

Importation d'ARNt et maladies mitochondriales

Le génome mitochondrial humain est une molécule circulaire de 16 569 bases codant pour 22 ARN de transfert (ARNt), deux ARN ribosomiques et 13 polypeptides faisant partie des complexes de la chaîne respiratoire [1]. Des mutations dans l'ADN mitochondrial sont responsables de certaines maladies neurodégénératives dues à un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules. Plusieurs de ces déficits (MERRF-*myoclonic epilepsy with ragged red fibres*, MELAS-*mitochondrial myopathy encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes*, cardiomyopathies, encéphalomyopathies...) sont associés à des mutations dans des gènes codant pour les ARNt mitochondriaux [2]. Ces mutations entraînent le plus souvent un défaut d'aminocyclation et/ou une baisse de la concentration de l'ARNt muté, ce qui se traduit par une altération de la synthèse protéique mitochondriale [3, 4]. Une thérapie génique pour ces pathologies serait envisageable s'il était possible de délivrer les ARNt non déficients dans l'organite. La voie d'importation des ARN du cytosol dans la mitochondrie semble offrir une telle possibilité.

L'importation mitochondriale d'ARNt a été démontrée chez la levure, les protozoaires et les plantes [5, 6]. Le nombre des ARNt cytosoliques importés dans la mitochondrie est très différent selon l'organisme, et peut varier d'un seul ARNt à la totalité. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un seul ARNt codé par l'ADN nucléaire est importé dans la matrice mitochondriale: il s'agit de tRK1, un ARNt^{Lys} dont l'anticodon est CUU [7]. La levure possède un autre isoaccepteur de la lysine codé aussi par l'ADN nucléaire, mais dont la localisation est exclusivement cytoplasmique: tRK2 (ARNt^{Lys}, anticodon UUU). L'ensemble de nos résultats a permis de proposer un modèle pour le mécanisme d'importation mito-

chondriale de tRK1 chez la levure. Ce modèle suggère que tRK1, après son aminoacylation, devient la cible d'un facteur d'adressage mitochondrial, le précurseur cytoplasmique de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale appelé aussi pré-MSK. Le complexe pré-MSK-tRK1 est ensuite dirigé vers la mitochondrie et l'ARNt est importé avec la protéine dans la matrice mitochondriale [8, 9].

Dans un second temps, nous avons étudié si ces données acquises chez la levure peuvent être exploitées afin de créer un système artificiel d'importation d'ARNt dans les mitochondries humaines dans lesquelles cette voie d'adressage n'existe pas. L'objectif final étant la mise au point d'une approche de thérapie génique de maladies dues à des mutations des ARNt mitochondriaux. Cependant, avant d'envisager une telle approche thérapeutique, il était essentiel de répondre aux questions suivantes: (1) les mitochondries humaines sont-elles capables d'importer les ARNt? (2) les ARNt cytoplasmiques peuvent-ils permettre la traduction d'ARN messagers mitochondriaux? Nos travaux récents permettent de répondre par l'affirmative à ces deux questions [10].

Nous avons démontré que les mitochondries humaines, isolées et placées dans les mêmes conditions que les mitochondries de levure, sont capables d'importer la forme native ainsi que plusieurs formes mutées de tRK1. Cette importation requiert la présence d'ATP à l'intérieur et à l'extérieur de l'organite, de récepteurs protéiques exposés sur la membrane externe et d'un gradient de protons ($\Delta\Psi$) à travers la membrane interne de la mitochondrie. En outre, comme dans le cas de la levure, l'importation est dépendante de facteurs protéiques solubles. Les facteurs d'importation de la levure, dont pré-MSK, sont en effet capables de diriger l'importation de tRK1

dans les mitochondries humaines. Toutefois, des extraits protéiques de cellules humaines se sont aussi avérés capables de la diriger s'ils étaient supplémentés par la protéine pré-MSK pure. Il apparaît donc qu'une cellule humaine puisse avoir la capacité de diriger l'import d'un ARNt vers la mitochondrie, si ce facteur d'importation de la levure est exprimé avec cet ARNt.

