

Université Louis Pasteur, Strasbourg I
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg
En Biologie Moléculaire et Cellulaire

par

Michaël RYCKELYNCK

**Aspects fonctionnels et structuraux de la régulation de
l'expression d'une aminoacyl-ARNt synthétase eucaryote :
l'aspartyl-ARNt synthétase de *Saccharomyces cerevisiae***

Soutenue publiquement le 13 Octobre 2005 devant la commission d'examen :

M.	E. WESTHOF	Rapporteur interne
M.	J.-F. MAYAUX	Rapporteur externe
M.	H. PUTZER	Rapporteur externe
M.	B. EHRESMANN	Examineur
M.	R. GIEGE	Directeur de thèse

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier l'ensemble des membres du jury : le Dr Jean-François MAYAUX, Directeur des Sciences Génomiques à SANOFI-AVENTIS, le Dr Harald PUTZER, Directeur de Recherche au CNRS, le Pr Eric WESTHOF, Professeur à l'Université Louis PASTEUR, le Pr Bernard EHRESMANN, Professeur à l'Université Louis PASTEUR et le Dr Richard GIEGE, Directeur de Recherche au CNRS, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger le travail présenté dans cette thèse.

D'autre part, j'exprime toute ma gratitude au Pr Bernard EHRESMANN et à son successeur, le Pr Eric WESTHOF, de m'avoir accueilli au sein de l'UPR 9002 du CNRS.

Merci aussi à vous Richard GIEGE de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de votre équipe. Bien que très pris par vos obligations au CNRS, vous avez toujours répondu présent lorsque l'on a besoin de vous. Vous avez su m'enseigner la rigueur requise quant à la synthèse, l'interprétation et la présentation des résultats expérimentaux.

Naturellement, une part importante de ces remerciements va au Dr Magali FRUGIER, Chargée de Recherche au CNRS. Au cours de ces quelques années passées ensemble tu as su m'apprendre la rigueur dans les manip et à ne pas se décourager devant la difficulté, mais au contraire à tout faire pour la surmonter et surtout à faire preuve d'ingéniosité. J'ai vraiment apprécié de travailler avec toi et je pense qu'on a réussi à être efficace quant cela a été nécessaire.

Merci à l'ensemble du personnel de l'unité (présent et passé), vous avez tous été géniaux au cours de ces 5 années passées avec vous. Il faudrait écrire un second tome pour pouvoir tous vous remercier individuellement comme il se doit.

De façon générale merci au team Giegé/Florentz : Anne, Jojo, Marie S. (Fais-moi plaisir : changes tes lunettes de soleil), Mini-moi (aurélie pour les non-initiés), Lucette (Luc, toujours pour les non-initiés) Catherine, Tania, Joern, Marie. M, Elodie, Claude, Bernard L. (si si sans blague), Caro, Richard, Magali, Agnes...

Merci à Magali (la même qu'en haut, mais avec ce que je lui ai fait endurer, elle a le droit) d'avoir enrichi considérablement ma culture musicale, ça n'a pas toujours été facile, mais, au final, je le confirme : la répétition fixe la notion (une chauve-souris aimait un parapluie...).

Merci à Caro pour l'assistance technique d'une part, mais aussi pour toutes ces parties de franche rigolade et nos chansonnettes parfois un peu ridicules et prise de tête je le reconnaît. Allez une petite dernière : Le petit bonhomme en mousse...

Un grand merci à Luc pour ton aide en informatique, pour l'initiation à la culture asiatique et pour m'avoir fait découvrir les chemises, disons : multicolores (?). Désolé de te laisser seul dans un environnement aussi féminin mais bon tu verras, on y survit (au moins en partie).

Merci à Benoît. Tout d'abord pour le modèle 3D et ta disponibilité, mais aussi pour les aventures en Autriche comme, par exemple, notre petit catapultage à Mach 2 (Je te téléphone pour la chute libre ?).

Merci à toi Béné, collègue et amie, pour tes encouragements, tes démonstrations de gym et tout le reste.

Merci à JC pour tes quelques mails quotidiens (en général moins de 10) et tes visites régulières et toujours si discrètes.

Merci au team du midi (Mathieu, Joël, Vince, Marie-Aline, Elodie, Béné, Jean-seb, Agnes, Luc) pour tout ces bons moments (à défaut d'une bonne bouffe sans hanneton à l'intérieur...).

Merci au team des fêtards du Vendredi soir (JC, Tométéor, Eric, Guigui, Mike ...)

pour les pots, les courses sur divers types d'engins (trottinettes), vélo, caddie...

Merci à mes proches, d'avoir toujours été près de moi dans les moments difficiles, avec une mention particulière pour mon père, Sylvain et Val.

Merci à Carte Noire et à son successeur, l'Or, d'avoir rythmé mes matinées.

Enfin, merci à toi, Agnes de m'avoir épaulé jour après jour, de m'avoir galvanisé dans les moments difficiles, de ton aide permanente au niveau technique, mais aussi et surtout pour l'assistance que tu m'as fournie tout au long de la rédaction de ce manuscrit. Promis je vais me remettre à la vaisselle, on part en vacances et tout le reste...

Sommaire

Nomenclature des macromolécules	p 1
Liste des principales abréviations utilisées	p 1
<hr/>	
Introduction	p 3
<hr/>	
I. Régulations de l'expression des gènes dirigées par l'ARN	p 6
1. ARN régulateurs en <i>trans</i>	p 6
1.1 Les ARN régulateurs de type « eucaryote » : les <i>micro</i> ARN (miARN)	p 7
<i>Transcription et maturation des miARN</i>	p 9
<i>Reconnaissance de l'ARNm cible et mécanisme de régulation</i>	p 9
1.2 Les riborégulateurs de type « procaryote »	p 11
1.2.1 <i>Riborégulateurs antisens codés par des éléments génétiques parasites</i>	p 11
<i>Maintien du plasmide R1 dans E.coli</i>	p 13
<i>Réplication du plasmide R1 dans E.coli</i>	p 13
1.2.2 <i>ARN régulateurs codés au niveau chromosomique</i>	p 15
<i>Riborégulateur chromosomique à cible unique : micF</i>	p 17
<i>Riborégulateurs chromosomiques à cibles multiples : l'ARN-III et dsrA</i>	p 17
2. Séquences régulatrices d'ARN en <i>cis</i>	p 21
2.1 Eléments régulateurs de type « eucaryote » en <i>cis</i>	p 23
2.1.1 <i>Régulations dirigées par les régions riches en A et U</i>	p 23
2.1.2 <i>Régulations dirigées par des éléments structurés</i>	p 25
<i>L'élément IRE</i>	p 25
<i>Le site de fixation de HBP</i>	p 25
<i>Le site de fixation de FMRP</i>	p 27
2.2 Eléments régulateurs de type « procaryote » en <i>cis</i>	p 27
2.2.1 <i>Régulation liée à un changement conformationnel de l'ARN en réponse à la fixation d'une protéine</i>	p 29
2.2.2 <i>Les ARN interrupteurs</i>	p 31
<i>Présentation du système</i>	p 31
<i>Les systèmes ribo-A et ribo-G</i>	p 31
2.3 Eléments mimétiques : système de « hybrides » à structure de type « procaryote » et mode d'action de type « eucaryote »	p 33
2.3.1 <i>Régulation de l'opéron S10 par atténuation transcriptionnelle</i>	p 35
2.3.2 <i>Régulation de l'opéron spc par inhibition du couplage traductionnel et dégradation de l'ARNm</i>	p 37
2.3.3 <i>Régulation de l'opéron α et de l'ARNm^{rpsO} par capture du ribosome</i>	p 39
2.3.4 <i>Autres mimétismes d'ARN ribosomiques</i>	p 43

II. Les ARN de transfert : des ARN non-codant à fonctions régulatrices en <i>cis</i> et en <i>trans</i>	p 45
1. Structure, biosynthèse et fonction primordiale des ARNt	p 45
2. Les structures d'ARNt dans des fonctions de régulation	p 49
2.1 Le pseudo-ARNt BC1, un riborégulateur en <i>trans</i>	p 51
2.2 L'ARNt régule l'expression des aminoacyl-ARNt synthétases	p 52
Article de revue n°1 : Les ARNt et les pseudo-ARNt fédèrent les	p 52
mécanismes de régulation de l'expression des aminoacyl-ARNt synthétases	
3. Autres structures pseudo-ARNt et fonctions non-canoniques des ARNt	p 67
3.1 L'ARN transfert-message	p 69
3.2 L'ARNs-85 de Trypanosome	p 70
3.3 Mimétisme de l'ARNt par des facteurs protéiques	p 70
III L'aspartyl-ARNt synthétase	p 73
1. Le domaine catalytique	p 73
1.1 Les deux classes d' aminoacyl-ARNt synthétases	p 75
1.2 La réaction d'aspartylation	p 77
1.3 Domaines impliqués dans la fidélité de la réaction	p 79
2. Domaines impliqués dans la reconnaissance spécifique de l'ARNt	p 80
2.1 Organisation structurale	p 80
2.2 Identité des ARNt	p 81
3. Les domaines idiosyncrasiques	p 83
4. Fonctions non canoniques des aaRS	p 87
4.1 Duplication de gènes d'aaRS	p 87
4.2 Protéolyse partielle des aaRS	p 88
IV Objectif et contribution du travail de thèse	p 90
<hr/>	
Résultats et Discussions	p 93
<hr/>	
I. Régulation de l'expression de l'AspRS <i>in vivo</i>	p 93
1. Introduction	p 93
1.1 Importation des aaRS dans le noyau	p 93
1.2 Fonctions des aaRS dans le noyau	p 94

2. Article n°1 : Régulation de l'expression de l'aspartyl-ARNt synthétase de <i>S.cerevisiae</i> : un équilibre entre ARNm et ARNt	p 95
3. Discussion	p 103
II. Structure de l'ARNm et étude de l'interaction AspRS/ARNm : mise en évidence d'un mimétisme de l'ARNt^{Asp}	p 107
1. Introduction	p 107
2. Article n°2 : Un mime moléculaire de l'ARNt ^{Asp} dirige la formation du complexe entre l'aspartyl-ARNt synthétase de levure et son ARNm	p 108
3. Limitations techniques liées à la solubilité de l'ARN	p 127
4. Discussion	p 129
4.1 Généralités sur les pseudo-noeuds	p 129
4.2 Organisation structurale de pseudo-ARNt de virus de plantes	p 129
<i>Le virus de la mosaïque jaune du navet (VMJN)</i>	p 131
<i>Le virus de la mosaïque du Brome (VMB)</i>	p 131
<i>Le virus de la mosaïque du Tabac (VMT)</i>	p 132
4.3 Fonctions des pseudo-ARNt de virus de plantes	p 132
4.4 Modèle d'interaction entre l'AspRS et l'ARNm ^{AspRS}	p 134
III. Aminoacylations incorrectes <i>in vitro</i>	p 137
1. Introduction	p 137
2. Article n°3 : La précision de la charge de l'ARNt ^{Asp} de levure est menacée par l'extension N-terminale de l'aspartyl-ARNt synthétase	p 138
3. Discussion	p 147
IV. Conséquences de l'augmentation de la concentration de l'AspRS <i>in vivo</i> : reconnaissance d'ARNt hétérologues et aminoacylations incorrectes	p 149
1. Introduction	p 149
2. Recherche d'une aminoacylation croisée <i>in vivo</i>	p 150
2.1 Mise au point d'un système rapporteur d'une aspartylation croisée <i>in vivo</i>	p 150
2.2 Détection d'une aspartylation croisée	p 153
2.3 Influence de la surproduction de l'AspRS sur la croissance cellulaire	p 155
3. Second niveau de régulation possible de l'expression de l'AspRS	p 156

3.1 Profil d'accumulation de l'AspRS au cours du temps	p 157
3.2 Analyse comparative du contenu protéique des levures	p 159
3.3 Caractérisation de la modification post-traductionnelle de l'AspRS	p 161
<i>Identification du site de modification</i>	p 161
<i>Identification de la modification</i>	p 163

4. Discussion	p 166
----------------------	-------

Conclusions et Perspectives	p 169
------------------------------------	-------

1. Interaction entre l'AspRS et l'ARNm^{AspRS} et mécanisme de régulation transcriptionnelle	p 169
2. Localisation nucléaire de l'AspRS	p 172
3. Régulation post-traductionnelle de l'AspRS de <i>S.cerevisiae</i>	p 173
4. Risque d'aspartylation hétérologue	p 174
5. Considérations évolutives	p 175

Matériel et Méthodes	p 177
-----------------------------	-------

I. Clonages et Mutagenèses	p 177
1. Clonages : principes généraux	p 177
1.1 Amplification de gènes par PCR	p 177
1.2 Digestion et purification des fragments	p 177
1.3 Ligation	p 178
1.4 Transformation de bactéries électro-compétentes	p 178
1.5 Criblage des colonies	p 179
2. Mutagenèses	p 181
2.1 Mutagenèse dirigée selon <i>Stratagene</i>	p 181
2.2 Mutagenèse par remplacement de cassette	p 181
II. Purification des protéines	p 183
1. Purification de l'AspRS de levure	p 183
1.1 Surexpression	p 183
1.2 Purification	p 183

