étiquetée au *locus* endogène. La fraction débris correspond aux débris cellulaires éliminés lors de la clarification des extraits. La fraction totale correspond à l'extrait avant fractionnement.

D. Résultats complémentaires sur Ppr2

1. Interaction avec le ribosome

Ppr2 est une protéine fascinante puisqu'à l'issue de nos premières analyses (article 2), nous ne savions pas du tout quelle pouvait être sa cible ARN dans la mitochondrie : tous les ARN mitochondriaux testés apparaissaient être d'abondance et de mobilité normale en Northern blot dans une souche $\Delta ppr2$. Par contre la traduction mitochondriale était très peu efficace et les produits de traduction, faiblement détectables par marquage au [^{35}S], n'étaient pas visibles en western blot. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette dégradation du peu de protéines produites : par exemple le couplage traduction/insertion membranaire pourrait être perturbé par l'inefficacité de la traduction, ou la fidélité de la traduction pourrait être altérée, conduisant à la production de protéines anormales qui sont rapidement dégradées.

Pour mieux comprendre le mode d'action de Ppr2, nous avons testé si cette protéine interagissait avec le ribosome. Pour cela j'ai étiqueté la protéine Ppr2 dans des souches ayant une ou deux sous-unités du ribosome marquées par un motif 3HA ou hepta-histidine (Voir chapitre I des résultats). Le gène codant *Ppr2* a été marqué soit à son propre *locus* avec les séquences codant un épitope cMyc, soit à un *locus* exogène, *leu1*, grâce au système d'intégration des plasmides pDUAL obtenus auprès du consortium RIKEN (Matsuyama *et al.*, 2006), la protéine étant dans ce cas étiquetée avec deux étiquettes FLAG et un hexa-histidine.

Dans un premier temps j'ai réalisé un test rapide sur coussin de saccharose. Pour cela des mitochondries de la souche LD32 (Ppr2-Flag₂-His₆, Mrp4-HA₃) ont été purifiées. Elles ont ensuite subi un traitement dans un tampon de lyse contenant du Triton X-100 pour solubiliser les membranes. Cet extrait a été clarifié avant d'être centrifugé à haute vitesse sur un coussin de saccharose à 40%. Dans cette expérience, seuls les complexes protéiques suffisamment lourds vont pouvoir tomber au fond du tube. On observe que la protéine Ppr2 est présente uniquement dans le culot, toute comme la protéine ribosomale Mrp4 (Figure 40); elle appartient donc, comme Mrp4, à un complexe lourd.

Pour tester plus précisément si Ppr2 peut co-sédimer avec le ribosome, j'ai analysé une souche triplement étiquetée Ppr2-FLAG₂-His₆, Mrp4-His₇ MrpL12-His₇ en gradient de saccharose de 10 à 45% comme décrit dans le chapitre I.

En présence de MgCl₂ qui prévient la dissociation du ribosome (Figure 41B), la protéine Ppr2 co-sédimente avec le ribosome associé, son profil est similaire à celui de Mrp4. En présence d'EDTA, Ppr2 suit également le profil de Mrp4 (Figure 41A). Ppr2 pourrait donc être une protéine de la petite sous-unité du ribosome, ou en tout cas y être fortement associée.

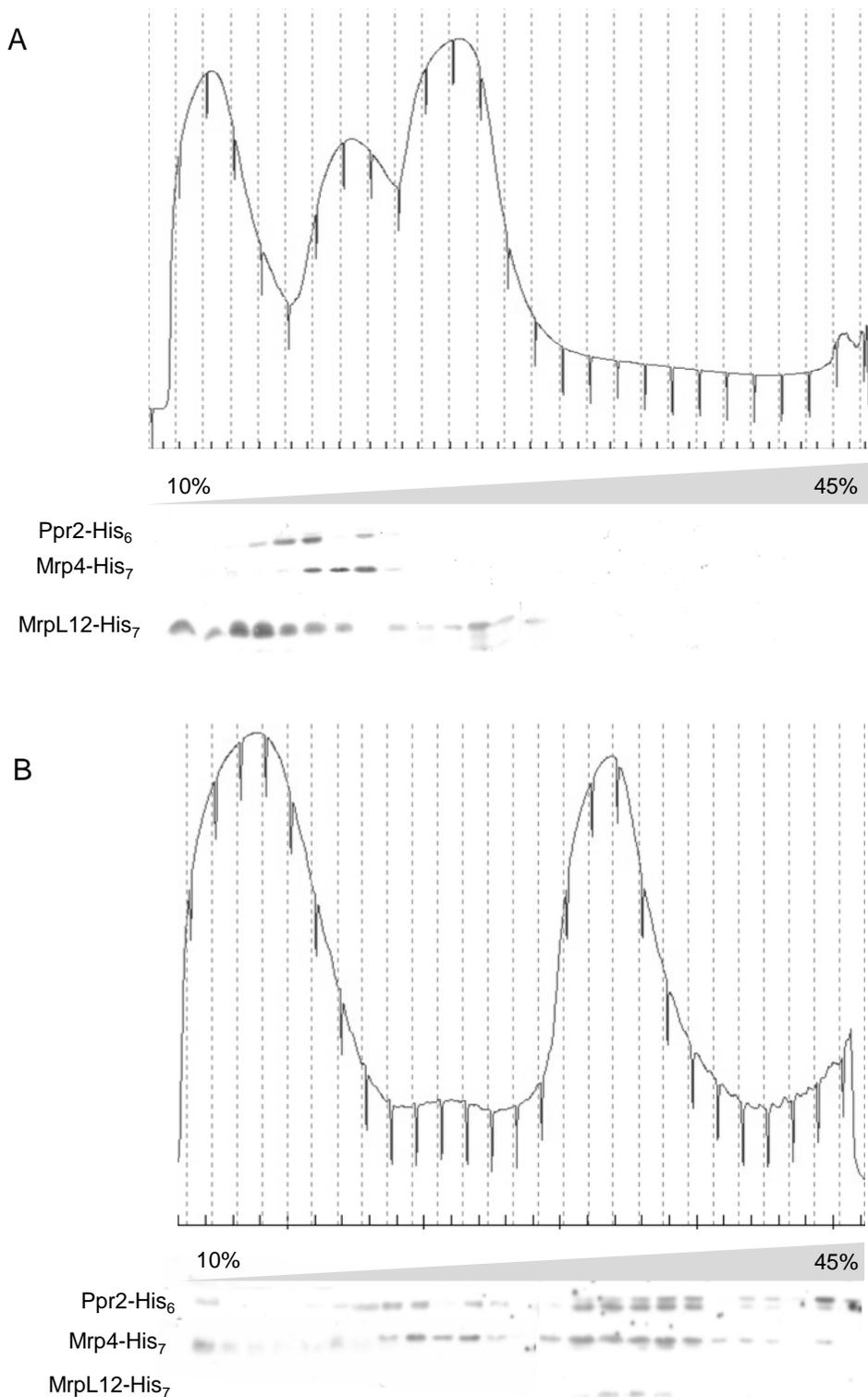


Figure 41 : Fractionnement ribosomal d'une souche étiquetée pour Ppr2 sur gradient de 10 à 45% saccharose. Les tracés à 254nm représentatifs des ARN totaux sont donnés pour chaque gradient. Les protéines Mrp4, MrpL12 et Ppr2 sont toutes révélées grâce à un anticorps anti-His. La révélation de MrpL12 nécessite une exposition plus longue. A) Extrait total obtenu en présence d'EDTA qui favorise la dissociation des sous-unité ribosomales. B) Extrait total obtenu en présence de MgCl₂ prévenant la dissociation des sous-unités du ribosome.

2. Délétion de motifs PPR

Ppr2 est la plus petite des protéines PPR de *S. pombe*. Comme présenté dans l'article 2, elle posséderait quatre motifs PPR selon la base de données Uniprot. L'algorithme SCIPHER développé par l'équipe de Pawel Golik détecte trois de ces quatre motifs, avec des limites parfois un peu différentes. Je me suis demandé si tous les motifs PPR de Ppr2 sont nécessaires à son fonctionnement. En effet, la délétion de *ppr2* entraîne une diminution importante de marquage de l'ensemble des protéines mitochondriales, indiquant que Ppr2 est un activateur général de la traduction. Mais quel est le mécanisme ? Est-ce que Ppr2 interagit avec tous les transcrits à traduire ou seulement un ARN jouant un rôle central dans la traduction, comme un ARNr ou un ARNt ? Ainsi la perte d'un ou plusieurs motifs engendre-t-il la baisse de la synthèse de toutes les protéines ou seulement d'un certain groupe ?

a. Choix des motifs

J'ai décidé de me concentrer sur les motifs donnés par SCIPHER car la base de données Uniprot ne donne aucune indication sur la façon dont les motifs ont été trouvés. Ainsi les motifs sélectionnés seraient entre les acides aminés 110 à 144, 362 à 396 et 397 à 431. Les deux derniers motifs étant adjacents, j'ai décidé de les déléter ensemble, cette région pouvant former un domaine structural, avec l'idée qu'il serait moins délétère d'enlever totalement plutôt que d'interrompre un domaine structural. Cette stratégie est fondée sur l'hypothèse qu'il existe au maximum quatre motifs PPR dans Ppr2 (Voir Discussion)

b. Délétions des motifs

En premier lieu j'ai cloné le gène *ppr2* avec son propre promoteur et son propre terminateur dans le vecteur multicopie de *S. pombe* pALKS (Tanaka *et al.*, 2000), pour servir de référence sauvage et de base pour l'introduction des mutations. En effet il n'existe malheureusement pas chez *S. pombe* de vecteur centromérique qui aurait permis d'être encore plus proche du niveau d'expression sauvage. Au besoin les inserts pourront être réintégrés au *locus* dans une souche Δ *ppr2*.

Pour le clonage, j'ai amplifié un fragment comprenant *ppr2* à partir d'ADN génomique, et je l'ai digéré par *HpaI* et *SphI*, situés respectivement à environ 200 pb en amont et en aval de l'ORF. Ce fragment a ensuite été traité par le fragment de Klenow de la PolI pour rendre les extrémités franches, puis cloné dans le vecteur pGEMT-easy. Pour finir l'insert a été transféré dans pALKS pour donner pALKS-*ppr2*.

A partir de cette construction « sauvage » j'ai délété les différents motifs en synthétisant par PCR des fragments d'ADN correspondant à la région désirée moins le(s) motif(s) Ppr (Figure 42). Ces fragments ont ensuite été digérés par des enzymes de restrictions et clonés à la place des régions sauvages dans le plasmide pALKS-*ppr2* (Figure 43).