Pour prouver que les ARNt importés sont actifs dans la traduction mitochondriale, nous avons utilisé deux approches complémentaires, *in vitro* et *in vivo*. La première approche utilise une forme mutée de tRK1 (U35/A35) transformant l'anticodon CUU en CAU (*figure 1A*): tRK1^{CAU} peut alors être aminoacylé par la méthionyl-ARNt synthétase, cette version aminoacylée mutée étant toujours capable d'être importée dans les mitochondries de levure isolées. Nous avons exploité ce fait pour adresser dans les mitochondries cet ARNt chargé par de la méthionine radioactive. Nos résultats montrent que l'acide aminé marqué est incorporé dans les produits de la synthèse protéique mitochondriale. Cette expérience a été répétée sur les mitochondries humaines avec le même résultat positif. La deuxième approche utilise une forme mutée de tRK2 dont les mutations lui confèrent d'une part une identité alanine (G3:U70) et d'autre part la capacité de décoder un codon stop UAG (*ambre*) (*figure 1B*). Cette version mutée peut aussi être importée *in vivo*. En outre, elle est capable de compléter une mutation introduite artificiellement dans le gène codant pour la sous-unité 2 de la cytochrome *c* oxydase mitochondriale de levure (localisée dans le génome mitochondrial). Cette mutation (*cox2-14^{amber}*), qui transforme un codon GCU (Ala) en UAG (stop *ambre*), provoque un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale et

