

Université de Montréal

**Caractérisation structurale et fonctionnelle des ARNtm
mitochondriaux de jakobides**

Yannick Jacob

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie

août 2003

©Yannick Jacob, 2003



W
4
U58
2004
V.032

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Caractérisation structurale et fonctionnelle des ARNtm
mitochondriaux de jakobides**

présenté par :

Yannick Jacob

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur: Chartrand, Pascal

Directeur de recherche: Lang, Bernd Franz

Membre du jury: Brakier-Gingras, Léa

RESUME

L'ARNtm est responsable chez les bactéries de la libération des ribosomes bloqués (par exemple, par la présence d'un ARNm sans codon stop) durant la traduction. La libération de ces ribosomes est accompagnée de la dégradation spécifique des protéines en cours de synthèse sur ces ribosomes. La découverte des ARNtm bactériens deux-morceaux a conduit à l'identification du premier ARNtm mitochondrial chez le jakobide *Reclinomonas americana*. Cet ARNtm semble être dépourvu du domaine structural responsable chez les ARNtm bactériens de diriger les polypeptides présents sur les ribosomes bloqués vers la dégradation. Cette évolution structurale particulière amène plusieurs questions concernant le rôle cellulaire de cet ARNtm dérivé. Ce projet de recherche a donc pour but la caractérisation structurale et fonctionnelle des ARNtm mitochondriaux de jakobides. Ce mémoire est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre se veut un résumé de la littérature concernant la structure et les fonctions des ARNtm bactériens. Le deuxième chapitre est écrit sous la forme d'un article scientifique et résume les principaux résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise. Finalement, le troisième et dernier chapitre est une discussion générale de l'évolution structurale et fonctionnelle des ARNtm mitochondriaux de jakobides.

Mots clés: ARNtm, jakobide, traduction mitochondriale, évolution structurale

ABSTRACT

Bacterial tmRNAs are involved in resolving stalled translation complexes (for example, stalled by mRNAs without in-frame stop codon) and in signalling nascent polypeptides for specific degradation. The discovery of two-piece bacterial tmRNAs has led to the identification of the first mitochondrial tmRNA in the jakobid-like flagellate *Reclinomonas americana*. The tmRNA of *R. americana* seems to lack the domain of bacterial tmRNAs involved in signalling nascent polypeptides for degradation. This observation generates numerous questions concerning the possible role of this variant tmRNA in the mitochondria of *R. americana*. Accordingly, the goal of this research project was to characterize structurally and functionally the mitochondrial tmRNAs of jakobides. This master's thesis is divided in three chapters. The first chapter is a general introduction on the structure and function of bacterial tmRNAs. The second chapter is a scientific article that shows the major results obtained on this research project. The third chapter is a discussion on the structural and functional evolution of jakobid mitochondrial tmRNAs.

Key Words: tmRNA, jakobid, mitochondrial translation, structural evolution

TABLE DES MATIERES

<u>Titres</u>	<u>Pages</u>
RESUME	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTES DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
LISTE DES CODES DES ACIDES AMINES	XII
REMERCIEMENTS	XIII
CHAPITRE I: INTRODUCTION	1
I.1 Structure des ARNtm bactériens	2
I.1.1 Historique de la découverte de l'ARNtm et identification chez cette molécule d'un domaine ressemblant à un ARNt	2
I.1.2 Identification des éléments de structure primaire et secondaire de l'ARNtm	5
I.1.3 Maturation des ARNtm bactériens	7
I.1.4 Découverte des ARNtm deux-morceaux chez les α -protéobactéries	9
I.2 Les fonctions des ARNtm bactériens	14
I.2.1 Résultats expérimentaux ayant contribué à l'identification des fonctions des ARNtm bactériens	14
I.2.2 Elaboration du modèle de <i>trans</i> -traduction	15

I.2.3 Situations physiologiques nécessitant l'action de l'ARNtm chez les bactéries	17
I.2.4 Identification de protéines impliquées dans le mécanisme de <i>trans</i> -traduction	19
I.2.5 Fonctions associées à l'ARNtm: libération des ribosomes bloqués et contrôle de la qualité de traduction	20
I.3 Identification des ARNtm plastidiques	21
I.3.1 Structure des ARNtm plastidiques	21
I.3.2 Distribution des ARNtm plastidiques	22
I.4 Découverte de l'ARNtm mitochondrial de <i>Reclinomonas americana</i>	25
I.4.1 Structure de l'ARNtm mitochondrial de <i>R. americana</i>	25
I.5 Objectifs et hypothèses du projet de recherche	27
CHAPITRE II: Article	29
II.1 Abstract	31
II.2 Introduction	32
II.3 Material and Methods.....	35
II.4 Results	39
II.5 Discussion	50
II.6 Acknowledgement	54

II.7 References	54
CHAPITRE III: DISCUSSION	57
III.1 Hypothèses concernant l'évolution des gènes <i>ssrA</i> mitochondriaux chez les eucaryotes	58
III.2 Structure des ARNtm mitochondriaux matures.....	60
III.3 Hypothèses concernant le rôle des ARNtm dans les mitochondries des jakobides	63
III.4 Essais fonctionnels de l'ARNtm de <i>J. libera</i> chez <i>E. coli</i> X91 (<i>ssrA</i> ⁻)	65
III.4.1 Introduction	65
III.4.2 Essai de signalisation des protéines pour la dégradation	67
III.4.3 Essai pour vérifier la libération de ribosomes bloqués	70
III.4.4 Essai de compétition entre l'ARNtm de <i>J. libera</i> et l'ARNtm de <i>E. coli</i>	72
III.4.5 Discussion concernant les essais fonctionnels	73
III.5 Présence d'un gène mitochondrial bi-fonctionnel encodant un ARNtm et un ARNt ^{Ser} chez <i>Jakoba bahamensis</i> ?	77
III.6 Perspectives	81
III.7 Conclusion	82
BIBLIOGRAPHIE	85

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION		Pages
Figure I.1	Modélisation du domaine équivalent à un demi-ARNt de l'ARNtm	4
Figure I.2	Structure primaire et secondaire de l'ARNtm de <i>Escherichia coli</i>	6
Figure I.3	Structure primaire et secondaire de l'ARNtm deux-morceaux de <i>Caulobacter crescentus</i>	10
Figure I.4	Modèle simplifié de permutation d'un gène conduisant à l'apparition des ARNtm deux-morceaux	11
Figure I.5	Comparaison génétique et structurale entre un ARNtm standard (<i>Escherichia coli</i>) et un ARNtm deux-morceaux (<i>Caulobacter crescentus</i>)	13
Figure I.6	Modèle d'action de l'ARNtm (<i>trans</i> -traduction)	16
Figure I.7	Comparaison entre l'ARNtm standard de <i>Escherichia coli</i> et l'ARNtm standard de la cyanobactérie <i>Synechococcus</i> PCC6301	23
Figure I.8	Diminution de la complexité structurale chez les ARNtm plastidiques comparativement à leurs homologues cyanobactériens	24
Figure I.9	Modélisation de la structure secondaire de l'ARNtm mitochondrial de <i>Reclinomonas americana</i>	26

ARTICLE	Pages
Figure II.1	Predicted secondary structure of the tRNA ^{Ala} -like domains of jakobid mitochondrial tmRNAs 40
Figure II.2	Verification of the potential genetic link between <i>ssrA</i> and <i>orf64</i> 43
Figure II.3	Characterization of the mature structure of <i>J. libera</i> tmRNA 46
Figure II.4	<i>In vitro</i> RNase P processing assay 48
Figure II.5	<i>In vitro</i> aminoacylation with alanine 49
DISCUSSION	
Figure III.1	Comparaison de la complexité génétique entre trois génomes mitochondriaux 59
Figure III.2	Cartographie par extension d'amorce de l'extrémité 5' située dans l'hélice équivalente à l'hélice P2 pour l'ARNtm mitochondrial de <i>R. americana</i> 62
Figure III.3	Système utilisé pour vérifier l'action potentielle de l'ARNtm mitochondrial dans la dégradation des protéines partiellement synthétisées (A) et résultats de l'expérience (B) 68
Figure III.4	Résultat de l'essai de compétition entre l'ARNtm mitochondrial de <i>J. libera</i> et l'ARNtm-DD de <i>E. coli</i> 74

Figure III.5	Buvarlage Northern pour vérifier la synthèse et la maturation de l'ARN _{tm} mitochondrial de <i>J. libera</i> exprimé chez <i>E. coli</i> X91 75
Figure III.6	Modèle pour la synthèse de deux ARN (ARN _{tm} /ARN ^{Ser}) 78

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Adénine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNmt	ADN mitochondrial
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ARNtm	ARN de transfert-messenger
C	Cytosine
drARNt	domaine ressemblant à un ARNt (domaine des ARNtm)
G	Guanine
pb	paires de bases
Pré-ARNt	Précurseur de l'ARN de transfert
RNase III	Ribonucléase III
RNase E	Ribonucléase E
RNase P	Ribonucléase P
ssrA	« Small Stable RNA A » Gène codant pour l'ARNtm
S	Coefficient de sédimentation ou Svedberg
T	Thymine
U	Uracyl

LISTE DES CODES DES ACIDES AMINES

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. B. Franz Lang, pour la confiance qu'il a eu en mes capacités et la latitude qu'il m'a accordée pour développer mes propres idées. De plus, je tiens à souligner sa grande contribution à la correction et à l'amélioration de ce mémoire.

Je veux également souligner le travail effectué par Elias Seif sur ce projet de recherche. Il m'a initié aux techniques de la biologie moléculaire et a lui-même participé à la réalisation de certaines expériences dont les résultats sont mentionnés dans le présent mémoire.

Ma reconnaissance va également aux autres membres de mon laboratoire, Lise Forget, Julien Lagarde, Jessica Leigh, Naiara Rodriguez-Ezpeleta et Zhang Wang et aux scientifiques externes, Dr. Brian Boyle, Dr. Daniel Chevrier, Chantal LeBlanc, Jean-Nicholas Mess, Pierre-Olivier Paquet, Shona Teijeiro et le Dr. Kelly P. Williams, qui auront, à divers degrés et de diverses façons, participé à la réalisation de ce projet.

Finalement, je remercie le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (NATEQ) pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté durant mes 2 années de maîtrise.

CHAPITRE I: INTRODUCTION

L'ARNtm (ARN transfert-messenger), connu également sous le nom de SsrA et ARN 10Sa, a été identifié pour la première fois chez *Escherichia coli* par B.K. Ray et D. Apirion [Ray et Apirion, 1979]. Depuis les dix dernières années, plusieurs résultats expérimentaux ont permis d'améliorer notre connaissance de la structure primaire, secondaire, et tertiaire de cette molécule, et d'identifier les fonctions principales de cet ARN chez les bactéries. L'ARNtm permet aux bactéries (1) de libérer les ribosomes bloqués durant la traduction et (2) de se débarrasser spécifiquement des protéines qui étaient en cours de synthèse préalablement au blocage de la traduction.

La découverte du premier ARNtm mitochondrial chez le protiste flagellé *Reclinomonas americana* a généré beaucoup de questions concernant le rôle dans la mitochondrie de cette molécule hautement dérivée comparativement à ses homologues bactériens. L'introduction de ce mémoire a pour but de résumer les principales découvertes concernant l'ARNtm afin de mieux comprendre les objectifs et les hypothèses derrière le projet de caractérisation structurale et fonctionnelle des ARNtm mitochondriaux de jakobides.

I.1 Structure des ARNtm bactériens

I.1.1 Historique de la découverte de l'ARNtm et identification chez cette molécule d'un domaine ressemblant à un ARNt

L'ARNtm a été découvert pour la première fois en 1979 chez *E. coli* et nommé par rapport à son coefficient de sédimentation (ARN 10Sa) [Ray et Apirion, 1979]. Un

autre ARN, l'ARN 10Sb, a été identifié en même temps que l'ARNtm [Subbaro et Apirion, 1989] et caractérisé plus tard comme étant la sous-unité catalytique de la RNase P. En se basant sur l'incapacité de réduire l'ARNtm à une taille comparable à un ARNt en utilisant un extrait cellulaire contenant les enzymes de maturation des ARNt, et sur l'absence significative de liaison de la molécule avec les ribosomes bactériens (un résultat qui sera contredit plus tard), les auteurs de ce premier article sur l'ARNtm ont affirmé que cet ARN ne pouvait être un ARNt ou un ARNm. Les études futures ont montré qu'ils avaient à la fois tort et raison en énonçant cette hypothèse quant à la nature de l'ARN qu'ils venaient d'isoler.

Chez *E. coli*, le gène codant l'ARNtm (*ssrA*) est monocistronique et contient son propre promoteur et terminateur de transcription. La taille de l'ARNtm mature de *E. coli* est de 363 nt. Un précurseur de cette molécule contenant environ 100 nt de plus à l'extrémité 3' a été identifié [Chauhan et Apirion, 1989]. Il a été démontré que le précurseur de l'ARNtm de *E. coli* est synthétisé avec 7 nt de plus à l'extrémité 5' [Komine *et al.*, 1994].

Le premier résultat significatif pour la compréhension ultérieure du rôle biologique de l'ARNtm est venu des études de modélisation de la structure secondaire de l'ARNtm. Premièrement, il a été trouvé que l'ARNtm de *Mycobacterium tuberculosis* possédait un élément de structure similaire au bras TΨC des ARNt [Tyagi et King, 1992]. Ensuite, des chercheurs ont montré que les ARNtm de *E. coli*, *M. tuberculosis* et *Alcaligenes eutrophus* pouvait être modélisés de façon à former, aux extrémités 5' et 3', un domaine équivalent à un demi-ARNt (Figure I.1) et consistant en un bras accepteur et un bras TΨC [Komine *et al.*, 1994].

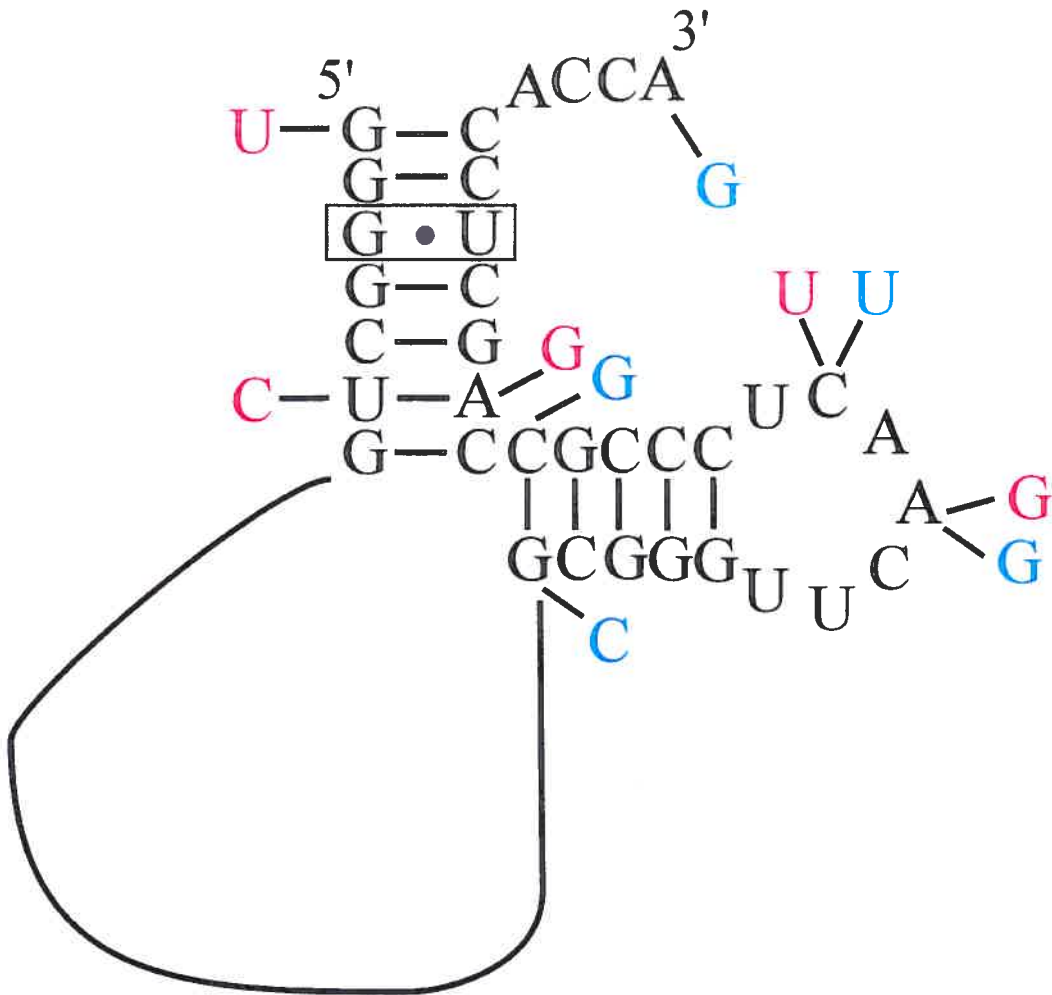


Figure I.1: Modélisation du domaine équivalent à un demi-ARNt de l'ARNtm.

Le domaine ARNt de l'ARNtm de *E. coli* est formé à partir des 7 premiers nucléotides en 5' et des 28 derniers nucléotides en 3'. Ce domaine est dit équivalent à un demi-ARNt à cause de la présence des éléments de structure secondaire similaires au bras accepteur et au bras TΨC des ARNt. La paire de bases G•U nécessaire pour l'aminocyclation des ARNt^{Ala} avec l'acide aminé alanine est encadrée. La queue CCA est présente à l'extrémité 3' de l'ARNtm. Les substitutions nucléotidiques retrouvées chez les ARNtm de *Mycobacterium tuberculosis* et *Alcaligenes eutrophus* sont indiquées en bleu et en rouge, respectivement. Cette figure est basée sur une figure tirée de Komine *et al.*, 1994.

I.1.2 Identification des éléments de structure primaire et secondaire de l'ARNtm

La modélisation, à partir du gène *ssrA*, du domaine ressemblant à un ARNt (drARNt) de l'ARNtm de *E. coli* a permis de constater la présence de la queue nucléotidique CCA à l'extrémité 3' de la molécule (Figure I.1). Cette queue CCA est conservée chez tous les ARNt connus. Elle est soit encodée dans les gènes (quelques bactéries) ou ajoutée post-transcriptionnellement (eucaryotes, plusieurs bactéries et quelques archeobactéries) [Schürer *et al.*, 2001].

Le drARNt de l'ARNtm de *E. coli* possède, au niveau de la troisième position du bras accepteur, la paire de base G•U. De plus, la base discriminante (base azotée située sur le dernier nucléotide avant la queue CCA) est l'adénine chez l'ARNtm de *E. coli*. Ces deux déterminants moléculaires sont connus comme étant responsables de la spécificité de l'aminocyclation des ARNt^{Ala} avec l'acide aminé alanine.

La boucle du bras TΨC identifié chez l'ARNtm de *E. coli* contient la séquence consensus UUCRANY. Cette séquence est conservée chez la plupart des ARNt [Felden *et al.*, 1998]. L'analyse de tous les ARNtm identifiés jusqu'à ce jour (276 séquences d'ARNtm provenant d'espèces différentes sont présentes dans la base de données « The tmRNA Website » [Williams 2002a] en date du 23/06/03) permet de constater la quasi-ubiquité des éléments décrits précédemment chez tous les ARNtm.

L'étude de la structure secondaire de l'ARNt de *E. coli* révèle toutefois des différences entre le drARNt de l'ARNtm et les ARNt (Figure I.2). Tout d'abord, la tige-boucle appelé bras D chez les ARNt est remplacée chez les ARNtm par une simple boucle sans hélice. La différence la plus marquée se situe toutefois au niveau de la

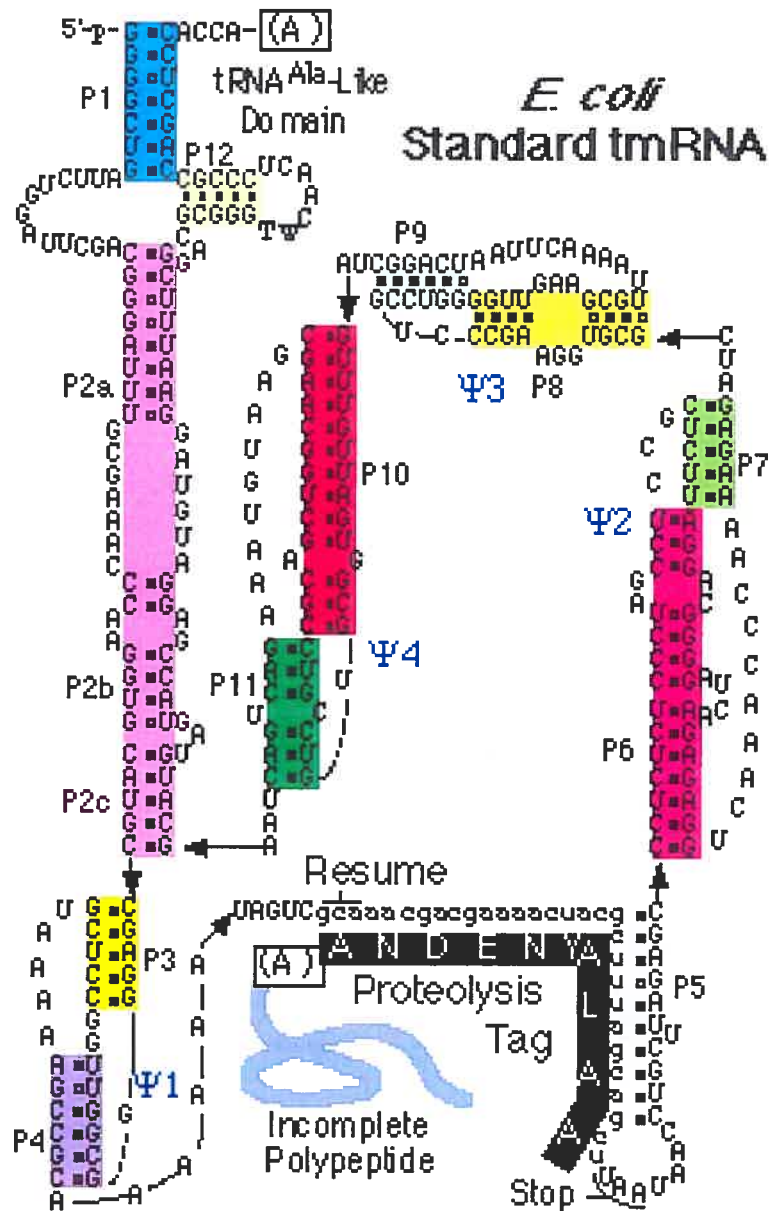


Figure I.2: Structure primaire et secondaire de l'ARNtm de *Escherichia coli*.
L'ARNtm de *E. coli* est composé de 12 hélices (P1-P12) et de 4 pseudo-nœuds (Ψ1-Ψ4). On peut voir qu'au niveau du drARN^t, il n'y a pas d'hélice dans la région équivalente au bras D des ARN^t. Cette figure a été tirée du tmRNA Website [Williams, 2002a].

région connue comme étant le bras anticodon des ARNt. Chez les ARNt, ce bras contient habituellement une courte hélice (ex. 6 pb chez la plupart des ARNt mitochondriaux [Steinberg *et al.*, 1997]) suivie d'une boucle comprenant l'anticodon. Chez les ARNtm, ce bras anticodon est remplacé par une longue boucle de plus de 300 nt en moyenne qui contient plusieurs hélices et pseudo-nœuds. Une étude réalisée à partir de l'alignement de 50 séquences d'ARNtm bactériens a permis d'identifier la présence de 12 hélices et 4 pseudo-nœuds chez les ARNtm [Zwieb *et al.*, 1999]. Par la suite, il a été démontré que le nombre de ces éléments de structure secondaire pouvait parfois varier chez certaines espèces (ex: 5 pseudo-nœuds chez certains ARNtm cyanobactériens). Des études ont montré que seul le pseudo-nœud 1 (Ψ_1 , voir Figure I.2) est essentiel pour la fonction de l'ARNtm [Nameki *et al.*, 2000]. Le rôle de ces pseudo-nœuds pour la fonction des ARNtm est inconnu.