2. Surproduction, purification et caractérisation de la ARN polymérase T7	p 185
2.1 Surproduction de l'ARN polymérase T7	p 185
2.2 Préparation de l'extrait brut	p 185
2.3 Purification et concentration de l'ARN polymérase T7	p 187
2.4 Caractérisation de l'ARN polymérase T7	p 188
3. Quantification des protéines (Bradford, BCR)	p 188
III. Préparation des ARN	p 191
1. Transcription <i>in vitro</i>	p 191
1.1 Préparation de la matrice	p 191
1.2 Transcription par l'ARN polymérase T7	p 191
2. Purification des ARN transcrit	p 192
2.1 Purification sur gel natif	p 192
2.2 Purification sur gel dénaturant	p 193
2.3 Purification des ARN par chromatographie (HPLC/FPLC)	p 193
<i>Purification par colonne échangeuse d'anions</i>	p 193
<i>Purification et analyse de l'ARN par gel filtration</i>	p 195
IV. Etudes structurales des ARN	p 197
1. Cartographie en solution	p 197
1.1 Sondes chimiques	p 197
1.2 Sondes enzymatiques	p 198
2. Révélation des cartographies en solution et séquençage par rétro-transcription	p 198
2.1 Marquage et purification des amorces	p 198
2.2 Extension d'amorce par la reverse transcriptase	p 199
2.3 Séparation des fragments sur gel	p 199
V. Etudes structurales et fonctionnelles des complexes ARN/protéines	p 201
1. Expériences de retard sur gel	p 201
1.1 Marquage co-transcriptionnel des ARN	p 201
1.2 Retard sur gel	p 201
2. Expériences d'empreinte	p 202
3. Détection de l'aminoacylation des ARNt <i>in vitro</i>	p 203
3.1 Aspects techniques de la méthode	p 203
3.2 Exploitation des résultats	p 204

3.3 Identification d'ARNt aspartylables par oxydation periodique	p 205
<i>Protection des bases thiolées</i>	p 205
<i>Aspartylation des ARNt totaux</i>	p 205
<i>Oxydation des ARNt non aminoacylés</i>	p 205
<i>Désacylation, déprotection et stabilisation des ARNt</i>	p 207
<i>Identification des ARNt aspartylés</i>	p 207

VI. Etudes *in vivo* p 209

1. Transformation de levures	p 209
-------------------------------------	-------

2. Suivi de la croissance des levures	p 209
--	-------

3. Résistance à la généticine	p 210
--------------------------------------	-------

4. Immunodétections	p 210
----------------------------	-------

5. Protéomique comparative	p 211
-----------------------------------	-------

5.1 Préparation des échantillons	p 211
----------------------------------	-------

5.2 Isoélectrofocalisation (première dimension)	p 212
---	-------

5.3 Equilibration des strips	p 213
------------------------------	-------

5.4 Séparation sur gel de polyacrylamide (seconde dimension)	p 213
--	-------

5.5 Coloration des gels au bleu colloïdal	p 215
---	-------

5.6 Analyses des gels	p 215
-----------------------	-------

Références Bibliographiques p 217

Nomenclature des macromolécules

Molécule	Style	Exemples
gène ou opéron de gènes	Italique	<i>rpsO</i> , <i>s10</i> ...
ARN (sauf BC1)	Minuscules normales	<i>dsrA</i> , <i>sok</i>
protéine	Majuscules	AspRS, FMRP...

Liste des principales abréviations utilisées

A	adénine
aa	acide aminé
aaRS	aminoacyl-ARNt synthétase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN copie
AMP	adénosine 5'-monophosphate
Amp	ampicilline
anti-S-D	séquence complémentaire à la séquence Shine-Dalgarno
ARE	séquence riche en A et en U
ARN	acide ribonucléique
ARNt ^(X)	ARN de transfert. Le nom en exposant indique l'acceptance de la molécule
ARNm ^(X)	ARN messenger. Le nom en exposant indique la protéine codée (Majuscule) ou le nom de l'ARN (Minuscule).
Asp	acide aspartique
AspRS	aspartyl-ARNt synthétase
ATP	adénosine 5'-triphosphate
BSA	albumine de sérum de bovin
C	cytosine
CHAPS	(3-[3-Cholamidopropyl] diméthylammonio]-1-propanesulfonate)
cm	centimètre
CMCT	(N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-méthylmorpholino)-éthyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonate)
cpm	coups par minute
CTP	cytidine 5'-triphosphate
dNTP	désoxyribonucléotide
Da	dalton
DMS	sulfate de diméthyle
DO	densité optique
DTE	dithioérythritol
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
EF-1 α	facteur d'élongation eucaryote 1 α
EF-Tu	facteur d'élongation procaryote
FPLC	« fast protein liquid chromatography »
G	guanine
g	gramme ou gravité selon le cas
Gbq	giga becquerel
GMP	guanosine 5'-monophosphate
GTP	guanosine 5'-triphosphate

^3H	tritium
HEPES	acide N-2-hydroxy éthyl pipérazine N'2 éthane sulfonique
HPLC	« high performance liquid chromatography »
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
K	potassium
k_{cat}	constante catalytique
kd	constante de dissociation
ki	constante d'inhibition
K_M	constante de Michaelis et Menten
L	litre
LB	milieu de Luria et Bertani
M	molaire
mA	milliampère
Mg	magnésium
miARN	<i>micro</i> ARN
mL	millilitre
mM	millimolaire
μA	microampère
μL	microlitre
μM	micromolaire
N	normal
Na	sodium
ng	nanogramme
NLS	séquence de localisation nucléaire
Nm	nanomètre
NTP	ribonucléotide
OB-fold	repliement Oligonucléotide Binding
ORF	phase ouverte de lecture (région codante)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
pH	potentiel hydrogène
pmol	<i>pico</i> moles
PMSF	phénylméthylsulphonylfluoride
PPi	pyrophosphate inorganique
RNase	endoribonucléase
rpm	révolution par minute
RT	reverse transcriptase
TCA	acide trichloroacétique
TBE	Tris-borate-EDTA
Tris	tris (hydroxyméthyl) aminométhane
S-D	séquence Shine-Dalgarno
SDS	dodécyl sulfate de sodium
U	uracile
UTP	uridine 5'-triphosphate
V	volt
v/v	volume à volume
W	watt
$^{\circ}\text{C}$	degré Celsius
-	appariement Watson-Crick canonique
•	appariement non-canonique
[X+]	phénotype où X indique l'auxotrophie de la levure

L'Acide RiboNucléique (ARN) a été longtemps considéré comme n'étant qu'un intermédiaire labile entre l'information génétique portée par l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) et les protéines. De nombreuses caractéristiques chimiques, structurales et fonctionnelles différencient ces deux types d'acides nucléiques. Ainsi, par exemple, la présence d'un groupement hydroxyle en position 2' du ribose de l'ARN le rend très sensible à l'hydrolyse, alors que son absence dans l'ADN contribue à la grande stabilité de la molécule. L'ADN a pour unique fonction le stockage de l'information génétique et s'organise presque exclusivement sous forme d'une double hélice continue. Au contraire, les molécules d'ARN sont essentiellement retrouvées sous la forme d'un brin unique et assurent différentes fonctions, dont certaines directement en relation avec leur repliement structural. Ces caractéristiques rendent l'ARN capable de reconnaître virtuellement n'importe quel substrat et même de catalyser n'importe quel type de réaction. A ce jour, cette famille de molécules a été impliquée, en plus du décodage de l'information génétique (ARN messenger et ARN de transfert), dans des fonctions aussi variées que la catalyse (RNase P, ARN ribosomiques), des rôles de guide (petits ARN nucléaires, ARN de la télomérase) ou encore de régulation (régions non-traduites de l'ARNm). Alors que la fonction codante de l'ARN messenger (ARNm) ne repose que sur la séquence de la phase ouverte de lecture (ORF), l'extraordinaire plasticité des molécules d'ARN prend tout son sens au niveau de ses régions non-traduites. L'implication de l'ARN dans les mécanismes de régulation est fondamentale pour le développement et la viabilité de tout organisme et sera le point central développé dans cette Introduction.

A la vue du grand nombre d'études ayant impliqué l'ARN dans des mécanismes de régulation, le thème central de ce travail, j'ai choisi de présenter un assortiment qui, bien que partiel, est représentatif de l'évolution des structures adoptées par ces molécules. La Figure 1 sera le fil conducteur de la première partie de cette Introduction. Les structures d'ARN ont été réparties en deux catégories selon leur mode d'action. Ainsi, les ARN régulateurs seront distingués suivant que le régulateur et sa cible sont présents sur la même molécule (effet en *cis*) ou sur deux molécules distinctes (effet en *trans*) (Figure 1a et 1b). A l'intérieur de ces catégories, j'ai opté pour un point de vue très personnel où j'ai voulu insister sur l'évolution des structures des ARN « régulateurs ». On y voit que ces structures peuvent être rangées en trois catégories. (i) Les structures de type « procaryote » qui, en général, sont caractérisées par des repliements très élaborés. (ii) Les structures de type

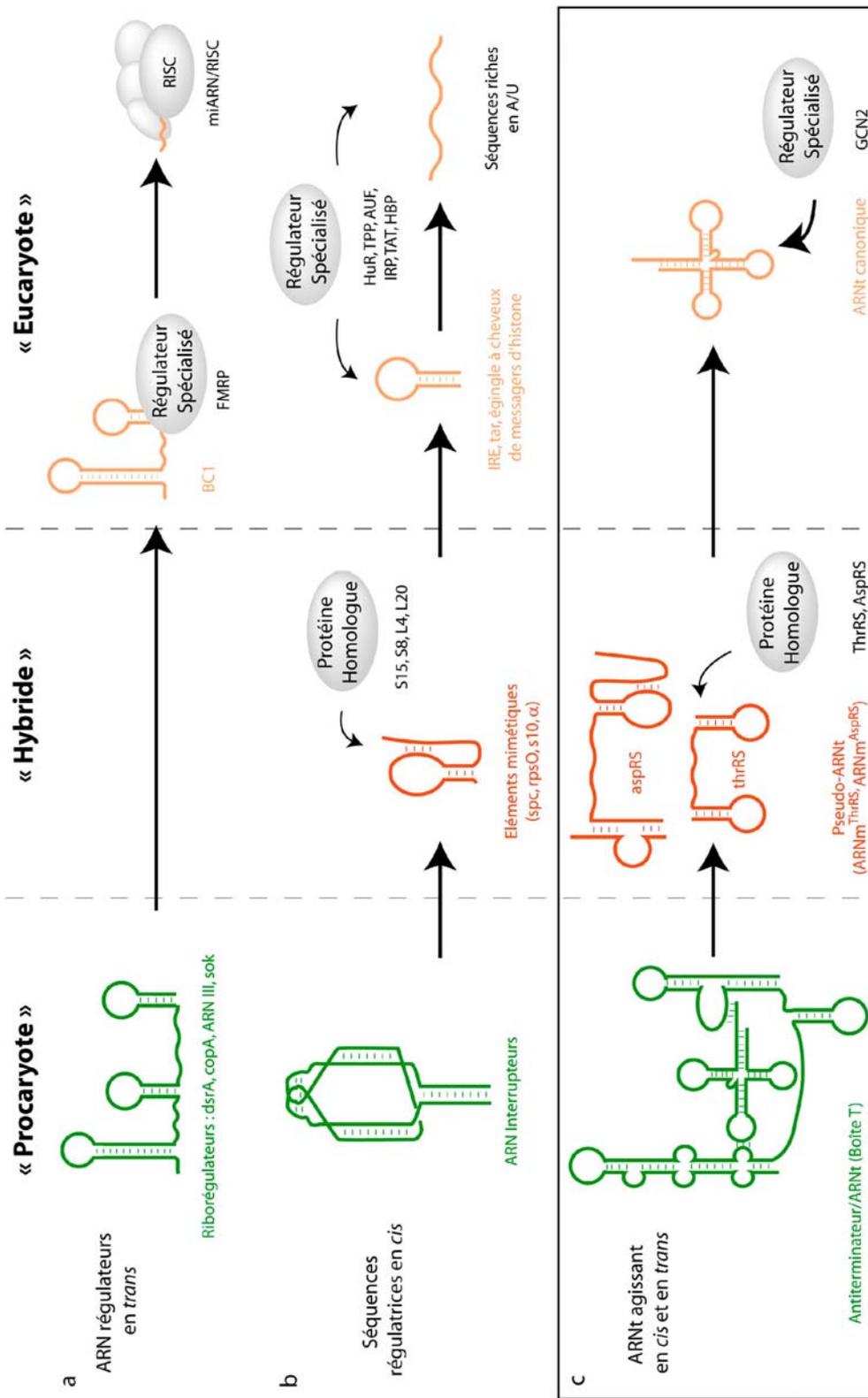


Figure 1 : Corrélation entre le degré de complexité des structures d'ARN régulateurs et le niveau d'évolution des organismes. Les structures sont réparties horizontalement en fonction du type auquel elles appartiennent : « procaryote » en vert, « eucaryote » en saumon ou « hybride » (procaryotes et eucaryotes unicellulaires) en rouge. Verticalement les structures sont classées selon la stratégie régulatrice employée, que l'ARN régulateur agisse en *trans*, en *cis* ou que le régulateur soit une structure d'ARNt agissant en *cis* ou en *trans*. Les structures d'ARN sont schématisées sous forme de fil de fer de couleurs différentes selon leur origine procaryote, eucaryote ou intermédiaire. Les partenaires protéiques des ARN régulateurs eucaryotes sont représentés par les disques gris. La structure secondaire de l'ARN *dsrA* (décrite dans le paragraphe I.1.2.2) illustre les ARN régulateurs bactériens, alors que le complexe BC1-FMRP représentatif des ARN régulateurs eucaryotes en *trans* sera décrit plus tard dans la section II.2.1 correspondant aux mimés d'ARNt, étant donné sa proximité de séquence avec l'ARNt^{Ala}.