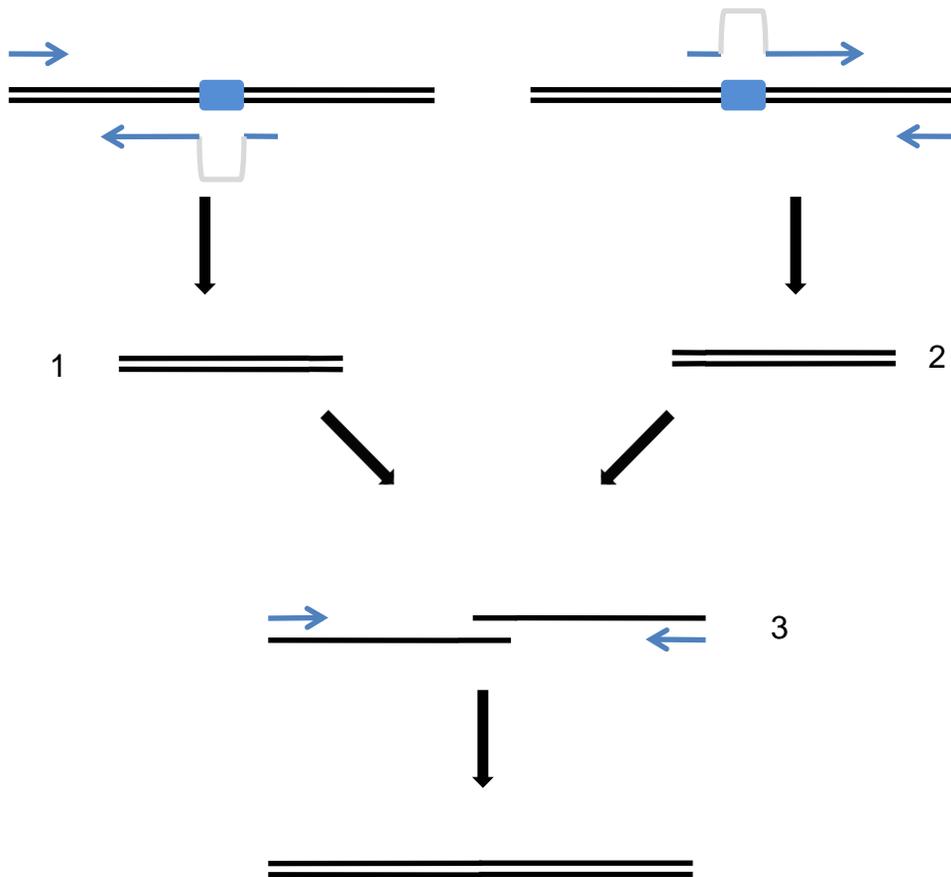


Figure 42 : Principe de délétion des motifs PPR. Un fragment amont (1) et un fragment aval (2) sont synthétisés par PCR de manière à supprimer le(s) motif(s) désiré(s). Ces fragments sont ensuite fusionnés par PCR (3) avant d'être clonés dans un plasmide contenant l'ORF de la protéine PPR dont on veut déléter le(s) motif(s).

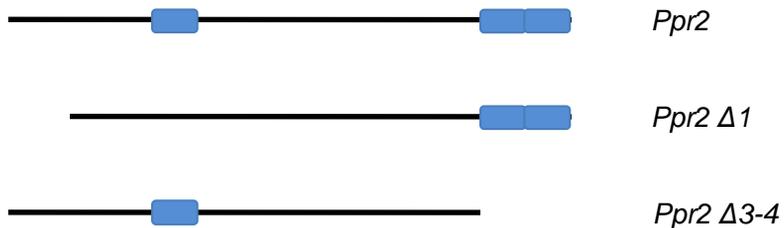


Figure 43 : Représentation schématique des différentes constructions de délétion de motifs de la protéine Ppr2. $\Delta 1$: variant délété pour le premier motif PPR; $\Delta 3-4$: variant délété pour les deux derniers motifs PPR.

J'ai introduit ces différents plasmides dans une souche $\Delta ppr2$ pour tester leur capacité à compléter l'absence de *ppr2*. La perte du premier motif semble rédhitoire pour le fonctionnement de la protéine alors que la perte des deux derniers motifs, qui revient à tronquer la fin de la protéine, permet à la protéine d'être partiellement fonctionnelle et donc d'avoir un phénotype respiratoire intermédiaire (Figure 44). Pour vérifier l'état de la traduction mitochondriale dans les différents transformants, les protéines mitochondriales ont été marquées au [^{35}S] en présence de cycloheximide (Figure 45). On observe que le profil de la souche délétée pour le premier motif PPR est plus faiblement marqué que pour le sauvage, mais que toutes les bandes sont présentes. Il n'y a donc pas une protéine mitochondriale qui soit plus affectée qu'une autre. Pour le mutant délété des deux derniers motifs PPR, le marquage est similaire à celui de la souche sauvage, la croissance plus faible doit donc être expliquée par des effets post-traductionnels.

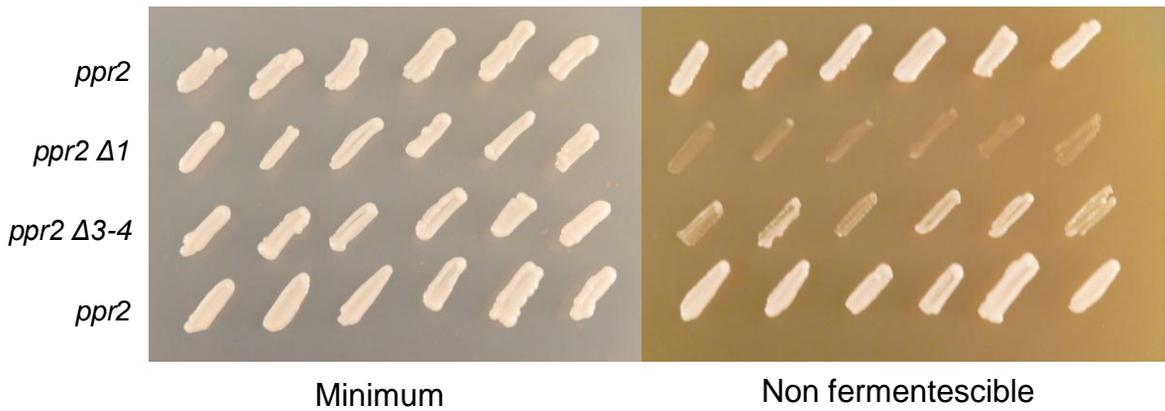


Figure 44 : Phénotype du mutant *Appr2* complétement par des variants de Ppr2. Les constructions de Ppr2 comportant plus ou moins de motifs PPR (Figure 43) sont clonées dans un plasmide répliatif et comportent le promoteur et le terminateur endogène de *ppr2*. Le milieu minimum fermentescible (glucose) permet de sélectionner la construction et le milieu non fermentescible pour *S. pombe* (galactose 0,1% glucose) permet de tester la complémentation fonctionnelle.

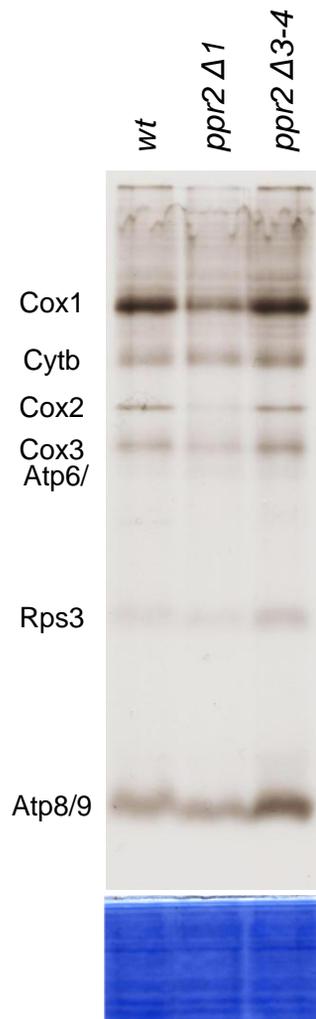


Figure 45 : Marquage des protéines mitochondriales néo-synthétisées en présence de $[^{35}\text{S}]$ et cycloheximide dans des souches contenant des variants de Ppr2. Variants présentés en Figure 44. La cycloheximide permet de bloquer la traduction cytoplasmique et de ne visualiser que les protéines synthétisées dans la mitochondrie.

Discussion

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à des facteurs jouant des rôles différents dans l'expression des gènes mitochondriaux chez la levure *S. pombe* : des protéines ribosomales, des protéines à motif peptidyl tRNA hydrolase, et des protéines de liaison aux ARNs. Il s'avère finalement que toutes les protéines sur lesquelles j'ai travaillé de manière approfondie ont un lien avec le ribosome mitochondrial.

Etiquetage de protéines du ribosome mitochondrial

Cette partie du travail a permis de visualiser les deux sous-unités du ribosome mitochondrial de *S. pombe* chez des souches sauvages, mais aussi dans des souches étiquetées pour d'autres protéines, dont la sédimentation avec le ribosome devait être testée. Cependant les résultats que nous avons obtenus sont encore trop limités pour la grande sous-unité ribosomale puisque MrpL12, la seule des trois protéines de la grande sous-unité testées que nous ayons pu détecter dans un gradient de saccharose, donne malgré tout un signal très faible.

Une possibilité est que la grande sous-unité du ribosome mitochondrial de *S. pombe* soit stochioométriquement présente en quantité plus faible que la petite sous-unité. Cette hypothèse serait confortée par le fait que dans les conditions où le ribosome est associé, une quantité non négligeable de Mrp4 sédimente avec la petite sous-unité libre. Un excès de petite sous-unité du ribosome pourrait optimiser l'efficacité de traduction en permettant d'assembler plus de complexes de pré-initiation entre les facteurs de traduction et la petite sous-unité du ribosome, qui soient prêts à s'associer à la grande sous-unité pour démarrer un cycle de traduction.

Cependant l'hypothèse la plus simple est que MrpL12 étiquetée subit probablement une dégradation rapide. La partie C-terminale de MrpL12 qui se présente comme une protubérance hors du ribosome est donc aussi bien une force qu'une faiblesse, force puisque localiser une étiquette à cet endroit n'affecte pas la fonction, faiblesse parce que l'étiquette est donc très vulnérable à la protéolyse. De plus le comportement de MrpL12 est surprenant par rapport à l'extraction par le carbonate, car la grande sous-unité du ribosome est normalement connue pour être associée à la membrane, par différents facteurs et notamment Oxa1 (Sczyrach *et al.*, 2003 ; Jia *et al.*, 2003). Or Oxa1 est bien conservé chez *S. pombe*, il existe même deux gènes (Bonney *et al.*, 2000). L'explication la plus raisonnable pour la solubilité de MrpL12 n'est pas que la grande sous-unité ribosomale de *S. pombe* ne soit pas associée à la membrane, mais plutôt que, dû à cette extrémité C-terminale sortant du ribosome, la protéine MrpL12 est extraite par le carbonate. Si cette hypothèse est vraie, d'autres protéines de la grande sous-unité du ribosome mitochondrial devraient rester associées à la membrane après extraction avec du carbonate. Il faut donc que nous trouvions une autre protéine de la grande sous-unité à étiqueter, ou contre laquelle générer des anticorps anti-peptides.