I.1.3 Maturation des ARNtm bactériens

Comme il a été mentionné auparavant, les ARNtm bactériens sont synthétisés sous la forme d'un précurseur. Ce précurseur doit être modifié par des enzymes de maturation car il contient, tout comme les précurseurs des ARNt, des extensions nucléotidiques aux extrémités 5' et 3'. Il a été montré, par l'utilisation d'une souche mutée de *E. coli* contenant une RNase P thermosensible, que la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNtm nécessitait l'action de ce ribozyme [Komine *et al.*, 1994]. La RNase P génère l'extrémité 5' mature des ARNt provenant des trois domaines de la vie (bactéries, archaebactéries et eucaryotes) [Schürer *et al.*, 2001]. Les enzymes impliqués dans la

maturation de l'extrémité 3' de l'ARN_{tm} de *E. coli* sont les mêmes que ceux responsables du même processus pour les ARNt: les endonucléases RNase III [Srivastava *et al.*, 1990, Srivastava *et al.*, 1992] et RNase E [Lin-Chao *et al.*, 1999] et les exonucléases RNase T et RNase PH [Li *et al.*, 1998]. La RNase E semble être capable de générer dans certains cas l'extrémité 3' mature de l'ARN_{tm} de *E. coli* par une seule coupure endonucléotidique [Lin-Chao *et al.*, 1999].

La queue CCA située à l'extrémité 3' des ARNt est nécessaire pour leur aminoacylation. Cette queue CCA est presque toujours encodée dans les gènes *ssrA* bactériens. Une exception a été reportée pour le gène *ssrA* de *Bacillus subtilis*. Cependant, puisqu'il a été démontré que l'ARN_{tm} mature de cette bactérie possède la queue CCA à l'extrémité 3', ceci signifie que la queue CCA est ajoutée post-transcriptionnellement sur cet ARN_{tm}. L'enzyme responsable de cette modification est probablement un orthologue de la ATP(CTP):tRNA nucléotidyltransférase, l'enzyme responsable de l'ajout post-transcriptionnel de la queue CCA en 3' sur les ARNt des eukaryotes, plusieurs bactéries et certaines archéobactéries [Schürer *et al.*, 2001].

D'autres modifications post-transcriptionnelles ont été mises en évidence pour l'ARN_{tm} de *E. coli*. La boucle présente dans le bras TΨC est modifiée de 341-UUCAACU-347 à 341-m⁵UΨCAACU-347 [Felden *et al.*, 1998]. Les modifications aux positions 341 et 342 sont également retrouvées universellement chez les ARNt aux positions équivalentes.

Chez les ARNt canoniques, les nucléotides Ψ₅₅ et C₅₆ (correspondant aux nucléotides 342 et 343 de l'ARN_{tm} de *E. coli*) interagissent avec les nucléotides G₁₈ et G₁₉ présent dans la boucle du bras D afin de stabiliser la structure tertiaires de ces

molécules. Il a été avancé que les nucléotides G₁₃ et G₁₄, présents dans la boucle de l'ARNtm de *E. coli* correspondant au bras D des ARNt, pourraient jouer le même rôle et interagir avec les nucléotides Ψ_{342} et C₃₄₃ afin de stabiliser la structure tertiaire de la molécule [Felden *et al.*, 1998 et Barends *et al.*, 2002]. Les nucléotides G₁₃ et G₁₄ sont conservés chez presque tous les ARNtm. Il a été montré expérimentalement que la présence des nucléotides modifiés augmentait la stabilité de la branche acceptrice (bras accepteur + bras T Ψ C) [Felden *et al.*, 1998]. De plus, la fonctionnalité de SmpB, une protéine liant l'ARNtm et essentielle à l'action cellulaire de ce dernier, dépend de la présence de ces nucléotides modifiés [Barends *et al.*, 2002].

I.1.4 Découverte des ARNtm deux-morceaux chez les α -protéobactéries

Un gène codant pour l'ARNtm a été identifié chez toutes les bactéries pour lesquelles une recherche a été effectuée. Un gène *ssrA* n'a encore jamais été identifié chez une archeobactérie. L'importance de l'ARNtm pour les bactéries est démontrée par la présence du gène encodant cette molécule chez *Mycoplasma genitalium*, un organisme dont le génome contient au total moins de 500 gènes.

A un certain moment, on a cru que cette molécule était absente chez les α -protéobactéries [Felden *et al.*, 1999]. La découverte chez ce taxon bactérien d'une nouvelle classe d'ARNtm (ARNtm deux-morceaux (Figure I.3)) a permis d'éliminer les doutes concernant l'universalité de cette molécule chez les bactéries [Keiler *et al.*, 2000]. Les ARNtm deux-morceaux sont le résultat d'un réarrangement génétique qui a conduit à la permutation circularisée du gène *ssrA* chez un ancêtre commun aux α -protéobactéries

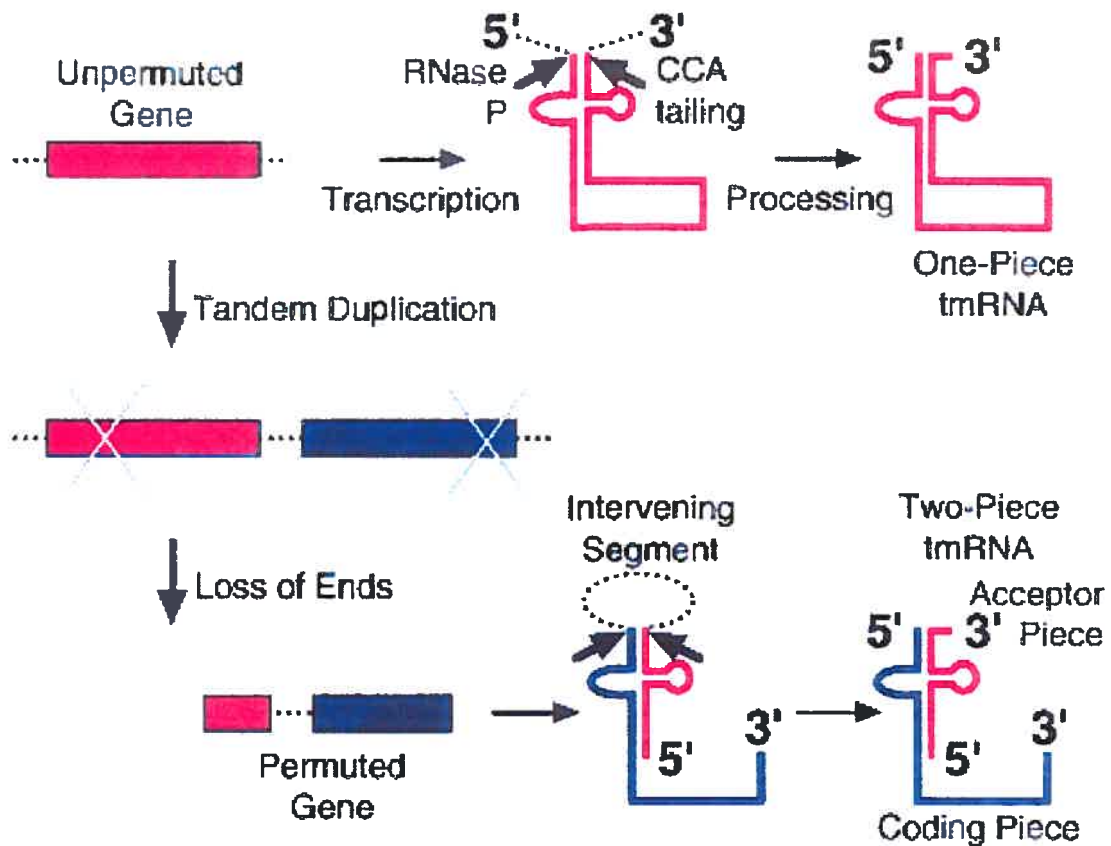


Figure I.4: Modèle simplifié de permutation circularisée d'un gène conduisant à l'apparition des ARNtm deux-morceaux.

L'apparition d'un gène *ssrA* permuté circulairement débute par la duplication du gène et est suivie de l'excision des segments extérieurs. Le gène permuté est composé en partie du gène original et du gène dupliqué. Cette figure a été tirée de Williams, 2002b.

actuelles. Le mécanisme biologique proposé habituellement pour expliquer l'apparition de gène permuté est la duplication génique suivie par la dégénération des segments extérieurs (Figure I.4). Il a été montré cependant que ce modèle simplifié n'était pas toujours suffisant pour expliquer l'architecture de tous les ARNtm deux-morceaux identifiés [Williams, 2002b]. Puisque des ARNtm deux-morceaux ont été également identifiés chez certaines cyanobactéries, ceci signifie qu'au moins deux événements de permutation circularisée de gènes *ssrA* ont eu lieu dans des branches évolutives bactériennes indépendantes.

Ces ARNtm sont appelés deux-morceaux puisque durant la maturation, il y a excision de la région appelée segment intervenant (voir Figure I.4), ce qui génère des ARNtm composés de deux ARN retenus ensemble uniquement par des ponts hydrogènes établis au niveau des hélices P1 et P2 (Figure I.5). Les ARNtm possédant la configuration habituelle (ex: ARNtm de *E. coli*) sont appelés ARNtm standards ou un-morceau afin de les différencier des ARNtm deux-morceaux. Les études fonctionnelles réalisées sur les ARNtm deux-morceaux ont montré que ceux-ci pouvaient effectuer les mêmes fonctions que les ARNtm standards [Keiler *et al.*, 2000].

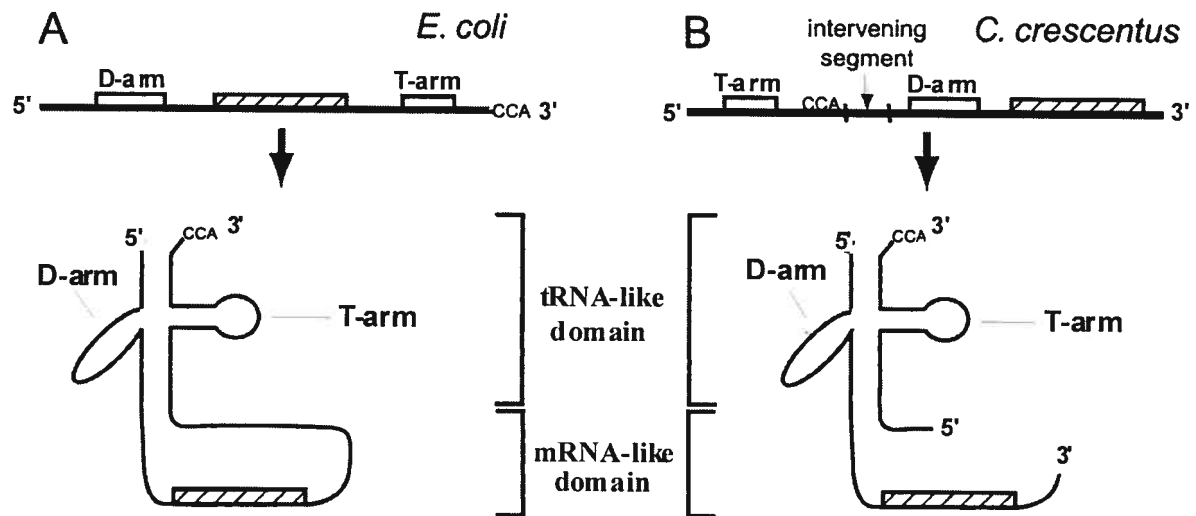


Figure I.5: Comparaison génétique et structurale entre un ARNtm standard (*Escherichia coli*) et un ARNtm deux-morceaux (*Caulobacter crescentus*).

Les deux types d'ARNtm (standard et deux-morceaux) contiennent les mêmes éléments structuraux. La circularisation perméée dans le gène codant pour l'ARNtm deux-morceaux altère toutefois l'ordre linéaire de ces éléments au niveau génétique. Les deux structures sont composées d'un drARNt et d'un domaine ARNm. L'ARNtm deux-morceaux est composé de deux ARN distincts. Cette figure a été tirée de Keiler *et al.*, 2000.

I.2 Les fonctions des ARNtm bactériens

I.2.1 Résultats expérimentaux ayant contribué à l'identification des fonctions des ARNtm bactériens

Plusieurs résultats expérimentaux ont contribué à l'identification des fonctions cellulaires des ARNtm. De tous ces résultats, certains d'entre eux ont été particulièrement révélateurs.

Tout d'abord, il a été montré, *in vitro* et *in vivo*, que l'ARNtm bactérien de *E. coli* pouvait, tout comme les ARNt^{Ala}, être aminoacylé avec l'acide aminé alanine [Komine *et al.*, 1994]. Ce résultat était prévisible dès le moment où les chercheurs se sont aperçus que tous les ARNtm bactériens identifiés contenaient un drARNt. De plus, la nature de l'acide aminé chargé sur les ARNtm était également prévisible, étant donné la conservation chez tous les ARNtm des deux déterminants moléculaires permettant l'aminoacylation des ARNt^{Ala} avec l'alanine (la paire de base G•U située en troisième position dans le bras accepteur et l'adénine en position équivalente à la base discriminante).

Un autre résultat déterminant fut la découverte de l'association *in vivo* de l'ARNtm avec les ribosomes 70S [Ushida *et al.*, 1994, Komine *et al.*, 1996]. Ce résultat a été obtenu en observant la co-sédimentation de ces deux entités sur un gradient de sucrose.

Ensuite, des chercheurs ont réalisé que lorsque l'interleukine 6 murine était sur-exprimée chez *E. coli*, une petite proportion de la population cellulaire de cette protéine

était composé de protéines tronquées [Tu *et al.*, 1995]. Le séquençage partiel de ces protéines a permis de révéler qu'elles étaient toutes tronquées à des endroits différents à l'extrémité C-terminale et qu'un peptide non codé par le gène et ayant la séquence (AANDENYALAA) était toujours présent à cette extrémité. Il a été ensuite trouvé que le cadre de lecture codant pour les dix derniers acides aminés de ce peptide signal était présent dans le gène codant pour l'ARNtm de *E. coli*.

Lorsque le peptide signal codé par l'ARNtm est présent en C-terminal d'une protéine, celle-ci devient sensible à la dégradation par la Tsp [Keiler et Sauer, 1996a]. La Tsp est une protéase qui reconnaît et coupe les protéines périplasmiques ayant deux ou trois résidus hydrophobes à l'extrémité C-terminale. Il a été montré également que les protéines cytoplasmiques ayant le peptide signal à l'extrémité C-terminale étaient sensibles à la dégradation par les protéases ClpXP, ClpAP et FtsH (HflB) [Keiler *et al.*, 1996b, Gottersman *et al.*, 1998, Herman *et al.*, 1998]. Le peptide signal codé par l'ARNtm est ajouté à l'extrémité C-terminale d'une protéine lorsque son ARNm correspondant ne contient pas de codon stop. Ceci a été démontré *in vivo* chez *E. coli* en plaçant un terminateur de transcription à l'intérieur d'un gène rapporteur et en observant la dégradation spécifique et rapide de la protéine codée par ce gène [Keiler *et al.*, 1996].

I.2.2 Elaboration du modèle de *trans*-traduction

Afin d'expliquer tous ces résultats, un modèle d'action de l'ARNtm appelé *trans*-traduction a été élaboré (Figure I.6) [Keiler *et al.*, 1996]. (1) Le ribosome, ayant atteint le

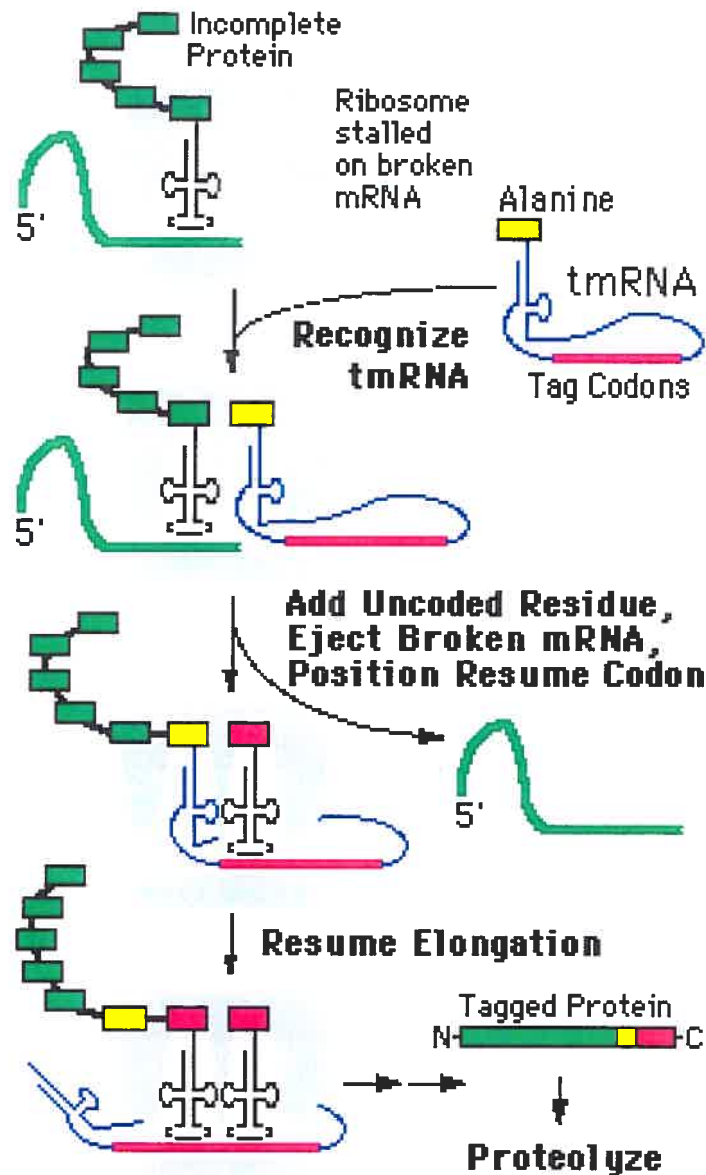


Figure I.6: Modèle d'action de l'ARNtm (*trans*-traduction).

La présence d'un ribosome bloqué en cours de synthèse protéique est reconnue par l'ARNtm. Celui-ci s'insère au niveau du site A du ribosome bloqué et agit comme un ARN^t en participant à une réaction de transpeptidation. Il y a ensuite translocation de l'ARNtm du site A vers le site P. L'ARNtm est éjecté du ribosome et est remplacé par le cadre de lecture situé sur l'ARNtm. Ce dernier sert de matrice pour la reprise de la traduction. Le cadre de lecture code pour un décapeptide qui est ajouté à la protéine partiellement synthétisée préalablement à l'arrêt de la traduction. La protéine chimérique résultante est relâchée et le peptide présent à l'extrémité C-terminale servira de signal pour la dégradation de la protéine chimérique. Cette figure a été tirée du tmRNA Website [Williams, 2002a].

dernier codon d'un ARNm sans codon stop, reste bloqué et signale l'entrée de l'ARNtm, chargé préalablement avec l'acide aminé alanine, au niveau du site A du ribosome. (2) La protéine en cours de traduction est transférée, à partir de l'ARNt présent au site P, sur le résidu alanine de l'ARNtm. Cette étape explique la présence du premier résidu du peptide signal (alanine) puisqu'il n'est pas encodé par l'ARNtm. (3) L'ARNm sans codon stop est ensuite éjecté du ribosome et remplacé par le cadre de lecture codant pour le peptide signal de l'ARNtm (cette étape pourrait se faire avant ou en même temps que l'étape 2). (4) La traduction reprend en utilisant l'ARNtm comme matrice et se termine normalement à cause de la présence d'un codon stop à la fin du cadre de lecture codant pour le peptide signal. La protéine chimérique est ensuite relâchée du ribosome et reconnue par les protéases.

I.2.3 Situations physiologiques nécessitant l'action de l'ARNtm chez les bactéries

Les ARNm sans codon stop ont été les premiers composants cellulaires identifiés comme étant capable de déclencher l'action de l'ARNtm [Keiler *et al.*, 1996b]. La présence d'ARNm endogènes sans codon stop chez les bactéries peut être expliquée par de nombreuses situations. La dégradation partielle des ARNm bactériens par les endonucléases et les 3'→5' exoribonucléases pourrait expliquer l'absence de codon stop chez les ARNm. Il est connu que l'action continue de ces nucléases a comme conséquence que la demi-vie moyenne des ARNm bactériens est seulement de 2-3 minutes [Ehretsmann *et al.*, 1992]. La génération d'ARNm sans codon stop peut également se produire lors de l'arrêt prématuré de la transcription. Il a été trouvé que la

liaison du répresseur lacI à l'opérateur de l'opéron lac induisait la terminaison prématurée de la transcription du gène codant pour ce même répresseur et le relâchement d'ARNm sans codon stop dans le cytoplasme [Abo *et al.*, 2000]. Finalement, il a été démontré récemment que la toxine RelE pouvait stimuler la coupure des ARNm en cours de synthèse au site A du ribosome. Cette protéine régulatrice joue un rôle dans l'adaptation des bactéries à un milieu de culture pauvre en nutriments [Pedersen *et al.*, 2003].

Il a été démontré que plusieurs situations responsables du ralentissement de la traduction pouvaient contribuer à l'action de l'ARNtm. Premièrement, la présence d'un bloc de 2-4 codons rares (ou l'absence au niveau du cytoplasme des ARNt correspondants) sur un ARNm possédant un codon stop est suffisante pour déclencher le mécanisme de *trans*-traduction [Roche et Sauer, 1999]. Un autre événement pouvant conduire à l'action de l'ARNtm est la présence d'une séquence stop faible sur un ARNm [Collier *et al.*, 2002, Roche et Sauer, 2001, Hayes *et al.*, 2001]. L'efficacité de terminaison de la traduction dépend du codon stop (ex. UGA est généralement moins efficace que UAA ou UAG) et de la nature de la base azotée située en 3' du codon stop [Kopelowitz *et al.*, 1992, Poole *et al.*, 1995, Pavlov *et al.*, 1998]. Finalement, la nature des acides aminés présents à l'extrémité C-terminale de la protéine en cours de synthèse est un autre déterminant pouvant déclencher l'action de l'ARNtm [Hayes *et al.*, 2002, Sunohara *et al.*, 2002].