« hybride » sont retrouvées chez les procaryotes et certains eucaryotes unicellulaires et mettent en jeu des motifs structuraux particulièrement intéressants puisqu'ils sont engagés dans des reconnaissances très subtiles qui reposent sur des repliements mimétiques. (iii) Enfin les structures de type « eucaryote » se distinguent par des conformations beaucoup plus épurées, se limitant le plus souvent à des régions d'ARN simple-brin ou en épingles à cheveux. Pour résumer, les motifs structuraux adoptés par les ARN ont tendance à se simplifier au cours de l'évolution. Ceci n'est pas sans conséquence au niveau fonctionnel. En effet, en se basant sur cette Figure récapitulative, il apparaît que, plus la structure de l'ARN est complexe (en général, chez les procaryotes), plus son « autonomie » fonctionnelle est renforcée. Au contraire, les motifs structuraux « simples » (le plus souvent chez les eucaryotes) sont assistés de protéines spécialisées dont le nombre peut être très important (par exemple pour le mécanisme des miARN). Cette remarque implique que les changements conformationnels sur lesquels s'appuie la fonction des riborégulateurs procaryotes disparaissent au cours de l'évolution pour des structures d'ARN figées, impliquées essentiellement dans le recrutement de facteurs protéiques non spécialisés (mécanismes d'autorégulation) ou spécialisés. L'accent sera mis sur les ARN de transfert (ARNt) dont la structure canonique ou des structures dérivées sont largement impliquées dans les régulations (Figure 1c). En particulier, j'insisterai sur les spécificités structurales et fonctionnelles des ARNt, leur omniprésence non seulement dans le monde des régulations, mais aussi dans certains mécanismes co-translationnels.

Enfin, un bilan des connaissances accumulées sur l'aspartyl-ARNt synthétase, dont la régulation est le sujet d'étude développé au cours de cette thèse, permettra de cerner les propriétés fonctionnelles de cette enzyme et les conséquences que cela entraîne.

I. Régulations de l'expression des gènes dirigées par l'ARN

Les régulations impliquant l'ARN varient selon les systèmes considérés, et peuvent affecter l'expression du gène au niveau de sa transcription, de la traduction de l'ARNm ou de n'importe quelle étape intermédiaire. Les exemples décrits dans cette Introduction sont, la plupart du temps, issus de mécanismes de régulation retrouvés chez les procaryotes, au cours desquels les structures mises en place sont souvent très élaborées.

En règle générale, lors d'une régulation transcriptionnelle, l'action du régulateur peut favoriser soit la formation d'un terminateur transcriptionnel, soit l'établissement d'une structure anti-terminatrice. Le terminateur transcriptionnel agit en déstabilisant l'association ADN matrice/ARN polymérase et ainsi promeut un arrêt prématuré de la transcription (terminaison), alors que l'anti-terminateur permet la progression de la transcription et l'expression du gène (anti-terminaison). Le même type de stratégie est employé au niveau traductionnel. Dans ce cas, le régulateur déplace un équilibre établi entre une séquence Shine-Dalgarno (S-D) libre et une forme où elle est associée à une séquence anti-S-D qui la rend inaccessible au ribosome. Ces stratégies sont peu caractérisées chez les eucaryotes où les structures d'ARN connues sont moins élaborées et où l'action régulatrice se fait principalement par le recrutement de protéines spécialisées qui induisent soit un encombrement stérique, soit une dégradation de l'ARNm cible.

1. ARN régulateurs en trans

Les ARN régulateurs en *trans* ont tous en commun de s'apparier avec l'ARNm cible. Ces contacts sont établis de façon spécifique et font, en général, intervenir des interactions canoniques (A-U, G-C et G•U). Dans ce cas précis, la Figure 1a met en avant une corrélation entre la complexité de la structure d'ARN mise en jeu dans la régulation et le degré d'évolution de l'organisme concerné. Par exemple, les organismes les plus évolués, les mammifères et les plantes, utilisent des *micro* ARN dont le rôle est limité à une fonction de guide où seule la structure primaire (séquence) de l'ARN est importante. Cette situation est comparable à ce que l'on observe dans la maturation des ARNm faisant intervenir les snRNP (small nuclear ribonucleo-particules) qui ne seront pas abordés ici. Ces mécanismes de régulation ne sont pas encore complètement élucidés et font intervenir un grand nombre de partenaires protéiques tant pour la maturation des miARN que pour leur fonction. En revanche, chez les procaryotes, il a été possible de mettre en évidence un grand nombre d'organisations structurales de l'ARN très complexes. On remarque

également que le rôle des protéines s'amenuise jusqu'à obtenir des systèmes purement ARN (ARN interrupteurs et riborégulateurs de type « bactérien »).

Cette Introduction fait un bilan partiel sur l'état des connaissances à ce jour et n'exclut pas que, à la vue du nombre croissant d'études entreprises chez les eucaryotes, des mécanismes utilisant des structures plus complexes que celles répertoriées ici puissent être mis à jour prochainement chez ces organismes.

1.1 Les ARN régulateurs de type « eucaryote » en trans : les *micro* ARN (miARN)

Les miARN ont été identifiés pour la première fois en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ces ARN régulateurs (*lin4* et *let7*) ont tout d'abord été considérés comme des cas isolés. Ce n'est qu'au début des années 2000 que (i) des études bioinformatiques ont mis en évidence leur conservation au cours de l'évolution et que (ii) les clonages systématiques d'ADNc ont mis au jour l'étendue de l'implication des miARN dans la vie cellulaire. A l'heure actuelle, beaucoup de miARN ont été identifiés tant chez les animaux que chez les plantes, toutefois leurs cibles sont encore peu caractérisées (Ambros, 2004). Les miARN agissent principalement par inhibition post-transcriptionnelle en s'appariant dans la région 3' non-traduite de l'ARNm. Cependant, la présence de sites de fixation dans les phases ouvertes de lecture n'est pas exclue. Ces régulateurs sont impliqués dans des mécanismes aussi divers que l'hématopoïèse, le contrôle du développement, la différenciation et la croissance cellulaire (Ambros, 2004; Harfe, 2005), mais aussi dans des mécanismes de défenses anti-virales ou d'ARN interférence (Voinnet, 2005; Wang et Metzloff, 2005), dans l'extinction de l'expression de gènes chez les plantes (Gendrel et Colot, 2005) ou encore dans la formation de l'hétérochromatine chez *S.pombe* (Martienssen et al., 2005). Si la biogenèse des miARN commence à être bien comprise, il n'en est pas de même pour leur mode d'action (Bartel, 2004; Cullen, 2004). Les modèles de biogenèse et de mécanisme d'action des miARN présentés dans les paragraphes suivants concernent les miARN (codés au niveau chromosomique) et les siARN (issus de virus, d'éléments génétiques mobiles ou introduits de façon artificielle) trouvés chez les animaux. Il faut noter que ces miARN sont certainement les ARN régulateurs les moins « autonomes ». En effet, leur biogenèse et leur fonction nécessitent l'assistance d'une lourde infrastructure protéique qui ne sera pas détaillée ici. Ils sont toujours associés à des particules ribonucléoprotéiques et leur rôle est restreint au guidage de ces complexes sur les ARN cibles à réguler.

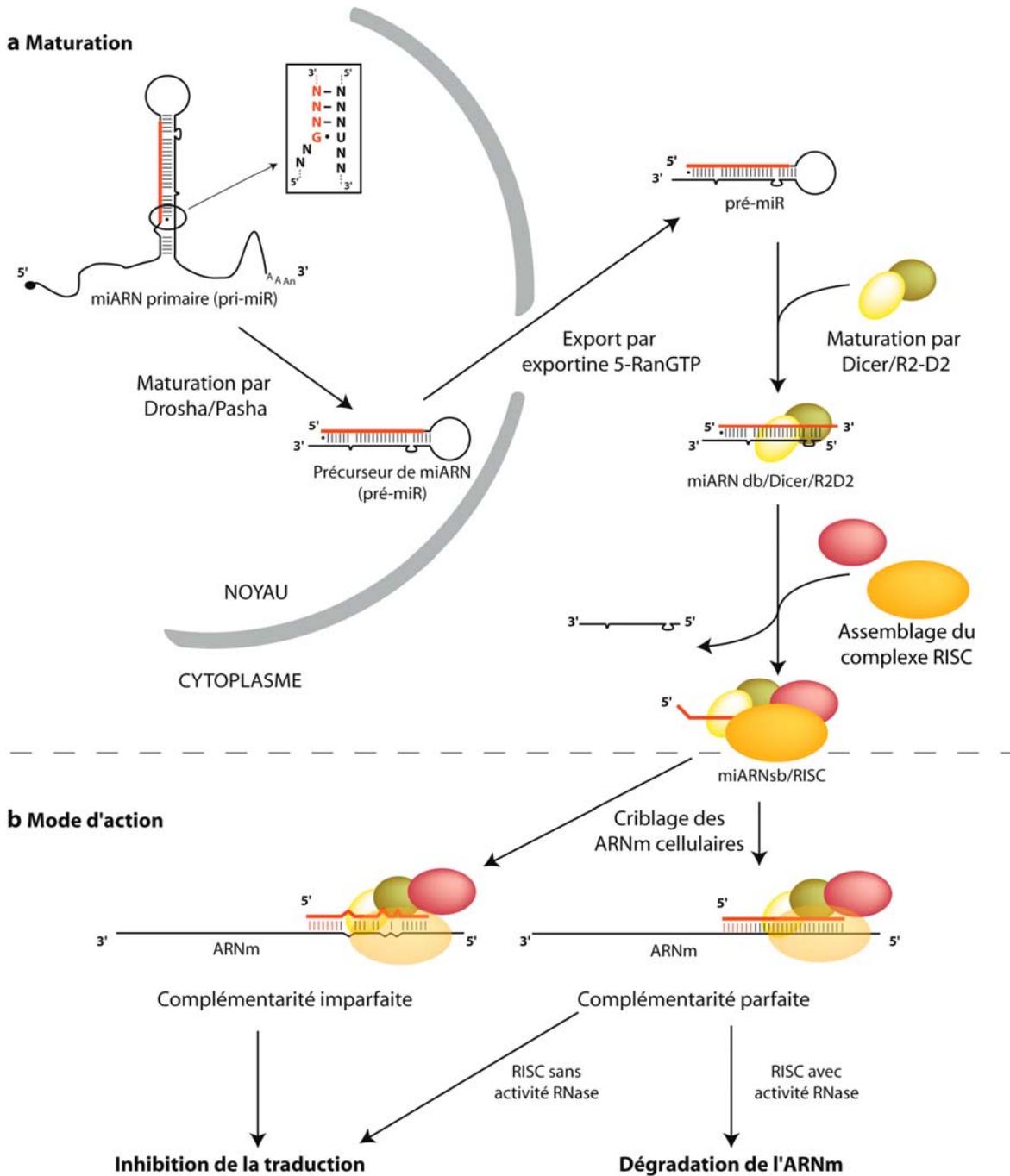


Figure 2 : Biosynthèse, structure et mécanisme d'action des miARN. **(a)** Maturation des miARN. Le transcrit primaire de miARN transcrit par l'ARN polymérase II est représenté coiffé en 5' (point noir) et poly-adenylé en 3' (An). La séquence correspondant au miARN mature est représentée en rouge dans l'insert et la paire de bases G•U fréquemment présente à la base de l'épingle à cheveux est symbolisée par un point. Une première maturation nucléaire du pri-miR catalysée par Drosha/Pasha libère un précurseur de miARN (pré-miR) exporté dans le cytoplasme par la voie exportine 5-RanGTP. Le pré-miR est maturé par Dicer/R2D2 qui reste associé au miARN double brin. Puis, RISC s'assemble sur ce dimère et sélectionne un des brins d'ARN. **(b)** Le complexe miARN/RISC crible alors les ARNm cellulaires. Les 7 paires de bases établies avec l'extrémité 5' du miARN nécessaires à l'obtention d'un complexe productif sont représentées en rouge. Enfin, le taux de complémentarité et la présence ou non d'une activité RNase au sein de miARN/RISC oriente l'ARNm vers la dégradation ou une inhibition de sa traduction. Figure adaptée de Filipowicz et al., 2005.

Transcription et maturation des miARN. Bien que certains miARN soient originaires de régions introniques, ou plus rarement de régions 3' non-traduites d'ARNm, la majeure partie d'entre eux est exprimée à partir d'un promoteur indépendant, en réponse à des activateurs transcriptionnels encore peu caractérisés (Cullen, 2004). Les gènes de miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II sous forme de longs précurseurs coiffés en 5' et poly-adiénylés en 3' (pri-miR). Il n'est pas rare que les gènes de miARN soient regroupés sur le génome et qu'ils soient exprimés au sein d'un transcrit primaire polycistronique (Cullen, 2004). Tous subissent une maturation très précise qui implique un grand nombre de protéines (Filipowicz et al., 2005). La Figure 2a résume les principales étapes de cette maturation. Dans un premier temps, le transcrit primaire (pri-miR) subit une pré-maturation nucléaire faisant intervenir le complexe Microprocesseur (Drosha/Pasha) pour libérer un précurseur de miARN (pré-miR). Le pré-miR correspond à une structure en épingle à cheveux d'environ 60 nucléotides, caractérisée par une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-sortante de 2 résidus. Le pré-miR est ensuite exporté dans le cytoplasme par le transporteur exportin 5-RanGTP et y subit un second niveau de maturation, catalysé par le dimère Dicer/R2D2. Le miARN produit est alors un petit ARN double-brin de 22 nucléotides possédant deux extrémités 3'-sortantes. Un seul brin du duplex d'ARN est pris en charge par le complexe protéique RISC (RNA Induced Silencing Complex). La discrimination entre ces deux brins repose sur la stabilité relative de leurs deux extrémités et l'intervention d'une hélicase. En effet, une asymétrie de stabilité est souvent introduite dans ces ARN par le biais d'une paire de bases non-canonique G•U à la base de l'hélice (G étant présent à l'extrémité 5' de l'épingle à cheveux) (Cullen, 2004).