Dans un premier temps, vu les résultats de gradient par exemple pour Pth4 qui est fortement associée à la grande sous-unité, nous pourrions utiliser cette protéine comme marqueur. Nous avons d'ailleurs vu que Pth4 reste tout le temps dans la fraction membranaire après extraction au carbonate. Cependant on ne sait pas si Pth4 est présente en

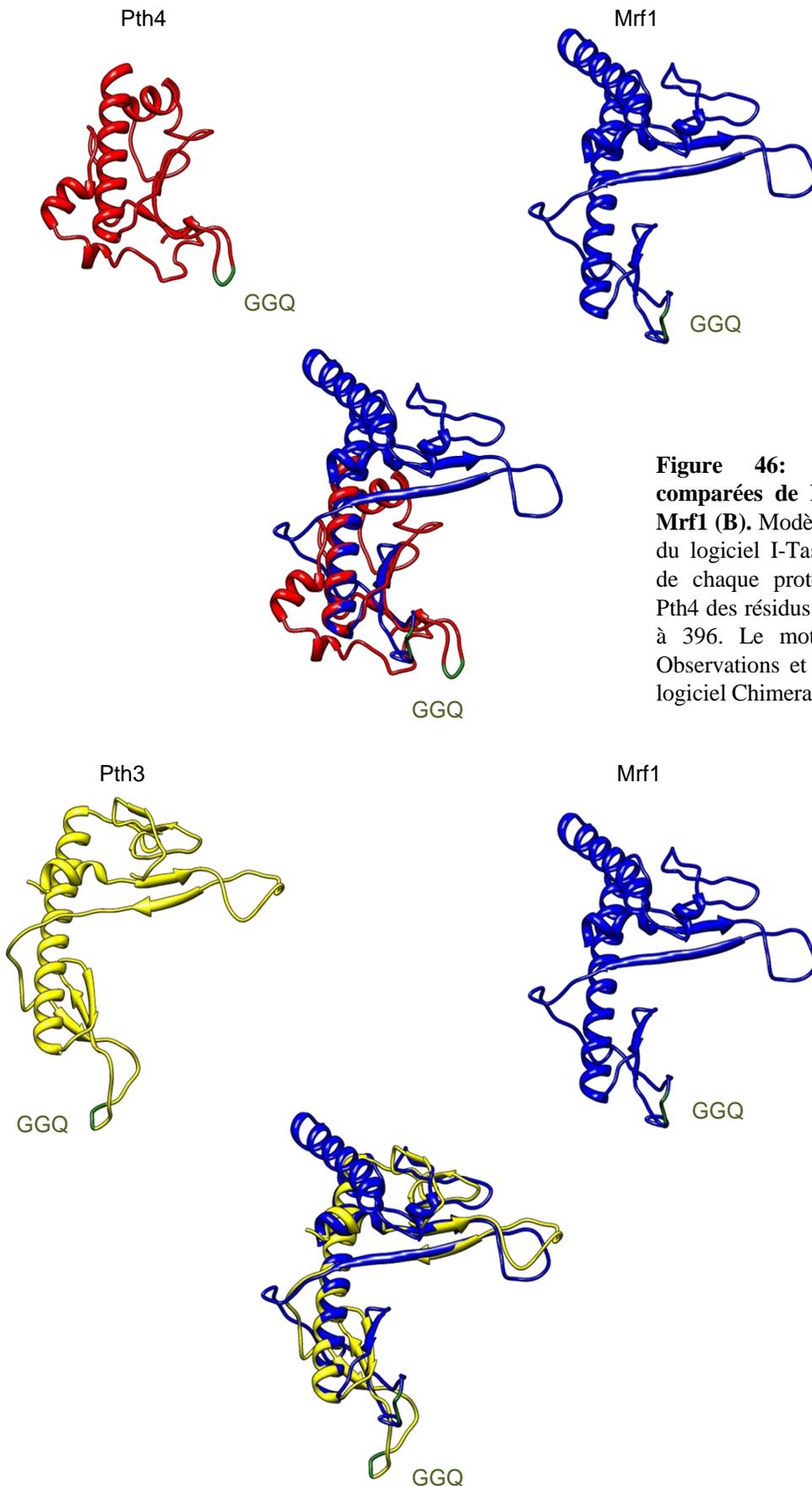


Figure 46: Prédiction de structures comparées de Pth4 et Mrf1 (A), et Pth3 et Mrf1 (B). Modèles de structures obtenus à l'aide du logiciel I-Tasser et les séquences complètes de chaque protéines. Protéine Pth3 complète, Pth4 des résidus 1 à 138 et Mrf1 des résidus 205 à 396. Le motif GGQ est indiqué en vert. Observations et superpositions réalisées avec le logiciel Chimera.

conditions stœchiométriques par rapport à la grande sous-unité du ribosome, c'est-à-dire est-ce que tous les ribosomes assemblés comportent Pth4 ou est-ce qu'il existe des sous-populations (exclusives ou non), portant Mrf1, ou Pth3, ou Pth4 ? De manière similaire, Ppr2 pourrait être utilisée comme marqueur de la petite sous-unité.

Peptidyl tRNA hydrolases

Cette partie de la thèse a permis de mettre en lumière un lien encore inédit chez les levures entre les peptidyl tRNA hydrolases à motif GGQ et la terminaison de la traduction mitochondriale.

Tout d'abord, le fait que les souches délétées pour les Pth ne présentent de phénotype respiratoire clair qu'en combinaison indique que ces facteurs participent au fonctionnement de la mitochondrie mais ne sont pas essentiels en conditions normales de croissance et qu'ils peuvent se compenser au moins partiellement. Il serait intéressant de tester des conditions plus drastiques, par exemple la sensibilité à des doses faibles de drogues perturbant la traduction mitochondriale comme la paromomycine, qui provoque des erreurs de traduction ou la puromycine, qui bloque l'élongation des chaînes peptidiques en cours de traduction.

De plus le fait que l'absence de Mrf1 puisse être complétée par la surproduction de Pth4 mais pas par celle de Pth3 montre que les fonctions des deux peptidyl tRNA hydrolases prédites sont bien différentes. Cette proposition est confortée par le fait que la délétion de *pth4* chez un mutant de *mRF1* entraîne un phénotype respiratoire très important accompagné d'une déplétion de l'ADNmt, évocatrice d'un défaut drastique de la traduction mitochondriale (Chiron *et al.*, 2005) alors qu'une souche délétée pour *pth3* et *mrf1* ne présente qu'un phénotype respiratoire similaire à un mutant $\Delta mrf1$. Il est possible que comme pour les équivalents humains ICT1 et C12orf65 (Richter *et al.*, 2010 ; Antonicka *et al.*, 2010), les activités peptidyl tRNA hydrolases de Pth4 et Pth3 s'exercent respectivement soit au sein soit en dehors du ribosome. Dans ce cas, Pth4 permettrait de compenser l'absence de Mrf1 parce qu'il est capable d'hydrolyser les peptidyl ARNt bloqués au sein du ribosome, alors que Pth3 agirait en dehors du ribosome sur les peptidyl ARNt interrompus et relargués en cours d'élongation. Cependant à la différence de C12orf65 (Richter *et al.*, 2010) nous avons montré que Pth3 sédimente avec la grande sous-unité du ribosome. De plus, on peut se demander comment Pth3 pourrait reconnaître des peptidyl-ARNt en absence du ribosome qui joue un rôle d'échafaudage pour mettre ces partenaires en interaction. Il serait intéressant de mesurer comme pour les protéines humaines (Richter *et al.*, 2010) l'activité peptidyl tRNA hydrolase de ces deux protéines en présence ou non du ribosome, et si cette activité est associée au ribosome, de déterminer si elle est dépendante ou non de la présence d'un codon particulier tel qu'un codon stop.

Si on observe des modèles de structure de ces différentes protéines, on peut remarquer que Pth3 et Pth4 recouvrent quasiment parfaitement une région de Mrf1, (Figure 46). Pth3 semble même avoir une plus grande homologie de structure avec Mrf1 que Pth4 malgré le fait qu'il n'interagisse pas génétiquement avec celui-ci. La différence de fonction entre Pth3 et Pth4 pourrait s'expliquer du fait de la différence de structure, présentant une partie C-terminale non structurée (non visualisée sur la figure 46), permettant peut-être une plus

grande souplesse pour intervenir en fin de traduction quand d'autres facteurs de recyclage du ribosome encombrant l'espace.

Protéines PPR

L'étude des protéines PPR a permis de mettre en évidence aussi bien des facteurs de traduction, comme Ppr4, le premier activateur traductionnel de *S. pombe* spécifique d'un ARNm mitochondrial, que des facteurs de stabilité de certains ARN mitochondriaux. Pour plusieurs de ces facteurs dont l'absence cause un défaut de stabilité de certains ARNm et de la synthèse des protéines qu'ils codent, il faudra déterminer si le défaut primaire est un défaut de traduction entraînant une instabilité de l'ARNm non traduit, ou un défaut de stabilité empêchant la synthèse de la protéine correspondante. Un facteur est aussi particulièrement original, il s'agit de la protéine Ppr5 qui fonctionne comme un inhibiteur général de la traduction mitochondriale, nous allons dans le futur rechercher sa ou ses cible(s) ARN directe(s) pour comprendre son mode d'action.

De manière intéressante, les deux protéines PPR pour lesquelles je présente des résultats additionnels à l'article sont aussi des protéines reliées fonctionnellement au ribosome, Ppr3 et Ppr2. Ppr3 stabilise l'ARNr *15S* de la petite sous-unité et donc joue probablement un rôle dans la biogenèse du ribosome. Ppr2 est particulièrement énigmatique puisqu'elle n'a pas de cible ARN claire suite aux expériences de Northern blot mais j'ai pu montrer qu'elle sédimente avec la petite sous-unité du ribosome. Il serait nécessaire de reproduire ces expériences pour tester si une plus grande fraction de Ppr2 est liée à la petite sous-unité libre plutôt qu'au ribosome associé. Si cela se confirme, on peut imaginer que Ppr2 serait un facteur d'initiation de la traduction qui se lie de préférence à la petite sous-unité du ribosome et qui se décroche du ribosome peu après la réassociation des sous-unités. Mais Ppr2 pourrait aussi comme MrpS27 chez l'homme (Davies *et al.*, 2012) être une protéine PPR qui joue un rôle de sous-unité ribosomale spécifique à *S. pombe*, tout comme *S. cerevisiae* et l'homme possèdent certaines protéines du ribosome mitochondrial qui leur sont propres (voir Tableaux 13 et 14).