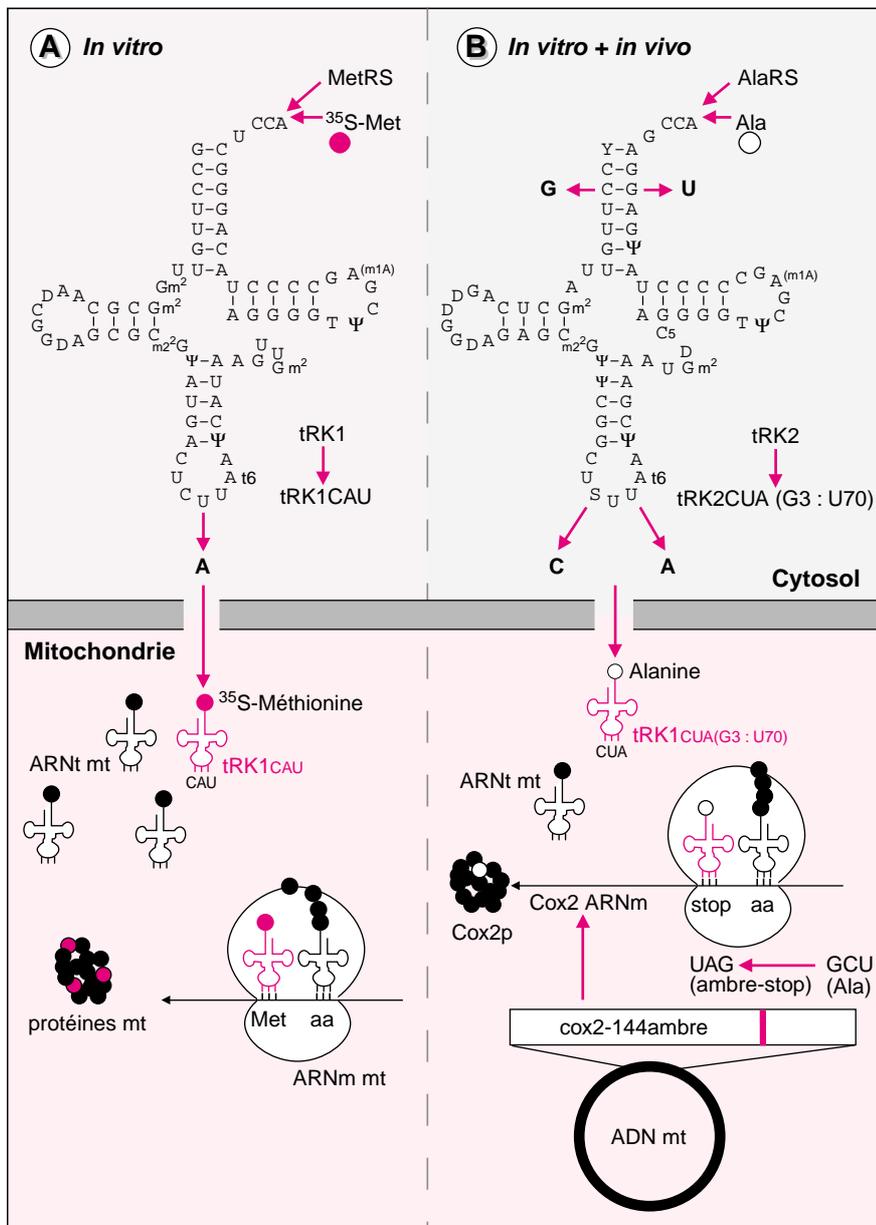


Figure 1. **Participation des ARNt importés du cytosol dans la mitochondrie à la traduction des protéines mitochondriales.** **A.** In vitro, tRK1_{CAU} qui contient une mutation de l'anticodon CUU en CAU est aminoacylé par la méthionyl-ARNt synthétase (MetRS) et chargé par de la méthionine radioactive (³⁵S-méthionine, point rouge). Il est alors importé dans la mitochondrie et participe à la synthèse des protéines mitochondriales en reconnaissant le codon Met des ARNm mitochondriaux. **B.** Complémentation d'une mutation nonsense dans un gène mitochondrial (cox2-144ambre) par l'ARNt tRK2_{CUA}[G3:U70]. Cet ARNt muté est aminoacylé par l'alanyl-ARNt synthétase (AlaRS), chargé par l'alanine in vivo, et importé du cytosol vers la mitochondrie. Il reconnaît alors le codon stop UAG (ambre) introduit en position 144 dans le gène de la cytochrome c oxydase mitochondriale (cox2-144ambre) et permet l'incorporation d'alanine à ce site dans la protéine Cox2p. aa: acide aminé.

l'absence de croissance de la levure sur des milieux contenant du glycérol comme source de carbone. Les cellules qui contenaient un plasmide exprimant le gène codant l'ARNt tRK2 muté récupéraient la capacité de croître sur des milieux glycérolés. Ces résultats montrent donc que des ARNt cytoplasmiques aminoacylés dans le cytosol sont capables de participer à la synthèse des protéines dans la mitochondrie.

Même s'il est trop précoce pour envisager une mise au point rapide d'une thérapie génique des maladies mitochondriales dues à des mutations de l'ADN mitochondrial reposant sur l'importation des ARNt du cytosol, les nouveaux résultats décrits ci-dessus sont clairement en faveur d'une telle possibilité.

Remerciements

Les auteurs remercient le Pr T.D. Fox (Cornell University, États-Unis) et le Dr H. Mireau (INRA, Versailles, France) pour la construction de la souche de levure contenant la mutation *cox2-144*. Les auteurs ont bénéficié d'un soutien de l'AFM (Association Française contre les Myopathies), de l'HFSP (Human Frontier Science Program) et de l'INTAS (International Association for Promotion of Cooperation with Scientists from the New Independent States).

Nina S. Entelis
Olga A. Kolesnikova

Cnrs FRE 2168, Mécanismes moléculaires de la division cellulaire et du développement, 21, rue René-Descartes, 67084 Strasbourg, France, et Molecular Biology Department, Biology Faculty of Moscow State University, Moscou 119899, Russie.

Robert P. Martin
Ivan A. Tarassov

Cnrs FRE 2168, Mécanismes moléculaires de la division cellulaire et du développement, 21, rue René-Descartes, 67084 Strasbourg, France.

1. Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-65.
2. Larsson NG, Clayton DA. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 151-78.
3. Enriquez JA, Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA^{Lys} and premature translation termination. *Nat Genet* 1995; 10: 47-55.
4. Hao H, Moraes CT. A disease-associated G5703A mutation in human mitochondrial DNA causes a conformational change and a

marked decrease in steady-state levels of the mitochondrial tRNA^{Asn}. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6831-7.

5. Schneider A. Import of RNA into mitochondria. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 282-6.
6. Tarassov IA, Entelis NS, Martin RP. Import of tRNA into yeast mitochondria: experimental approaches and possible applications. In: Lesienne P, ed. *Mitochondrial diseases, models and methods*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1999; 303-16.
7. Martin RP, Schneller JM, Stahl AJC, Dirheimer G. Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid

(anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry* 1979; 18: 4600-5.