I.2.4 Identification de protéines impliquées dans le mécanisme de *trans*-traduction

Plusieurs protéines jouent un rôle au niveau du mécanisme de *trans*-traduction. SmpB est une protéine d'environ 160 acides aminés qui est retrouvé chez toutes les bactéries. Cette protéine lie spécifiquement et avec une grande affinité l'ARNtm. Sans la présence de cette protéine, l'ARNtm ne peut se lier au ribosome *in vivo* [Karzai *et al.*, 1999]. De plus, cette protéine augmente l'efficacité de chargement avec l'alanine de l'ARNtm de *E. coli in vitro* [Shimizu et Ueda, 2002]. Le rôle de cette protéine dans le mécanisme de *trans*-traduction n'est pas encore très bien défini. Il a été dernièrement montré qu'elle se liait au drARNt de l'ARNtm [Barends *et al.*, 2001, Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2002, Valle *et al.*, 2003] et qu'elle permettait de faire le pont entre l'ARNtm et la sous-unité 50S du ribosome [Valle *et al.*, 2003].

Le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu est une autre protéine qui se lie à l'ARNtm [Zrevera *et al.*, 2001]. Comme pour les ARNt, cette protéine interagit avec la branche acceptrice des ARNtm et forme un complexe ternaire ARNtm•EF-TU•GTP [Barends *et al.*, 2000, Valle *et al.*, 2003].

Il a été montré que la protéine S1 pouvait également se lier à l'ARNtm, possiblement en interagissant avec les différents pseudo-nœuds [Wower *et al.*, 2000, Karzai et Sauer, 2001 et Bordeau et Felden, 2002]. Des évidences expérimentales suggèrent que plus d'une protéine S1 peuvent se lier à l'ARNtm en même temps [Bordeau et Felden, 2002]. La présence de cette protéine semble essentielle pour la liaison de l'ARNtm au ribosome [Wower *et al.*, 2000]. Selon les évidences biochimiques obtenues, cette protéine serait capable de dérouler les régions hélicoïdales des ARNm.

Cette action pourrait ainsi faciliter l'élongation de la traduction [Bear *et al.*, 1976]. Des études structurales cryo-EM de ribosomes complexés avec l'ARNtm et ses composants protéiques laissent croire que la protéine S1 pourrait avoir le même rôle pour l'ARNtm, c'est-à-dire préparer celui-ci à agir comme ARNm en déroulant les régions hautement structurées (pseudo-nœuds et hélices) de cette molécule [Valle *et al.*, 2003].

I.2.5 Fonctions associées à l'ARNtm: libération des ribosomes bloqués et contrôle de la qualité de traduction

L'ARNtm n'est pas une molécule essentielle pour la croissance de *E. coli*. La délétion du gène encodant l'ARNtm entraîne toutefois plusieurs phénotypes chez *E. coli*: faible croissance à des températures élevées, mobilité réduite, récupération plus lente après un manque de produits carbonés, augmentation de l'activité de certaines protéases et de protéines liant l'ADN et impossibilité de faire pousser le phage hybride λ immP22.

Des études réalisées par Withey et Friedman ont démontré que ce dernier phénotype pouvait être complété par la présence d'un gène muté encodant l'ARNtm [Withey et Friedman, 1999]. La mutation se situe au niveau du cadre de lecture encodant le peptide signal. La séquence du peptide signal est modifiée et n'est plus reconnue par les protéases. Ceci signifie que les protéines chimériques produites durant la *trans*-traduction ne sont plus dégradées spécifiquement. L'intérêt de ce résultat vient du fait que le même phénotype (impossibilité de faire pousser le phage hybride λ immP22) ne peut être complété par la présence d'un ARNtm muté de façon à ne plus pouvoir être

chargé avec l'alanine. Le chargement de l'alanine sur l'ARNtm est la première étape du mécanisme de *trans*-traduction.

Un résultat équivalent a été obtenu en effectuant des travaux chez la bactérie *N. gonorrhoeae*. Chez cette bactérie, l'ARNtm est une molécule essentielle. La délétion du gène encodant l'ARNtm entraîne la mort cellulaire de la bactérie. Toutefois, la présence d'un ARNtm muté n'encodant plus un peptide reconnu par les protéases est suffisante pour compléter la perte de l'ARNtm sauvage et permettre à la bactérie de survivre [Withey et Friedman, 1999].

Ces résultats démontrent l'importance des premières étapes de l'action de l'ARNtm. Ces étapes conduisent à la libération des ribosomes bloqués par des ARN^m problématiques, indépendamment de la signalisation des protéines chimériques vers les protéases. L'ARNtm a donc deux rôles indépendants liés par le même mécanisme chez les bactéries, soit la libération des ribosomes bloqués et la dégradation des protéines en cours de synthèse. De ces deux rôles, celui permettant la libération des ribosomes bloqués serait le plus important [Withey et Friedman, 1999].

I.3 Identification des ARNtm plastidiques

I.3.1 Structure des ARNtm plastidiques

Il y a plusieurs évidences concernant l'hypothèse d'une origine cyanobactérienne pour les plastides. De plus, la plupart de ces évidences convergent vers l'idée que tous

les plastides actuels dériveraient d'une seule cyanobactérie [Palmer et Delwiche, 1998 et Turner *et al.*, 1999].

La majorité des ARNtm cyanobactériens identifiés possèdent la configuration un-morceau (voir section I.1.4). Une lignée cyanobactérienne possède toutefois des ARNtm deux-morceux. Les ARNtm cyanobactériens un-morceau sont structurellement différents des autres ARNtm bactériens un-morceau puisqu'ils possèdent un pseudo-nœud et une hélice supplémentaires situés après le cadre de lecture codant pour le peptide signal (Figure I.7).

Des gènes codant pour l'ARNtm ont été identifiés dans plusieurs génomes plastidiques. Ces ARNtm sont tous de configuration standard (voir section I.1.4). Ils possèdent le domaine ressemblant à un ARNt et le cadre de lecture codant pour le peptide signal. Toutefois, ils semblent être dépourvus, d'après les alignements effectués, de tous les pseudo-nœuds situés habituellement après le cadre de lecture chez les ARNtm bactériens (Figure I.8). Les analyses statistiques montrent que la région comprenant ces pseudo-nœuds est extrêmement réduite par rapport aux ARNtm bactériens [K.P. Williams, communication personnelle].

I.3.2 Distribution des ARNtm plastidiques

Des gènes codant pour l'ARNtm ont été identifiés dans les génomes plastidiques des trois grandes branches plastidiques: les plastides verts, les plastides rouges et les Glaucocystophytes. Cependant, un gène *ssrA* n'a pas été identifié dans tous les génomes

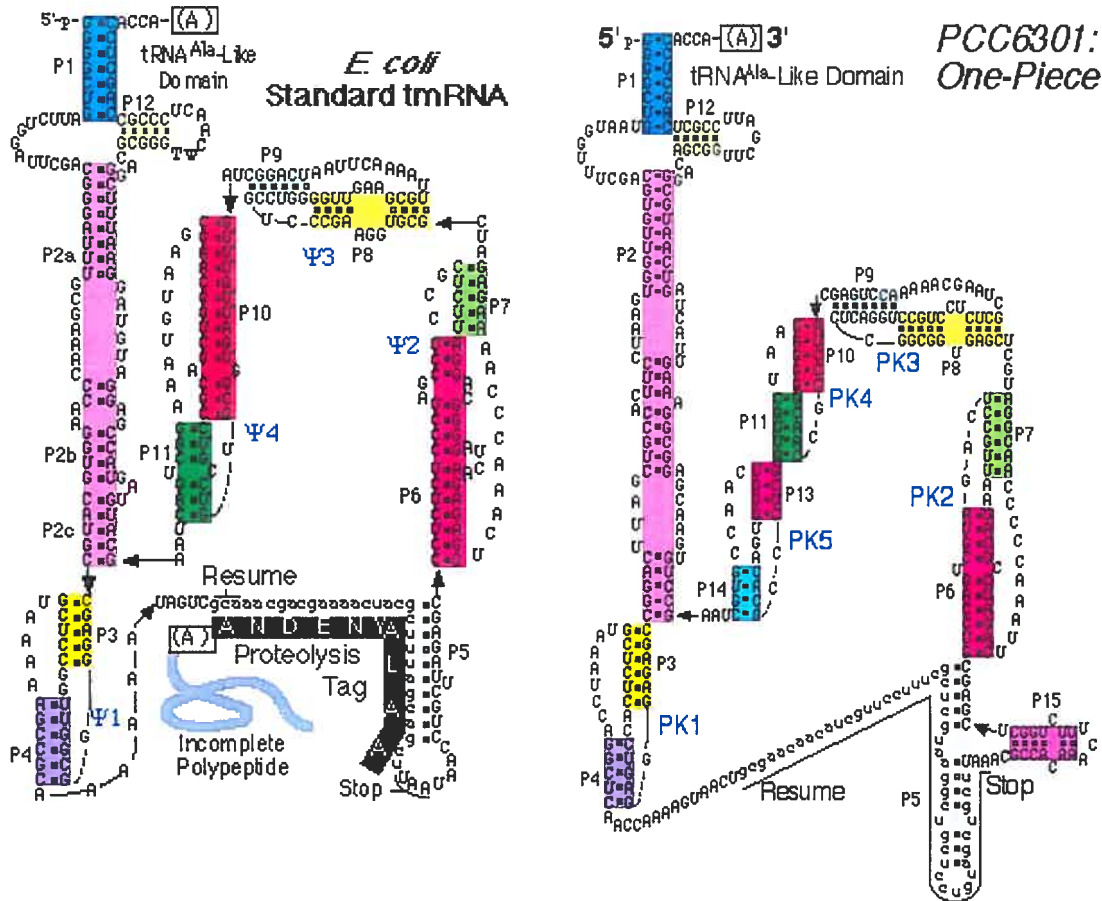


Figure I.7: Comparaison entre l'ARNtm standard de *Escherichia coli* et l'ARNtm standard de la cyanobactérie *Synechococcus* PCC6301.

Les ARNtm cyanobactériens standards sont caractérisés par une plus grande complexification structurale après le premier pseudo-nœud (PK1 ou Ψ1). Ceci est démontré par la présence d'un pseudo-nœud (PK5) et d'une hélice (P15) supplémentaires comparativement aux autres ARNtm standards. Ces figures ont été tirées du tmRNA Website [Williams, 2002a].

plastidiques analysés, ce qui laisse croire que le gène plastidique codant pour l'ARNtm aurait été probablement perdu chez certains organismes au cours de l'évolution.

I.4 Découverte de l'ARNtm mitochondrial de *Reclinomonas americana*

I.4.1 Structure de l'ARNtm mitochondrial de *R. americana*

Un gène circulairement permuté codant pour un ARNtm deux-morceaux hautement dérivé a été identifié dans le génome mitochondrial du jakobide *Reclinomonas americana* [Keiler *et al.*, 2000]. Les jakobides sont un groupe de protistes flagellés caractérisés entre autre par la présence de mitochondries ayant conservé beaucoup de traits ancestraux. Parmi tous ces traits, le nombre et l'identité des gènes codés dans le génome mitochondrial de *R. americana* sont sans précédent relativement aux autres mitochondries analysées et provenant de toutes les branches évolutives [Lang *et al.*, 1997].

L'ARNtm mitochondrial identifié chez *R. americana* est caractérisé par l'absence de pseudo-nœuds et du cadre de lecture codant pour le peptide signal (Figure I.9). Ce résultat a conduit les chercheurs à émettre l'hypothèse que le rôle mitochondrial de cet ARNtm ne pourrait inclure l'activité de signalisation vers les protéases [Keiler *et al.*, 2000]. Toutefois, la conservation du drARNt et des déterminants moléculaires permettant le chargement de l'alanine laisse croire à une fonction mitochondriale pour cet

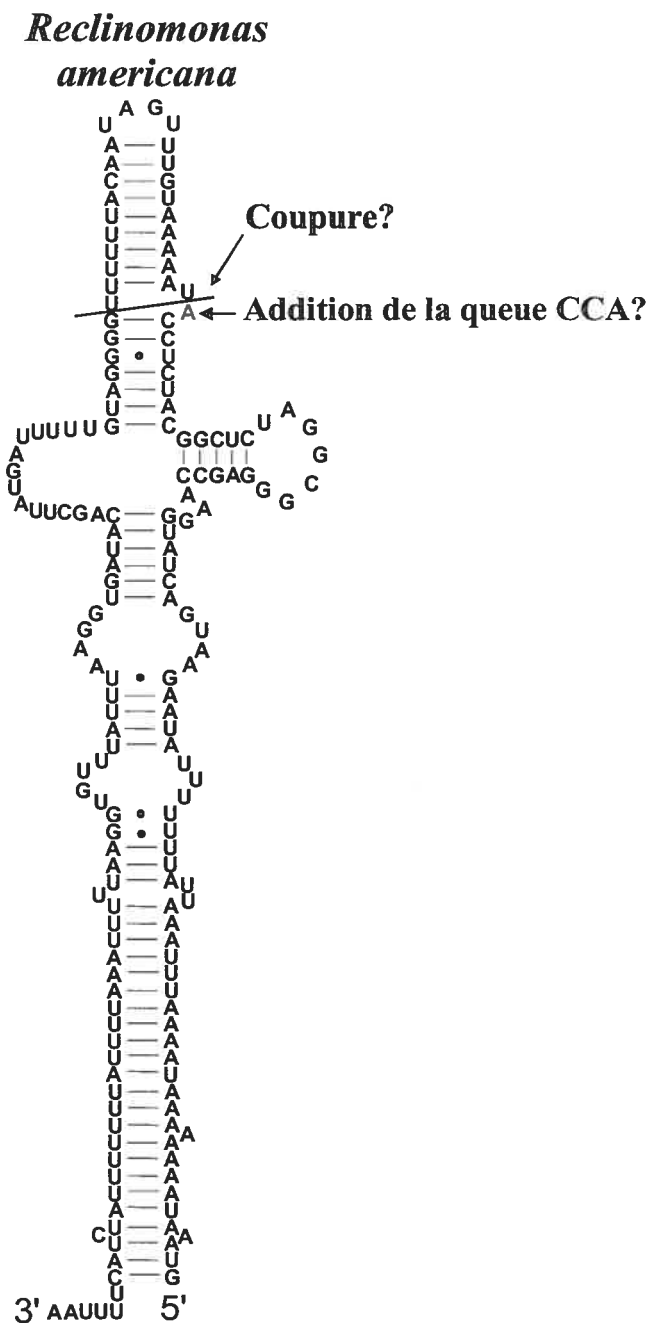


Figure I.9: Modélisation de la structure secondaire de l'ARNtm mitochondrial de *Reclinomonas americana*.

L'ARNtm mitochondrial de *R. americana* est de configuration deux-morceaux. Les déterminants moléculaires (en rouge) pour le chargement de l'alanine sont présents chez cette molécule. Les pseudo-nœuds et le cadre de lecture codant pour le peptide signal sont absents chez ces ARNtm. La queue CCA nécessaire pour l'aminocyclation des ARNt et des ARNtm n'est pas codée dans le gène mitochondrial *ssrA*.

ARNtm qui pourrait ressembler à la fonction de libération des ribosomes bloqués par les ARNtm bactériens.

I.5 Objectifs et hypothèses du projet de recherche

Ce projet de recherche a pour but la caractérisation structurale et fonctionnelle des ARNtm mitochondriaux de jakobides. La divergence structurale identifiée chez l'ARNtm de *R. americana* génère plusieurs questions concernant la fonctionnalité de cette molécule au niveau de la mitochondrie. Est-ce que l'ARNtm de *R. americana* a développé une nouvelle fonction spécifique à la présence de la molécule dans les mitochondries? Est-ce que la molécule est responsable dans les mitochondries des jakobides du recyclage des ribosomes bloqués comme ses homologues bactériens? Étant donné l'absence d'un cadre de lecture codant pour le peptide signal, il est évident que l'activité associée à cet élément, c'est-à-dire la signalisation vers les protéases des protéines présentes sur les ribosomes bloqués, est disparue ou a été remplacée par un autre mécanisme.

L'approche expérimentale utilisée pour tenter de répondre à ces questions sera basée en grande partie sur les expériences effectuées pour caractériser structurellement et fonctionnellement les ARNtm bactériens. L'identification de plusieurs séquences mitochondriales de jakobides encodant l'ARNtm permettra une analyse comparative-phylogénétique qui aidera à déterminer plus précisément les différents éléments structuraux et fonctionnels des ARNtm mitochondriaux. Ces nouvelles séquences seront

identifiées par le séquençage exhaustif de génomes mitochondriaux de jakobides. Pour effectuer la caractérisation structurale des ARN_{tm} mitochondriaux, on effectuera des expériences de buvardage Northern et d'extension d'amorce. Ces expériences sont couramment utilisées pour déterminer la taille et l'extrémité 5' des ARN, respectivement. Les modifications post-transcriptionnelles permettant aux ARN_{tm} bactériens d'être actifs seront vérifiées pour les ARN_{tm} mitochondriaux par RT-PCR, clonage et séquençage. Finalement, les expériences visant à déterminer leur rôle cellulaire se baseront sur la mise en évidence des actions connues des ARN_{tm} dans les bactéries (ex.: liaison de la molécule aux ribosomes et aminoacylation avec l'alanine) et sur des essais de complémentarité chez *E. coli*.

CHAPITRE II: ARTICLE

Loss of the mRNA-like region in mitochondrial tmRNAs of jakobids

Yannick Jacob^{1,3}, Elias Seif², Pierre-Olivier Paquet² and B. Franz Lang^{1,2,*}

¹ Program in Evolutionary Biology, Canadian Institute for Advanced Research

² Département de Biochimie, Université de Montréal, 2900 Boulevard Edouard Montpetit, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4.

³ Current address: Department of Biology, Indiana University, 1001 E. Third St., Bloomington, IN 47405, U.S.A.

***Corresponding author:**

Tel: +(514) 343-5842

Fax: +(514) 343-2210

e-mail: Franz.Lang@umontreal.ca

Key Words: mitochondrial tmRNAs, jakobids, standard and permuted *ssrA* gene, *orf64*

II.1 Abstract

It has been postulated that a highly reduced form of transfer messenger RNA (tmRNA), a RNA molecule involved in the rescue of eubacterial ribosomes stalled by mRNAs without stop codons, is also present in the mitochondrion of the jakobid *Reclinomonas americana*. Here we show that genes encoding both one-piece and two-piece tmRNAs are present in six different jakobid mitochondrial DNAs. Mitochondrial tmRNAs have retained the highly conserved tRNA^{Ala}-like domain, but they apparently lack the mRNA-like region universally present in all eubacterial tmRNAs. Comparative analysis of jakobid mitochondrial genomes shows that a potential mRNA-like region in *R. americana* (*orf64*) is not only located at distant genomic positions in other jakobids, but that this ORF is instead a *tatA* homologue. Through Northern hybridization we confirm the postulated reduced size of both, a one-piece tmRNA in *Jakoba libera*, and a two-piece tmRNA in *Seculamonas ecuadoriensis*. The *J. libera* tmRNA is post-transcriptionally modified by addition of a 3' CCA tail, processed *in vitro* by RNase P RNA, and specifically charged with alanine *in vitro* by alanyl-tRNA synthetase. Our results strongly support the functionality of these reduced mitochondrial tmRNAs.

II.2 Introduction

Genes encoding transfer-messenger RNAs (*ssrA*) are found in eubacterial and chloroplast genomes (Williams, 2002a). Two functions are associated to tmRNAs: reactivation of ribosomal translation complexes that are blocked by mRNAs without in-frame stop codons (e.g., partially degraded mRNAs), and signalisation of the polypeptides for proteolysis (for a review, see (Karzai et al., 2000)). Accordingly, bacterial tmRNAs are composed of two distinct structural elements: (i) a tRNA^{Ala}-like domain responsible for the entry of the alanine-charged tmRNA to the A site of a stalled ribosome; and (ii) an mRNA-like region, which codes for a hydrophobic signal peptide that is added to the end of the polypeptide once the stalled ribosome has switched from the original mRNA to the tmRNA reading frame (Keiler et al., 1996). When the ribosome reaches the stop codon of the tmRNA reading frame, translation is terminated as usual, the polypeptide is released, and subsequently degraded by specific proteases that recognize the C-terminal signal peptide (referred to as “tag” in the following).

It was previously thought that α -Proteobacteria was the only group of eubacteria lacking an *ssrA* gene (Felden et al., 1999). However, the universality of tmRNAs in eubacteria has been established with the identification of circularly permuted *ssrA* genes that code for two-piece tmRNAs in α -Proteobacteria (Keiler et al., 2000). These variant tmRNAs, also present through an independent gene permutation event in a specific group of Cyanobacteria (Keiler et al., 2000; Gaudin et al., 2002), have been given the attribute ‘two-piece’ (as opposed to standard or ‘one-piece’ tmRNAs) since they are composed of two distinct RNA molecules: (i) the ‘coding RNA’, which contains the tag reading frame plus one part of the tRNA-like sequence, and (ii) the

acceptor RNA, which carries the other part of the tRNA-like structure that will have the alanine moiety attached at its 3' end (see Fig. 2A, *R. prowazekii* tmRNA).

The discovery of two-piece *ssrA* genes in α -Proteobacteria, the closest known bacterial relatives of mitochondria, was immediately followed by the identification of a likewise circularly permuted *ssrA* gene in the mitochondrial genome of the jakobid-like flagellate *Reclinomonas americana* (strain ATCC 50394) (Keiler et al., 2000). Jakobid-like flagellates are a group of free-living, bacterivorous protists (O'Kelly, 1993). In taxonomic terms, they are subdivided into two families based on morphological and ultrastructural data: the Malawimonadidae (malawimonads), and the Jakobidae (jakobids, also known as 'core jakobids') (O'Kelly et al., 1999). As we will show, mitochondrial tmRNA genes are only found in the jakobid family, including the genera *Jakoba*, *Reclinomonas*, *Histiona* and *Seculamonas*. Jakobid cells have a single mitochondrion, and the most gene-rich and bacterial-like mitochondrial DNA of all eukaryotic cells ((Lang et al., 1997); B.F. Lang and G. Burger, unpublished results).

The tmRNA homologue encoded by the mitochondrial *ssrA* gene of *R. americana* has the typical tRNA^{Ala}-like domain, but it appears to have lost the mRNA-like region since a typical tag reading frame has not been found (Keiler et al., 2000). Loss of structural elements characteristic of eubacterial tmRNAs has been observed in other endosymbiont tmRNAs (K.P. Williams, unpublished results), but the tmRNA of *R. americana* would be the only one to lack a tag reading frame. In the mitochondrial genome of *R. americana*, the sequence coding for the tRNA^{Ala}-like domain is immediately followed by an open reading frame encoding a potential, currently unidentified protein of 64 amino acids preceded by a canonical Shine-Dalgarno sequence. By comparison with the genetic structure of two-piece eubacterial tmRNA genes, the mRNA-like

region of *R. americana* tmRNA should be encoded in the region of the mtDNA sequence corresponding to *orf64*.

Comparative analysis with other jakobid mitochondrial tmRNAs (mt-tmRNAs) would greatly help to define the conserved structural elements that might be important for the cellular role of these molecules, and to verify the possible genetic link between *ssrA* and *orf64*. To address these issues, we have identified five new jakobid mt-tmRNAs (in two additional *R. americana* strains, *Histiona aroides*, *Seculamonas ecuadoriensis* and *Jakoba libera*). Comparative and Northern blot analyses confirm that all jakobid mitochondrial tmRNAs have lost the mRNA-like region. We further show that *J. libera* tmRNA is expressed at the RNA level, processed and post-transcriptionally modified, and therefore potentially charged with alanine *in vivo*. Recognition and modification of this tmRNA *in vitro* by enzymes that interact with eubacterial tmRNAs is also demonstrated. The function of these highly derived tmRNAs is discussed.