En tout cas, aucun suppresseur en copies multiples de $\Delta ppr2$ n'a pu être isolé, malgré une recherche intensive, et des suppresseurs extragéniques s'avèrent après analyse être tous des allèles d'un même gène. La cellule ne dispose donc pas de nombreuses possibilités pour compenser l'absence de Ppr2. Il sera particulièrement intéressant de connaître la nature du gène suppresseur de la délétion de *ppr2*, cependant la mutation suppresseur seule n'ayant pas de phénotype nous projetons d'utiliser les possibilités de séquençage haut débit pour l'identifier. Ce séquençage sera fait sur des souches avec des allèles suppresseurs et sauvages ayant été recroisées 10 fois avec le mutant $\Delta ppr2$ pour homogénéiser le fond génétique, ces croisements sont en cours au laboratoire.

Il convient maintenant pour aller plus loin de rechercher la cible ARN de Ppr2. Une possibilité est bien sûr l'ARN ribosomal *15S*, vu l'interaction avec la petite sous-unité du ribosome. Mais si Ppr2 est un facteur général d'initiation de la traduction on peut aussi imaginer qu'il se lie à tous les ARNm, de manière relativement aspécifique, pour les guider vers le ribosome. Il est aussi possible que Ppr2 optimise l'interaction entre les ARNt et le

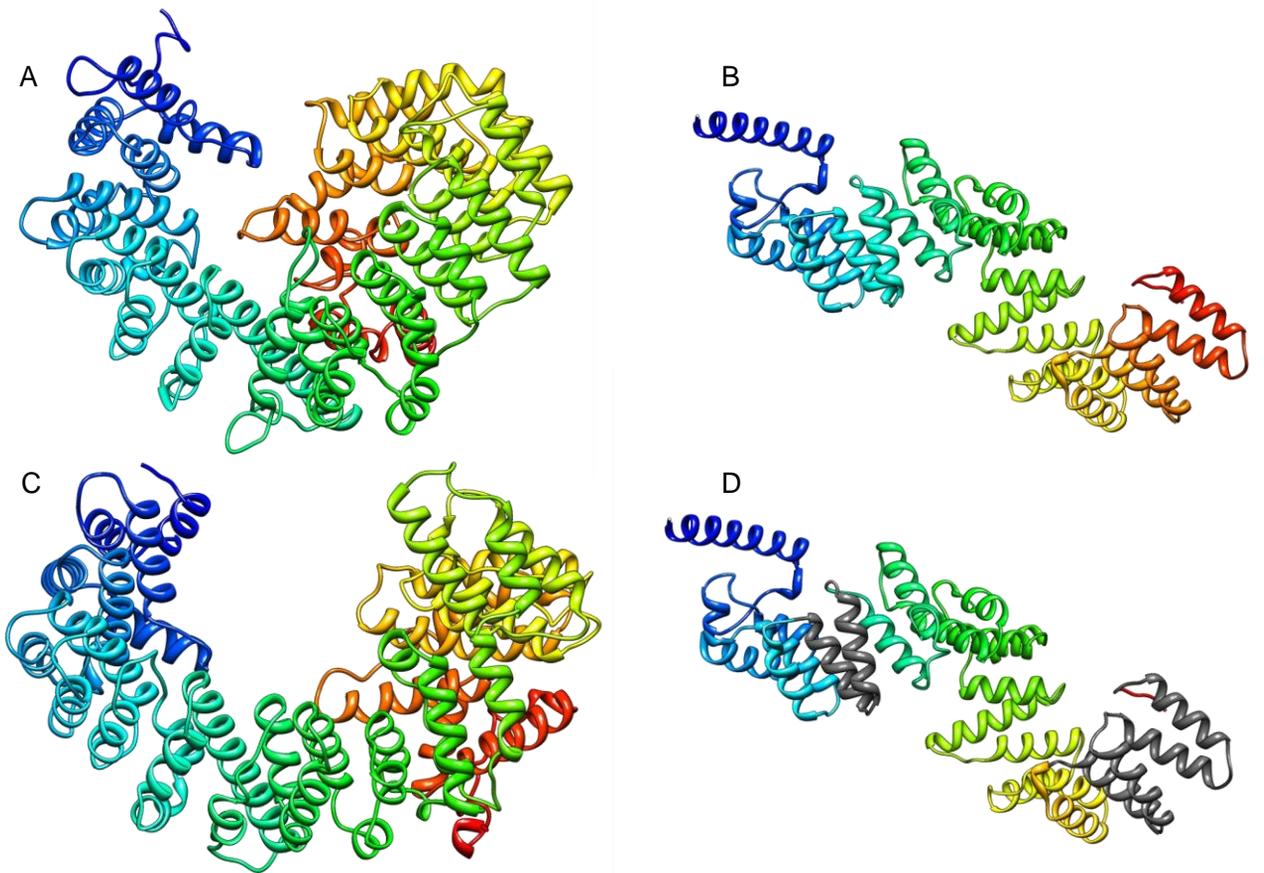


Figure 47 : Modèles de structures de protéines PPR de *S. pombe*. Les modèles A-C ont été obtenus *via* le logiciel I-Tasser. Le début de la protéine est en bleu alors que la fin est en rouge. A) Structure de Ppr1. B) Structure de Ppr2. C) Structure de Ppr3. D) Structure de Ppr2 avec les motifs délétés en gris.

ribosome, dans ce cas ses cibles pourraient être des zones conservées des ARNt et l'absence de Ppr2 diminuerait l'efficacité et la fidélité de la traduction. De nombreuses autres hypothèses peuvent être formulées et ne seront tranchées que lorsque la ou les cible(s) moléculaire(s) de Ppr2 aura ou auront été identifiées. La méthode la plus directe sera d'immunoprécipiter la protéine Ppr2 étiquetée et d'analyser par RT-PCR ou par Northern blot les ARNs qui pourraient co-précipiter, par exemple en utilisant dans un premier temps comme sonde l'ADNmt complet.

En plus de cette ou ces cible(s) moléculaire(s) de Ppr2, il sera important aussi pour bien comprendre l'interaction protéine Ppr2-ARN de bien définir tous les motifs PPR de Ppr2. En effet des données nouvelles récemment publiées sur les protéines PPR (notamment de plante) et leur mode de reconnaissance des ARN (Barkan *et al.*, 2012), impliquent pour chaque nucléotide reconnu un acide aminé du motif n et un acide aminé du motif n+1 (Introduction Section IV-A-3-a). Dans ce cadre, il est très important que les protéines PPR disposent d'un nombre suffisant de motifs assez proches pour reconnaître des séquences suffisamment spécifiques. Pour les protéines PPR de *S. pombe*, existe-t-il un mode de reconnaissance similaire? Il faudrait pour élucider ce code ré-analyser les séquences primaires et secondaires de ces protéines PPR pour déterminer s'il y a des motifs additionnels du type PPR en séquence et/ou en structure, qui manquaient dans les prédictions publiées dans l'article 2. Si on regarde une modélisation de la structure secondaire de la protéine Ppr2 réalisée à l'aide du logiciel I-Tasser (Figure 47), il semble exister chez Ppr2 bien plus de motifs du type PPR en double hélice que prévu par les seuls algorithmes, qui ne s'intéressent qu'à la séquence primaire des motifs. Il en va de même pour Ppr1 et Ppr3 (Figure 47) et probablement pour les autres protéines PPR de *S. pombe* aussi. Ainsi le motif 1 de Ppr2 se retrouve encadré de plusieurs motifs (Figure 47), la délétion de ce motif créant un trou au milieu d'un domaine structural ce qui pourrait expliquer pourquoi sa perte est plus grave que la perte des deux derniers motifs.

Dans l'ensemble, les travaux présentés au cours de cette thèse auront permis de mieux connaître le ribosome mitochondrial de *S. pombe*, pour lequel une seule protéine a été étudiée jusqu'alors (Wiley *et al.*, 2008). J'ai pu mettre en place des outils pour visualiser les sous-unités du ribosome mitochondrial et ainsi identifier des protéines qui s'y associent. Ces protéines sont toutes prédites comme interagissant avec des ARN, soit *via* le motif peptidyl tRNA hydrolase, soit *via* les motifs PPR. Les expériences ultérieures permettront de déterminer si elles sont des sous-unités accessoires ou permanentes du ribosome mitochondrial de *S. pombe*.

Bibliographie

- Ackerman, S.H. and Tzagoloff, A. (1990) Identification of two nuclear genes (*ATP11*, *ATP12*) required for assembly of the yeast F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4986-4990.
- Ackerman, S.H. and Tzagoloff, A. (1990) *ATP10*, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F1-F0 complex. *J Biol Chem*, **265**, 9952-9959.
- Alverson, A.J., Wei, X., Rice, D.W., Stern, D.B., Barry, K. and Palmer, J.D. (2010) Insights into the evolution of mitochondrial genome size from complete sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Mol Biol Evol*, **27**, 1436-1448.
- Amiott, E.A. and Jaehning, J.A. (2006) Mitochondrial transcription is regulated *via* an ATP "sensing" mechanism that couples RNA abundance to respiration. *Mol Cell*, **22**, 329-338.
- Antonicka, H., Sasarman, F., Kennaway, N.G. and Shoubridge, E.A. (2006) The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1. *Hum Mol Genet*, **15**, 1835-1846.
- Antonicka, H., Ostergaard, E., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Wibrand, F., Pedersen, A.M., Rodenburg, R.J., van der Knaap, M.S., Smeitink, J.A., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. and Shoubridge, E.A. (2010) Mutations in *C12orf65* in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect. *Am J Hum Genet*, **87**, 115-122.
- Arents, G. and Moudrianakis, E.N. (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11170-11174.
- Attardi, G. and Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*, **4**, 289-333.
- Barkan, A., Rojas, M., Fujii, S., Yap, A., Chong, Y.S., Bond, C.S. and Small, I. (2012) A combinatorial amino acid code for RNA recognition by pentatricopeptide repeat proteins. *PLoS Genet*, **8**, e1002910.
- Barrell, B.G., Anderson, S., Bankier, A.T., de Bruijn, M.H., Chen, E., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1980) Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 3164-3166.
- Barrientos, A., Korr, D. and Tzagoloff, A. (2002) Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial *COX1* in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO J*, **21**, 43-52.
- Barrientos, A., Korr, D., Barwell, K.J., Sjulsen, C., Gajewski, C.D., Manfredi, G., Ackerman, S. and Tzagoloff, A. (2003) *MTG1* codes for a conserved protein required for mitochondrial translation. *Mol Biol Cell*, **14**, 2292-2302.
- Bauerschmitt, H., Mick, D.U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P. and Herrmann, J.M. (2010) Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell*, **21**, 1937-1944.
- Baughman, J.M., Nilsson, R., Gohil, V.M., Arlow, D.H., Gauhar, Z. and Mootha, V.K. (2009) A computational screen for regulators of oxidative phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis. *PLoS Genet*, **5**, e1000590.
- Bendich, A.J. (1993) Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. *Curr Genet*, **24**, 279-290.
- Bendich, A.J. (2010) The end of the circle for yeast mitochondrial DNA. *Mol Cell*, **39**, 831-832.
- Bhargava, K., Templeton, P. and Spemulli, L.L. (2004) Expression and characterization of isoform 1 of human mitochondrial elongation factor G. *Protein Expr Purif*, **37**, 368-376.
- Biswas, T.K., Edwards, J.C., Rabinowitz, M. and Getz, G.S. (1985) Characterization of a yeast mitochondrial promoter by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1954-1958.
- Biswas, T.K. and Getz, G.S. (1986) Nucleotides flanking the promoter sequence influence the transcription of the yeast mitochondrial gene coding for ATPase subunit 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 270-274.