8. Tarassov IA, Entelis NS, Martin RP. An intact protein translocation machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *J Mol Biol* 1995; 245: 315-23.
9. Tarassov IA, Entelis NS, Martin RP. Mitochondrial import of a lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J* 1995; 14: 3461-71.
10. Kolesnikova OA, Entelis NS, Mireau H, Fox TD, Martin RP, Tarassov IA. Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* 2000; 289: 1931-3.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Gémellité dizygote : influence du gène *PPARγ* ?** Les causes génétiques influençant le nombre des grossesses gémellaires dans les populations humaines sont encore mal connues. La fréquence des gémellités monozygotes se situe aux environs de 3,5 à 4 pour mille accouchements, quels que soient l'origine géographique, l'âge de la mère ou la place dans la fratrie, et est restée constante au cours des ces cinquante dernières années. En revanche, celle des naissances de jumeaux dizygotes varie avec de nombreux facteurs : l'âge de la mère (avec un maximum vers 37 ans), le rang de naissance, les groupes ethniques (sans compter les effets des traitements de la stérilité). Indépendamment de l'influence de facteurs hormonaux (en particulier celle de l'hormone de croissance folliculaire) et environnementaux, l'hypothèse de l'existence de gènes favorisant la gémellité dizygote a souvent été évoquée. Les fréquences élevées de jumeaux dizygotes observées dans des isolats, au Brésil [1] et en Finlande [2] entre autres, vont dans ce sens et sont plutôt en faveur de gènes récessifs. Au cours d'une recherche utilisant la méthode des jumeaux, l'attention vient d'être attirée par une relation

existant entre le bras court du chromosome 3 et la gémellité dizygote. L'étude portait sur les gènes intervenant dans la modulation de la cholestérolémie, en particulier sur la relation entre cholestérol et polymorphismes du gène *PPARγ* (codant pour un récepteur nucléaire activé par les inducteurs péroxysomiaux) qui intervient dans l'obésité (*m/s* 1995, n°4, p. 625). A l'occasion de cette étude initiale, sur 122 paires de jumeaux monozygotes et 100 paires de jumeaux dizygotes - et indépendamment des concentrations de cholestérol - on s'aperçut qu'un déséquilibre de liaison existait chez les jumeaux dizygotes pour des marqueurs polymorphiques situés à proximité du gène *PPARγ* ainsi que pour un polymorphisme intragénique (substitution C → T dans le gène *PPARγ*). La poursuite de l'étude sur 81 jumeaux dizygotes supplémentaires (originaires de Finlande et de Pologne), comparés à des jumeaux monozygotes et à des germains, confirma, avec des résultats statistiquement très significatifs, ce déséquilibre de liaison pour des variants alléliques, uniquement chez les dizygotes [3]. L'étude des parents ne montra pas de transmission maternelle préférentielle. Il existe donc, dans cette

région du chromosome 3, un gène qui favoriserait la naissance de jumeaux dizygotes. Le gène *PPARγ* mérite d'être retenu comme candidat : il intervient dans les effets de l'insuline (*m/s* 1997, n°2, p. 280), dans la masse corporelle et le métabolisme des lipides (*m/s* 1998, n°11, p. 278). Il pourrait donc avoir un effet favorisant le développement et la survie des deux jumeaux, en cas de grossesse gémellaire. On sait en effet, grâce à l'échographie fœtale, qu'un pourcentage non négligeable de grossesses gémellaires (certains auteurs l'évaluent jusqu'à 40 % [4]) se terminent par la naissance d'un enfant unique (phénomène du jumeau évanescent). Ce n'est qu'une des hypothèses possibles, mais ce travail marque le premier pas vers la mise en évidence de causes génétiques dans les gémellités.

[1. Nielsen DM, *et al.* *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1531.]

[2. Lummaa V, *et al.* *Nature* 1998; 394: 533-4.]

[3. Busjahn A, *et al.* *Nat Genet* 2000; 26: 398-9.]

[4. Landy HJ, Keith L. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 177-83.]