Reconnaissance de l'ARNm cible et mécanisme de régulation. La ribonucléoparticule miARN/RISC scanne les ARNm cellulaires et y recherche des séquences complémentaires au miARN (Figure 2b). Les différentes interactions établies entre RISC et le petit ARN permettent une présentation optimale de celui-ci. En effet, pour qu'une interaction entre miARN/RISC et un messenger soit productive, il faut impérativement que les 7 résidus 5' terminaux du miARN soient appariés à l'ARNm cible (Lai, 2005), la perte d'une seule de ces interactions étant suffisante pour empêcher la mise en route du mécanisme de régulation. La formation de cette hélice parfaite constitue le point de nucléation de l'association et permet l'établissement d'interactions supplémentaires entre la cible et l'ARN guide. Le degré d'appariement entre les deux ARN définit le devenir de la cible.

Ainsi une forte complémentarité rend le complexe compétent pour un clivage du messenger, alors qu'une association partielle est à l'origine d'une inhibition de la traduction. Cependant, la dégradation ou non du messenger n'est pas uniquement dictée par cette complémentarité, mais dépend également de la composition du complexe RISC (présence d'une activité RNase ou non) qui ne sera pas détaillée ici. Dans le cas de la dégradation, une coupure est catalysée sur l'ARNm cible entre les paires de bases 10 et 11 du duplex ARNm cible/miARN. Ce clivage constitue un point d'accès pour d'autres RNases, dont celles de l'exosome, et conduit à la dégradation totale de l'ARNm. En revanche, l'inhibition de la traduction implique un mécanisme encore peu connu où la fixation de RISC ralentirait, ou bloquerait le mouvement du ribosome sur le messenger.

1.2 Les riborégulateurs de type « procaryote »

Chez les bactéries, les architectures moléculaires rencontrées dans les mécanismes de régulation exploitent largement la plasticité et la dynamique de l'ARN pour élaborer des structures complexes et fonctionnelles. Deux classes de riborégulateurs coexistent chez les bactéries (Wagner et al., 2002). On distingue tout d'abord les ARN issus d'éléments génétiques parasites (plasmides, transposons et bactériophages), codés au même locus que leur cible, mais transcrits en orientation inverse. Ainsi, la complémentarité parfaite entre l'ARN régulateur et l'ARNm cible restreint son action à une seule cible. La seconde classe d'ARN régulateurs est d'origine chromosomique. En général, ces ARN sont codés à un locus différent de celui de leurs cibles, ne sont que partiellement complémentaires à celles-ci et régulent, le cas échéant, plusieurs ARNm.

Selon le cas, l'appariement entre le riborégulateur et sa cible conduit soit à une modification de l'accessibilité de la séquence S-D au ribosome, soit à la création d'un site reconnu par une endoribonucléase, mais dans tous les cas l'ARNm cible subit un remodelage de sa structure. Enfin, contrairement aux miARN, les riborégulateurs bactériens ne font pas intervenir de lourdes machineries protéiques, à l'exception de la protéine chaperonne Hfq (Host factor Q) qui peut s'avérer nécessaire dans certains cas (dsrA).

1.2.1 Riborégulateurs antisens codés par des éléments génétiques parasites

Les modes de régulation impliquant des riborégulateurs codés par des éléments génétiques parasites seront illustrés par deux systèmes complémentaires, décrits dans le cas

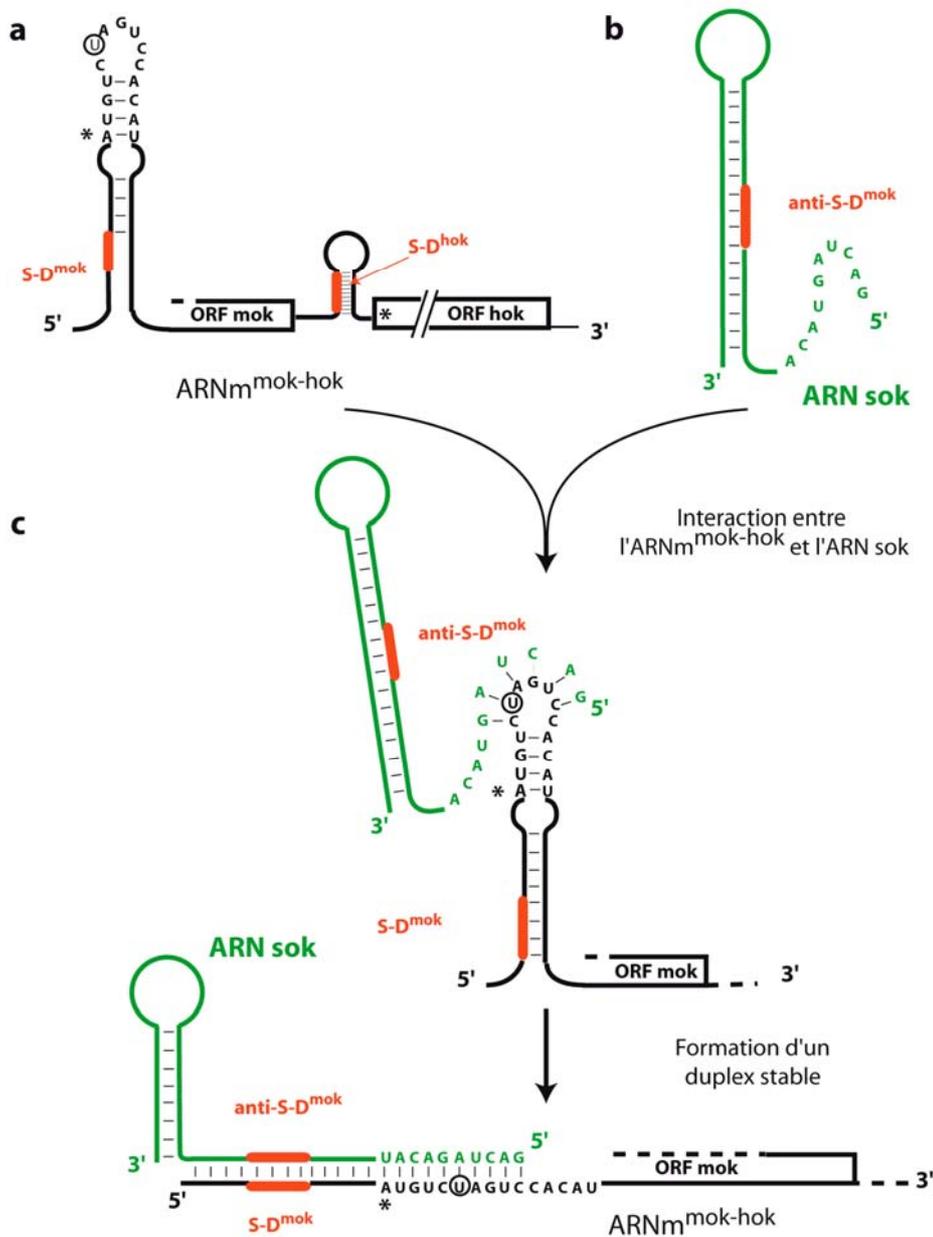


Figure 3 : Structure et interaction de l'ARNm^{mok-hok} et de l'ARN sok impliqués dans le mécanisme de maintien du plasmide R1 dans *E.coli*. (a) Organisation structurale de l'ARNm^{mok-hok}. Les séquences Shine-Dalgarno, S-D^{mok} et S-D^{hok} sont indiquées en rouge, et les codons d'initiation de la traduction sont représentés par un astérisque. Le résidu U, conférant sa conformation en « U-turn » à la boucle de l'épingle à cheveux présente en amont de l'ORF^{mok}, est encerclé. Alors que dans cette conformation, S-D^{mok} est accessible au ribosome, la séquence S-D^{hok}, en aval, est placée dans une conformation inactive au sein d'une structure secondaire. (b) Organisation structurale de l'ARN sok en épingle à cheveux contenant une séquence complémentaire à la séquence S-D^{mok} en rouge, et 11 résidus 5' terminaux simple-brin. (c) L'association entre les deux ARN débute par la reconnaissance de la boucle de la première épingle à cheveux de l'ARNm^{mok-hok} par l'extrémité 5' simple-brin de l'ARN sok. Cette interaction évolue ensuite rapidement vers la formation d'un duplex stable où les régions S-D^{mok} et anti-S-D^{mok} sont appariées, inhibant la traduction de l'ORF^{mok} et de l'ORF^{hok}. Figure établie selon le mécanisme décrit par Thisted et al., 1994.

du plasmide R1. Cette unité extrachromosomique retrouvée chez *Escherichia coli* a développé différents mécanismes pour d'une part, assurer son maintien dans la cellule (système hok/sok) et d'autre part, limiter son nombre de copies (système copA/copT).

Maintien du plasmide R1 dans E.coli. Pour se maintenir dans la cellule, le plasmide R1 utilise un ingénieux système basé sur l'expression d'une protéine toxique (Hok pour Host Killing) produite uniquement si le plasmide est perdu par la bactérie (Gerdes et al., 1986). Cette toxine est codée par l'ARNm^{mok-hok} et son expression dépend de la traduction préalable de la phase ouverte de lecture mok (mediation of killing) en amont (Thisted et Gerdes, 1992; Thisted et al., 1995) (Figure 3a). L'expression du gène *Hok* est régulée à deux niveaux. D'une part, la région 3' non-traduite de l'ARNm^{mok-hok} s'apparie avec la séquence S-D^{mok} et la rend inaccessible au ribosome (non montré sur la Figure). D'autre part, le plasmide code pour un riborégulateur, sok (suppressor of killer) qui est un petit ARN de 67 nucléotides, organisé en une longue tige-boucle précédée de 11 résidus non appariés (Figure 3b). L'ARN sok s'hybride à la séquence S-D^{mok}, apportant ainsi un second niveau de verrouillage à l'expression de l'ARNm^{mok-hok}. La région simple-brin de sok s'hybride à la tige-boucle située à l'extrémité 5' de l'ARNm^{mok-hok} (Figure 3c) et ce complexe évolue rapidement vers la formation d'un duplex stable bloquant l'accès de S-D^{mok} au ribosome (Thisted et al., 1994). La boucle apicale de l'ARNm^{mok-hok} se distingue par une organisation en « U-turn » initialement identifiée dans les ARN de transfert. C'est une structure caractéristique commune à la plupart des boucles intervenant dans de tels mécanismes de reconnaissance, qui agit vraisemblablement en présentant la chaîne ribose-phosphate dans une conformation favorable aux interactions ARN/ARN (Franch et al., 1999).

L'ARNm^{mok-hok} est très stable en comparaison de l'ARN sok. Ainsi, après division, si une des cellules filles ne reçoit pas un exemplaire du plasmide R1, l'ARN sok s'épuise plus rapidement que l'ARNm cible et ne pourra plus réprimer la synthèse de Hok dont la production rapide entraîne la mort de la cellule.