- Bogenghen, D.F., Rousseau, D. and Burke, S. (2008) The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem*, **283**, 3665-3675.
- Boni, I.V., Artamonova, V.S., Tzareva, N.V. and Dreyfus, M. (2001) Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: synthesis of ribosomal protein S1. *EMBO J*, **20**, 4222-4232.
- Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Brivet-Chevillotte, P. and Dujardin, G. (1996) Cloning by functional complementation, and inactivation, of the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *ABC1*. *Mol Gen Genet*, **251**, 204-210.
- Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O. and Dujardin, G. (2000) The respiratory gene *OXA1* has two fission yeast orthologues which together encode a function essential for cellular viability. *Mol Microbiol*, **35**, 1135-1145.
- Bordonne, R., Dirheimer, G. and Martin, R.P. (1987) Transcription initiation and RNA processing of a yeast mitochondrial tRNA gene cluster. *Nucleic Acids Res*, **15**, 7381-7394.
- Brown, N.G., Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1994) Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial *COX3* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **14**, 1045-1053.
- Burger, G., Gray, M.W. and Lang, B.F. (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet*, **19**, 709-716.
- Burke, D.T. and Olson, M.V. (1986) Oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis of *Escherichia coli* and yeast by simple cotransformation of the primer and template. *DNA*, **5**, 325-332.
- Castandet, B. and Araya, A. (2011) RNA editing in plant organelles. Why make it easy? *Biochemistry (Mosc)*, **76**, 924-931.
- Chan, D.C. (2012) Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annu Rev Genet*.
- Chateigner-Boutin, A.L., Ramos-Vega, M., Guevara-Garcia, A., Andres, C., de la Luz Gutierrez-Nava, M., Cantero, A., Delannoy, E., Jimenez, L.F., Lurin, C., Small, I. and Leon, P. (2008) CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *Plant J*, **56**, 590-602.
- Chen, X.J. and Clark-Walker, G.D. (1993) Mutations in *MGI* genes convert *Kluyveromyces lactis* into a petite-positive yeast. *Genetics*, **133**, 517-525.
- Chen, X.J. and Clark-Walker, G.D. (1995) Specific mutations in alpha- and gamma-subunits of F1-ATPase affect mitochondrial genome integrity in the *petite*-negative yeast *Kluyveromyces lactis*. *EMBO J*, **14**, 3277-3286.
- Chen, X.J. and Clark-Walker, G.D. (2000) The *petite* mutation in yeasts: 50 years on. *Int Rev Cytol*, **194**, 197-238.
- Chiron, S., Suleau, A. and Bonnefoy, N. (2005) Mitochondrial translation: elongation factor tu is essential in fission yeast and depends on an exchange factor conserved in humans but not in budding yeast. *Genetics*, **169**, 1891-1901.
- Chiron, S., Gaisne, M., Guillou, E., Belenguer, P., Clark-Walker, G.D. and Bonnefoy, N. (2007) Studying mitochondria in an attractive model: *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Mol Biol*, **372**, 91-105.
- Christian, B., Haque, E. and Spemulli, L. (2009) Ribosome shifting or splitting: it is all up to the EF-G. *Mol Cell*, **35**, 400-402.
- Christianson, T., Edwards, J., Levens, D., Locker, J. and Rabinowitz, M. (1982) Transcriptional initiation and processing of the small ribosomal RNA of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **257**, 6494-6500.
- Chu, Z., Li, J., Eshaghi, M., Karuturi, R.K., Lin, K. and Liu, J. (2007) Adaptive expression responses in the Pol-gamma null strain of *S. pombe* depleted of mitochondrial genome. *BMC Genomics*, **8**, 323.

- Chujo, T., Ohira, T., Sakaguchi, Y., Goshima, N., Nomura, N., Nagao, A. and Suzuki, T. (2012) LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria. *Nucleic Acids Res*, **40**, 8033-8047.
- Claisse, M.L., Pere-Aubert, G.A., Clavilier, L.P. and Slonimski, P.P. (1970) Method for the determination of cytochrome concentrations in whole yeast cells. *Eur J Biochem*, **16**, 430-438.
- Cliften, P.F., Park, J.Y., Davis, B.P., Jang, S.H. and Jaehning, J.A. (1997) Identification of three regions essential for interaction between a sigma-like factor and core RNA polymerase. *Genes Dev*, **11**, 2897-2909.
- Contamine, V. and Picard, M. (2000) Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 281-315.
- Cooper, M.P., Qu, L., Rohas, L.M., Lin, J., Yang, W., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Spiegelman, B.M. (2006) Defects in energy homeostasis in Leigh syndrome French Canadian variant through PGC-1alpha/LRP130 complex. *Genes Dev*, **20**, 2996-3009.
- Costanzo, M.C., Bonnefoy, N., Williams, E.H., Clark-Walker, G.D. and Fox, T.D. (2000) Highly diverged homologs of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial mRNA-specific translational activators have orthologous functions in other budding yeasts. *Genetics*, **154**, 999-1012.
- Cuzin, F., Kretschmer, N., Greenberg, R.E., Hurwitz, R. and Chapeville, F. (1967) Enzymatic hydrolysis of the ester liason between the transfer ribonucleic acids and N-substituted amino acids. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, **264**, 2675-2678.
- Daoud, R., Forget, L. and Lang, B.F. (2011) Yeast mitochondrial RNase P, RNase Z and the RNA degradosome are part of a stable supercomplex. *Nucleic Acids Res*, **40**, 1728-1736.
- Das, G. and Varshney, U. (2006) Peptidyl-tRNA hydrolase and its critical role in protein biosynthesis. *Microbiology*, **152**, 2191-2195.
- Davies, S.M., Rackham, O., Shearwood, A.M., Hamilton, K.L., Narsai, R., Whelan, J. and Filipovska, A. (2009) Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. *FEBS Lett*, **583**, 1853-1858.
- Davies, S.M., Lopez Sanchez, M.I., Narsai, R., Shearwood, A.M., Razif, M.F., Small, I.D., Whelan, J., Rackham, O. and Filipovska, A. (2012) MRPS27 is a pentatricopeptide repeat domain protein required for the translation of mitochondrially encoded proteins. *FEBS Lett*, **586**, 3555-3561.
- Del Giudice, L., Wolf, K., Manna, F. and Massardo, D.R. (1983) Expression of cloned mitochondrial DNA from the petite negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* in *E. coli* minicells. *Mol Gen Genet*, **191**, 91-98.
- Deshpande, A.P. and Patel, S.S. (2012) Mechanism of transcription initiation by the yeast mitochondrial RNA polymerase. *Biochim Biophys Acta*, **1819**, 930-938.
- Dieckmann, C.L. and Staples, R.R. (1994) Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol*, **152**, 145-181.
- Dressler, D. (1970) The rolling circle for phiX DNA replication. II. Synthesis of single-stranded circles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **67**, 1934-1942.
- Dressler, D. and Wolfson, J. (1970) The rolling circle for phi X DNA replication. 3. Synthesis of supercoiled duplex rings. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **67**, 456-463.
- Dudek, J., Rehling, P. and van der Laan, M. (2012) Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta*.
- Dulebohn, D., Choy, J., Sundermeier, T., Okan, N. and Karzai, A.W. (2007) Trans-translation: the tmRNA-mediated surveillance mechanism for ribosome rescue, directed protein degradation, and nonstop mRNA decay. *Biochemistry*, **46**, 4681-4693.

- Dunstan, H.M., Green-Willms, N.S. and Fox, T.D. (1997) *In vivo* analysis of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader functions in mitochondrial translation initiation and translational activation. *Genetics*, **147**, 87-100.
- Dutka, S., Meinnel, T., Lazennec, C., Mechulam, Y. and Blanquet, S. (1993) Role of the 1-72 base pair in tRNAs for the activity of *Escherichia coli* peptidyl-tRNA hydrolase. *Nucleic Acids Res*, **21**, 4025-4030.
- Ellis, T.P., Lukins, H.B., Nagley, P. and Corner, B.E. (1999) Suppression of a nuclear *aep2* mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by a base substitution in the 5'-untranslated region of the mitochondrial *oli1* gene encoding subunit 9 of ATP synthase. *Genetics*, **151**, 1353-1363.
- Feagin, J.E. (1992) The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Mol Biochem Parasitol*, **52**, 145-148.
- Fiori, A., Perez-Martinez, X. and Fox, T.D. (2005) Overexpression of the *COX2* translational activator, Pet111p, prevents translation of *COX1* mRNA and cytochrome *c* oxidase assembly in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **56**, 1689-1704.
- Florentz, C., Sohm, B., Tryoen-Toth, P., Putz, J. and Sissler, M. (2003) Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 1356-1375.
- Fontanesi, F., Clemente, P. and Barrientos, A. (2011) Cox25 teams up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to regulate mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 expression and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **286**, 555-566.
- Forsburg, S.L. and Nurse, P. (1991) Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol*, **7**, 227-256.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **440**, 325-331.
- Fox, T.D. (1996) Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia*, **52**, 1130-1135.
- Fujii, S. and Small, I. (2011) The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. *New Phytol*, **191**, 37-47.
- Gagliardi, D., Stepien, P.P., Temperley, R.J., Lightowers, R.N. and Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2004) Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends Genet*, **20**, 260-267.
- Gan, X., Kitakawa, M., Yoshino, K., Oshiro, N., Yonezawa, K. and Isono, K. (2002) Tag-mediated isolation of yeast mitochondrial ribosome and mass spectrometric identification of its new components. *Eur J Biochem*, **269**, 5203-5214.
- Gan, X., Yang, J., Li, J., Yu, H., Dai, H., Liu, J. and Huang, Y. (2011) The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has two distinct tRNase Z(L)s encoded by two different genes and differentially targeted to the nucleus and mitochondria. *Biochem J*, **435**, 103-111.
- Gaur, R., Grasso, D., Datta, P.P., Krishna, P.D., Das, G., Spencer, A., Agrawal, R.K., Spremulli, L. and Varshney, U. (2008) A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Mol Cell*, **29**, 180-190.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563-547.
- Goldstein, A.L. and McCusker, J.H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 1541-1553.
- Gouget, K., Verde, F. and Barrientos, A. (2008) *In vivo* labeling and analysis of mitochondrial translation products in budding and in fission yeasts. *Methods Mol Biol*, **457**, 113-124.