II.3 Material and methods

Sequences

Mitochondrial tmRNA sequences were identified in ongoing jakobid sequencing projects of the Organelle Genome Megasequencing Project. *Jakoba libera* cells were grown at 25°C in F/2 medium, all other jakobids were grown at 25°C in WCL medium (<http://megasun.bch.umontreal.ca/People/lang/FMGP/methods/>).

Purification of small mitochondrial RNAs

Mitochondrial DNA and RNA from jakobids were extracted from partially purified mitochondria obtained after breaking the cells with glass beads. Mitochondria were separated from the cell debris by differential centrifugations and lysed by incubation with 1% SDS and 100 µg/ml of Proteinase K for 1 hour at 25°C. The mitochondrial fraction was placed over a 30% glycerol solution and the small mitochondrial RNAs (including tRNAs, tmRNA and 5S rRNA) were separated from the large RNAs and DNA by ultracentrifugation (240,000 g, 3 hours, 10°C). Small mitochondrial RNAs were collected from the upper part of the glycerol solution and precipitated twice with 95% ethanol/0.5 M ammonium acetate, washed with 80% ethanol and stored at -70°C in DEPC-treated water.

Northern blot analysis and primer extension assay

The oligonucleotide (5'-TACTGCCCATGGTTTTATCTA) used for the Northern blot analyses and primer extension assays was 5'-labeled with (γ -³²P)-ATP (Perkin-Elmer) and T4 Polynucleotide Kinase (USB). For Northern blot analyses, 500 ng of small mitochondrial RNAs

of *J. libera* were separated on a 10-12% polyacrylamide/8M urea gel. The separated RNAs were electro-blotted onto a Hybond-N membrane (Amersham Pharmacia Biotech). Pre-Hybridization was performed in 1 mM EDTA, 6X SSPE, 0.2% SDS, 7.5X Denhardt's reagent for 2 hours, and hybridization in 6X SSPE overnight. The membrane was washed twice for 10 min at room temperature in 6X SSPE, 15 min at hybridization temperature in 6X SSPE, and 10 min at hybridization temperature in 6X SSPE. The membrane was exposed overnight at -70°C. For the primer extension assay, cDNA synthesis and preparation of the DNA ladder was performed as described (Sambrook et al., 1989). The cDNAs and the DNA ladder were migrated on a 5% polyacrylamide/8 M urea gel.

RNA circularization and RT-PCR

Circularization of mitochondrial RNAs, and cDNAs synthesis was based on the protocol of Yokobori and Pääbo (Yokobori & Pääbo, 1995). The oligonucleotide used for cDNA synthesis of *J. libera* RNAs was 5'-GGATTACTTAAATATCTAAACTAA, and cDNAs were PCR-amplified with the additional primer 5'-GCTTAGATAAAACCATGGGCAGTA. The resulting PCR fragment of appropriate size was purified on an agarose gel, cloned into the *EcoRV* restriction site of the phagemid pFBS (B.F. Lang, unpublished), and sequenced by the dideoxy chain-termination method.

***In vitro* RNase P RNA processing assay**

The *ssrA* genes of *J. libera* and *R. americana* 50394 was PCR-amplified with oligonucleotides to produce DNA fragments that were used to generate precursor mt-tmRNAs. For *J. libera*, two different pre-tmRNAs were synthesized (for details, see the RNA structures in Fig. 4). They both

have a wild-type 5' sequence extension, and (i) a wild-type 3' sequence extension or (ii) a 3' CCA tail that is required for more efficient processing by *E. coli* RNase P (Liu & Altman, 1996). The run-off transcription reaction was performed as described (Yuan et al., 1992). The precursor tmRNAs were purified on a 10% polyacrylamide/8M urea gel and quantified in a liquid scintillation counter.

The expression plasmid carrying the *E. coli* RNase P RNA gene (kindly provided by Sidney Altman) was used for run-off transcription. The resulting RNA was purified on a G50 column, precipitated twice with 95% ethanol/0.5 M ammonium acetate, washed with 80% ethanol, and stored in DEPC-treated water at -80°C. For the essays, the RNA was first activated by heating the sample to 65°C for 5 minutes, and cooling it slowly to room temperature in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl. 1000 cpm of tmRNA substrates were incubated at 37°C in a 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 4% PEG, buffer; in the presence of different RNase P RNA concentrations (10 nM, 20 nM or 100 nM). The total volume of the reaction was 10 µl. After one hour, 10 µl of loading buffer was added, and the sample was heated at 75°C for 2 minutes before loading on a 8% polyacrylamide/8M urea gel.

***In vitro* aminoacylation assay**

Oligonucleotides were designed to PCR-amplify the mitochondrial *ssrA* gene of *J. libera*, and tRNA(Ala) and tRNA(Cys) genes from *E. coli*. For amplification of the *J. libera ssrA* sequence, the oligonucleotide was designed such that the amplified sequence would include a (non-encoded) 3' CCA tail. The PCR fragments were cloned into the *EcoR*5 restriction site of the phagemid pFBS, the plasmids were sequenced, digested with *Mva*I, and run-off transcription

reaction performed as described (Yuan et al., 1992). The resulting RNAs were purified on a denaturing 15% polyacrylamide/8M urea gel, and quantified by spectrophotometry.

The partial purification of *E. coli* alanyl-tRNA synthase, and the aminoacylation reactions were performed as described (Komine et al., 1994), with slight modifications. 1.5 g of wet weight *E. coli* cells were collected from an overnight culture and sonicated. The enzyme was partially purified from an S100 extract by ion-exchange chromatography (on DEAE-Amersham Pharmacia Biotech). The fraction containing the enzyme was desalted, concentrated to 200 μ l and partially purified from smaller proteins by using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Membrane NMWL 100 000 (Millipore). Glycerol was added to the enzyme solution to reach a final concentration of 50%, and stored at -20°C. For the aminoacylation reactions, the RNAs were activated in water by heating for 5 min at 90°C, followed by rapid cooling on ice-cold water.

II.4 Results

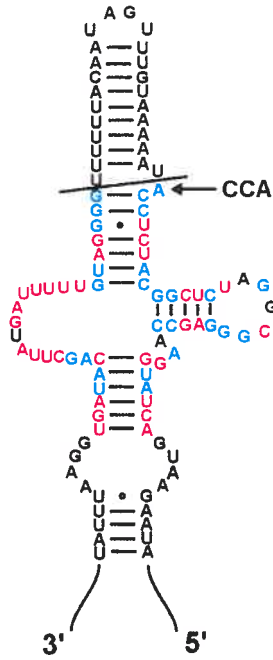
One-piece and two-piece tmRNA genes in jakobid mitochondrial genomes

Sequencing of jakobid mitochondrial DNAs (mtDNAs) has permitted the identification of five new mitochondrial *ssrA* genes (Fig. 1). Like in *R. americana* (strain ATCC 50394), these new *ssrA* genes encode two-piece mt-tmRNAs, except for *J. libera*, which has a one-piece conformation.

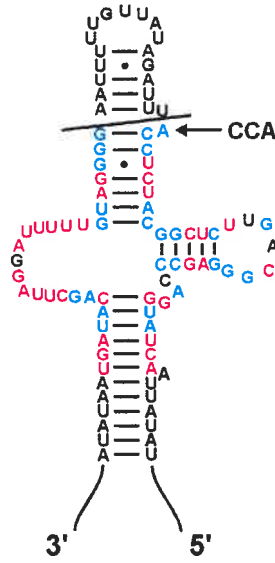
Figure 1 shows the predicted secondary structures of all known mt-tmRNAs. The one-piece configuration of the *J. libera* molecule allows a precise prediction of both, the processing sites and the size of this RNA molecule (102 nt, including the post-transcriptionally added 3' CCA tail; Fig. 1). The two-piece mt-tmRNAs are expected to require a total of four RNA processing steps; two, likely mediated by RNase P and a 3' tRNA-like processing activities, to remove the intervening sequence (thus generating the two distinct RNAs of the two-piece tmRNAs); and two mechanistically undefined steps at the two opposite RNA termini. A size prediction of these tmRNAs requires additional data from RNA mapping experiments.

The tRNA^{Ala}-like domains of all mt-tmRNAs display the canonical features of the corresponding domains of eubacterial tmRNAs, most notably, a series of G residues at the 5' end, a G•U base-pair at the third position of the acceptor stem, and an A residue at the discriminator position (Williams, 2002a). Only the mt-tmRNA of *S. ecuadoriensis* lacks the universal G•U base pair at the third position of the acceptor stem. Other features shared between the tRNA^{Ala}-like domains of eubacterial and mitochondrial tmRNAs are the absence of a D stem, and the presence of a short (3 nt) variable loop. Like in the tmRNAs of their α -proteobacterial relatives (Fig. 2A, *R. prowazekii* tmRNA), the mt-tmRNA sequences deviate in the T Ψ C loop

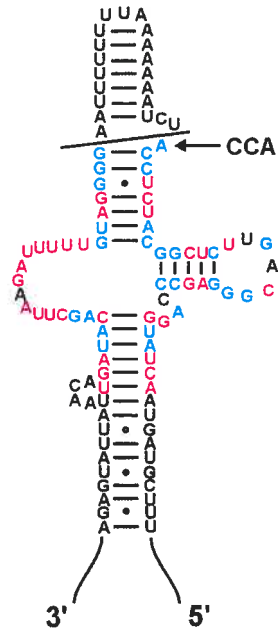
Reclinomonas americana 50394



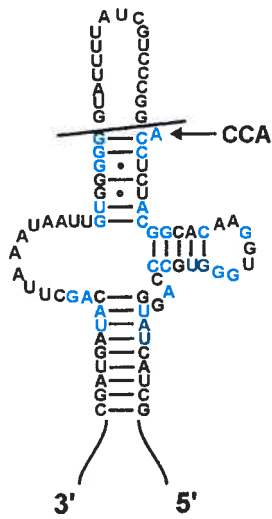
Reclinomonas americana 50283



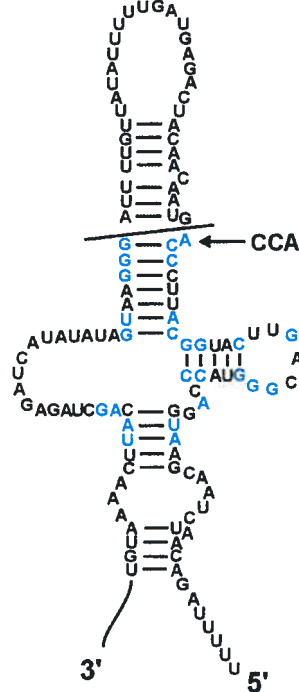
Reclinomonas americana 50284



Histiona aroides



Seculamonas ecuadoriensis



Jakoba libera

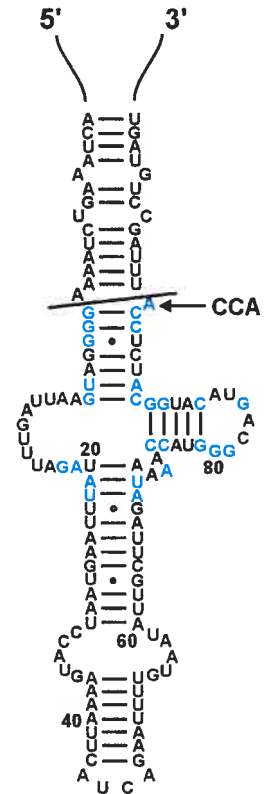


Figure II.1: Predicted secondary structure of the tRNA^{Ala}-like domains of jakobid mitochondrial tmRNAs.

All of the tmRNAs presented, except *J. libera* tmRNA, are in the two-piece conformation. The conservation of the primary structure between all mitochondrial tmRNAs (blue) and between the three *R. americana* tmRNAs (blue and red) is shown. Straight lines separate the regions (intervening sequences, two-piece tmRNAs) that are expected to be cut during the processing of mt-tmRNAs. The mature 5' and 3' ends located below the tRNA^{Ala}-like domain are still unknown for two-piece mt-tmRNAs. Therefore, this region is represented by curved lines. The 5' end of *S. ecuadoriensis* tmRNA shown here corresponds to the first nucleotide after the stop codon of the gene (*rps2*) located immediately upstream of the *ssrA* gene. The 3' CCA tail is not encoded in the mitochondrial tmRNA genes and is therefore predicted to be post-transcriptionally added.

from the conserved UUCRANY motif that is otherwise most common in both tRNAs and tmRNAs (Felden et al., 1998). In addition, the residues G₁₈ and A₁₉ of mt-tmRNAs (referring to the *J. libera* tmRNA numbering, Fig. 1) are universally conserved in all eubacterial tmRNAs (Williams, 2002a). A mutation in this motif has been shown to inhibit the binding *in vitro* of the SmpB protein to *E. coli* tmRNA (Hanawa-Suetsugu et al., 2002). SmpB binding is essential for the activity of eubacterial tmRNAs (Karzai et al., 1999).

Jakobid mt-tmRNAs have lost the mRNA-like region of eubacterial tmRNAs

The small, one-piece *J. libera* mt-tmRNA clearly does not include the mRNA-like region that is present in all eubacterial and plastid tmRNAs. However, it remains to be shown for two-piece mt-tmRNAs whether or not an mRNA-like region is encoded downstream of the tRNA^{Ala}-like domain.

In the mitochondrial genome of all three *R. americana* strains, a functionally unassigned ORF (*orf64*) follows the 3' end of the tRNA^{Ala}-like domain. A short AU-rich segment (~50 nt in *R. americana* 50394 tmRNA) separates the predicted Shine-Dalgarno sequence preceding *orf64* and the tRNA^{Ala}-like domain (see Fig. 2A, *R. americana* 50394 tmRNA). For *R. americana* tmRNAs to have a mRNA-like domain, *orf64* would have to be genetically included, either partially or completely, into a two-piece mt-tmRNA gene based on the genetic structure of two-piece eubacterial tmRNAs. Our analyses of the mitochondrial gene organisation of jakobid species with two-piece tmRNAs show that *H. aroides* has an *orf64* homologue located immediately downstream of its *ssrA* gene (Fig. 2B). However, the *orf64* homologue in *S. ecuadoriensis* is located upstream of the *ssrA* gene, and a *rps2* gene (ribosomal small subunit protein 2) is located between the *orf64* homologue and the *ssrA* gene, making it highly unlikely

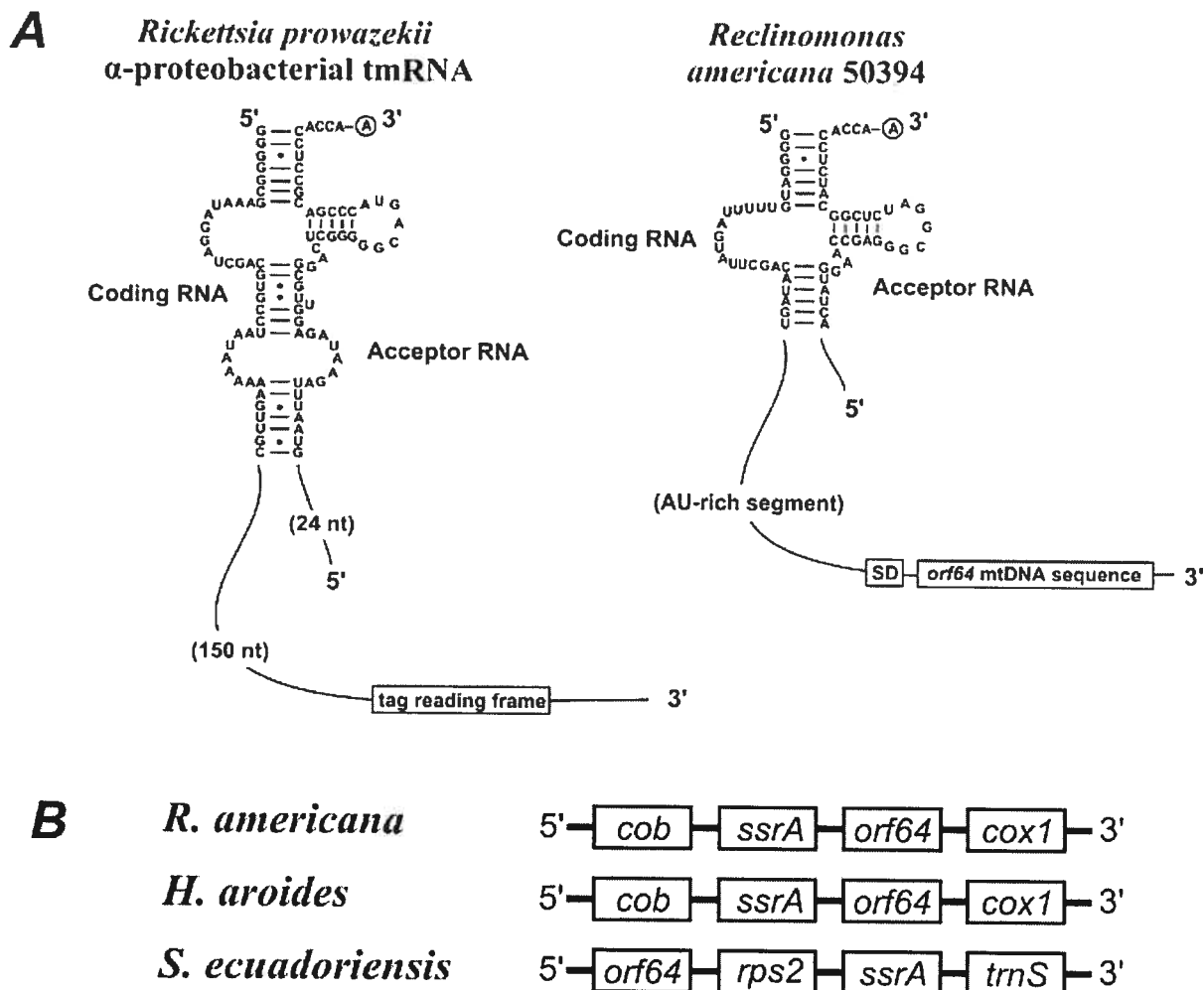


Figure II.2: Verification of the potential genetic link between *ssrA* and *orf64*.

(A) Based on the structure of eubacterial two-piece tmRNAs (e.g. *R. prowazekii* tmRNA), the mRNA-like region of *R. americana* mt-tmRNAs (e.g., *R. americana* 50394) should be present in the mtDNA sequence assigned to the functionally uncharacterized *orf64*. SD: Predicted Shine-Dalgarno sequence of *orf64*. (B) The presence of an *orf64* homologue immediately downstream of the *ssrA* gene is conserved between *R. americana* and *H. aroides*. However, this mitochondrial gene organisation is different in *S. ecuadoriensis* since *orf64* is upstream of *ssrA* and separated from it by *rps2* (ribosomal small subunit protein 2). The mitochondrial gene organisation in *S. ecuadoriensis* does not support the hypothesis that *orf64* is a part of jakobid *ssrA* genes.

that *orf64* encodes an mRNA-like region. To further demonstrate the genetic independence of *ssrA* and *orf64*, we have searched the Orf64 amino acids sequence against public databases, and conclude that it does not have any similarity to known mRNA-like regions of turns, but instead codes for a TatA homologue. Tat proteins are implicated in the twin-arginine protein translocation pathway that requires both the TatA and TatC proteins for activity (Wu et al., 2000). *tatC* genes (also known as *mttB*) have been identified in all jakobid mtDNAs (B.F. Lang and G. Burger, unpublished results), which is in line with our finding that *orf64* is a *tatA* homologue.

A comparison of all mt-tmRNA sequences shows that the conservation of the primary structure is restricted to the tRNA^{Ala}-like domain (see color coding in Fig. 1), implying that the 5' and 3' termini of the mature two-piece mt-tmRNAs might be directly adjacent to the regions of primary sequence similarity. Results from Northern blot analyses for *S. ecuadoriensis* mt-tmRNA validate this assumption, through identification of two small RNAs of ~30 nt and ~40 nt, corresponding to the coding RNA and the acceptor RNA, respectively (data not shown). These results confirm the small size of the two-piece mt-tmRNAs of *S. ecuadoriensis*, and the absence of an mRNA-like domain.

***J. libera* mt-tmRNA is processed at the expected nucleotide positions**

To determine if mt-tmRNAs are processed at the expected nucleotide positions (see straight lines in Fig. 1), we have chosen the experimentally simplest one-piece mt-tmRNA of *J. libera* as a model. A stable mt-tmRNA transcript of ~100 nt was identified in *J. libera* by Northern blot analysis (Fig. 3A). This size is consistent with the expected size of an mt-tmRNA that is

processed at the 5' and 3' ends to generate a mature tRNA^{Ala}-like domain (Fig. 1). A more precise primer extension assay has confirmed the expected, exact 5' processing site of *J. libera* mt-tmRNA (Fig. 3B).

Additional evidence that mt-tmRNAs are functional in mitochondria comes from the analysis of the 3' CCA tail, which is essential for the aminoacylation of both tRNAs and tmRNAs. While it is encoded in the tRNA genes of some bacteria, it is post-transcriptionally added by a specific nucleotidyl transferase (CCase) to most bacterial, and to all mitochondrial and eukaryotic cytoplasmic tRNAs (e.g., (Chen & Martin, 1988; Joyce & Gray, 1989; Tomita et al., 1996; Laforest et al., 1997; Schurer et al., 2001)). As expected, the tRNA and tmRNA genes in the jakobid mitochondrial genomes lack the 3' CCA tail. Ligation of the 5' and 3' ends of the mt-tmRNA of *J. libera*, followed by RT-PCR and sequencing, has revealed the addition of the CCA tail for this mt-tmRNA (Fig. 3C). This confirms the 5' end processing of *J. libera* mt-tmRNA, precisely at the predicted nucleotide position, plus the recognition of this RNA by a CCcase-like enzyme.