Réplication du plasmide R1 dans E.coli. Le plasmide R1 dispose, en plus de son système de maintien dans la cellule exposé précédemment, d'un mécanisme de contrôle de sa réplication lui garantissant une présence en faible nombre de copies. L'initiation de la réplication du plasmide dépend de l'expression préalable de la protéine RepA. La traduction de l'ORF^{repA} est couplée à la traduction d'une courte séquence (tap) placée en

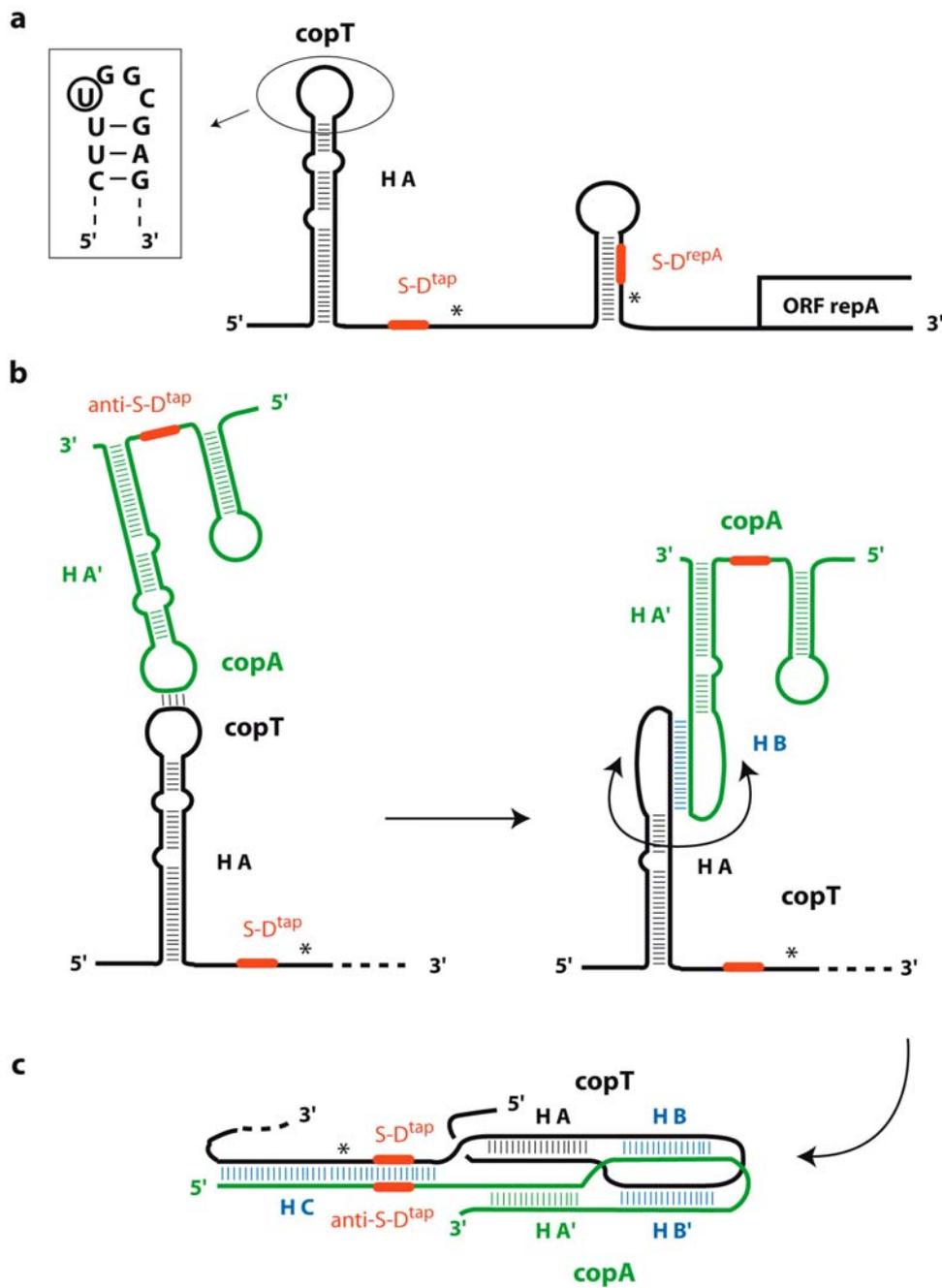


Figure 4 : Structures secondaires et mécanisme de reconnaissance entre les ARN *copA* et *copT* impliqués dans la régulation de la réplication du plasmide R1. **(a)** Organisation structurale de l'ARN en amont de l'ORF^{repA}. La région *copT* est repliée sous la forme d'une hélice irrégulière (HA), fermée par une boucle (tetraloop) adoptant une organisation en « U-turn » (détaillée dans l'insert). Les séquences S-D^{tap} et S-D^{repA} sont représentées en rouge et leurs codons initiateurs respectifs sont indiqués par des astérisques. **(b)** Différentes étapes de l'interaction *copA*-*copT*. A gauche, l'association entre les deux ARN débute par une interaction entre les deux boucles apicales de *copT* (noir) et de *copA* (vert). A droite, les parties supérieures des hélices HA et HA' se dissocient pour former l'hélice intermoléculaire HB (bleu). **(c)** Les régions simple-brin restantes s'associent en hélices HB' et HC (bleu) entraînant l'appariement des séquences S-D^{tap} de *copT* et anti-S-D^{tap} de *copA* (rouge). Figure adaptée de Kolb et al., 2001.

amont (Wagner et al., 1987; Blomberg et al., 1992) (Figure 4a). La traduction de l'ORF^{tap} dépend elle-même de la présence en amont d'une structure en tige-boucle de 47 nucléotides (copT). CopT est reconnue spécifiquement par le riborégulateur antisens copA constitué de 91 nucléotides organisés en deux épingle à cheveux. En s'appariant à copT, copA capture la séquence S-D^{tap}, la rendant inaccessible au ribosome. Le mode de reconnaissance entre copA et copT a été particulièrement bien étudié au niveau structural (Figure 4b) et suit une hiérarchie d'événements dictés également par la présence d'un « U-turn » dans la boucle apicale de copT (Kolb et al., 2000a; Slagter-Jäger et Wagner, 2003). Elle débute tout d'abord par une interaction boucle-boucle qui évolue rapidement en complexe boucle-boucle étendu (Kolb et al., 2000b). Cette progression est rendue possible par la présence de bulges (bulles internes) qui affaiblissent les hélices intramoléculaires (HA et HA') au profit des hélices intermoléculaires HB et HB' (Kolb et al., 2001b) dont l'empilement permet de former une jonction originale à quatre hélices en X (Kolb et al., 2001a). Ceci a pour effet un rapprochement des régions simple-brins de copA et copT, dont l'association en hélice HC emprisonne la séquence S-D^{tap} (Figure 4c) et réprime ainsi la traduction de tap et de repA. Une association en duplex étendu peut être observée *in vitro*, toutefois aucune preuve de son existence n'a été fournie *in vivo*. Un ultime niveau de régulation est apporté par un clivage du duplex par la RNase III (Blomberg et al., 1990). Cette enzyme dégrade spécifiquement les ARN double-brins, comme le duplex copA-copT, mais ses composants isolés (copA ou copT) sont protégés par la présence des résidus en bulges (Hjalt et Wagner, 1995). Cette répression est exercée tant que la concentration en copA, proportionnelle à la concentration en plasmide, est maintenue au-dessus d'un certain seuil. Inversement, une fois que la concentration en plasmide est réduite, la répression de RepA est levée et la réplication du plasmide à nouveau activée.

1.2.2. ARN régulateurs codés au niveau chromosomique

Contrairement aux ARN régulateurs codés par des éléments génétiques parasites, les riborégulateurs codés au niveau chromosomique n'ont qu'une complémentarité limitée avec l'ARNm cible et, selon le cas, ils peuvent avoir une cible unique (micF) ou un spectre d'action beaucoup plus large (ARN III, dsrA) (Wagner et Vogel, 2003). Néanmoins, le mode de reconnaissance de l'ARNm cible par ces riborégulateurs est bien moins compris que pour leurs pendants codés par des éléments génétiques parasites décrits précédemment. Ces ARN régulateurs interviennent essentiellement dans des contrôles liés à des conditions

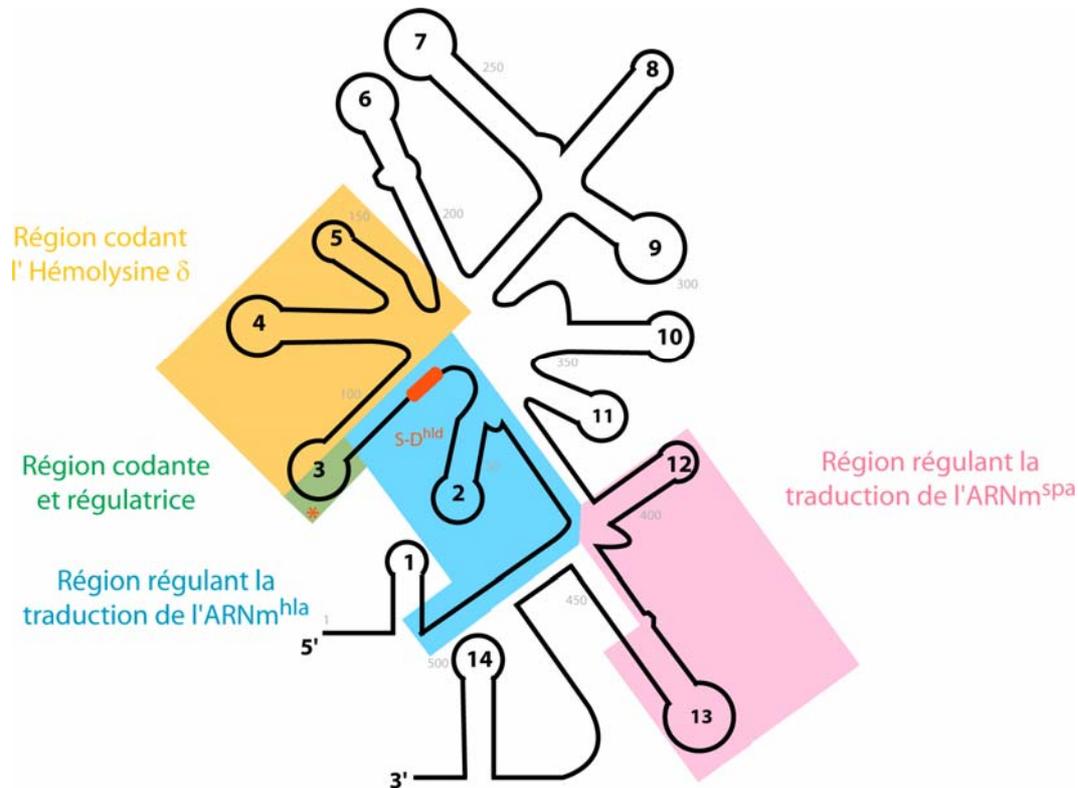


Figure 5 : Organisation structurale de l'ARN III de *Staphylococcus aureus*. La structure secondaire de l'ARN III comprend 14 épingles à cheveux numérotées en gras dans leur boucle. Les régions (i) codant pour l'hémolysine δ , (ii) activant la traduction de la toxine α et (iii) réprimant la synthèse de la protéine A, sont surlignées en ocre, bleu et rose, respectivement. La région assurant à la fois une fonction codante et une fonction régulatrice est signalée en vert. La séquence S-D^{hld} est en rouge et le codon initiateur est indiqué par un astérisque. Figure adaptée de la structure déterminée par Benito et al., 2000.

de stress élevé, période de la vie cellulaire où l'économie d'énergie est vitale. L'utilisation des riborégulateurs prend alors tout son sens grâce au faible coût énergétique de leur production comparé à celui de la synthèse d'une protéine. Les promoteurs de ces riborégulateurs contiennent de nombreux sites de fixation de facteurs de transcription, eux-mêmes activés dans des conditions de stress intense telles que l'augmentation de la température ou de l'osmolarité, un stress oxydatif ou la présence de certains antibiotiques dans le milieu.

Riborégulateur chromosomique à cible unique : micF. MicF est le premier riborégulateur chromosomique à avoir été découvert chez *E.coli* (Delihias et Forst, 2001). Cet ARN non-traduit est composé de 93 nucléotides et se replie en 2 petites tige-boucles. Il est conservé dans de nombreuses entérobactéries et est exprimé de façon inductible. Il réprime l'expression de la protéine OmpF (Outer Membrane Protein F) qui, sous sa forme homotrimérique, constitue une porine garantissant le transport passif de petites molécules hydrophobes à travers la membrane externe. Ainsi, une fois transcrit, micF inhibe la traduction de l'ARNm^{ompF} en s'y appariant et en séquestrant sa séquence S-D^{ompF} et son codon initiateur dans une structure secondaire inaccessible au ribosome. Cependant, le mécanisme exact de cette reconnaissance est peu connu, mais certaines données suggèrent que l'association des deux ARN constitue un signal conduisant à la dégradation de l'ARNm^{ompF} par intervention de partenaires encore non-identifiés.

De même, la traduction d'une autre perméase (OmpC) est régulée suivant le même principe, mais implique le riborégulateur micC, et requiert l'assistance de la protéine chaperonne Hfq (Chen et al., 2004).

Riborégulateurs chromosomiques à cibles multiples : l'ARN III et dsrA. L'ARN III de *Staphylococcus aureus* est l'exemple typique d'un riborégulateur à cibles multiples. Il est composé de 514 nucléotides organisés en 14 tige-boucles et comporte différents domaines fonctionnels (Benito et al., 2000) (Figure 5). Cet ARN pléiotropique est d'une part un ARNm (ARNm^{hld}) codant pour l'hémolysine δ (tige-boucles 3, 4 et 5) et d'autre part est impliqué dans l'expression de nombreux gènes de protéines de surface et de protéines sécrétées grâce à 2 domaines régulateurs (tige-boucle 2 et tige-boucles 12 et 13) (Johansson et Cossart, 2003). Son mode d'action varie d'une régulation à une autre et implique des mécanismes moléculaires très différents.