- Gray, M.W., Lang, B.F., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T.G., Plante, I., Rioux, P., Saint-Louis, D., Zhu, Y. and Burger, G. (1998) Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res*, **26**, 865-878.
- Green-Willms, N.S., Butler, C.A., Dunstan, H.M. and Fox, T.D. (2001) Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene *COX2*. *J Biol Chem*, **276**, 6392-6397.
- Grimm, C., Kohli, J., Murray, J. and Maundrell, K. (1988) Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. *Mol Gen Genet*, **215**, 81-86.
- Haffter, P. and Fox, T.D. (1992) Nuclear mutations in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* allow growth of cells lacking mitochondrial DNA. *Genetics*, **131**, 255-260.
- Hammani, K., Okuda, K., Tanz, S.K., Chateigner-Boutin, A.L., Shikanai, T. and Small, I. (2009) A study of new Arabidopsis chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. *Plant Cell*, **21**, 3686-3699.
- Hammarsund, M., Wilson, W., Corcoran, M., Merup, M., Einhorn, S., Grander, D. and Sangfelt, O. (2001) Identification and characterization of two novel human mitochondrial elongation factor genes, *hEFG2* and *hEFG1*, phylogenetically conserved through evolution. *Hum Genet*, **109**, 542-550.
- Han, Z. and Stachow, C. (1994) Analysis of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondrial DNA replication by two dimensional gel electrophoresis. *Chromosoma*, **103**, 162-170.
- Handa, Y., Hikawa, Y., Tochio, N., Kogure, H., Inoue, M., Koshihara, S., Guntert, P., Inoue, Y., Kigawa, T., Yokoyama, S. and Nameki, N. (2010) Solution structure of the catalytic domain of the mitochondrial protein ICT1 that is essential for cell vitality. *J Mol Biol*, **404**, 260-273.
- Hardy, C.M. and Clark-Walker, G.D. (1990) Nucleotide sequence of the cytochrome oxidase subunit 2 and val-tRNA genes and surrounding sequences from *Kluyveromyces lactis* K8 mitochondrial DNA. *Yeast*, **6**, 403-410.
- Hernandez Mora, J.R., Rivals, E., Mireau, H. and Budar, F. (2010) Sequence analysis of two alleles reveals that intra- and intergenic recombination played a role in the evolution of the radish fertility restorer (Rfo). *BMC Plant Biol*, **10**, 35.
- Herrmann, J.M., Woellhaf, M.W. and Bonnefoy, N. (2012) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochim Biophys Acta*.
- Heurgue-Hamard, V., Mora, L., Guarneros, G. and Buckingham, R.H. (1996) The growth defect in *Escherichia coli* deficient in peptidyl-tRNA hydrolase is due to starvation for Lys-tRNA(Lys). *EMBO J*, **15**, 2826-2833.
- Hirose, T. and Sugiura, M. (2001) Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast in vitro RNA editing system. *EMBO J*, **20**, 1144-1152.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Hoffmann, B., Nickel, J., Speer, F. and Schafer, B. (2008) The 3' ends of mature transcripts are generated by a processosome complex in fission yeast mitochondria. *J Mol Biol*, **377**, 1024-1037.
- Huynen, M.A., Duarte, I., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. and Nabuurs, S.B. (2012) Structure based hypothesis of a mitochondrial ribosome rescue mechanism. *Biol Direct*, **7**, 14.
- Ishii, T., Funakoshi, M. and Kobayashi, H. (2006) Yeast Pth2 is a UBL domain-binding protein that participates in the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, **25**, 5492-5503.

- Jacobs, H.T. and Turnbull, D.M. (2005) Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease. *Trends Genet*, **21**, 312-314.
- Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K. and Stuart, R.A. (2003) Yeast Oxal1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxal1. *EMBO J*, **22**, 6438-6447.
- Jiang, H., Sun, W., Wang, Z., Zhang, J., Chen, D. and Murchie, A.I. (2011) Identification and characterization of the mitochondrial RNA polymerase and transcription factor in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, **39**, 5119-5130.
- Jost, J.P. and Bock, R.M. (1969) Enzymatic hydrolysis of N-substituted aminoacyl transfer ribonucleic acid in yeast. *J Biol Chem*, **244**, 5866-5873.
- Kanazawa, M. and Mori, M. (2002) Mitochondrial urea cycle and related enzymes. *Nihon Rinsho*, **60 Suppl 4**, 159-163.
- Kaspar, B.J., Bifano, A.L. and Caprara, M.G. (2008) A shared RNA-binding site in the Pet54 protein is required for translational activation and group I intron splicing in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res*, **36**, 2958-2968.
- Kaufert, N.F. and Potashkin, J. (2000) Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3003-3010.
- Keil, M., Bareth, B., Woellhaf, M.W., Peleh, V., Prestele, M., Rehling, P. and Herrmann, J.M. (2012) Oxal1-ribosome complexes coordinate the assembly of cytochrome C oxidase in mitochondria. *J Biol Chem*, **287**, 34484-34493.
- Kerscher, S., Durstewitz, G., Casaregola, S., Gaillardin, C. and Brandt, U. (2001) The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comp Funct Genomics*, **2**, 80-90.
- Khalimonchuk, O., Ostermann, K. and Rodel, G. (2005) Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox11p, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome c oxidase. *Curr Genet*, **47**, 223-233.
- Khalimonchuk, O., Ott, M., Funes, S., Ostermann, K., Rodel, G. and Herrmann, J.M. (2006) Sequential processing of a mitochondrial tandem protein: insights into protein import in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, **5**, 997-1006.
- Kim, D.U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H.O., Won, M., Yoo, H.S., Duhig, T., Nam, M., Palmer, G., Han, S., Jeffery, L., Baek, S.T., Lee, H., Shim, Y.S., Lee, M., Kim, L., Heo, K.S., Noh, E.J., Lee, A.R., Jang, Y.J., Chung, K.S., Choi, S.J., Park, J.Y., Park, Y., Kim, H.M., Park, S.K., Park, H.J., Kang, E.J., Kim, H.B., Kang, H.S., Park, H.M., Kim, K., Song, K., Song, K.B., Nurse, P. and Hoe, K.L. (2010) Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*, **28**, 617-623.
- King, M.P. and Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500-503.
- Kobayashi, Y., Matsuo, M., Sakamoto, K., Wakasugi, T., Yamada, K. and Obokata, J. (2008) Two RNA editing sites with *cis*-acting elements of moderate sequence identity are recognized by an identical site-recognition protein in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, **36**, 311-318.
- Kossel, H. and RajBhandary, U.L. (1968) Studies on polynucleotides. LXXXVI. Enzymatic hydrolysis of N-acylaminoacyl-transfer RNA. *J Mol Biol*, **35**, 539-560.
- Kossel, H. (1970) Purification and properties of peptidyl-tRNA hydrolase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **204**, 191-202.
- Kothe, U., Wieden, H.J., Mohr, D. and Rodnina, M.V. (2004) Interaction of helix D of elongation factor Tu with helices 4 and 5 of protein L7/12 on the ribosome. *J Mol Biol*, **336**, 1011-1021.

- Kühl, I., Fox, T.D. and Bonnefoy, N. (2012) *Schizosaccharomyces pombe* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins Cbp6 and Mss51 function at a post-translational step of respiratory complex biogenesis. *Mitochondrion*, **12**, 381-390.
- Kuramae, E.E., Robert, V., Snel, B. and Boekhout, T. (2006) Conflicting phylogenetic position of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genomics*, **88**, 387-393.
- Lang, B.F., Gray, M.W. and Burger, G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*, **33**, 351-397.
- Lee, C., Tibbetts, A.S., Kramer, G. and Appling, D.R. (2009) Yeast AEP3p is an accessory factor in initiation of mitochondrial translation. *J Biol Chem*, **284**, 34116-34125.
- Lee, T. and Pelletier, J. (2012) Eukaryotic initiation factor 4F: a vulnerability of tumor cells. *Future Med Chem*, **4**, 19-31.
- Lemaire, C. and Dujardin, G. (2008) Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria : activity measurement and subunit composition analysis. *Methods Mol Biol*, **432**, 65-81.
- Lightowers, R.N. and Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2010) Terminating human mitochondrial protein synthesis: a shift in our thinking. *RNA Biol*, **7**, 282-286.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C. and Muhlenhoff, U. (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta*, **1823**, 1491-1508.
- Ling, M., Merante, F., Chen, H.S., Duff, C., Duncan, A.M. and Robinson, B.H. (1997) The human mitochondrial elongation factor Tu (EF-Tu) gene: cDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene. *Gene*, **197**, 325-336.
- Lipinski, K.A., Kaniak-Golik, A. and Golik, P. (2010) Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome—from genetics to evolution and systems biology. *Biochim Biophys Acta*, **1797**, 1086-1098.
- Lipinski, K.A., Puchta, O., Surendranath, V., Kudla, M. and Golik, P. (2011) Revisiting the yeast PPR proteins—application of an Iterative Hidden Markov Model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Mol Biol Evol*, **28**, 2935-2948.
- Liu, L., Sanosaka, M., Lei, S., Bestwick, M.L., Frey, J.H., Jr., Surovtseva, Y.V., Shadel, G.S. and Cooper, M.P. (2011) LRP130 protein remodels mitochondria and stimulates fatty acid oxidation. *J Biol Chem*, **286**, 41253-41264.
- Liu, M. and Spremulli, L. (2000) Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem*, **275**, 29400-29406.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L. and Small, I. (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, **16**, 2089-2103.
- Maleszka, R., Skelly, P.J. and Clark-Walker, G.D. (1991) Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J*, **10**, 3923-3929.
- Malka, F., Lombes, A. and Rojo, M. (2006) Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: focus on vertebrate nucleoids. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 463-472.