RNase P RNA processes precursor tmRNAs of *J. libera* and *R. americana* 50394

One-piece bacterial precursor tmRNAs fold into tRNA-like structures that are recognized and processed by the ribonucleoprotein RNase P, to generate the mature 5' end in the tRNA^{Ala}-like domain (Komine et al., 1994). In order to verify if RNase P processes precursor mt-tmRNAs, we have performed an *in vitro* RNA processing assay using the RNase P RNA of *E. coli*, which is known to cleave pre-tRNAs *in vitro* in the absence of a protein component (Guerrier-Takada & Altman, 1984). For the assay, precursors of the one-piece *J. libera* tmRNA and two-piece *R. americana* 50394 were synthesized *in vitro*. Since the significance of base-pairing between

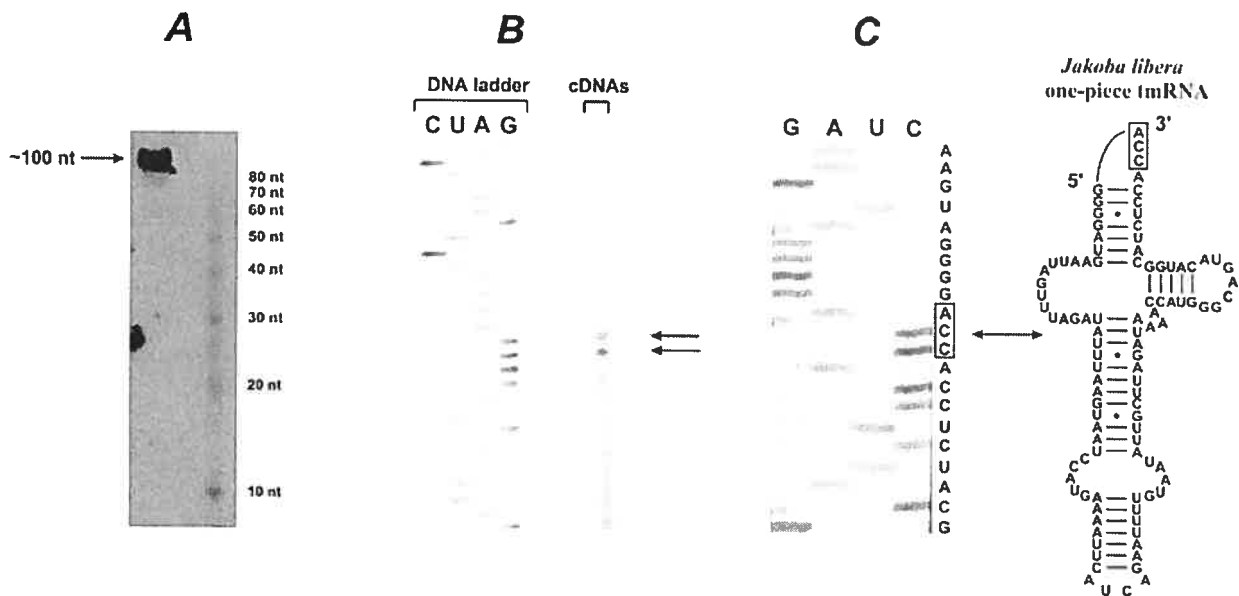


Figure II.3: Characterization of the mature structure of *J. libera* tmRNA.

(A) A *J. libera* tmRNA transcript has been detected by Northern blot analysis. The size of this transcript estimated from the RNA ladder (Ambion) is ~100 nt, which is consistent with its expected size (102 nt) if it is processed like the bacterial tmRNAs. (B) A primer extension assay shows the 5' end of the mature mitochondrial tmRNA. The result obtained in the next experiment demonstrated that the upper band is an artefact caused by the reverse transcriptase. (C) Ligation of the acceptor stem region of the *J. libera* mt-tmRNA, followed by RT-PCR and sequencing, reveal the presence of the non-encoded CCA tail, and confirms the nature of the mature 5' end identified with the primer extension assay.

leader and trailer sequences of the *J. libera* pre-tmRNA is unknown, two different *J. libera* RNA molecules were synthesized *in vitro*. One construct contains a 5' wild-type sequence extension and a CCA tail, while another one contains both the 5' and 3' extensions corresponding to the wild-type sequence (Fig. 4). The experimental results indicate that the enzyme cleaves specifically all three pre-tmRNA constructs. As expected for the activity of an *E. coli* RNase P RNA, the pre-tmRNA with the CCA tail was processed more efficiently than one lacking this element ((Guerrier-Takada & Altman, 1984; Guerrier-Takada et al., 1984); Fig. 4A,B).

These results strongly suggest that the mt-tmRNAs efficiently fold into tRNA-like structures. *In vivo*, they are likely processed at the 5' end by the mitochondrial RNase P, whose RNA subunit is mtDNA-encoded in all jakobids.

J. libera* tmRNA is aminoacylated with alanine *in vitro

Another enzyme known to modify eubacterial tmRNAs is alanyl-tRNA synthetase. This enzyme is responsible for the alanylation of these molecules (Komine et al., 1994), a process stimulated by the presence of the tRNA^{Ala} identity element (G•U bp at the third position of the acceptor arm and A as the unpaired discriminator base preceding the CCA tail) in all known eubacterial tmRNAs (Williams, 2002b). Because these identity elements are also present in the mt-tmRNA of *J. libera*, an aminoacylation assay was performed to verify its alanine-charging ability *in vitro* using the partially purified *E. coli* alanyl-tRNA synthetase. The mt-tmRNA of *J. libera* was indeed specifically aminoacylated with alanine *in vitro* (Fig. 5). However, the efficiency of its aminoacylation, determined by comparison of the aminoacylation plateau, was lower (20-30% of the tRNA^{Ala} level, depending on the preparation) compared to *E. coli* tRNA^{Ala}.

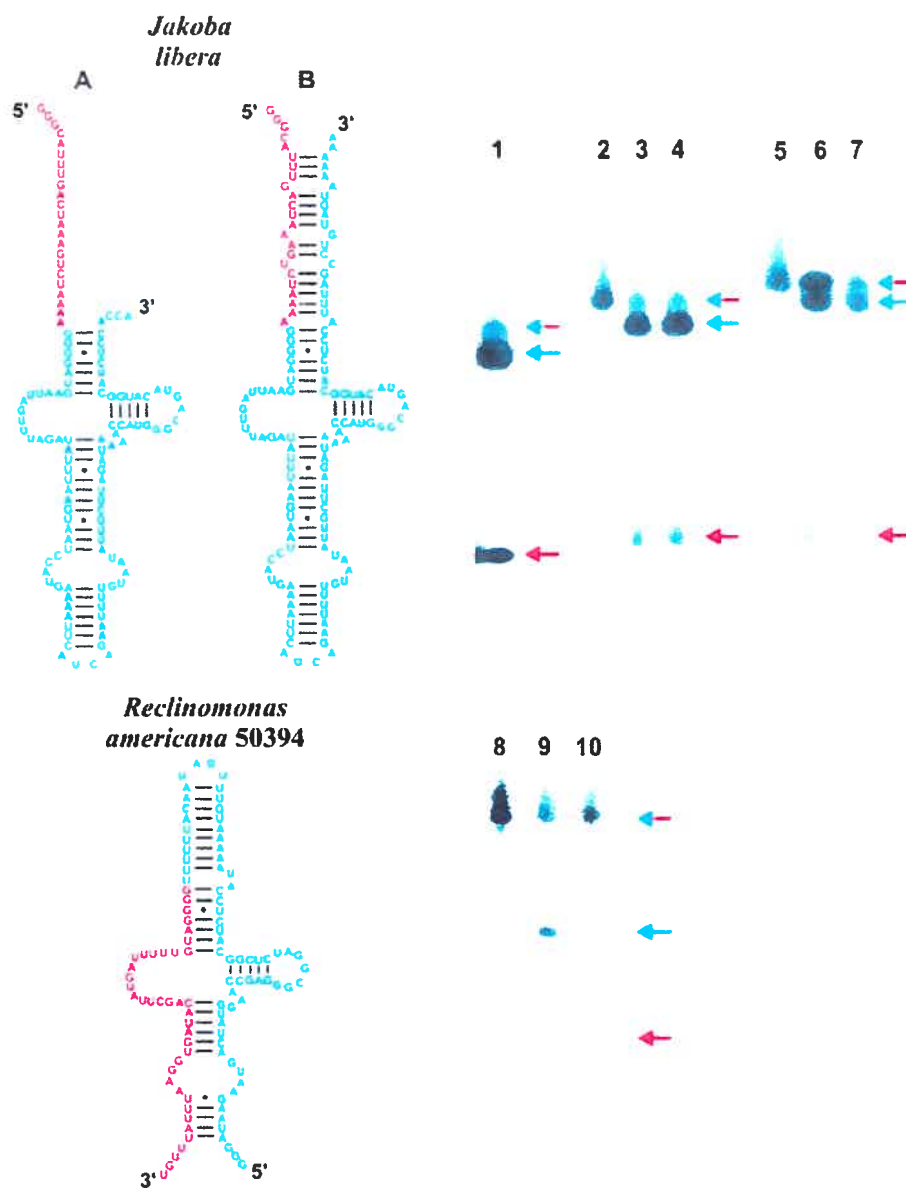


Figure II.4: *In vitro* RNase P processing assay.

Two different *J. libera* pre-tmRNAs and one *R. americana* 50394 pre-tmRNA were produced by *in vitro* transcription. The two tmRNAs of *J. libera* have wild-type 5' sequence extension (red) and either the 3' CCA tail (A: lanes 2-4) or a wild-type 3' sequence extension (B: lanes 5-7). 10 nM (lanes 1, 3, 6, 8), 20 nM (lanes 4, 7) or 100 nM (lane 9) of *E. coli* RNase P RNA were used. *R. americana* tRNA^{Pro} (1) and the three pre-tmRNAs incubated in absence of enzyme (lanes 2, 5, 10) served as positive and negative controls, respectively. The three G residues at the 5' end of all three pre-tmRNAs are not encoded in the mtDNA genomes, but serve to increase the efficiency of *in vitro* transcription. The expected sites of the cleavage are at the junction of the red and blue nucleotides. In each well, the upper band (red-blue arrow) is the unprocessed RNA. When a RNA is processed by the enzyme, there is a band (blue arrow) below the upper band, and a band (red arrow) closer to the bottom of the gel.

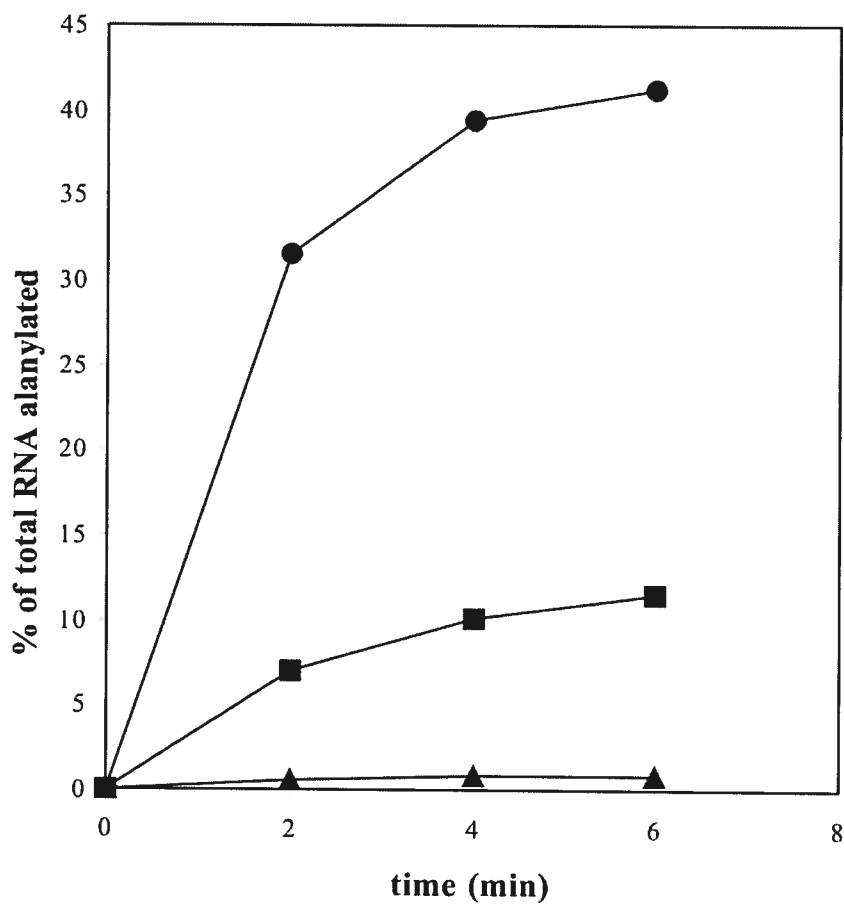


Figure II.5: *In vitro* aminoacylation with alanine.

30 pmol of each RNA produced by *in vitro* transcription were used for the aminoacylation assay at 37°C. (●) tRNA^{Ala} *E. coli*, (■) tmRNA *J. libera*, (▲) tRNA^{Cys} *E. coli*.

II.5 Discussion

The initial suggestion by Keiler *et al.* that the mt-tmRNA of *R. americana* might not contain an mRNA-like region, was based on the lack of similarity to other tmRNAs outside of the tRNA^{Ala}-like domain (Keiler *et al.*, 2000). An open reading frame (*orf64*) that is located immediately downstream of the tRNA^{Ala}-like domain was tentatively excluded as a candidate mRNA-like region, because *orf64* would start with a potential Shine-Dalgarno sequence upstream of a presumed initiation codon. Yet, in the absence of more information on the function of *orf64*, and the lack of evidence that the initiation codon was correctly inferred, the possibility remained that this open reading frame encodes a highly derived variant of an mRNA-like region. Here we provide several lines of evidence to show that structural similarity between mt-tmRNAs and eubacterial tmRNAs is indeed restricted to the tRNA^{Ala}-like domain as suggested by Keiler *et al.*

The existence of a one-piece mt-tmRNA in *J. libera* likely results from a secondary, circular permutation event of an originally permuted *ssrA* gene, because all known α -Proteobacteria (and by inference, the mitochondrial ancestor) contain two-piece tmRNAs. A secondary rearrangement of an *ssrA* gene, from a permuted to a standard conformation, has never been observed before. Structural characterization of the mt-tmRNA of *J. libera* has revealed that it is composed *in vivo* of a single RNA molecule, which is modified post-transcriptionally by the addition of a CCA tail. This strongly suggests that this, and by inference all mitochondrial tmRNAs, are aminoacylated with alanine *in vivo*. Only the *S. ecuadoriensis* mt-tmRNA would lack the distinctive G•U bp at the third position of the acceptor arm, an element that serves as a major molecular determinant for the alanylation of tmRNAs (Komine *et al.*, 1994). Since two mtDNA-encoded tRNAs are edited at their 3' end in *S. ecuadoriensis* (J. Leigh and B.F. Lang,

unpublished results), it would be possible that the G-C base pair present at the third position of the acceptor stem is edited to G•U, although this type of editing usually restores Watson-Crick base pairs rather than eliminating them.

The functionality of mt-tmRNAs is supported by the *in vitro* aminoacylation of *J. libera* mt-tmRNA. In our assay, the efficiency of aminoacylation of the mt-tmRNA is significantly lower compared to *E. coli* tRNA^{Ala}. However, similar results have been obtained in other *in vitro* aminoacylation assays of bacterial tmRNAs, when compared to tRNA^{Ala} (Komine et al., 1994; Ushida et al., 1994; Barends et al., 2000). It is known that the binding of the SmpB protein specifically increases the aminoacylation of *E. coli* tmRNA *in vitro* (Felden et al., 1998; Barends et al., 2001). The crystal structure of the tRNA^{Ala}-like domain of *E. coli* tmRNA in complex with SmpB shows that this protein makes contact with highly conserved nucleotides located in the variable loop and 3' end of the D-loop (Gutmann et al., 2003). The conservation of these nucleotides in the mt-tmRNAs (i.e. G₁₈, A₁₉ and A₇₃, referring to *J. libera* numbering) could be an indication that SmpB is also needed for their cellular role. We have failed to identify a gene encoding a SmpB homologue in completely sequenced jakobid mitochondrial genomes. The results from the Protist EST Program (http://megasun.bch.umontreal.ca/pepdb/pep_main.html) will help to determine if such a gene is encoded in jakobid nuclear genomes.

The *in vitro* alanylation of the *J. libera* mt-tmRNA suggests that jakobid tmRNAs interact *in vivo* with mitochondrial ribosomes. The lack of an mRNA-like region implies that they cannot tag a protein for degradation by switching to an internal reading frame. However, they might have conserved, with some mechanistic modifications, the ability to liberate stalled ribosomes. In bacteria, this activity has been proposed to be more important than peptide tagging for degradation (Withey & Friedman, 1999). Recruitment of release factors by mitochondrial

tmRNAs has been suggested as a possible mechanistic alternative to switching to the tmRNA reading frame in order to free stalled ribosomes (Keiler et al., 2000). We have attempted to verify if *J. libera* mt-tmRNA liberates stalled ribosomes by expressing it from a low-copy plasmid in *E. coli* X90 *ssrA1::cat*. This *E. coli* strain was also transformed with a high-copy plasmid producing a specific mRNA lacking an in-frame stop codon (Keiler et al., 1996). If the *J. libera* mt-tmRNA liberated the stalled ribosomes through a transpeptidation reaction in *E. coli*, we might expect to detect a single-alanine tagged reporter protein. However, mass spectrophotometry of the purified protein that was encoded by an mRNA without a stop codon has not revealed an alanine tagging (data not shown). Since it has been shown that this reporter protein tagged with alanine is quite stable upon overproduction in *E. coli* X91 (Williams et al., 1999), we can eliminate the possibility that addition of a single alanine by the mt-tmRNA has resulted in protein degradation.

One explanation for the lack of an alanine addition in our reporter system is a somewhat impaired processing of the precursor mt-tmRNA that was expressed in *E. coli*, as determined by Northern hybridization (data not shown). An alternative interpretation is that mt-tmRNAs have lost the potential of adding an alanine in a transpeptidation reaction, both in the heterologous *E. coli* system, and in jakobid mitochondria. In fact, alanylation as a mechanism of targeting proteins for degradation can probably be excluded because some jakobid mitochondrial genes are predicted to code for proteins with alanine as their last C-terminal amino acid residue. For example, from the 61 protein-coding genes in the *J. libera* mitochondrial genome, three (*cox3*, *nad1* and *atp1*) are predicted to code for proteins with a C-terminal alanine residue. This observation virtually excludes that a single C-terminal alanine, added to a polypeptide by a mt-tmRNA, would serve as a signal for its degradation. Why then do we find a tRNA^{Ala} identity

element (most notably, a G•U bp at the third position of the acceptor arm) in most mt-tmRNAs? Alanylation might be important only to help protect mt-tmRNAs from degradation and to deliver them to the mitochondrial ribosomes.

Also in mitochondria of other eukaryotes, there is no known sequence motif that can trigger protein degradation (Kaser & Langer, 2000). Quality control of mitochondrial proteins seems to be dependent only on the folding state of the proteins; non-assembled or incorrectly folded polypeptides are selectively removed by ATP-dependent proteases in the various mitochondrial subcompartments (Wagner et al., 1994; Pearce & Sherman, 1995; Savel'ev et al., 1998). An efficient sensor system for such misfolded proteins in jakobid mitochondria might be sufficient to also degrade all partially synthesized proteins freed from stalled ribosomes by the action of mt-tmRNAs. In support of this hypothesis, it has been shown in *S. cerevisiae* that the mitochondrial inner membrane protease *m*-AAA can carry out proteolysis of partially synthesized mitochondrial translation products (Pajic et al., 1994). Efficient proteolysis in jakobid mitochondria might thus explain the absence of the mRNA-like region in mt-tmRNAs.

II.6 Acknowledgements

We thank K.P. Williams for critically reading the manuscript, and for supplying several plasmid constructs, *E. coli* strain X90 *ssrA1::cat*, and for help with the functional assay. This work was supported by grants from Canadian Institutes for Health Research (MOP-42475; B.F.L.), and ‘Le Fond Quebecois de la Recherche sur la Nature et les Technologies’ (NATEQ; Y.J.). Salary and interaction support from the Canadian Institute for Advanced Research (B.F.L.) is gratefully acknowledged. This project was supported by equipment grants from Sun Microsystems (Palo Alto, CA) and LiCor (Lincoln, NE).

References

1. Barends S, Karzai AW, Sauer RT, Wower J, Kraal B. 2001. Simultaneous and functional binding of SmpB and EF-Tu-TP to the alanyl acceptor arm of tmRNA. *J Mol Biol* 314:9-21.
2. Barends S, Wower J, Kraal B. 2000. Kinetic parameters for tmRNA binding to alanyl-tRNA synthetase and elongation factor Tu from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 39:2652-2658.
3. Chen JY, Martin NC. 1988. Biosynthesis of tRNA in yeast mitochondria. An endonuclease is responsible for the 3'-processing of tRNA precursors. *J Biol Chem* 263:13677-13682.
4. Felden B, Gesteland RF, Atkins JF. 1999. Eubacterial tmRNAs: everywhere except the alpha-proteobacteria? *Biochim Biophys Acta* 1446:145-148.
5. Felden B, Hanawa K, Atkins JF, Himeno H, Muto A, Gesteland RF, McCloskey JA, Crain PF. 1998. Presence and location of modified nucleotides in *Escherichia coli* tmRNA: structural mimicry with tRNA acceptor branches. *Embo J* 17:3188-3196.
6. Gaudin C, Zhou X, Williams KP, Felden B. 2002. Two-piece tmRNA in cyanobacteria and its structural analysis. *Nucleic Acids Res* 30:2018-2024.
7. Guerrier-Takada C, Altman S. 1984. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription *in vitro*. *Science* 223:285-286.
8. Guerrier-Takada C, McClain WH, Altman S. 1984. Cleavage of tRNA precursors by the RNA subunit of *E. coli* ribonuclease P (M1 RNA) is influenced by 3'-proximal CCA in the substrates. *Cell* 38:219-224.

9. Gutmann S, Haebel PW, Metzinger L, Sutter M, Felden B, Ban N. 2003. Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. *Nature* 424:699-703.
10. Hanawa-Suetsugu K, Takagi M, Inokuchi H, Himeno H, Muto A. 2002. SmpB functions in various steps of trans-translation. *Nucleic Acids Res* 30:1620-1629.
11. Joyce PB, Gray MW. 1989. Chloroplast-like transfer RNA genes expressed in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res* 17:5461-5476.
12. Karzai AW, Roche ED, Sauer RT. 2000. The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* 7:449-455.
13. Karzai AW, Susskind MM, Sauer RT. 1999. SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *Embo J* 18:3793-3799.
14. Kaser M, Langer T. 2000. Protein degradation in mitochondria. *Semin Cell Dev Biol* 11:181-190.
15. Keiler KC, Shapiro L, Williams KP. 2000. tmRNAs that encode proteolysis-inducing tags are found in all known bacterial genomes: A two-piece tmRNA functions in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7778-7783.
16. Keiler KC, Waller PR, Sauer RT. 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271:990-993.
17. Komine Y, Kitabatake M, Yokogawa T, Nishikawa K, Inokuchi H. 1994. A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9223-9227.
18. Laforest MJ, Roewer I, Lang BF. 1997. Mitochondrial tRNAs in the lower fungus *Spizellomyces punctatus*: tRNA editing and UAG 'stop' codons recognized as leucine. *Nucleic Acids Res* 25:626-632.
19. Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW. 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387:493-497.
20. Liu F, Altman S. 1996. Requirements for cleavage by a modified RNase P of a small model substrate. *Nucleic Acids Res* 24:2690-2696.
21. O'Kelly CJ. 1993. The jakobid flagellates: structural features of *Jakoba*, *Reclinomonas* and *Histiona* and implications for the early diversification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 40:627-636.
22. O'Kelly CJ, Farmer MA, Nerad TA. 1999. Ultrastructure of *Trimastix pyriformis* (Klebs) Bernard et al.: similarities of *Trimastix* species with retortamonad and jakobid flagellates. *Protist* 150:149-162.
23. Pajic A, Tauer R, Feldmann H, Neupert W, Langer T. 1994. Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria. *FEBS Lett* 353:201-206.
24. Pearce DA, Sherman F. 1995. Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome c and suppression of the degradation by mutation of *yme1*. *J Biol Chem* 270:20879-20882.
25. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
26. Savel'ev AS, Novikova LA, Kovaleva IE, Luzikov VN, Neupert W, Langer T. 1998. ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert

- overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *J Biol Chem* 273:20596-20602.
27. Schurer H, Schiffer S, Marchfelder A, Morl M. 2001. This is the end: processing, editing and repair at the tRNA 3'-terminus. *Biol Chem* 382:1147-1156.
 28. Tomita K, Ueda T, Watanabe K. 1996. RNA editing in the acceptor stem of squid mitochondrial tRNA(Tyr). *Nucleic Acids Res* 24:4987-4991.
 29. Ushida C, Himeno H, Watanabe T, Muto A. 1994. tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 22:3392-3396.
 30. Wagner I, Arlt H, van Dyck L, Langer T, Neupert W. 1994. Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *Embo J* 13:5135-5145.
 31. Williams KP. 2002a. Descent of a split RNA. *Nucleic Acids Res* 30:2025-2030.
 32. Williams KP. 2002b. The tmRNA Website: invasion by an intron. *Nucleic Acids Res* 30:179-182.
 33. Williams KP, Martindale KA, Bartel DP. 1999. Resuming translation on tmRNA: a unique mode of determining a reading frame. *Embo J* 18:5423-5433.
 34. Withey J, Friedman D. 1999. Analysis of the role of trans-translation in the requirement of tmRNA for lambdaimmP22 growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:2148-2157.
 35. Wu LF, Ize B, Chanal A, Quentin Y, Fichant G. 2000. Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2:179-189.
 36. Yokobori S, Pääbo S. 1995. Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10432-10435.
 37. Yuan Y, Hwang ES, Altman S. 1992. Targeted cleavage of mRNA by human RNase P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8006-8010.