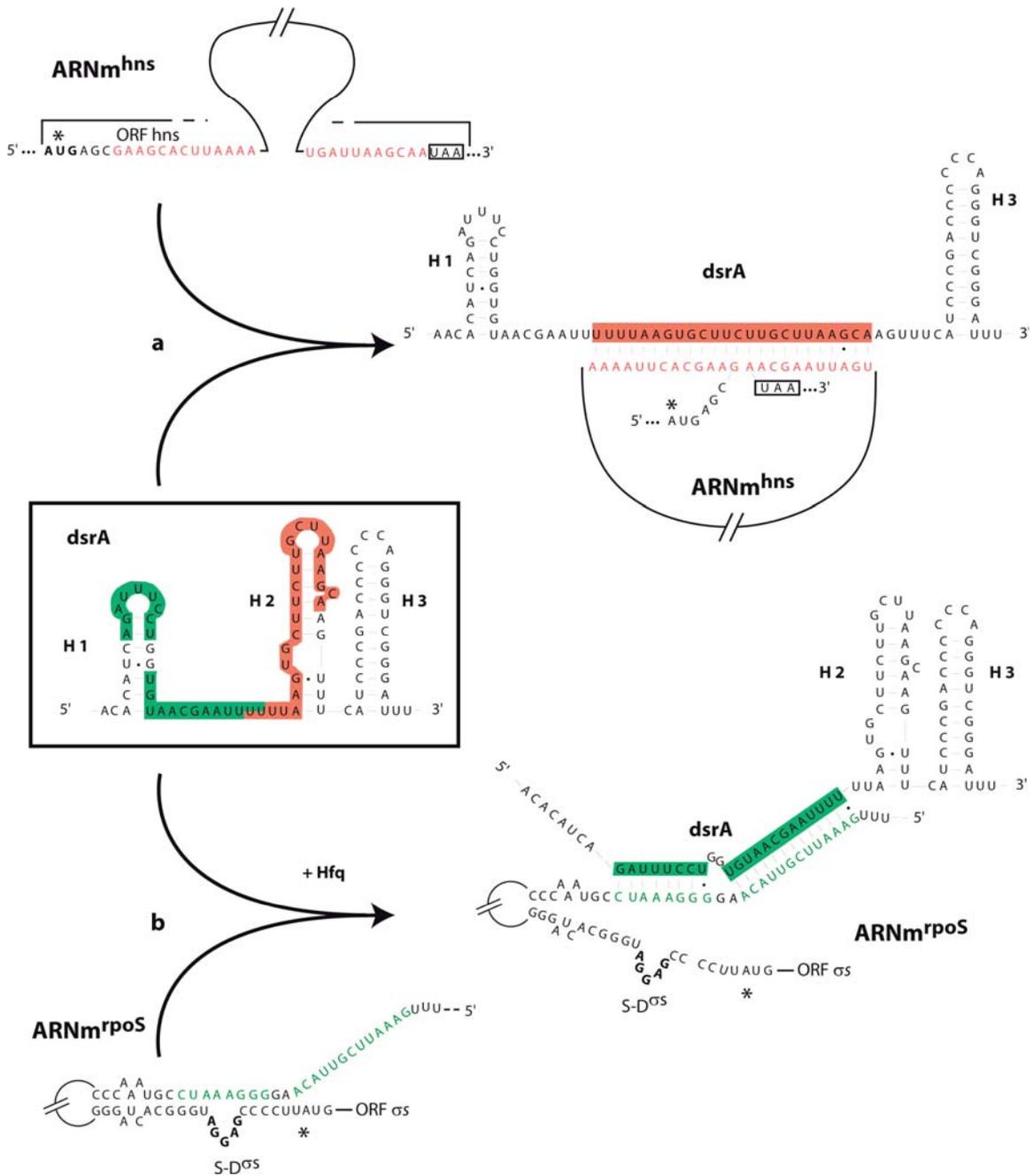


Figure 6 : Mode de reconnaissance entre l'ARN *dsrA* et les *ARNm^{hns}* et *ARNm^{rpoS}*. L'organisation secondaire de l'ARN *dsrA* est encadrée. Les régions impliquées dans la reconnaissance de l'*ARNm^{hns}* (hélice H2 rouge) et de l'*ARNm^{rpoS}* (hélice H1 verte) sont indiquées. (a) L'interaction entre *dsrA* et l'*ARNm^{hns}* fait intervenir les résidus 5' et 3' terminaux de l'ORF^{hns} (en rouge) et l'hélice H2 de *dsrA*. Cette reconnaissance conduit à la formation d'un duplex étendu qui sera reconnu par la RNase III, initiant ainsi la dégradation de l'ARNm. (b) *DsrA* reconnaît une région (résidus en vert) en amont de la séquence S-D^{σS} (résidus en gras) de l'*ARNm^{rpoS}*. Cette interaction est assistée par Hfq et conduit à la libération de la séquence S-D^{σS} et à l'activation de la traduction de l'*ARNm^{rpoS}*. Les codons initiateurs sont indiqués par un astérisque et le codon Stop est encadré. Figure adaptée de Lease et al., 2000.

La première cible de cet ARN régulateur est lui-même. En effet, la transcription de l'ARN III débute au cours de la phase exponentielle de croissance de la bactérie et est maximale en phase stationnaire. Elle est induite, suite à l'augmentation de la population bactérienne, en réponse à une concentration élevée de phéromone AgrD dans le milieu (Lyon et Novick, 2004). Toutefois, sa traduction en hémolysine δ ne débute qu'une heure après sa transcription. Cette période de « silence » est imposée par une « autorégulation » purement traductionnelle où les régions S-D^{hld} et 3' non-traduite du messenger sont appariées et empêchent la fixation du ribosome (Balaban et Novick, 1995).

Les propriétés riborégulatrices de l'ARN III sont remarquablement vastes et dirigent l'activation de la synthèse d'enzymes et de toxines extracellulaires (toxine alpha, hémolysines, protéases, nucléases...) et la répression de la production de protéines de surface (protéine A, coagulase et récepteur de la fibronectine). Ce large spectre de régulation est la conséquence d'une propriété essentielle de l'ARN III qui agirait indirectement en détournant les facteurs de transcription impliqués dans la transcription de ces gènes (répresseurs ou activateurs). De plus, l'ARN III module à un niveau post-transcriptionnel l'expression de l'ARNm^{hla} (code pour la toxine alpha) et de l'ARNm^{spa} (code pour la protéine de surface A), mais avec des conséquences opposées. Il stimule la traduction de l'ARNm^{hla} alors qu'il inhibe la traduction de l'ARNm^{spa}.

L'ARNm^{hla} est reconnu spécifiquement par l'extrémité 5' de l'ARN III (nucléotides 15 à 87) *in vivo* et *in vitro* (Figure 5). La formation de ce complexe conduit à la libération de la séquence S-D^{hla}, jusque-là emprisonnée dans une structure compacte (Morfeldt et al., 1995). Au contraire, le domaine 3' de l'ARN III (nucléotides 384 à 445) s'hybride à la séquence S-D^{spa} et en bloque l'accès au ribosome, inhibant ainsi sa traduction. De plus, le duplex étendu formé entre l'ARN III et l'ARNm^{spa} constitue un site de coupure par la ribonucléase III et apporte un niveau de régulation supplémentaire (Huntzinger et al., 2005).

DsrA est un autre exemple d'ARN régulateur à cibles multiples présent chez *E.coli* (Lease et Belfort, 2000) et impliqué dans l'expression de deux ARNm, l'ARNm^{hns} et l'ARNm^{tpoS}, codant pour un répresseur transcriptionnel et le facteur σ_s respectivement. L'ARN dsrA n'est pas traduit et sa transcription est activée en conditions de stress, telles qu'une température basse ou un choc osmotique. Les 87 nucléotides de cet ARN s'organisent en trois tige-boucles. Les hélices H1 et H2 constituent les sites régulateurs s'appariant aux cibles, alors que l'hélice H3 est le terminateur de transcription de l'ARN

(Figure 6). L'appariement entre *dsrA* et l'ARNm^{hns} fait intervenir l'hélice H2 de *dsrA* et les séquences S-D^{hns} et 3' non-traduite de l'ARNm^{hns} (Figure 6a). Cette complémentarité crée une région hélicale régulière sensible à l'endonucléase III, et dirige ainsi une répression basée sur une réduction de la demi-vie de l'ARNm. En revanche, l'hélice H1 et la région interhélicale (H1-H2) de *dsrA* interagissent avec la région anti-S-D^{rpoS}, libèrent la séquence S-D^{rpoS} et activent la traduction de la protéine (Figure 6b).

Les mécanismes qui ont été décrits sont les systèmes les mieux étudiés parmi la trentaine de riborégulateurs connus à ce jour (Wagner et al., 2002). Certains d'entre eux font intervenir la protéine chaperonne Hfq. Cette protéine est apparentée à la famille des protéines Sm (composantes de la machinerie d'épissage chez les eucaryotes) et est active sous forme d'hexamères qui s'organisent en anneau (Sauter et al., 2003). Le mode d'interaction de Hfq avec l'ARN n'est pas connu, toutefois plusieurs modèles sont proposés selon lesquels Hfq agirait en augmentant la concentration locale en ARN et/ou en remodelant la structure de celui-ci (Storz et al., 2004). De récentes études ont mis en évidence la contribution de Hfq à la formation des complexes ARN III-ARNm^{spa} (Huntzinger et al., 2005) et *dsrA*-ARNm^{rpoS} (Brescia et Sledjeski, 2003). Par exemple, Hfq favoriserait le repliement optimal de *dsrA* pour interagir avec l'ARNm^{rpoS} (Lease et Belfort, 2000), et le protégerait également de la RNaseE (Moll et al., 2003). La régulation de l'expression de *RpoS* fait également intervenir un autre riborégulateur, *oxyS*, (antagoniste à *dsrA*), qui réprime la traduction de l'ARNm^{rpoS} en séquestrant la protéine Hfq (Brescia et Sledjeski, 2003).

Les exemples de « riborégulations » en *trans* qui viennent d'être présentés suivent le modèle de simplification des structures d'ARN régulatrices au cours de l'évolution. Cette simplification structurale est corrélée à une limitation du rôle fonctionnel de l'ARN qui est assisté, puis progressivement remplacé, par les protéines. Au contraire, la diminution du nombre de facteurs protéiques associés aux ARN régulateurs en *trans* chez les bactéries s'accompagne de l'apparition de structures plus complexes et plus dynamiques. Dans la deuxième partie de cette Introduction, nous allons voir que cette proposition de schéma évolutif est confirmée lorsque l'on s'intéresse aux régions régulatrices portées en *cis* sur les ARNm dont l'expression est régulée.

2. Séquences régulatrices d'ARN en *cis*

Les séquences ARN régulatrices en *cis* sont, en général, localisées dans les régions non codantes des ARNm et sont caractérisées par des structures bien définies capables d'accommoder spécifiquement une macromolécule (métabolite ou protéine). Selon le ligand impliqué, on distinguera les ARN interrupteurs, dont la région aptamère fixe un métabolite, des structures d'ARN recrutant des facteurs protéiques. Comme cela est le cas pour les ARN régulateurs en *trans*, la complexité des structures d'ARN régulatrices en *cis* ainsi que leur niveau d'implication dans les différents mécanismes de régulation sont, encore une fois, corrélés avec le degré d'évolution de l'organisme considéré (Figure 7). Les ARN interrupteurs se retrouvent essentiellement chez les procaryotes alors que les structures recrutant des protéines spécialisées sont plus souvent présentes chez les eucaryotes. Une situation intermédiaire (hybride) correspond à des mécanismes d'autorégulation, retrouvés aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes unicellulaires, où les ARNm sont reconnus par les protéines qu'ils codent.

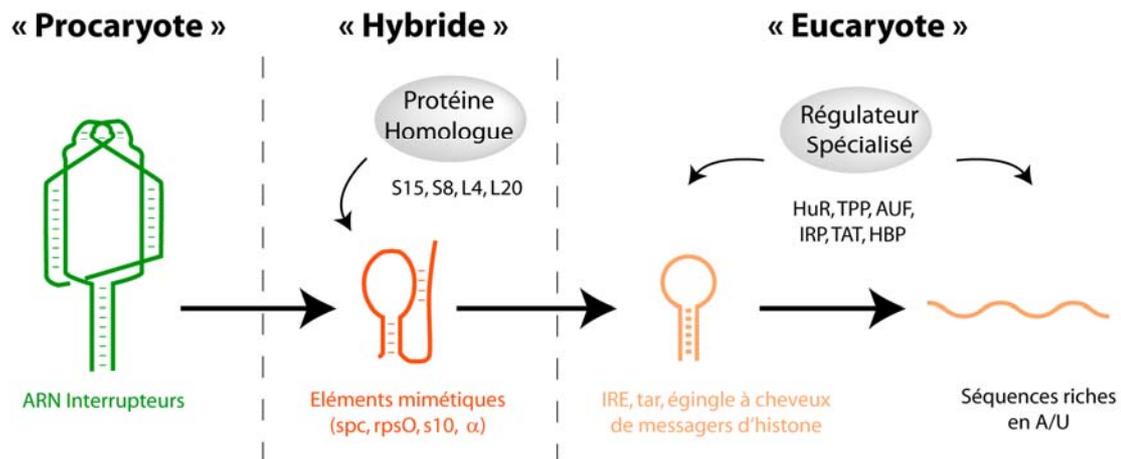


Figure 7 : Evolution des structures secondaires adoptées par les régulateurs en *cis*. La situation « hybride » correspond à des situations rencontrées essentiellement chez les procaryotes et les eucaryotes unicellulaires. C'est le cas, en particulier, des mimes de structures d'ARN retrouvés dans les mécanismes d'autorégulation caractéristiques de l'expression des gènes de protéines ribosomiques.