- Mangus, D.A., Jang, S.H. and Jaehning, J.A. (1994) Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes. *J Biol Chem*, **269**, 26568-26574.
- Manthey, G.M. and McEwen, J.E. (1995) The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **14**, 4031-4043.
- Massardo, D.R., Manna, F., Schafer, B., Wolf, K. and Del Giudice, L. (1994) Complete absence of mitochondrial DNA in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* leads to resistance towards the alkaloid lycorine. *Curr Genet*, **25**, 80-83.
- Matsuyama, A., Shirai, A., Yashiroda, Y., Kamata, A., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (2004) pDUAL, a multipurpose, multicopy vector capable of chromosomal integration in fission yeast. *Yeast*, **21**, 1289-1305.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*, **24**, 841-847.
- Matsuzawa, T., Fujita, Y., Tanaka, N., Tohda, H., Itadani, A. and Takegawa, K. (2011) New insights into galactose metabolism by *Schizosaccharomyces pombe*: isolation and characterization of a galactose-assimilating mutant. *J Biosci Bioeng*, **111**, 158-166.
- McMullin, T.W. and Fox, T.D. (1993) *COX3* mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **268**, 11737-11741.
- Mears, J.A., Cannone, J.J., Stagg, S.M., Gutell, R.R., Agrawal, R.K. and Harvey, S.C. (2002) Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol*, **321**, 215-234.
- Menninger, J.R. (1979) Accumulation of peptidyl tRNA is lethal to *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **137**, 694-696.
- Merante, F., Petrova-Benedict, R., MacKay, N., Mitchell, G., Lambert, M., Morin, C., De Braekeleer, M., Laframboise, R., Gagne, R. and Robinson, B.H. (1993) A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *Am J Hum Genet*, **53**, 481-487.
- Mick, D.U., Vukotic, M., Piechura, H., Meyer, H.E., Warscheid, B., Deckers, M. and Rehling, P. (2010) Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of *COX1* translation in mitochondria. *J Cell Biol*, **191**, 141-154.
- Mili, S., Shu, H.J., Zhao, Y. and Pinol-Roma, S. (2001) Distinct RNP complexes of shuttling hnRNP proteins with pre-mRNA and mRNA: candidate intermediates in formation and export of mRNA. *Mol Cell Biol*, **21**, 7307-7319.
- Minet, M., Dufour, M.E. and Lacroute, F. (1992) Cloning and sequencing of a human cDNA coding for dihydroorotate dehydrogenase by complementation of the corresponding yeast mutant. *Gene*, **121**, 393-396.
- Miyamoto, T., Obokata, J. and Sugiura, M. (2002) Recognition of RNA editing sites is directed by unique proteins in chloroplasts: biochemical identification of cis-acting elements and trans-acting factors involved in RNA editing in tobacco and pea chloroplasts. *Mol Cell Biol*, **22**, 6726-6734.
- Miyamoto, T., Obokata, J. and Sugiura, M. (2004) A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 48-52.

- Mootha, V.K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., Delmonte, T., Villeneuve, A., Sladek, R., Xu, F., Mitchell, G.A., Morin, C., Mann, M., Hudson, T.J., Robinson, B., Rioux, J.D. and Lander, E.S. (2003) Identification of a gene causing human cytochrome *c* oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 605-610.
- Morten, K.J., Ashley, N., Wijburg, F., Hadzic, N., Parr, J., Jayawant, S., Adams, S., Bindoff, L., Bakker, H.D., Mieli-Vergani, G., Zeviani, M. and Poulton, J. (2007) Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. *Mitochondrion*, **7**, 386-395.
- Mulero, J.J. and Fox, T.D. (1993) PET111 acts in the 5'-leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial *COX2* mRNA to promote its translation. *Genetics*, **133**, 509-516.
- Nagy, M., Lacroute, F. and Thomas, D. (1992) Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8966-8970.
- Naithani, S., Saracco, S.A., Butler, C.A. and Fox, T.D. (2003) Interactions among *COX1*, *COX2*, and *COX3* mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **14**, 324-333.
- Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R.J. and Schweyen, R.J. (2007) Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ*, **14**, 1647-1656.
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. and Okayama, H. (1990) High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by *trans*-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, **18**, 6485-6489.
- Okuda, K., Hammani, K., Tanz, S.K., Peng, L., Fukao, Y., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Small, I. and Shikanai, T. (2009) The pentatricopeptide repeat protein OTP82 is required for RNA editing of plastid *ndhB* and *ndhG* transcripts. *Plant J*, **61**, 339-349.
- 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.
- Paluh, J.L. and Clayton, D.A. (1996) A functional dominant mutation in *Schizosaccharomyces pombe* RNase MRP RNA affects nuclear RNA processing and requires the mitochondrial-associated nuclear mutation *ptp1-1* for viability. *EMBO J*, **15**, 4723-4733.
- Parsons, T.J., Muniec, D.S., Sullivan, K., Woodyatt, N., Alliston-Greiner, R., Wilson, M.R., Berry, D.L., Holland, K.A., Weedn, V.W., Gill, P. and Holland, M.M. (1997) A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet*, **15**, 363-368.
- Pearce, S., Nezich, C.L. and Spinazzola, A. (2012) Mitochondrial diseases: Translation matters. *Mol Cell Neurosci*.
- Pel, H.J., Rep, M. and Grivell, L.A. (1992) Sequence comparison of new prokaryotic and mitochondrial members of the polypeptide chain release factor family predicts a five-domain model for release factor structure. *Nucleic Acids Res*, **20**, 4423-4428.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S.A. and Fox, T.D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J*, **22**, 5951-5961.

- Perez-Martinez, X., Funes, S., Camacho-Villasana, Y., Marjavaara, S., Tavares-Carreón, F. and Shingu-Vazquez, M. (2008) Protein synthesis and assembly in mitochondrial disorders. *Curr Top Med Chem*, **8**, 1335-1350.
- Perez-Martinez, X., Butler, C.A., Shingu-Vazquez, M. and Fox, T.D. (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Biol Cell*, **20**, 4371-4380.
- Petracek, M.E. and Longtine, M.S. (2002) PCR-based engineering of yeast genome. *Methods Enzymol*, **350**, 445-469.
- Preuss, M., Leonhard, K., Hell, K., Stuart, R.A., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2001) Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **153**, 1085-1096.
- Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G. and Barkan, A. (2010) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 415-420.
- Putcha, P., Danzer, K.M., Kranich, L.R., Scott, A., Silinski, M., Mabbett, S., Hicks, C.D., Veal, J.M., Steed, P.M., Hyman, B.T. and McLean, P.J. (2010) Brain-permeable small-molecule inhibitors of Hsp90 prevent alpha-synuclein oligomer formation and rescue alpha-synuclein-induced toxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, **332**, 849-857.
- Rackham, O., Davies, S.M., Shearwood, A.M., Hamilton, K.L., Whelan, J. and Filipovska, A. (2009) Pentatricopeptide repeat domain protein 1 lowers the levels of mitochondrial leucine tRNAs in cells. *Nucleic Acids Res*, **37**, 5859-5867.
- Rackham, O. and Filipovska, A. (2011) The role of mammalian PPR domain proteins in the regulation of mitochondrial gene expression. *Biochim Biophys Acta*, **1819**, 1008-1016.
- Ragnini, A. and Frontali, L. (1994) Ordered processing of the polygenic transcripts from a mitochondrial tRNA gene cluster in *K. lactis*. *Curr Genet*, **25**, 342-349.
- Richter, C., Park, J.W. and Ames, B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6465-6467.
- Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P.M., Wessels, H.J., Huynen, M.A., Smeitink, J.A., Lightowlers, R.N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010) A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *EMBO J*, **29**, 1116-1125.
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y.I., Litonin, D., Cramer, P. and Temiakov, D. (2011) Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature*, **478**, 269-273.
- Robin, E.D. and Wong, R. (1988) Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol*, **136**, 507-513.
- Rorbach, J., Richter, R., Wessels, H.J., Wydro, M., Pekalski, M., Farhoud, M., Kuhl, I., Gaisne, M., Bonnefoy, N., Smeitink, J.A., Lightowlers, R.N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2008) The human mitochondrial ribosome recycling factor is essential for cell viability. *Nucleic Acids Res*, **36**, 5787-5799.
- Rosas-Sandoval, G., Ambrogelly, A., Rinehart, J., Wei, D., Cruz-Vera, L.R., Graham, D.E., Stetter, K.O., Guarneros, G. and Soll, D. (2002) Orthologs of a novel archaeal and of the bacterial peptidyl-tRNA hydrolase are nonessential in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16707-16712.
- Rudinger, M., Fritz-Laylin, L., Polsakiewicz, M. and Knoop, V. (2011) Plant-type mitochondrial RNA editing in the protist *Naegleria gruberi*. *RNA*, **17**, 2058-2062.
- Rudinger, M., Volkmar, U., Lenz, H., Groth-Malonek, M. and Knoop, V. (2012) Nuclear DYW-type PPR gene families diversify with increasing RNA editing frequencies in liverwort and moss mitochondria. *J Mol Evol*, **74**, 37-51.

- Ruzzenente, B., Metodiev, M.D., Wredenberg, A., Bratic, A., Park, C.B., Camara, Y., Milenkovic, D., Zickermann, V., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Brandt, U., Stewart, J.B., Gustafsson, C.M. and Larsson, N.G. (2011) LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J*, **31**, 443-456.
- Salinas, T., Duby, F., Larosa, V., Coosemans, N., Bonnefoy, N., Motte, P., Marechal-Drouard, L. and Remacle, C. (2012) Co-Evolution of Mitochondrial tRNA Import and Codon Usage Determines Translational Efficiency in the Green Alga *Chlamydomonas*. *PLoS Genet*, **8**, e1002946.
- Sanchez, M.I., Mercer, T.R., Davies, S.M., Shearwood, A.M., Nygard, K.K., Richman, T.R., Mattick, J.S., Rackham, O. and Filipovska, A. (2011) RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle*, **10**, 2904-2916.
- Sasarman, F., Brunel-Guitton, C., Antonicka, H., Wai, T. and Shoubridge, E.A. (2010) LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. *Mol Biol Cell*, **21**, 1315-1323.
- Schafer, B. (2005) RNA maturation in mitochondria of *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Gene*, **354**, 80-85.
- Schafer, B., Hansen, M. and Lang, B.F. (2005) Transcription and RNA-processing in fission yeast mitochondria. *RNA*, **11**, 785-795.
- Schinkel, A.H., Groot Koerkamp, M.J., Van der Horst, G.T., Touw, E.P., Osinga, K.A., Van der Blik, A.M., Veeneman, G.H., Van Boom, J.H. and Tabak, H.F. (1986) Characterization of the promoter of the large ribosomal RNA gene in yeast mitochondria and separation of mitochondrial RNA polymerase into two different functional components. *EMBO J*, **5**, 1041-1047.
- Schmeing, T.M., Voorhees, R.M., Kelley, A.C., Gao, Y.G., Murphy, F.V.t., Weir, J.R. and Ramakrishnan, V. (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. *Science*, **326**, 688-694.
- Schmitz-Linneweber, C. and Small, I. (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci*, **13**, 663-670.
- Seeger, J., Schrank, B., Pyle, A., Stucka, R., Lorcher, U., Muller-Ziermann, S., Abicht, A., Czermin, B., Holinski-Feder, E., Lochmuller, H. and Horvath, R. (2010) Clinical and neuropathological findings in patients with *TACO1* mutations. *Neuromuscul Disord*, **20**, 720-724.
- Shadel, G.S. and Clayton, D.A. (1993) Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. *J Biol Chem*, **268**, 16083-16086.
- Sharma, M.R., Koc, E.C., Datta, P.P., Booth, T.M., Spremulli, L.L. and Agrawal, R.K. (2003) Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, **115**, 97-108.
- Singh, N.S. and Varshney, U. (2004) A physiological connection between tmRNA and peptidyl-tRNA hydrolase functions in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **32**, 6028-6037.
- Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D. and Schuster, G. (2005) Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Mol Cell Biol*, **25**, 6427-6435.
- Small, I.D. and Peeters, N. (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci*, **25**, 46-47.
- Soleimanpour-Lichaei, H.R., Kuhl, I., Gaisne, M., Passos, J.F., Wydro, M., Rorbach, J., Temperley, R., Bonnefoy, N., Tate, W., Lightowlers, R. and Chrzanowska-Lightowlers, Z. (2007) mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG. *Mol Cell*, **27**, 745-757.