CHAPITRE III: DISCUSSION

III.1 Hypothèses concernant l'évolution des gènes *ssrA* mitochondriaux chez les eucaryotes

L'analyse du contenu génétique des génomes mitochondriaux provenant de toutes les grandes branches évolutives révèle que les jakobides sont les seuls eucaryotes dont les génomes mitochondriaux possèdent un gène *ssrA*. Ceci n'est pas une particularité de ce gène puisque les jakobides ont de loin, comparativement aux autres mitochondries analysées, les mitochondries les plus complexes génétiquement [Lang *et al.*, 1997]. A partir de cette observation, on peut énoncer au moins deux hypothèses concernant l'évolution des gènes *ssrA* mitochondriaux. Premièrement, l'absence d'un gène *ssrA* mitochondrial chez la plupart des eucaryotes pourrait être liée à la diminution au cours de l'évolution de la complexité génétique des différents génomes mitochondriaux (Figure III.1) [Gray *et al.*, 1999]. Etant donné le rôle joué par l'ARNtm au niveau de la traduction, on peut supposer que la réduction de la quantité de gènes codés dans les mitochondries a entraîné la simplification du processus de traduction mitochondriale et par conséquent, l'élimination de l'avantage évolutif apporté par la possession des mécanismes ancestraux utilisés pour résoudre certains problèmes pouvant survenir durant la traduction bactérienne. Chez les jakobides, étant donné le grand nombre de gènes encore présents dans les mitochondries, l'ARNtm aurait été conservé. Pour cette hypothèse, on suppose évidemment que les ARNtm mitochondriaux ont un rôle similaire à celui de leurs homologues bactériens. Le gène *ssrA* aurait donc été simplement éliminé chez la plupart des eucaryotes à l'exception des jakobides, et certains eucaryotes dont le génome plastidique possède encore le gène d'origine cyanobactérienne (voir section I.3).

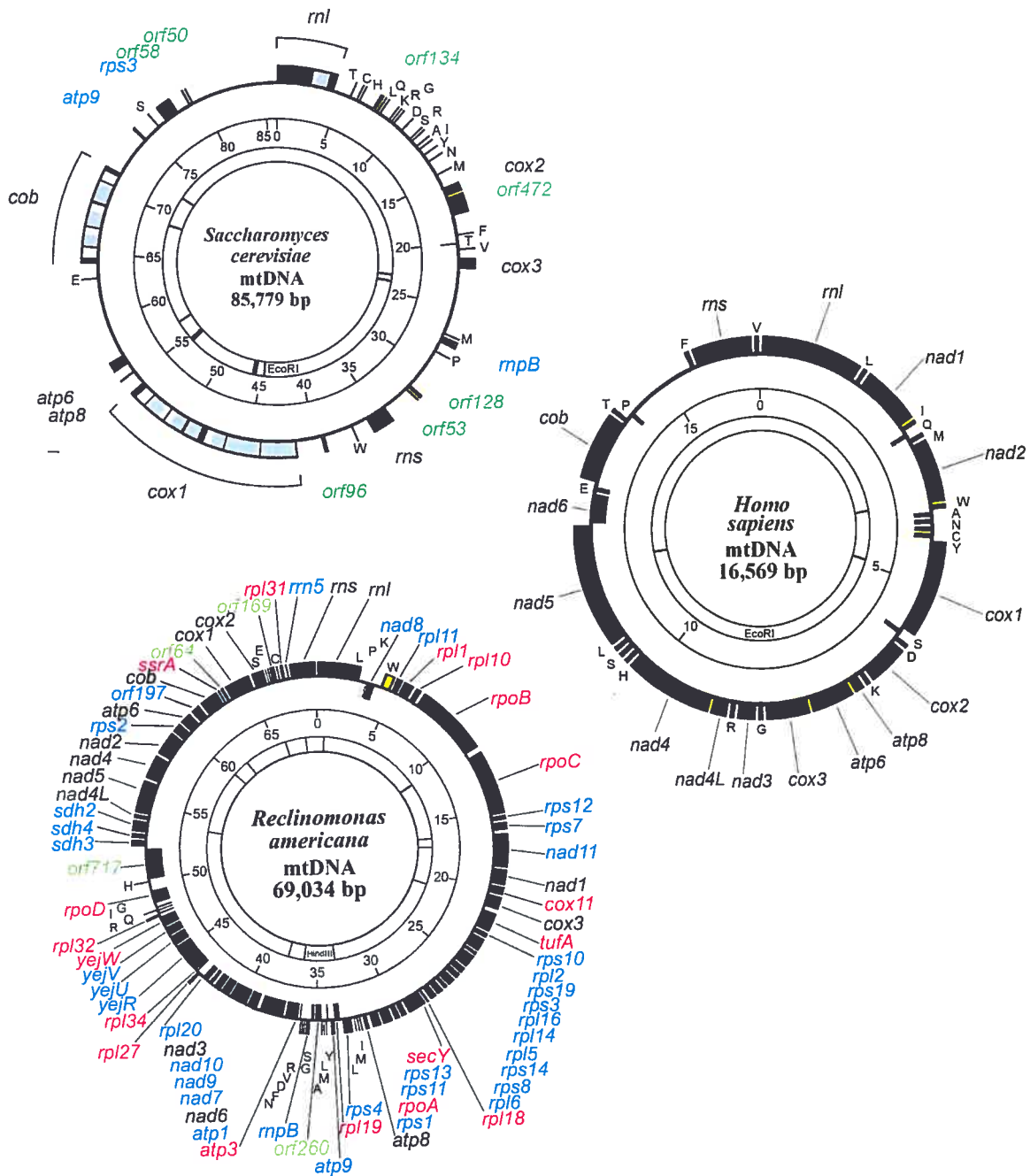


Figure III.1: Comparaison de la complexité génétique entre trois génomes mitochondriaux. *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi), *Homo sapiens* (Métazoaire) et *Reclinomonas americana* (Protiste).

A l'opposé de cette hypothèse, il faut aussi considérer la possibilité que le gène *ssrA* mitochondrial n'a pas été éliminé durant l'évolution des différents génomes mitochondriaux mais plutôt, comme beaucoup d'autres gènes, transféré de la mitochondrie vers le noyau. Après transcription dans le noyau, l'ARN_{tm} serait simplement exporté du cytoplasme vers la mitochondrie. A cet effet, il est connu que certaines mitochondries ont besoin d'importer des ARN_t afin de pouvoir effectuer la traduction des protéines codées dans l'ADN mitochondrial [Dietrich *et al.*, 1992, Lye *et al.*, 1993]. La ressemblance structurale entre les ARN_t et les ARN_{tm} mitochondriaux de jakobides laisse croire que s'il y avait effectivement importation d'ARN_{tm} vers les mitochondries, le mécanisme d'importation pourrait être sensiblement le même que celui utilisé par les ARN_t. On pourrait s'attendre à ce que l'identification d'un ARN_{tm} codé dans le génome nucléaire d'un eucaryote soit une tâche plutôt difficile étant donné la diversité structurale inhérente à cette molécule et la taille de ces génomes. Par exemple, il serait facile de confondre une séquence codant pour un ARN_{tm} avec un pseudo-gène qui aurait auparavant codé pour un ARN_t. Ceci expliquerait pourquoi un gène codant pour un homologue de l'ARN_{tm} n'a jamais été trouvé dans un génome nucléaire.

III.2 Structure des ARN_{tm} mitochondriaux matures

L'identification de plusieurs autres ARN_{tm} mitochondriaux a permis de confirmer l'élimination chez ces molécules du domaine ARN_m associé aux ARN_{tm} bactériens. Il y a eu perte au cours de l'évolution du cadre de lecture codant pour le peptide signal chez

les homologues mitochondriaux des ARNtm bactériens. Ceci est particulièrement évident lorsque l'on observe l'ARNtm mitochondrial un-morceau de *J. libera*.

Dans le cas des ARNtm mitochondriaux deux-morceaux, il reste encore à cartographier précisément les extrémités 5' et 3' de ces ARNtm afin de connaître leur structure mature. La figure III.2 montre la structure de l'ARNtm mitochondrial deux-morceaux de *R. americana* 50394 modélisée d'après la séquence génomique (figure tirée du tmRNA Website: Williams, 2002a). Sur cette figure, on peut observer une longue hélice sortant du drARNt de l'ARNtm et qui pourrait représenter un équivalent de l'hélice P2 des ARNtm bactériens (voir Figure I.7). Toutefois, plusieurs évidences suggèrent que cette longue hélice ne fait pas partie intégralement de la structure mature de l'ARNtm de *R. americana* ou d'un autre ARNtm deux-morceaux de jakobide.

Premièrement, les résultats de buvardage Northern mentionnés dans l'article indiquent que l'ARNtm mitochondrial deux-morceaux de *S. ecuadoriensis* est extrêmement réduit. Il est mentionné que les ARN codant et accepteur (voir Figure II.2) de l'ARNtm de *S. ecuadoriensis* ont une taille de ~30 nt et ~40 nt, respectivement. De plus, un ARN codant de ~30 nt a également été identifié par buvardage Northern pour l'ARNtm *R. americana* 50394. Ces ARN sont trop petits pour pouvoir former une hélice P2 complète.

Deuxièmement, il a été possible de cartographier par extension d'amorce une extrémité 5' présente dans cette hélice chez l'ARNtm deux-morceaux de *R. americana* 50394 (Figure III.2). La localisation de cette extrémité 5' semble correspondre approximativement à la même localisation que l'extrémité 5' (indiquée sur la figure II.1) chez l'ARNtm mitochondrial deux-morceaux de *S. ecuadoriensis*. Si cette extrémité est

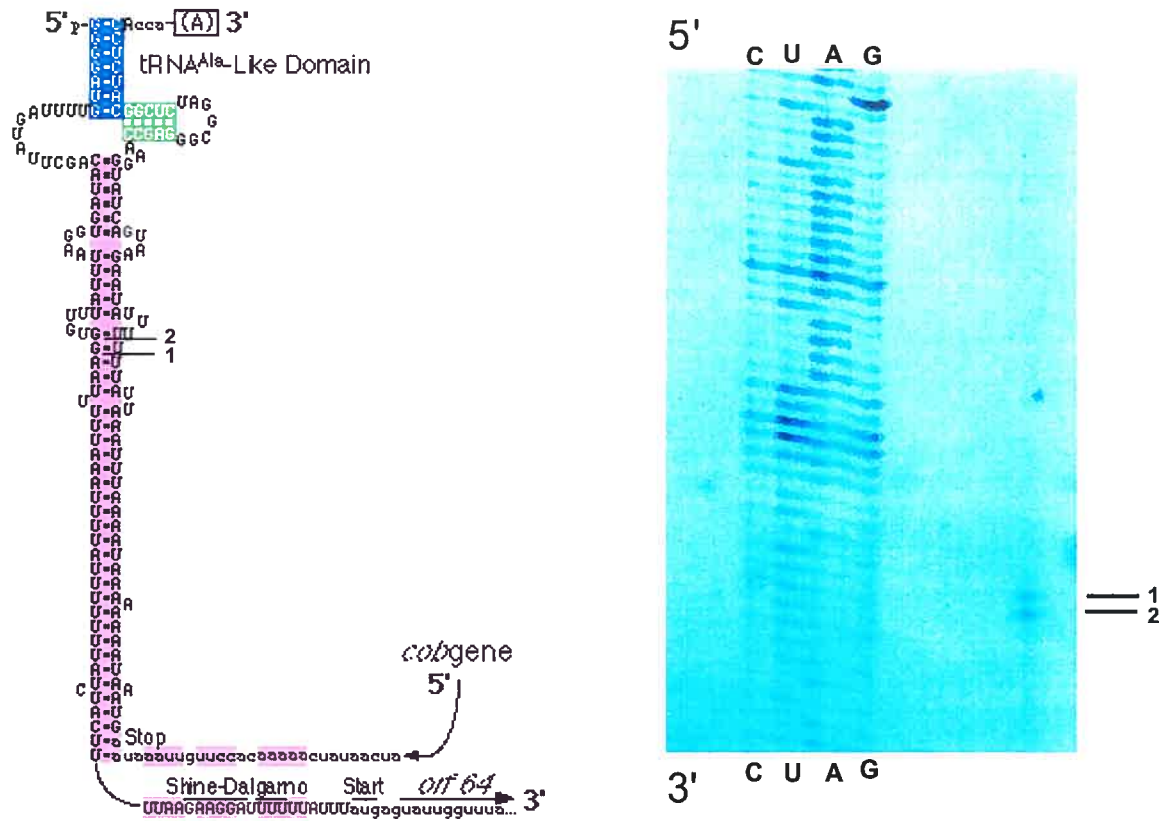


Figure III.2: Cartographie par extension d'amorce de l'extrémité 5' située dans l'hélice équivalente à l'hélice P2 pour l'ARNtm mitochondrial de *R. americana*.
 Les lignes 1 et 2 indiquent la position sur l'ARNtm des signaux obtenus sur le gel. Ce résultat indique que la longue hélice (en rose) n'est pas présente intégralement au niveau de la structure mature de l'ARNtm mitochondrial de *R. americana*.

effectivement une extrémité 5' mature de l'ARNtm de *R. americana*, cela signifie que l'hélice P2 montrée à la figure III.2 (en rose) n'est pas intégralement comprise dans la structure mature de l'ARNtm.

La convergence de ces deux évidences tend à confirmer la réduction extrême, chez les ARNtm mitochondriaux deux-morceaux matures, de la taille de hélice équivalente à l'hélice P2 des ARNtm bactériens. Ces évidences font en sorte de rapprocher structurellement ces ARNtm à l'ARNtm mitochondrial de *J. libera*.

III.3 Hypothèses concernant le rôle des ARNtm dans les mitochondries des jakobides

La caractérisation structurale de l'ARNtm mitochondrial mature de *J. libera* a révélé la présence des modifications post-transcriptionnelles attendues afin que cet ARNtm puisse être aminoacylé *in vivo* avec l'alanine. La capacité de cette molécule à être aminoacylée avec l'alanine a été démontrée *in vitro* (voir Chapitre II: section II.4). Si les ARNtm mitochondriaux de jakobides sont effectivement aminoacylés avec l'alanine dans les mitochondries, on peut assumer que leur fonction cellulaire est probablement liée à la traduction mitochondriale.

Etant donné l'absence d'anticodon chez les ARNtm mitochondriaux, on peut aisément éliminer la possibilité qu'ils soient impliqués dans la reconnaissance de codons comme les ARNt. L'hypothèse la plus raisonnable serait que les ARNtm mitochondriaux auraient une fonction semblable à celle effectuée par les ARNtm bactériens, c'est-à-dire la libération de ribosomes bloqués au cours de la traduction. Les ARNtm mitochondriaux

pourraient reconnaître, comme leurs homologues bactériens, un ribosome bloqué en cours de synthèse et s'y insérer afin de le désengager de l'ARNm et du polypeptide. Il est toutefois difficile d'imaginer le mécanisme moléculaire par lequel les ARNtm mitochondriaux pourraient libérer les ribosomes bloqués. Contrairement aux ARNtm bactériens, ils ne contiennent pas de cadre de lecture ouvert se terminant par un codon stop, un élément moléculaire nécessaire pour la terminaison normale de la traduction.

Il est évident que la signalisation classique caractérisée par l'ajout d'un peptide signal codé par l'ARNtm n'est pas une fonction possible pour les ARNtm mitochondriaux. Cette fonction propre aux ARNtm bactériens et plastidiques a probablement été éliminée au cours de l'évolution des ARNtm mitochondriaux. Selon les études de Withey et Friedman, le rôle le plus important des ARNtm bactériens serait leur capacité à désengager les ribosomes bloqués, une fonction qui ne nécessite pas une séquence codant pour un peptide signal d'après les études effectuées chez *Neisseria gonorrhoeae* [Withey et Friedman, 1999].

Le contrôle de qualité des protéines dans les mitochondries semble dépendre uniquement de la conformation des protéines [Käser et Langer, 2000]. Il est connu que les protéases mitochondriales dégradent les protéines mitochondriales mal repliées [Savel'ev *et al.*, 1998], les sous-unités protéiques n'étant pas associées avec leur(s) partenaire(s) d'interaction [Savel'ev *et al.*, 1998] et les protéines incomplètes résultant de la traduction mitochondriale [Pajic *et al.*, 1994]. Cette dernière observation est particulièrement intéressante car elle permettrait d'expliquer pourquoi la fonction de signalisation des ARNtm bactériens aurait été perdue chez un ancêtre des ARNtm mitochondriaux de jakobides. En effet, si les protéases mitochondriales des jakobides

peuvent efficacement reconnaître et se débarrasser des protéines partiellement synthétisées (probablement parce qu'elles sont mal repliées) durant la traduction mitochondriale, la fonction de signalisation vers les protéases de l'ARNtm devient alors inutile et peut possiblement être éliminée sans conséquence pour la maintenance de l'intégrité mitochondriale.

III.4 Essais fonctionnels de l'ARNtm de *J. libera* chez *E. coli* X91 (*ssrA*)

III.4.1 Introduction

La caractérisation structurale de l'ARNtm mitochondrial mature de *J. libera* a permis de confirmer la présence d'un drARNt mature équivalent au même domaine chez les ARNtm bactériens. L'ARNtm de *J. libera* possède donc tous les éléments structuraux essentiels pour être théoriquement reconnu et aminoacylé avec l'alanine *in vivo*.

Afin d'identifier un rôle biologique pour les ARNtm mitochondriaux, nous avons tenté plusieurs essais fonctionnels avec l'ARNtm mitochondrial de *J. libera* exprimé chez une souche *ssrA* de *E. coli*. Il est évident que faire des inférences sur le rôle des ARNtm de jakobides en utilisant un système bactérien n'est pas la solution idéale. Cette démarche est toutefois justifiée par l'impossibilité d'utiliser les outils de la génétique directement dans les mitochondries des jakobides. La seule option à notre disposition est le système génétique bactérien où les expériences pour tester les fonctions des ARNtm sont déjà développées [Williams *et al.*, 1999, Karzai *et al.*, 1999].

Deux raisons justifient la décision d'utiliser l'ARNtm de *J. libera* et non pas un autre ARNtm mitochondrial pour ces essais. Premièrement, l'ARNtm mitochondrial de *J. libera* est le seul ARNtm mitochondrial dont la structure mature a été caractérisée expérimentalement (voir Chapitre II). Les extrémités 5' et 3' de la molécule sont cartographiées, l'ajout post-transcriptionnel de la queue CCA a été vérifié et la molécule est reconnue et modifiée *in vitro* par deux enzymes impliquées dans l'activation des ARNtm bactériens. Deuxièmement, le système bactérien utilisé (*E. coli*) possède un ARNtm un-morceau. L'ARNtm de *J. libera* est le seul ARNtm mitochondrial un-morceau identifié à ce jour.

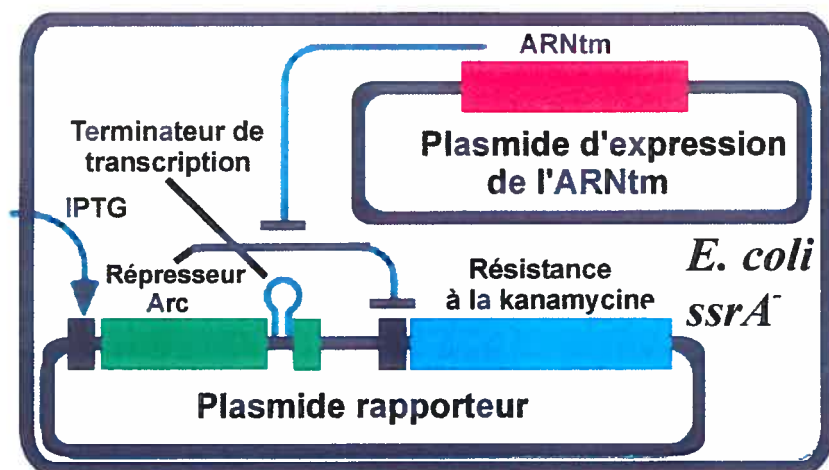
Nous avons effectué trois essais fonctionnels différents chez *E. coli* X91. Chez cette souche de *E. coli*, le gène *ssrA* a été remplacé par le gène de résistance à l'antibiotique chloramphénicol [Keiler *et al.*, 1996]. Le but de ces essais était de mettre en évidence une fonction particulière de l'ARNtm mitochondrial chez *E. coli*. D'un point de vue technique, ces essais ont en commun la co-transformation de *E. coli* X91 avec (1) un plasmide d'expression (à faible copie ou en multicopie) codant pour l'ARNtm de *J. libera* (ou l'ARNtm de *E. coli* qui sert comme contrôle positif) précédé et suivi, respectivement, du promoteur et du terminateur de transcription sauvage de l'ARNtm de *E. coli*, et (2) un autre plasmide contenant les éléments génétiques nécessaires à la détection d'une fonction particulière de l'ARNtm mitochondrial.

III.4.2 Essai de signalisation des protéines pour la dégradation

Ce premier essai avait pour but de vérifier si l'ARNtm mitochondrial possède la fonction de signalisation pour la dégradation des protéines partiellement synthétisées à partir d'ARNm sans codon stop. L'hypothèse est que l'ajout au cours de la traduction de un ou plusieurs acides aminés alanine par l'ARNtm mitochondrial sur ces protéines serait suffisant pour les libérer des ribosomes bloqués par la présence d'ARNm sans codon stop et les diriger vers les protéases cellulaires. Chez les bactéries, la reconnaissance par les protéases du peptide signal codé et ajouté par les ARNtm est due à sa nature hydrophobe. Par exemple, le changement des deux derniers acides aminés alanine du peptide signal de l'ARNtm de *E. coli* pour deux acide aspartique n'affecte pas l'ajout du peptide signal lors de la *trans*-traduction. Cependant, cela a pour effet d'augmenter considérablement la demi-vie des protéines chimériques possédant le peptide signal modifié comparativement aux protéines chimériques possédant le peptide signal sauvage (Karzai *et al.*, 1999). L'ajout par l'ARNtm mitochondrial d'une ou plusieurs alanine (un acide aminé hydrophobe) pourrait donc permettre un marquage équivalent à celui effectué par les ARNtm bactériens.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons co-transformé *E. coli* X91 avec deux plasmides (Figure III.3A). Le premier plasmide est un plasmide à faible copie contenant le gène codant pour l'ARNtm mitochondrial. Le deuxième plasmide est le plasmide rapporteur. Ce plasmide contient le gène du répresseur Arc et le gène de résistance à la kanamycine. La transcription du gène de résistance à la kanamycine est dépendante de

A



B

		Concentration de kanamycine dans le milieu de culture ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	10	50	100
Plasmide d'expression	pXXT	+	-	-	-
	pAAT	+	+	+	+
	P0T	+	-	-	-

Figure III.3: Système utilisé pour vérifier l'action potentielle de l'ARNtm mitochondrial dans la dégradation des protéines partiellement synthétisées (A) et résultats de l'expérience (B).