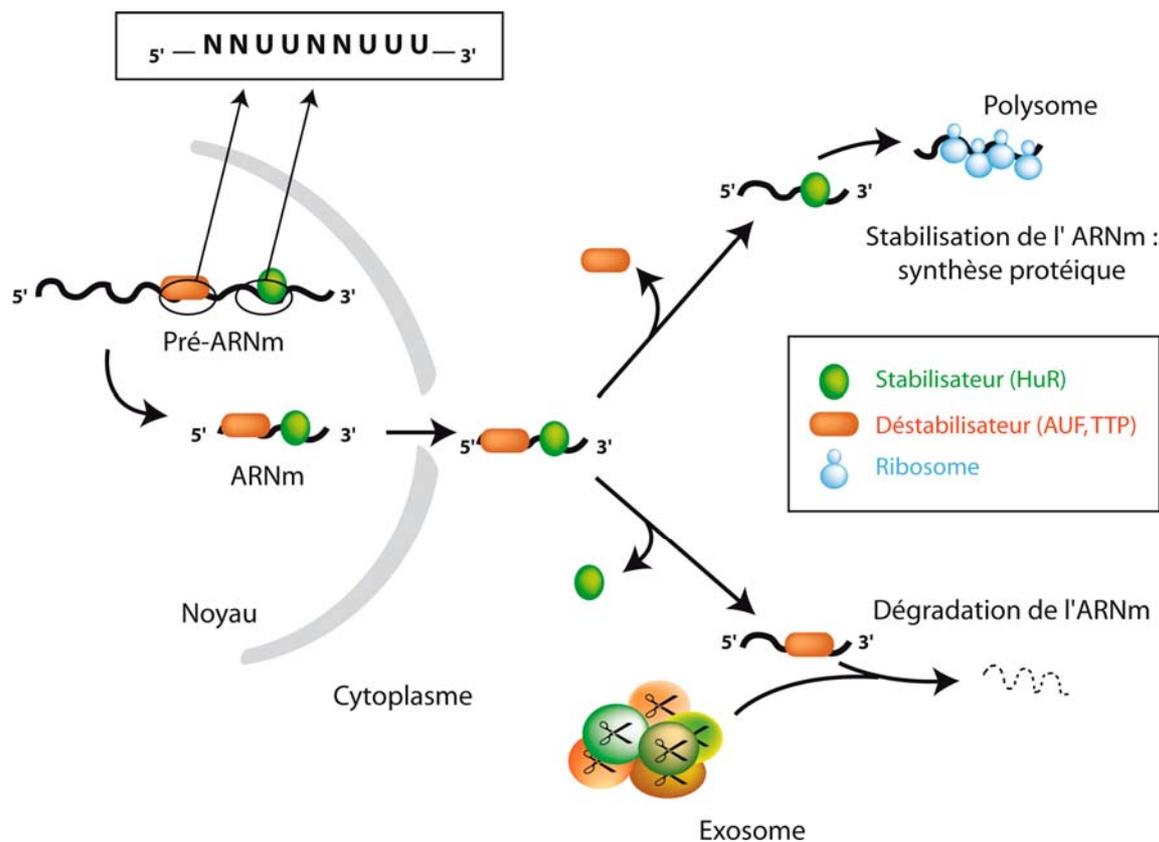


Figure 8 : Modèle proposé pour la régulation basée sur la stabilité des ARNm riches en A et en U. L'ARNm fraîchement transcrit est reconnu dans le noyau par les stabilisateurs (vert) et les déstabilisateurs (rouge), au niveau de régions riches en A et en U dont la séquence consensus est représentée dans l'encadré. Après maturation, l'ARNm est exporté dans le cytoplasme où une seule classe de protéines reste associée à l'ARNm. La conservation du stabilisateur (vert) permet au complexe de prendre la voie de la traduction, alors que la conservation du déstabilisateur (rouge) conduit au recrutement de l'exosome et à la dégradation de l'ARNm. Figure adaptée de Lal et al., 2004.

2.1 Eléments régulateurs de type « eucaryote » en *cis*

Les motifs régulateurs en *cis* trouvés chez les organismes eucaryotes sont essentiellement de deux types. Soit ils ne présentent pas de structure à proprement parler comme cela est le cas des régions riches en A et en U, soit ils sont présentés dans un environnement structural rarement plus complexe qu'une tige-boucle.

2.1.1 Régulations dirigées par les régions riches en A et U

Chez les animaux, les régions riches en A et en U (ARE) agissent essentiellement en modulant la stabilité d'ARNm caractérisés par une courte durée de vie, tels que ceux codant pour des cytokines (IL-8, TNF- α) et des oncogènes (c-Fos) (Zhang et al., 2002). Ces séquences ARE (une dizaine de résidus répétés) sont présentes dans la région 3' non-traduite des messagers et recrutent des protéines permettant de stabiliser (protéines Hu) ou, au contraire, de déstabiliser (AUF-1, TPP...) les ARNm. Hormis la richesse en résidus A et U, peu de données sont disponibles concernant l'organisation structurale de ces régions, exception faite des régions impliquées dans le recrutement des protéines stabilisatrices Hu.

Les protéines Hu rassemblent quatre membres. Trois d'entre eux, HuB, C et D, sont exclusivement exprimés dans les cellules nerveuses alors que HuR est ubiquitaire. Ces facteurs sont essentiellement nucléaires et se lient aux ARE grâce à deux motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM). Récemment, deux études ont permis d'identifier une séquence consensus NNUUNNUUU reconnue par HuR (Meisner et al., 2004; Silanes et al., 2004), dont le maintien sous la forme simple-brin est essentiel à sa reconnaissance par la protéine (Meisner et al., 2004). Ceci a été mis en évidence grâce à la structure cristallographique de HuD en complexe avec l'ARE de c-fos où la protéine reconnaît 8 nucléotides de l'ARN en conformation simple-brin (Wang et Hall, 2001).

Si le mode de reconnaissance des protéines Hu est bien compris, leur mode d'action exact est encore approximatif (Figure 8). Les séquences ARE de l'ARNm nouvellement synthétisées recrutent des déstabilisateurs (AUF-1, TPP..) et des stabilisateurs (Hu) (Lal et al., 2004). Une fois l'ARNm mûré et exporté dans le cytoplasme, un des deux régulateurs quitte le messenger permettant ainsi à ce dernier d'emprunter soit la voie de la traduction, soit la voie de la dégradation. En effet, HuR pourrait agir en bloquant l'accès de l'ARNm aux facteurs de déstabilisation, et ainsi favoriser sa prise en charge par les polysomes

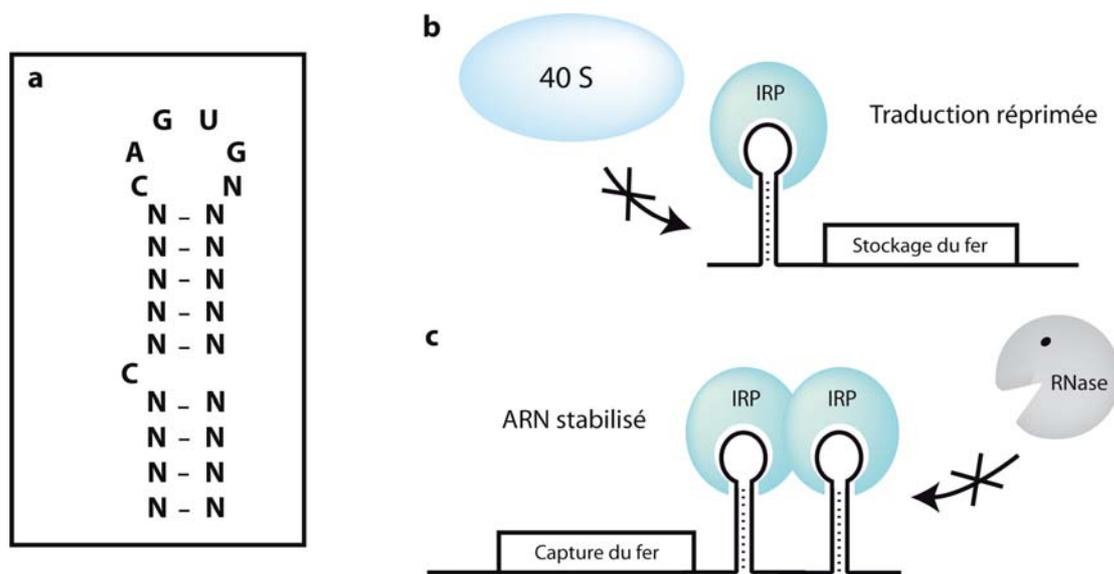


Figure 9 : Structure et fonctions de l'IRE (Iron Responsive Element). **(a)** Organisation secondaire de l'élément IRE. Les résidus strictement conservés sont indiqués et N représente n'importe lequel des 4 nucléotides. **(b)** La fixation d'IRP (Iron Responsive Protein) sur l'IRE, localisé dans la région 5' non-traduite des ARNm codant pour les enzymes de stockage du fer, bloque l'accès au ribosome et réprime leur expression. **(c)** La fixation d'IRP sur les IRE, localisés dans la région 3' non-traduite des ARNm codant pour les enzymes de capture du fer, les stabilise en bloquant l'accès aux RNases. Figure établie selon le mécanisme décrit par Hentzke et al., 2004.

(Lal et al., 2004). En revanche, la perte de HuR au profit de facteurs déstabilisateurs (AUF ou TPP) conduirait au recrutement de l'exosome au niveau des ARE et à la dégradation rapide de l'ARNm. Il faut noter que dans le cas de la déstabilisation de l'ARNm^{tmf-α} dirigée par TPP, le recrutement du complexe ribonucléasique pourrait être assisté par la voie des *micro* ARN (Jing et al., 2005). La nature du facteur conservé (stabilisateur ou déstabilisateur) dépend (i) de la séquence de l'ARE, (ii) des concentrations cellulaires relatives de chaque effecteur et (iii) peut également être influencée par un stimulus extérieur (Winzen et al., 2004).

2.1.2 Régulations dirigées par des éléments structurés

L'élément IRE. L'élément de réponse au fer (IRE) compte parmi les tige-boucles régulatrices les mieux étudiées (Hentze et al., 2004). Les IRE canoniques, retrouvés chez les insectes et les mammifères, se composent d'une tige interrompue par un résidu C en bulge et fermée par une boucle apicale de séquence consensus CAGUGN (Figure 9a). Les deux motifs structuraux sont obligatoirement espacés par 5 paires de bases. Cette structure consensus est le site de fixation des protéines régulatrices du fer (IRP1 et IRP2). Lorsque la concentration cellulaire en fer est limitante, les IRP sont actives et se fixent aux IRE avec des conséquences différentes en fonction du nombre et de la localisation de ces IRE sur l'ARNm. Ainsi, la présence d'un seul IRE dans la région 5' non-traduite des ARNm codant pour des enzymes impliquées dans le stockage du fer, conduit à l'inhibition de leur traduction (Figure 9b). Au contraire, la présence d'exemplaires multiples d'IRE dans la région 3' non-traduite d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans la capture du fer, stabilise ceux-ci (Figure 9c).

Ce mécanisme est contre-balancé par une augmentation de la concentration en fer qui, de son côté, inhibe les IRP. Une concentration élevée en fer conduit à la formation d'un complexe [4Fe-4S] qui se fixe à IRP1 et inhibe ainsi son activité de liaison aux IRE. L'inhibition de IRP2 est plus subtile. En effet, à forte concentration en fer, l'hème déclenche (i) une oxydation du domaine N-terminal de IRP2, suivie (ii) d'une ubiquitinylation et (iii) de la dégradation d'IRP2 par le protéasome.

Le site de fixation de HBP. Une autre structure en épingle à cheveux est strictement conservée en aval de l'ORF des ARNm d'histones exprimés au cours de la division cellulaire (Jaeger et al., 2005). Cette petite tige-boucle est caractérisée par une hélice de 6

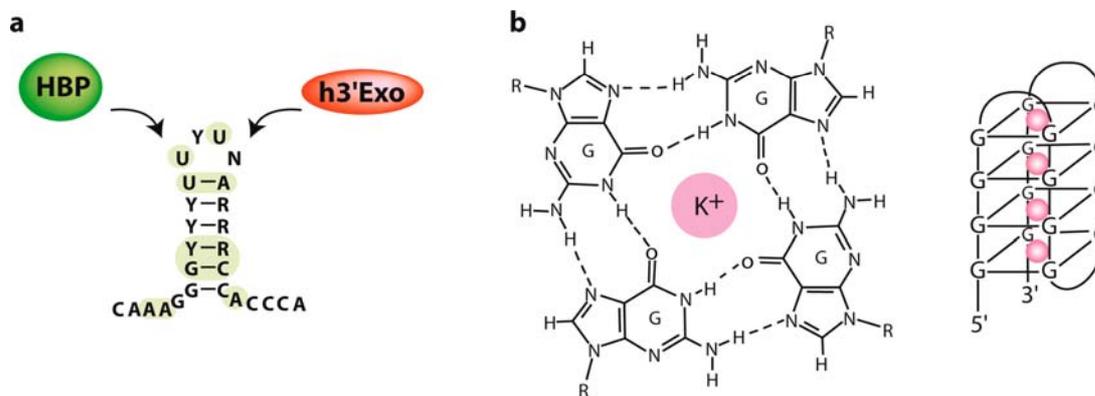


Figure 10 : Exemples d'organisations structurales des séquences d'ARN eucaryotes reconnues par des facteurs de régulation spécialisés. **(a)** Structure secondaire en épingle à cheveux présente dans la région 3' non-codante des messagers d'histones. L'élément est représenté avec sa séquence consensus, où Y représente une pyrimidine, R représente une purine et N représente n'importe lequel des 4 nucléotides. Les signaux structuraux reconnus spécifiquement par HBP (Hairpin Binding Protein) sont indiqués par un ombrage vert. Cette structure est également reconnue spécifiquement par la RNase h3'Exo. Figure adaptée de Jaeger et al., 2005. **(b)** Organisation structurale des quartets de purines reconnus par FMRP. A gauche, organisation d'un plateau de 4 guanines où les nucléotides sont associés en conformation plane par des interactions entre les faces Watson-Crick et les faces Hoogsteen, et stabilisés par un ion K^+ . A droite, organisation tridimensionnelle des éléments en quartet de purines résultant de l'empilement des plateaux de guanine, les ions K^+ sont représentés par des sphères roses. Figure adaptée de Schaeffer et al.,

paires de bases conservées, fermée par une téraloop contenant 2 résidus U invariants (Figure 10a). Elle est reconnue par deux facteurs protéiques : d'une part, la protéine HBP (Hairpin Binding Protein) et d'autre part, la RNase h3'Exo. HBP contribue à stabiliser l'ARNm et agirait également en stimulant sa traduction. En revanche, la RNase h3'Exo se fixe après le départ de HBP et catalyse la dégradation de la région 3' non codante de l'ARNm contenant l'épingle à cheveux, rendant le reste de l'ARNm accessible aux RNases conventionnelles.