- Sondheimer, N., Fang, J.K., Polyak, E., Falk, M.J. and Avadhani, N.G. (2010) Leucine-rich pentatricopeptide-repeat containing protein regulates mitochondrial transcription. *Biochemistry*, **49**, 7467-7473.
- Spremulli, L.L., Coursey, A., Navratil, T. and Hunter, S.E. (2004) Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **77**, 211-261.
- Sprinzi, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. and Steinberg, S. (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **26**, 148-153.
- Steinberg, S., Gautheret, D. and Cedergren, R. (1994) Fitting the structurally diverse animal mitochondrial tRNAs(Ser) to common three-dimensional constraints. *J Mol Biol*, **236**, 982-989.
- Steinberg, S., Leclerc, F. and Cedergren, R. (1997) Structural rules and conformational compensations in the tRNA L-form. *J Mol Biol*, **266**, 269-282.
- Sterky, F.H., Ruzzenente, B., Gustafsson, C.M., Samuelsson, T. and Larsson, N.G. (2010) LRPPRC is a mitochondrial matrix protein that is conserved in metazoans. *Biochem Biophys Res Commun*, **398**, 759-764.
- Suga, M., Isobe, M. and Hatakeyama, T. (2000) Cryopreservation of competent intact yeast cells for efficient electroporation. *Yeast*, **16**, 889-896.
- Suga, M. and Hatakeyama, T. (2001) High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* pretreated with thiol compounds by electroporation. *Yeast*, **18**, 1015-1021.
- Suga, M., Kusanagi, I. and Hatakeyama, T. (2004) Electroporation of *Schizosaccharomyces pombe* by hyperosmotic post-pulse incubation. *Biotechniques*, **36**, 218-220.
- Suga, M. and Hatakeyama, T. (2009) Gene transfer and protein release of fission yeast by application of a high voltage electric pulse. *Anal Bioanal Chem*, **394**, 13-16.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J*, **22**, 6448-6457.
- Tanaka, K. and Okayama, H. (2000) A pcl-like cyclin activates the Res2p-Cdc10p cell cycle "start" transcriptional factor complex in fission yeast. *Mol Biol Cell*, **11**, 2845-2862.
- Tarassov, I.A. and Entelis, N.S. (1992) Mitochondrially-imported cytoplasmic tRNA(Lys)(CUU) of *Saccharomyces cerevisiae*: *in vivo* and *in vitro* targeting systems. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1277-1281.
- Tavares-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingu-Vazquez, M., Torres-Larios, A. and Perez-Martinez, X. (2008) The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial *COX1* mRNA in yeast. *J Biol Chem*, **283**, 1472-1479.
- Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowers, R.N. and Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2010) Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes. *Science*, **327**, 301.
- Temperley, R.J., Wydro, M., Lightowers, R.N. and Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2010) Human mitochondrial mRNAs--like members of all families, similar but different. *Biochim Biophys Acta*, **1797**, 1081-1085.
- Terasaki, M., Suzuki, T., Hanada, T. and Watanabe, K. (2004) Functional compatibility of elongation factors between mammalian mitochondrial and bacterial ribosomes: characterization of GTPase activity and translation elongation by hybrid ribosomes bearing heterologous L7/12 proteins. *J Mol Biol*, **336**, 331-342.
- Towpik, J., Kutner, J. and Boguta, M. (2005) Expression of mitochondrial release factor in relation to respiratory competence in yeast. *Curr Genet*, **48**, 101-108.

- Tsuboi, M., Morita, H., Nozaki, Y., Akama, K., Ueda, T., Ito, K., Nierhaus, K.H. and Takeuchi, N. (2009) EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis. *Mol Cell*, **35**, 502-510.
- Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M. and Frank, J. (2003) Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell*, **114**, 123-134.
- Van der Giezen, M. and Tovar, J. (2005) Degenerate mitochondria. *EMBO Rep*, **6**, 525-530.
- Vogel, Z., Vogel, T., Zamir, A. and Elson, D. (1971) The protection by 70 S ribosomes of N-acetyl-aminoacyl-tRNA against cleavage by peptidyl-tRNA hydrolase and its use to assay ribosomal association. *Eur J Biochem*, **21**, 582-592.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.
- Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 259-265.
- Wang, Y., Singh, U. and Mueller, D.M. (2007) Mitochondrial genome integrity mutations uncouple the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Biol Chem*, **282**, 8228-8236.
- Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J.E., Lochmuller, H., Chevrette, M., Kaufman, B.A., Horvath, R. and Shoubridge, E.A. (2009) Mutation in *TACO1*, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet*, **41**, 833-837.
- Wiesenberger, G., Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1995) Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial *COX3* mRNA 5' untranslated leader: translational activation and mRNA processing. *Mol Cell Biol*, **15**, 3291-3300.
- Wiley, D.J., Catanuto, P., Fontanesi, F., Rios, C., Sanchez, N., Barrientos, A. and Verde, F. (2008) Bot1p is required for mitochondrial translation, respiratory function, and normal cell morphology in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, **7**, 619-629.
- Williams, E.H., Butler, C.A., Bonnefoy, N. and Fox, T.D. (2007) Translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: functional interactions among mitochondrial ribosomal protein Rsm28p, initiation factor 2, methionyl-tRNA-formyltransferase and novel protein Rmd9p. *Genetics*, **175**, 1117-1126.
- Williamson, D. (2002) The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet*, **3**, 475-481.
- Williamson, D.H. and Fennell, D.J. (1979) Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol*, **56**, 728-733.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. and Davis, R.W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906.

- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G. and Nurse, P. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **415**, 871-880.
- Xin, H., Worix, V., Burkhart, W. and Spemulli, L.L. (1995) Cloning and expression of mitochondrial translational elongation factor Ts from bovine and human liver. *J Biol Chem*, **270**, 17243-17249.
- Xu, F., Morin, C., Mitchell, G., Ackerley, C. and Robinson, B.H. (2004) The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochem J*, **382**, 331-336.
- Xu, F., Ackerley, C., Maj, M.C., Addis, J.B., Levandovskiy, V., Lee, J., Mackay, N., Cameron, J.M. and Robinson, B.H. (2008) Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome *b* expression and a marked reduction in ubiquinol-cytochrome c reductase activity in mouse heart mitochondria. *Biochem J*, **416**, 15-26.
- Yaffe, M.P. (1991) Analysis of mitochondrial function and assembly. *Methods Enzymol*, **194**, 627-643.
- Yassin, A.S., Haque, M.E., Datta, P.P., Elmore, K., Banavali, N.K., Spemulli, L.L. and Agrawal, R.K. (2011) Insertion domain within mammalian mitochondrial translation initiation factor 2 serves the role of eubacterial initiation factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 3918-3923.
- Yu, M., Zhou, Y., Shi, Y., Ning, L., Yang, Y., Wei, X., Zhang, N., Hao, X. and Niu, R. (2007) Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life*, **59**, 450-457.
- Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R.L., Fox, T.D., Tzagoloff, A. and Barrientos, A. (2007) Aberrant translation of cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **18**, 523-535.
- Zhang, Y. and Spemulli, L.L. (1998) Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. *Biochim Biophys Acta*, **1443**, 245-250.
- Zhao, Y. and Lieberman, H.B. (1995) *Schizosaccharomyces pombe*: a model for molecular studies of eukaryotic genes. *DNA Cell Biol*, **14**, 359-371.

Summary

Mitochondria are organelles present in most eukaryotic cells and specialized in the production of energy *via* the respiratory chain located in their inner membrane. Mitochondria have their own genome and their own system of gene expression, which is involved in the biogenesis of the respiratory complexes. The mitochondrial translation machinery, like the respiratory complexes, has a dual genetic origin, both nuclear and mitochondrial. Numerous human diseases result from defects in the expression of mitochondrial genes and especially mutations of factors involved in mitochondrial translation. The yeast *Schizosaccharomyces pombe* is a useful model for the identification and functional analysis of these factors because it is a simple organism that is physiologically closer to higher eukaryotes than *Saccharomyces cerevisiae*.

During my PhD I first participated in the development of new tools to further our understanding of mitochondrial translation, by tagging the small and large subunits of *S. pombe* mitoribosome. In addition I set up fractionation experiments on sucrose gradients to analyze the sedimentation of associated or dissociated mitochondrial ribosomes and test whether given factors are bound to mitoribosome.

I also became interested in factors that could act in the termination mitochondrial translation. Surprisingly, the only factor known to recognize stop codons in *S. pombe*, Mrf1, is not essential, thus I tried to determine which other proteins might also be involved in translation termination. *S. pombe* contains four predicted peptidyl tRNA hydrolases (Pth), two of which, Pth3 and Pth4, have a GGQ motif like Mrf1, which is thought to contribute directly to the hydrolysis of the peptidyl-tRNA bond. Thus they seemed to be good candidates to explain how *S. pombe* can survive without Mrf1. I have shown that Pth3 and Pth4 play a role in mitochondrial biogenesis and that Pth4 is both a high copy suppressor and a synthetic lethal of the $\Delta mrf1$ mutant.

Finally I worked on the Pentatricopeptide Repeat family of proteins (PPR), predicted to be involved in the metabolism of mitochondrial RNA. There are at least nine PPR proteins in *S. pombe* named Ppr1 to Ppr8 and the mitochondrial RNA polymerase, Rpo41. The study of these PPR proteins has shown that all of them are involved in the metabolism of RNA at different stages, mainly stability and translation, and that they often have specific targets. For example Ppr3 is involved in the stability of the small rRNA *rns* while Ppr4 is a specific activator of the translation of *cox1* and Ppr2 is a general activator of mitochondrial translation whose target remains to be identified.

Overall, these studies show that *S. pombe* is an excellent model for mitochondrial functions, both for fundamental studies and as a tool for understanding more complex organisms such as man.