Le fonctionnement de cet essai est décrit à la section III.3.2. Cet essai démontre que l'ARNtm mitochondrial (pXXT) ne peut pas diriger les répresseurs Arc partiels pour la dégradation chez *E. coli*, ce qui a comme conséquence d'empêcher la transcription du gène de résistance à la kanamycine et la survie des cellules sur un milieu contenant cet antibiotique. A l'opposé, l'expression de l'ARNtm sauvage (pAAT; contrôle positif) de *E. coli* permet la dégradation des répresseurs partiels et la survie des cellules. P0T; plasmide d'expression sans un gène codant pour un ARNtm (contrôle négatif). +, croissance; -, absence de croissance.

l'absence significative dans la cellule du répresseur Arc. Ceci implique que la croissance de *E. coli* X91 sur un milieu contenant de la kanamycine dépend de la dégradation cellulaire du répresseur Arc si la synthèse de celui-ci est induite. Dans cet essai, la transcription du gène codant pour le répresseur Arc est induite par la présence dans le milieu de culture de l'IPTG. Un terminateur de transcription a été placé à l'intérieur de ce gène proche de son extrémité 3'. Ceci fait en sorte que les ARNm produits encodant le répresseur Arc ne possèdent pas de codon stop. La traduction de ces ARNm sans codon stop aura comme conséquence de bloquer les ribosomes et d'induire, s'il y a lieu, l'action de l'ARNtm. Si la cellule ne contient pas d'ARNtm pouvant libérer ces ribosomes et signaler les répresseurs Arc vers les protéases, une quantité suffisante de répresseurs Arc partiels sera libérée des ribosomes et ces protéines empêcheront la transcription du gène de résistance à la kanamycine. Toutefois, si la cellule contient un ARNm capable de reconnaître les ribosomes contenant les ARNm sans codons stop et modifier les répresseurs Arc en cours de synthèse de façon à les diriger vers les protéases, la transcription du gène de résistance à la kanamycine se fera et la cellule pourra survivre sur un milieu contenant l'antibiotique.

Les résultats obtenus pour cet essai montrent que s'il y a effectivement ajout par l'ARNtm mitochondrial de une ou plusieurs alanine sur les répresseurs Arc en cours de synthèses, ceux-ci ne sont pas modifiés de façon à être dirigés vers les protéases cellulaires. Ceci est démontré par l'absence de croissance de *E. coli* X91 sur un milieu contenant la kanamycine (Figure III.3B). La diminution de la concentration de kanamycine dans le milieu de culture n'a pas changé le résultat obtenu. A l'opposé, l'expression de l'ARNtm sauvage de *E. coli* (contrôle positif) au lieu de l'ARNtm

mitochondrial permet la survie des cellules, ce qui démontre l'efficacité du système pour vérifier le rôle des ARNtm dans la dégradation des protéines codées par des ARNm tronqués (Figure III.3B).

III.4.3 Essai pour vérifier la libération de ribosomes bloqués

Le but de cet essai était de vérifier si l'ARNtm mitochondrial était capable de reconnaître un ribosome bloqué par un ARNm sans codon stop et de le libérer sans nécessairement diriger la protéine partiellement synthétisée vers les protéases cellulaires. Comme l'essai fonctionnel précédent l'a démontré, l'ARNtm mitochondrial semble incapable de modifier une protéine en cours de synthèse de façon à la rendre plus sensible à la dégradation par les protéases. Ceci ne veut toutefois pas dire que l'ARNtm mitochondrial ne peut reconnaître un ribosome bloqué par un ARNm sans codon stop et le libérer en ajoutant un (libération après l'arrivée d'un seul ARNtm au ribosome bloqué) ou plusieurs (libération après l'arrivée successive d'un nombre X d'ARNtm au ribosome bloqué) résidus d'alanine. Les ribosomes bloqués seraient ainsi libérés sans que les protéines partielles soient modifiées de façon à être reconnues par les protéases. Cette hypothèse est supportée par l'observation que la fonction principale des ARNtm bactériens n'est pas de diriger des protéines vers les protéases mais de libérer des ribosomes bloqués [Withey et Friedman, 1999]. La perte du domaine codant pour le peptide signal chez les ARNtm mitochondriaux serait expliquée par l'inutilité de diriger vers les protéases les protéines libérées par l'action de l'ARNtm dans les mitochondries des jakobides.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons co-transformé *E. coli* X91 avec un plasmide à faible copie contenant le gène codant pour l'ARNtm mitochondrial et un plasmide en mult copie contenant un gène codant pour une protéine rapporteuse. Un terminateur de transcription a été inséré dans ce gène avant le codon stop, ce qui permet de générer des ARNm sans codon stop. Si l'ARNtm mitochondrial est capable de reconnaître les ribosomes bloqués par ces ARNm et les libérer par l'ajout d'acide(s) aminé(s) alanine, on devrait observer, après purification par immuno-précipitation des protéines codées par ces ARNm et modifiés par l'ARNtm mitochondrial, un ou plusieurs résidus alanines à l'extrémité C-terminale de ces protéines.

L'analyse par spectrométrie de masse des protéines purifiées a révélé l'absence de résidu alanine en C-terminal (résultat non montré). Ce résultat suggère fortement que l'ARNtm ne reconnaît pas les ribosomes bloqués chez *E. coli* X91. S'il peut reconnaître les ribosomes bloqués et les libérer, ceci se fait sans réaction de transpeptidation puisque il a été impossible de détecter la présence de résidu alanine sur les protéines rapporteuses. Les résultats de l'essai précédent (absence d'activité de signalisation vers la dégradation pour l'ARNtm mitochondrial) ne permettent pas d'émettre l'hypothèse que les protéines marquées par l'ajout d'acide(s) aminé(s) alanine sont dégradées spécifiquement, ce qui empêcherait leur purification et leur détection. Le contrôle positif de cette expérience était l'ARNtm de *E. coli* modifié (remplacement dans le peptide signal des deux derniers acides aminés AA par DD) de façon à ce que le peptide signal qui est ajouté lors de la *trans*-traduction ne soit plus reconnu par les protéases. L'utilisation de l'ARNtm-DD permet d'observer l'action de l'ARNtm dans la libération des ribosomes par l'accumulation des protéines modifiées avec le peptide signal. L'analyse par

spectrométrie de masse des protéines purifiées lorsque l'ARNtm-DD est exprimé à la place de l'ARNtm mitochondrial confirme l'ajout du peptide signal modifié et l'efficacité du système.

III.4.4 Essai de compétition entre l'ARNtm de *J. libera* et l'ARNtm de *E. coli*

Un troisième et dernier essai a été tenté afin de mettre en évidence une fonction possible de l'ARNtm mitochondrial chez *E. coli* X91. Cet essai est basé sur l'observation que l'expression du drARNt de l'ARNtm de *E. coli* (la partie centrale du gène *ssrA* de *E. coli* comprenant les pseudo-noeuds et le cadre de lecture encodant le peptide signal est enlevée) est suffisante pour empêcher l'action de l'ARNtm de *E. coli* (K.P. Williams, communication personnelle). Les raisons les plus plausibles pour expliquer l'inhibition de l'ARNtm sont que (1) le drARNt est en compétition avec l'ARNtm pour des facteurs protéiques essentiels (ex. SmpB) et/ou (2) le drARNt occupe tous les ribosomes bloqués et empêche l'entrée de l'ARNtm au site A de ces ribosomes. Etant donné que les ARNtm mitochondriaux sont composés presque uniquement du drARNt, nous avons pensé qu'ils pourraient également avoir un effet inhibiteur sur l'action de l'ARNtm de *E. coli*.

L'essai nécessite la co-transformation de *E. coli* X91 avec deux plasmides. Le premier plasmide est un plasmide en multicopie responsable de l'expression de l'ARNtm mitochondrial de *J. libera*. Le deuxième plasmide est un plasmide à faible copie qui contient un gène générant des ARNm sans codon stop et le gène codant pour l'ARNtm-DD (voir section précédente) de *E. coli*. S'il n'y a pas d'inhibition de l'action de l'ARNtm-DD, on devrait voir deux bandes après buvardage Western des protéines

rapporteuses purifiées et ayant migré sur gel. Une bande correspondant aux protéines rapporteuses synthétisées jusqu'au dernier codon des ARNm sans codon stop (« run-off translation product ») et une autre bande correspondant aux protéines rapporteuses modifiées par l'ajout du peptide signal lors de la *trans*-traduction. S'il y a inhibition de l'action de l'ARNtm-DD, l'intensité de cette dernière bande devrait diminuer relativement à l'autre bande.

Les résultats de cette expérience (Figure III.4) montrent que l'ARNtm mitochondrial n'inhibe pas l'action de l'ARNtm-DD. A l'opposé, l'expression du drARNt de l'ARNtm de *E. coli* (contrôle positif) est suffisante pour empêcher l'action de l'ARNtm-DD. Ceci est démontré par la présence d'une bande plus intense correspondant aux protéines rapporteuses modifiées par l'ajout du peptide signal à l'extrémité C-terminale de ces protéines.

III.4.5 Discussion concernant les essais fonctionnels

Les trois essais fonctionnels effectués chez *E. coli* n'ont pas permis l'identification d'un rôle particulier pour l'ARNtm mitochondrial de *J. libera*. Afin de comprendre pourquoi l'ARNtm mitochondrial est inactif dans nos essais, nous avons fait un buvardage Northern à partir de l'ARN total extrait d'une culture de *E. coli* X91 transformé avec un plasmide à faible copie contenant soit le gène de l'ARNtm mitochondrial *J. libera*, soit le gène de l'ARNtm-DD de *E. coli*. Cette expérience avait pour but d'examiner l'expression et la maturation de l'ARNtm mitochondrial chez *E. coli* X91. Le résultat de cette expérience (Figure III.5) démontre clairement que la forme

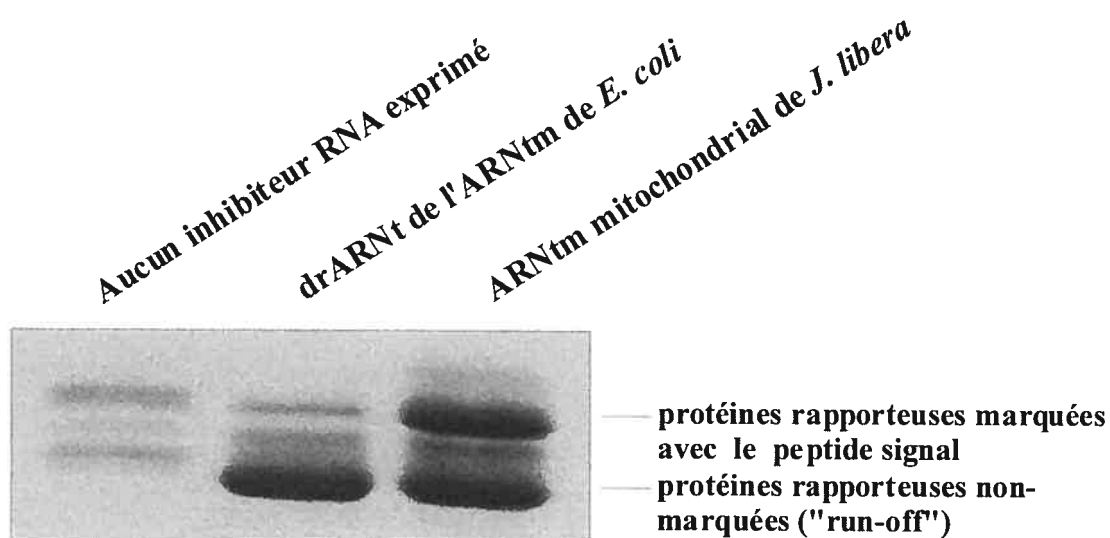


Figure III.4: Résultat de l'essai de compétition entre l'ARNtm mitochondrial de *J. libera* et l'ARNtm-DD de *E. coli*.

Le fonctionnement de cet essai est décrit à la section III.3.4. La première colonne représente le résultat lorsque qu'il n'y a pas d'ARN exprimé à partir du plasmide. Il ne peut donc y avoir d'inhibition de l'ARNtm-DD et en conséquence, on voit le rapport normal de protéines rapporteuses marquées/protéines rapporteuses non-marquées (PRM/PRNM). La deuxième colonne représente le résultat lorsque le drARNt de l'ARNtm de *E. coli* est exprimé. La diminution du rapport PRM/PRNM confirme l'effet inhibiteur de cette molécule sur l'action de l'ARNtm-DD en diminuant le nombre de protéines rapporteuses marquées. Le résultat de la troisième colonne indique un rapport PRM/PRNM semblable à celui obtenu lorsqu'il n'y a pas d'ARN exprimé, ce qui indique que l'ARNtm mitochondrial n'inhibe pas l'action de l'ARNtm-DD.

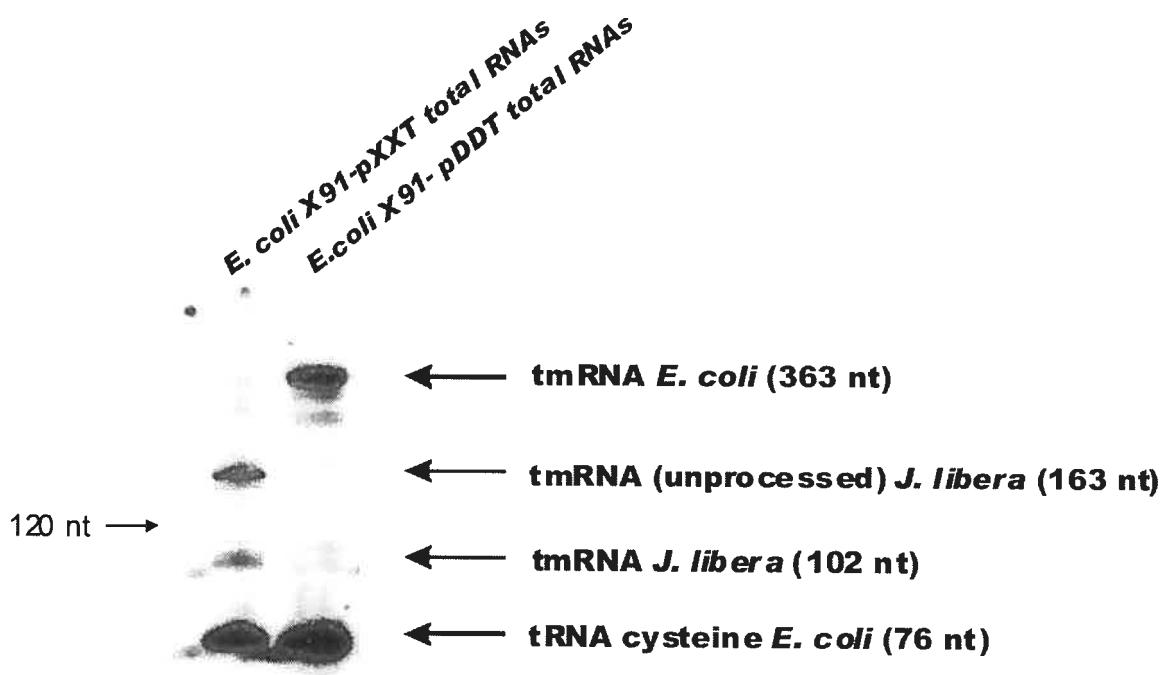


Figure III.5: Buvardage Northern pour vérifier la synthèse et la maturation de l'ARNtm mitochondrial de *J. libera* exprimé chez *E. coli* X91.

Les deux colonnes correspondent au buvardage Northern de l'ARN total extrait à partir d'une culture stationnaire de *E. coli* X91 contenant (colonne de gauche) le plasmide pXXT (plasmide d'expression de l'ARNtm mitochondrial de *J. libera*) ou (colonne de droite) le plasmide pDDT (plasmide d'expression de l'ARNtm-DD de *E. coli*). Les résultats de cette expérience montrent que la majorité des ARNtm mitochondriaux (bande intense) ne sont pas correctement maturés chez *E. coli* X91. La taille de ces molécules est estimée à 163 nt, ce qui est 51 nt de plus que le produit mature attendu et qui est présent au niveau cellulaire mais en faible quantité. A l'opposé, l'ARNtm-DD exprimé à partir du même plasmide que l'ARNtm mitochondrial semble être présent uniquement sous forme mature d'après la taille de l'ARN détecté. L'hybridation de l'ARNt cystéine de *E. coli* a servi à contrôler la quantité d'ARN total déposé dans chaque puit. La position correspondant sur la membrane correspondant à 120 nt a été déterminée à partir de l'hybridation de l'ARNr 5S de *E. coli*.

mature de l'ARNtm mitochondrial représente une petite fraction seulement de la quantité totale d'ARNtm mitochondriaux exprimés. D'après la taille observée des pré-ARNtm mitochondriaux (163 nt), il est possible de constater que la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNtm mitochondrial n'est pas effectuée efficacement chez *E. coli*. Après la transcription, l'extrémité 5' non-mature de l'ARNtm mitochondrial contient seulement 10 nt devant être excisés. La différence (51 nt) entre la taille des ARNtm mature (102 nt) et la taille estimée des pré-ARNtm (163 nt) ne peut être expliquée uniquement par un problème au niveau de la maturation à l'extrémité 5'. On ne peut toutefois exclure la possibilité que la maturation à cette extrémité soit aussi altérée.

Ce résultat pourrait expliquer pourquoi les essais n'ont pas permis l'identification d'une fonction particulière pour l'ARNtm mitochondrial. Il est évident que si les extrémités 5' et 3' de l'ARNtm mitochondrial exprimé chez *E. coli* ne peuvent être correctement générées par les enzymes impliquées dans la maturation, l'ARNtm ne sera pas chargé avec l'acide aminé alanine et ne pourra se lier aux ribosomes bactériens. La faible concentration intracellulaire d'ARNtm mitochondriaux matures pourrait donc expliquer en partie pourquoi nos essais n'ont pas permis d'identifier une activité pour cette molécule chez *E. coli*. Ces résultats semblent démontrer que *E. coli* n'est pas un système génétique pouvant être utilisé pour tester les fonctions des ARNtm mitochondriaux.

III.5 Présence d'un gène mitochondrial bi-fonctionnel encodant un ARNtm et un ARN^{Ser} chez *Jakoba bahamensis*?

Nous avons essayé d'identifier un gène *ssrA* mitochondrial chez le protiste *Jakoba bahamensis*. Les analyses phylogénétiques et le séquençage complet de son génome mitochondrial révèlent que *J. bahamensis* est un membre des jakobides et qu'il possède la même complexité génétique mitochondriale que les autres jakobides. En utilisant RNAMOT, nous avons réussi à identifier chez *J. bahamensis* une séquence mitochondriale qui pourrait coder pour un ARN possédant les éléments de structures minimaux associés aux ARNtm mitochondriaux. Ces éléments sont: (1) un drARNt contenant un bras accepteur de 7 pb et un bras TΨC contenant une tige-boucle canonique, (2) une paire de base G•U en troisième position dans le bras accepteur et (3) adénine en position correspondant à la base discriminante. La séquence génomique mitochondriale qui coderait pour cet ARNtm chevauche presque complètement la séquence codant pour l'ARN^{Ser} (gcu). En fait, seulement les 6 premiers nucléotides de cet ARNtm lui seraient spécifiques. Le reste de la séquence coderait soit pour la suite de l'ARNtm, soit pour l'ARN^{Ser} (gcu) (Figure III.6).

On peut imaginer un modèle moléculaire qui permettrait l'expression dans la mitochondrie de *J. bahamensis* de ces deux ARN fonctionnellement différents à partir d'un seul gène. Un seul transcrit serait suffisant pour générer les 2 types d'ARN. L'identité fonctionnelle de ce transcrit serait déterminée simplement par son repliement. Il pourrait se replier soit en ARNtm, soit en ARN^{Ser} (gcu) (Figure III.6A). Après le

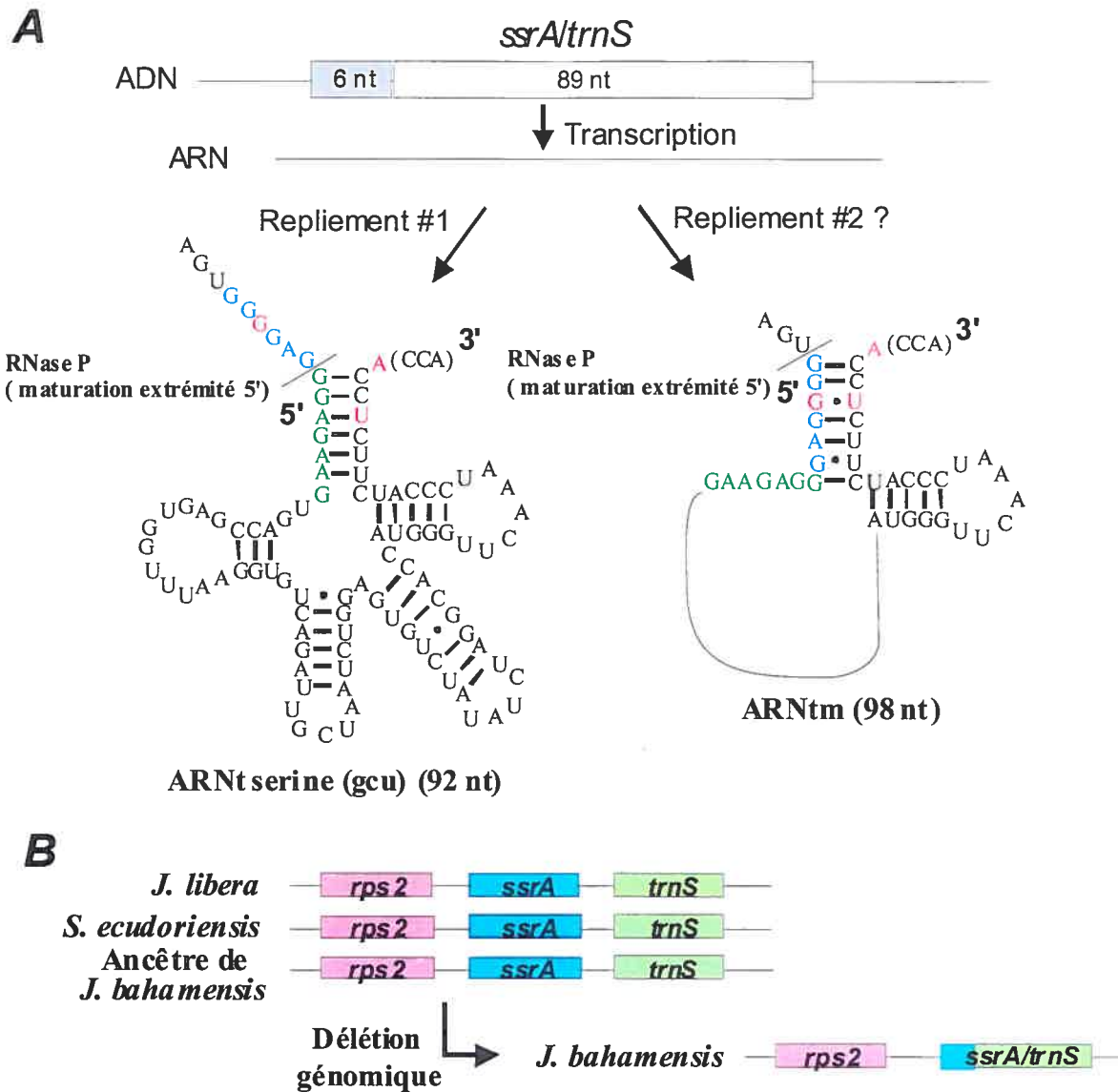


Figure III.6: Modèle pour la synthèse de deux ARN (ARNtm/ARNt^{Ser})

(A) Dans le modèle du gène bi-fonctionnel, un seul transcrit est nécessaire pour générer l'ARNtm et l'ARNt^{Ser}(*gcu*). La sélection entre les deux ARN se fait au niveau du repliement du transcrit. La maturation de l'extrémité 5' par la RNase P vient par la suite sceller le destin fonctionnel de l'ARN replié. (B) La conservation de l'ordre des gènes mitochondriaux supporte l'hypothèse du gène bi-fonctionnel. Dans les génomes mitochondriaux des jakobides *J. libera* et *S. ecuadoriensis*, le gène *ssrA* est précédé du gène *rps2* et suivi du gène *trnS*. Puisque l'hypothétique gène bi-fonctionnel est également précédé du gène *rps2* dans le génome mitochondrial du jakobide *J. bahamensis*, ceci indique que l'ordre des gènes est conservé. Ceci permet d'émettre l'hypothèse qu'un seul événement génomique aurait pu donner naissance au gène bi-fonctionnel. Cet événement aurait été la délétion de la séquence comprise entre les 6 premiers nucléotides du gène *ssrA* et le début du gène *trnS* chez un ancêtre de *J. bahamensis*.

repliement, la RNase P viendrait générer l'extrémité 5' mature et ainsi sceller le destin fonctionnel de l'ARN replié (Figure III.6A).

La conservation de l'ordre des gènes mitochondriaux chez les jakobides supporte l'hypothèse de bi-fonctionnalité pour ce gène. Les gènes *ssrA* mitochondriaux de *S. ecuadoriensis* et *J. libera* sont situés entre le gène *rps2* (en amont) codant pour une protéine ribosomale et le gène *trnS* (*gcu*) (en aval) codant pour l'ARNt^{Ser} (*gcu*). Chez *J. bahamensis*, le gène mitochondrial potentiellement bi-fonctionnel est immédiatement précédé dans le génome du gène *rps2*. L'apparition du gène bi-fonctionnel pourrait donc être expliquée par un seul événement génomique survenu chez un ancêtre de *J. bahamensis* (Figure III.6B). Cet événement serait la délétion de la séquence comprise entre les premiers nucléotides du gène *ssrA* et l'extrémité 5' de l'ARNt^{Ser} (*gcu*).

La paire de base G•U dans le bras accepteur et l'adénine comme base discriminante sont des évidences solides en faveur de la bi-fonctionnalité de ce gène. Ces éléments moléculaires serviraient pour l'aminocyclation de l'ARNtm de *J. bahamensis* avec l'alanine, un événement caractéristique à tous les ARNtm connus.

Si le gène codait seulement pour un ARNt^{Ser}, il serait difficile d'expliquer la présence de l'adénine comme base discriminante. Chez les 7 autres ARNt^{Ser} encodés dans les mitochondries des jakobides *J. libera*, *J. bahamensis*, *S. ecuadoriensis* et *R. americana*, on ne retrouve que G ou U comme base discriminante. Une guanine est souvent présente comme base discriminante chez les ARNt^{Ser} des bactéries et des eucaryotes inférieurs puisqu'elle sert d'anti-déterminant pour les isoaccepteurs sérine [Lenhard *et al.*, 1998]. Ceci signifie que la guanine ne contribue pas à la sérylation des ARNt^{Ser} par la seryl-tRNA synthetase mais empêche le chargement d'autres acides

aminés sur les isoaccepteurs sérine [Asahara *et al.*, 1994]. Par exemple, la guanine est la base azotée la plus défavorisée comme base discriminante par la leucyl-tRNA synthétase [Asahara *et al.*, 1993] et la tyrosyl-tRNA synthetase [Himeno *et al.*, 1990]. Ces deux enzymes catalysent le chargement des isoaccepteurs leucine et tyrosine qui sont, avec les isoaccepteurs sérine, les ARNt de classe II (long bras variable). La nature de cette base joue un rôle clé dans la discrimination entre ces trois isoaccepteurs. Puisque le long bras variable commun à ces trois isoaccepteurs est un élément servant à la reconnaissance de ces ARNt par leur synthétases respectives [Lenhard *et al.*, 1998], ceci les rend plus aptes à être chargés avec l'acide aminé correspondant à un autre ARNt de classe II.

L'adénine comme base discriminante est un déterminant de l'aminoacylation des isoaccepteurs leucine et tyrosine de *E. coli*, *S. cerevisiae* [Giégé *et al.*, 1998] et probablement aussi des jakobides étant donné la conservation stricte de l'adénine à cette position. En conséquence, pourquoi l'ARNt^{Ser} (gcu) mitochondrial de *J. bahamensis* aurait-il une adénine comme base discriminante? Ne devrait-il pas avoir à cette position, comme chez les ARNt^{Ser} bactériens, les ARNt^{Ser} des eucaryotes inférieurs et les autres ARNt^{Ser} de jakobides, une base azotée autre que l'adénine et qui aurait le rôle d'anti-déterminant pour contribuer à empêcher la misacylation de cet isoaccepteur sérine avec la leucine ou la tyrosine? Ceci pourrait s'expliquer par l'hypothèse du gène bi-fonctionnel où la présence de l'adénine contribuerait au chargement de l'alanine sur l'ARN replié en ARNtm sans toutefois être suffisante pour rendre l'ARN replié en ARNt^{Ser} sensible à la misacylation par la leucyl-tRNA synthétase ou la tyrosyl-tRNA synthétase dans la mitochondrie de *J. bahamensis*.

III.6 Perspectives

L'impossibilité d'effectuer des essais fonctionnels chez *E. coli* rendra difficile les études visant à identifier un rôle pour les ARNtm mitochondriaux. Ceci est encore plus vrai lorsqu'on ajoute à cela notre incapacité au moment présent de faire des expériences génétiques directement dans les mitochondries des jakobides.

Afin de faire des déductions sur la fonction des ARNtm mitochondriaux, on devra continuer à procéder par analyse comparative-phylogénétique, c'est-à-dire identifier de nouveaux ARNtm mitochondriaux, mettre en évidence les éléments moléculaires conservés et les comparer entre eux et avec ceux retrouvés chez les ARNtm bactériens. Il faudra aussi tenter de cartographier les extrémités 5' et 3' des ARNtm mitochondriaux deux-morceaux afin de connaître la structure mature de ces ARNtm. Des expériences dans ce sens ont été effectuées lors de ce projet de maîtrise avec toutefois très peu de succès.

Il y a des expériences et des découvertes qui pourront, dans un délai raisonnable, contribuer à notre compréhension du rôle cellulaire des ARNtm mitochondriaux. Par exemple, le premier homologue eucaryotique de la protéine SmpB (voir section I.2.4) a récemment été identifié dans le génome nucléaire du diatome *Thalassiosira pseudonana* (K.P. Williams, communication personnelle). Cette protéine possède les signaux peptidiques nécessaires à son exportation vers le plastide où l'ARNtm est encodé. La co-localisation chez cet organisme de l'ARNtm et de la protéine SmpB, bien que codés dans des compartiments cellulaires différents, suggère que la protéine aurait la même fonction que ses homologues bactériens. Puisque les ARNtm mitochondriaux possèdent un

drARNt similaire à celui des ARNtm bactériens et plastidiques (SmpB lie le drARNt des ARNtm bactériens), on peut s'attendre, si les ARNtm de jakobides interagissent avec les ribosomes mitochondriaux, à trouver un gène encodant la protéine SmpB dans le noyau des jakobides étant donné son absence dans les génomes mitochondriaux. Le projet PEP (http://megasun.bch.umontreal.ca/pepdb/pep_main.html), établi en partie à l'Université de Montréal, permettra entre autre le séquençage des régions exprimées (EST et ADNc) du génome nucléaire des jakobides. Les résultats qui seront obtenus aideront à résoudre la question, à savoir si un homologue de cette protéine est effectivement encodé chez les jakobides. La découverte d'un gène SmpB chez les jakobides contribuerait à supporter l'hypothèse que les ARNtm mitochondriaux sont impliqués dans un mécanisme biologique lié à la traduction et possiblement équivalent à celui impliquant les ARNtm chez les bactéries.

Afin de vérifier directement l'interaction possible entre les ribosomes mitochondriaux et les ARNtm des jakobides, nous effectuerons prochainement dans notre laboratoire des expériences de co-sédimentation de ces deux entités sur un gradient de sucrose. Ces expériences ont été préalablement effectuées pour mettre en évidence l'interaction entre les ARNtm bactériens et les ribosomes [Komine *et al.*, 1996].

III.7 Conclusion

Ce projet de recherche a permis d'obtenir de nombreux résultats sur les ARNtm mitochondriaux de jakobides. Premièrement, 5 nouveaux ARNtm ont été identifiés chez les jakobides *S. eudoriensis*, *H. aroides* et *J. libera*, *R. americana* 83 et *R. americana* 84.

L'ARNtm de *J. libera* à la particularité d'être de configuration standard, ce qui indique que pour la première fois, un événement de circularisation permuté s'est produit afin de ramener un gène *ssrA* permuté vers la configuration standard.

Un autre ARNtm a été potentiellement identifié chez le jakobide *J. bahamensis*. Toutefois, étant donné qu'il devrait être transcrit à partir d'un gène qui code certainement pour un ARNt^{Ser}, la confirmation de son existence devra attendre les résultats expérimentaux. Si le modèle du gène bi-fonctionnel devait être démontré expérimentalement, cela montrerait encore une fois la formidable capacité des ARNtm à évoluer structurellement. Pour des exemples de cette capacité, on n'a qu'à penser aux ARNtm bactériens deux-morceaux, aux ARNtm plastidiques et évidemment, aux ARNtm mitochondriaux identifiés lors de ce projet de recherche.

La caractérisation structurale des ARNtm mitochondriaux de jakobides a permis de confirmer l'élimination chez ces molécules du segment comprenant le cadre de lecture ouvert et les pseudo-nœuds. Cela indique que l'activité de signalisation par l'ajout d'un peptide signal a été perdue au cours de l'évolution de ces molécules dans les mitochondries des jakobides. Les expériences effectuées pour l'ARNtm de *J. libera* ont confirmé que cet ARNtm était effectivement exprimé, qu'il possédait sous sa forme mature une taille de 102 nt et qu'il était modifié par l'ajout de la queue CCA nécessaire pour l'aminocyclation de tous les ARNt/ARNtm connus. De plus, le fait qu'il est reconnu par la RNase P RNA et l'alanyl-tRNA synthétase *in vitro* suggère que l'ARNtm de *J. libera* se replie *in vivo* de façon à exhiber un domaine ressemblant à un demi-ARNt.

Ces informations suggèrent fortement que les ARNtm mitochondriaux sont aminocyclés dans les mitochondries des jakobides. S'ils sont effectivement aminocyclés,

leur rôle est probablement lié à la traduction mitochondriale. Ces suggestions ne permettent toutefois pas d'identifier avec certitude le rôle de ces molécules chez les jakobides. La dérivation structurale importante de ces molécules fait en sorte qu'il est difficile d'utiliser nos connaissances sur les ARN_{tm} bactériens pour faire des hypothèses sur le rôle cellulaire des ARN_{tm} mitochondriaux.

Bibliographie

Abo, T., Inada, T., Ogawa, K. and Aiba, H. (2000) SsrA-mediated tagging and proteolysis of LacI and its role in the regulation of lac operon. *EMBO J*, **19**, 3762-3769.

Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H. and Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, **396**, 133-140.

Asahara, H., Himeno, H., Tamura, K., Hasegawa, T., Watanabe, K. and Shimizu, M. (1993) Recognition nucleotides of *Escherichia coli* tRNA(Leu) and its elements facilitating discrimination from tRNA^{Ser} and tRNA^(Tyr). *J Mol Biol.*, **231**, 219-229.

Asahara, H., Himeno, H., Tamura, K., Nameki, N., Hasegawa, T. and Shimizu, M. (1994) *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA(Ser) by its characteristic tertiary structure. *J Mol Biol.*, **236**, 738-748.

Barends, S., Wower, J. and Kraal, B. (2000) Kinetic parameters for tmRNA binding to alanyl-tRNA synthetase and elongation factor Tu from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **39**, 2652-2658.

Barends, S., Karzai, A.W., Sauer, R.T., Wower, J. and Kraal B. (2001) Simultaneous and functional binding of SmpB and EF-Tu-TP to the alanyl acceptor arm of tmRNA. *J. Mol. Biol.*, **314**, 9-21.

Barends, S., Bjork, K., Gulyaev, A.P., de Smit, M.H., Pleij, C.W. and Kraal, B. (2002) Functional evidence for D- and T-loop interactions in tmRNA. *FEBS Lett.*, **514**, 78-83.

Bear, D.G., Ng, R., Van Derveer, D., Johnson, N.P., Thomas, G., Schleich, T. and Noller, H.F. (1976) Alteration of polynucleotide secondary structure by ribosomal protein S1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 1824-1828.

Bordeau, V. and Felden, B. (2002) Ribosomal protein S1 induces a conformational change of tmRNA; more than one protein S1 per molecule of tmRNA. *Biochimie*, **84**, 723-729.

Chauhan A.K. and Apirion, D. (1989) The gene for a small stable RNA (10S RNA) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **3**, 1481-1485.

Collier, J., Binet, E. and Bouloc, P. (2002) Competition between SsrA tagging and translational termination at weak stop codons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **245**, 745-754.

- Dietrich, A., Weil, J.H. and Marechal-Drouard, L. (1992) Nuclear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. *Annu Rev Cell Biol.*, **8**, 115-31.
- Ehretsmann, C.P., Carpousis, A.J. and Krisch, H.M. (1992) mRNA degradation in prokaryotes. *FASEB J.*, **6**, 3186-3192.
- Felden, B., Hanawa, K., Atkins, J.F., Himeno, H., Muto, A., Gesteland, R.F., McCloskey, J.A. and Crain, P.F. (1998) Presence and location of modified nucleotides in Escherichia coli tmRNA: structural mimicry with tRNA acceptor branches. *EMBO J.*, **17**, 3188-3196.
- Felden, B., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. (1999) Eubacterial tmRNAs: everywhere except the alpha-proteobacteria? *Biochim. Biophys. Acta*, **1446**, 145-148.
- Giege, R., Sissler, M. and Florentz, C. (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5017-5035.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. and Sauer, R.T. (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.*, **12**, 1338-1347.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481
- Hanawa-Suetsugu, K., Takagi, M., Inokuchi, H., Himeno, H. and Muto, A. (2002) SmpB functions in various steps of *trans*-translation. *Nucleic Acid Res.*, **30**, 1620-1629.
- Hayes, C.S., Bose, B. and Sauer, R.T. (2001) Stop codons preceded by rare arginine codons are efficient determinants of SsrA tagging in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3440-3445.
- Hayes, C.S., Bose, B. and Sauer, R.T. (2002) Proline residues at the C terminus of nascent chains induce SsrA tagging during translation termination. *J. Biol. Chem.*, **277**, 33825-33832.
- Herman, C., Thevenet, D., Bouloc, P., Walker, G.C. and D'Ari, R. (1998) Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the Escherichia coli protease HflB (FtsH). *Genes Dev.*, **12**, 1348-1355.
- Himeno, H., Hasegawa, T., Ueda, T., Watanabe, K. and Shimizu, M. (1990) Conversion of aminoacylation specificity from tRNA(Tyr) to tRNA(Ser) in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6815-6819.
- Karzai, A.W., Susskind, M.M. and Sauer, R.T. (1999) SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA. *EMBO J.*, **18**, 3793-3799.

- Karzai, A.W., Roche, E.D. and Sauer, R.T. (2000) The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 449-455.
- Karzai, A.W. and Sauer, R.T. (2001) Protein factors associated with the SsrA-SmpB tagging and ribosome rescue complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3040-3044.
- Käser, M. and Langer, T. (2000) Protein degradation in mitochondria. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **11**, 181-190.
- Keiler, K.C., and Sauer, R.T. (1996a). Sequence determinants of C-terminal substrate recognition by the Tsp protease. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2589-2593.
- Keiler, K.C., Waller, P.R., and Sauer, R.T. (1996b). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*, **271**, 990-993.
- Keiler, K.C., Shapiro L. and Williams, K.P. (2000) tmRNAs that encode proteolysis-inducing tags are found in all bacterial genomes: a two-piece tmRNA functions in *Caulobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7778-7783.
- Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Inokuchi, H. (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9223-9227.
- Komine, Y., Kitabatake, M. and Inokuchi, H. (1996) 10Sa RNA is associated with 70S ribosome particles in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* **119**, 463-467.
- Kopelowitz, J., Hampe, C., Goldman, R., Reches, M., and Engelberg-Kulka, H. (1992) Influence of codon context on UGA suppression and readthrough. *J Mol Biol*, **225**, 261-269.
- Lang, B.F., Burger, G. O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. and Gray, M.W. (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling eubacterial genome in miniature. *Nature*, **387**, 493-497.
- Lenhard, B., Orellana, O., Ibba, M. and Weygand-Durasevic, I. (1999) tRNA recognition and evolution of determinants in seryl-tRNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 721-9.
- Lin-Chao, S., Wei, C.L. and Lin, Y.T. (1999) RNase E is required for the maturation of ssrA RNA and normal ssrA RNA peptide-tagging activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12406-12411.
- Lye, L.F., Chen, D.H. and Suyama, Y. (1993) Selective import of nuclear-encoded tRNAs into mitochondria of the protozoan *Leishmania tarentolae*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **58**, 233-45.

Nameki, N., Tadaki, T., Himeno, H. and Muto, A. (2000) Three of four pseudoknots in tmRNA are interchangeable and are substitutable with single-stranded RNAs. *FEBS Lett.*, **470**, 345-349.

Pajic, A., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W. and Langer, T. (1994) Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria. *FEBS Lett.*, **353**, 201-206.

Palmer, J.D. and Delwiche, C.F. (1998) In Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Doyle, J.J. (eds.), *Molecular systematics of plants II*. Chapman and Hall, New York, pp. 375-409.

Pavlov, M.Y., Freistroffer, D.V., Dincbas, V., MacDougall, J., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (1998) A direct estimation of the context effect on the efficiency of termination. *J Mol Biol*, **284**, 579-590.

Pedersen, K., Zavialov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K. and Ehrenberg, M. (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*, **112**, 131-140.

Poole, E.S., Brown, C.M., and Tate, W.P. (1995) The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of *in vivo* translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J*, **14**, 151-158.

Ray, B.K. and Apirion, D. (1979) Characterization of 10S RNA: a new stable RNA molecule from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **174**, 25-32.

Roche, E.D. and Sauer, R.T. (1999) SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *EMBO J.*, **18**, 4579-4589.

Roche, E.D. and Sauer, R.T. (2001) Identification of endogenous SsrA-tagged proteins reveals tagging at positions corresponding to stop codons. *J. Biol. Chem.*, **276**, 28509-28515.

Savel'ev, A.S., Novikova, L.A., Kovaleva, I.E., Luzikov, V.N., Neupert, W. and Langer, T. (1998) ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20596-20602.

Schürer, H., Schiffer, S., Marchfelder, A. and Mörl, M. (2001) This is the end: processing, editing and repair at the tRNA 3'-Terminus. *Biol. Chem.*, **382**, 1147-1156.

Shimizu, Y. and Ueda, T. (2002) The role of SmpB protein in trans-translation. *FEBS Lett.*, **514**, 74-77.

Srivastava, R.K., Miczak, A. and Apirion D (1990) Maturation of precursor 10Sa RNA in *Escherichia coli* is a two-step process: the first reaction is catalyzed by RNase III in presence of Mn²⁺. *Biochimie*, **72**, 791-802.

Srivastava, R.A., Srivastava, N. and Apirion, D. (1992) Characterization of the RNA processing enzyme RNase III from wild type and overexpressing *Escherichia coli* cells in processing natural RNA substrates. *Int. J. Biochem.*, **24**, 737-749.

Steinberg, S., Leclerc, F. and Cedergren, R. (1997) Structural rules and conformational compensations in the tRNA L-form. *J. Mol. Biol.*, **266**, 269-282.

Subbarao, M.N. and Apirion, D. (1989) A precursor for a small stable RNA (10Sa RNA) of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 499-504.

Sunohara, T., Abo, T., Inada, T. and Aiba, H. (2002) The C-terminal amino acid sequence of nascent peptide is a major determinant of SsrA tagging at all three stop codons. *RNA*, **8**, 1416-1427.

Tu, G.F., Reid, G.E., Zhang, J.G., Moritz, R.L., Simpson, R.J. (1995) C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *J. Biol. Chem.*, **270**, 9322-9326.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P. and Palmer, J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **46**, 327-338.

Tyagi, J.S. and Kinger, A.K. (1992) Identification of the 10Sa RNA structural gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 138.

Ushida, C., Himeno, H., Watanabe, T., and Muto, A. (1994) tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acid Res.*, **22**, 3392-3396.

Valle, M., Gillet, R., Kaur, S., Henne, A., Ramakrishnan, V. and Frank, J. (2003) Visualizing tmRNA entry into a stalled ribosome. *Science*, **300**, 127-130.

Williams, K.P., Martindale, K.A. and Bartel, D.P. (1999) Resuming translation on tmRNA: a unique mode of determining a reading frame. *EMBO J.*, **18**, 5423-5433.

Williams, K.P. (2002a) The tmRNA website: invasion by an intron. *Nucleic Acid Res.*, **30**, 179-182.

Williams, K.P. (2002b) Descent of a split RNA. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2025-2030.

- Withey, J. and Friedman, D. (1999) Analysis of the role of trans-translation in the requirement of tmRNA for lambdaimmP22 growth in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **181**, 148-157.
- Wower, I.K., Zwieb, C.W., Guven, S.A. and Wower, J. (2000) Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the Escherichia coli ribosome. *EMBO J.*, **19**, 6612-6621.
- Li, Z., Shilpa, Pandit, S., and Deutscher, M.P. (1998) 3' Exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2856-2861.
- Zvereva, M.I., Ivanov, P.V., Teraoka, Y., Topilina, N.I., Dontsova, O.A., Bogdanov, A.A., Kalkum, M., Nierhaus, K.H. and Shpanchenko, O.V. (2001) Complex of transfer-messenger RNA and elongation factor Tu. Unexpected modes of interaction. *J. Biol. Chem.*, **276**, 47702-47708.
- Zwieb, C., Wower, I. and Wower, J. (1999) Comparative sequence analysis of tmRNA. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2063-2071.