Le site de fixation de FMRP. Des structures plus élaborées que les motifs en tige-boucle ont également été répertoriées. C'est le cas d'une organisation en quartet de purines, qui est le site de recrutement de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein). Cette structure particulière résulte de l'empilement de plusieurs plateaux formés de 4 résidus guanine dans une conformation plane et associés par des liaisons de type Hoogsteen (Figure 10b). Chaque plateau de cette structure est stabilisé spécifiquement par un ion potassium (K^+). Cette structure a été retrouvée au niveau de 31 ARNm exprimés dans les cellules nerveuses. FMRP reconnaît spécifiquement 6 de ces ARN candidats, dont son propre ARNm (Schaeffer et al., 2001) et l'ARNm de la protéine 1b associée aux microtubules (Darnell et al., 2001). Côté protéique, l'interaction met en jeu un motif connu sous le nom de boîte RGG (Ramos et al., 2003). A ce jour, plusieurs fonctions potentielles ont été attribuées à cette reconnaissance. FMRP assurerait une fonction de chaperon, escortant l'ARNm lors de sa sortie du noyau et, une fois dans le cytoplasme, participerait de façon active au transport de l'ARNm vers les jonctions synaptiques (Bagni et Greenough, 2005).

2.2 Eléments régulateurs de type « procaryote » en *cis*

Comme prédit par le modèle évolutif proposé dans cette Introduction, les éléments régulateurs de type « procaryote » en *cis* présentent un niveau de complexité supérieur à celui des éléments de type « eucaryote » en *cis* et, dans ce cas, l'implication fonctionnelle de la structure ARN est au moins aussi importante que celle du partenaire protéique. Cela est parfaitement illustré par le mécanisme de régulation de l'expression de l'opéron du tryptophane utilisant la protéine TRAP comme médiateur. Dans ce cas, bien que l'ARN soit reconnu sous sa forme simple-brin, en recrutant TRAP, il subit un changement conformationnel qui active, ou réprime, l'expression de l'opéron. Ce « transfert de

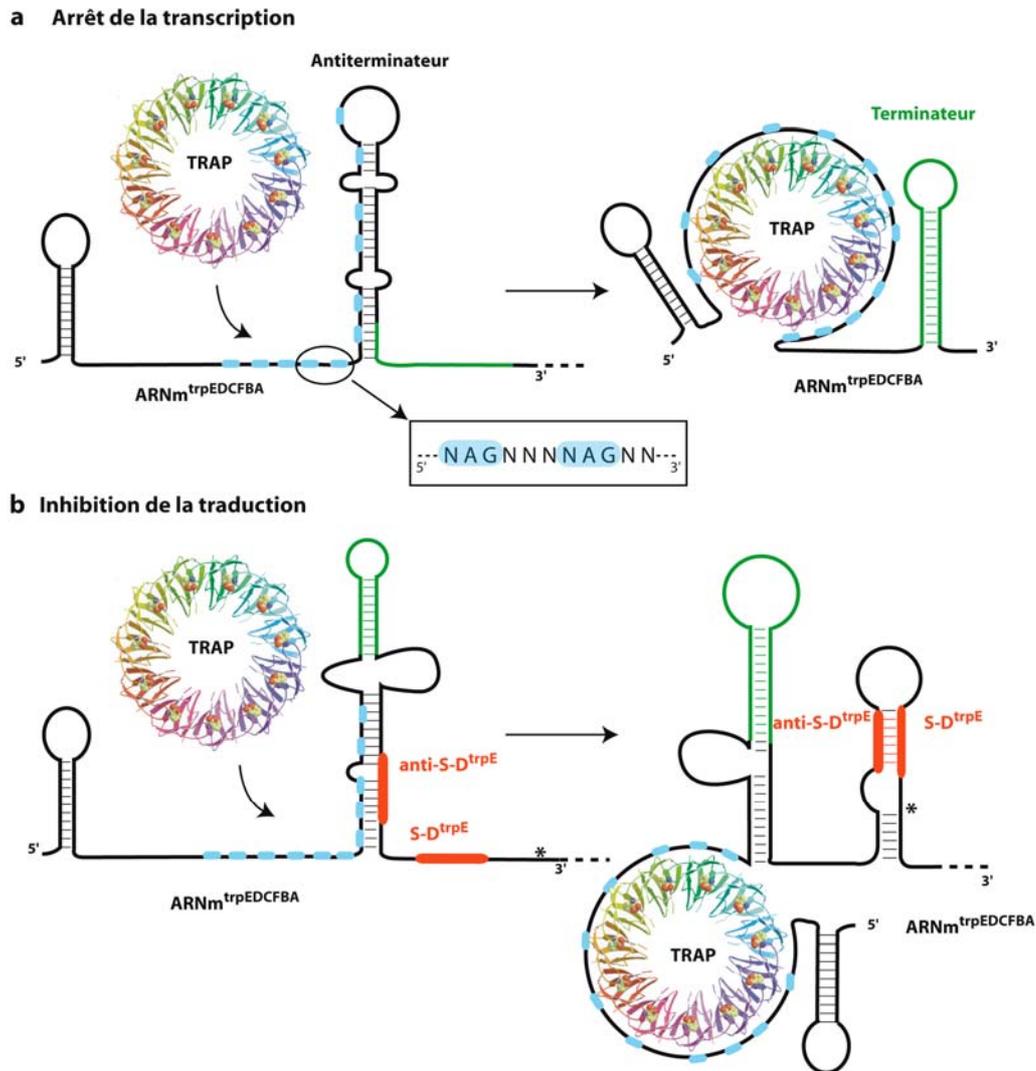


Figure 11 : Organisation structurale de l'opéron *trp*. La protéine TRAP reconnaît l'ARNm au niveau de 11 répétitions du triplet NAG, représenté dans l'encadré (bleu). (a) L'enroulement de l'ARNm, en cours de transcription, autour de TRAP déstabilise la structure de l'antitermineur au profit du termineur de transcription (vert) et cause un arrêt de la transcription. (b) La même interaction se fait avec l'ARNm déjà transcrit et cette fois déstabilise une structure emprisonnant une séquence anti-S-D^{trpE} (rouge). Cette dernière, en s'hybridant à la séquence S-D^{trpE}, inhibe la traduction de l'opéron *trp*. (*) identifie le codon d'initiation de la traduction de *trpE*. Figure adaptée de Babitzke, 2004

fonction » (des protéines vers l'ARN) est maximal dans le cas des ARN interrupteurs qui, eux, ne font intervenir aucune protéine et sont comparables à certains riborégulateurs de type « procaryote » en *trans*.

2.2.1 Régulation liée à un changement conformationnel de l'ARN en réponse à la fixation d'une protéine

L'opéron tryptophane (*trp*) de *Bacillus subtilis* est composé de six ORF codant pour différentes protéines impliquées dans la synthèse du tryptophane (Trp). Les six gènes sont co-transcrits en un ARNm polycistronique dont la région 5' non-codante est la cible d'une régulation dirigée par la protéine TRAP (protéine d'atténuation en réponse au Trp). L'intérêt de ce mécanisme réside dans le fait qu'il utilise une régulation à la fois transcriptionnelle et traductionnelle, toutes deux impliquant TRAP (Babitzke, 2004). Le site de liaison de TRAP est uniquement retrouvé chez *B.subtilis* et chez quelques espèces proches (Gutierrez-Preciado et al., 2005), et se compose d'une région d'ARN simple-brin comportant 9 à 11 répétitions du triplet de bases NAG (N représentant A, C, G ou U) en amont d'une structure anti-terminatrice (Figure 11a). Cette organisation structurale de l'ARN est directement liée à la structure tridimensionnelle de la protéine. En effet, TRAP est un undécamère organisé en anneau, dont chaque sous-unité possède un site de liaison au Trp et un motif KKR. Sous sa forme libre, la protéine est normalement inactive. Cependant, lorsque la concentration de Trp dépasse un certain seuil, celui-ci se fixe de façon coopérative à chaque sous-unité de TRAP qui subit un changement conformationnel. La protéine expose alors en surface ses motifs KKR qui interagissent spécifiquement avec les deux derniers résidus de chaque triplet NAG. La nature simple-brin de l'ARN lui permet alors d'initier son enroulement autour de TRAP. Les propriétés régulatrices de ce complexe reposent sur le fait que les triplets NAG de l'ARN ne se trouvent pas tous dans la région simple-brin. En effet, 6 des 11 répétitions de nucléotides sont localisées dans la tige anti-terminatrice contrôlant la transcription du premier gène de l'opéron *trp* (ORF^{trpE}). Ainsi, lors de la fixation de TRAP, l'organisation de l'ARN autour de la protéine déstabilise la structure anti-terminatrice et favorise la formation d'une structure terminatrice qui provoque un arrêt prématuré de la transcription. Ce premier niveau de régulation transcriptionnelle est renforcé par une régulation traductionnelle basée sur le même principe. Dans ce cas, lorsque la transcription échappe au contrôle de son

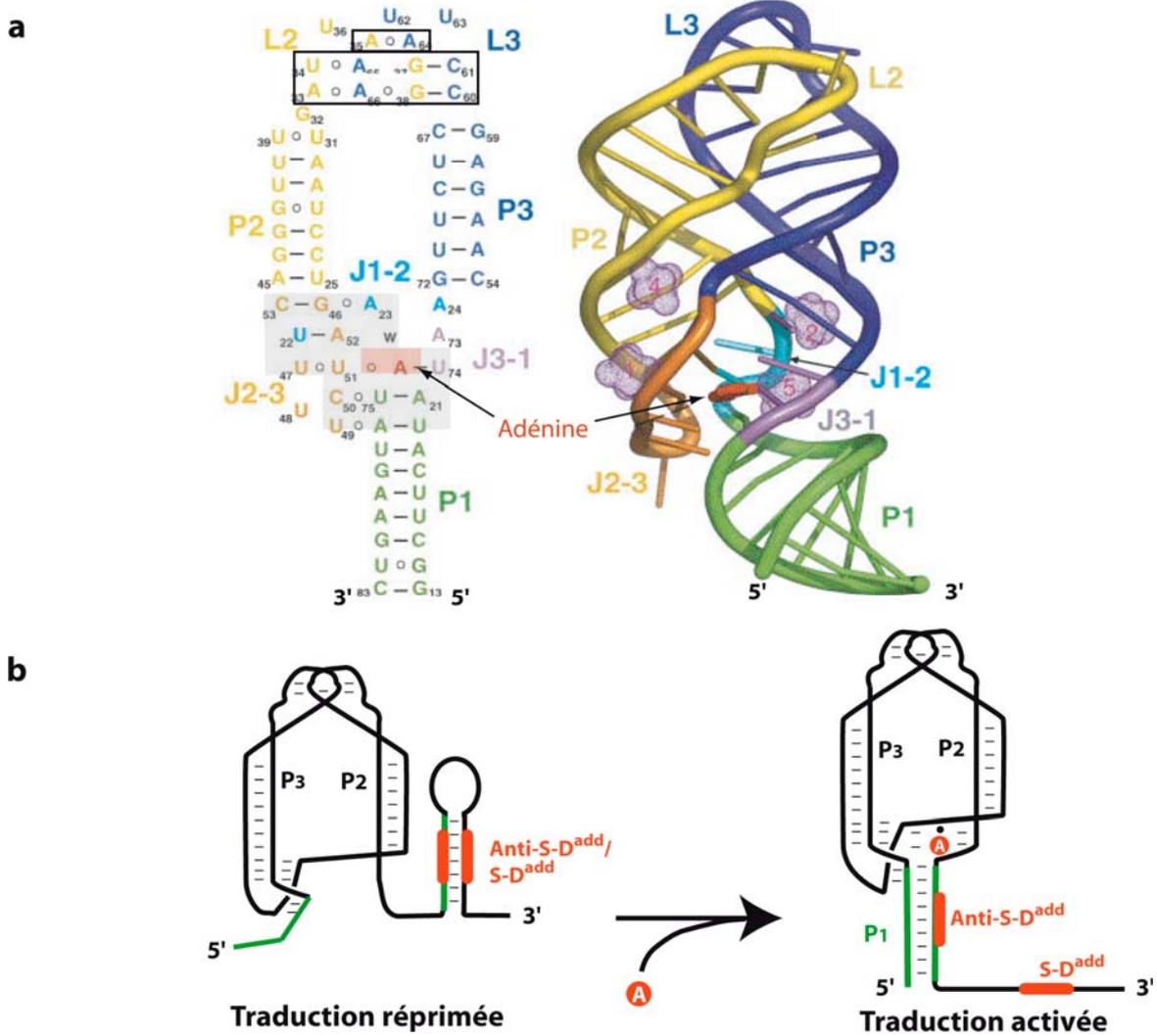


Figure 12 : Structure et mode d'action des ARN interrupteurs. (a) Structures secondaire et tertiaire de l'interrupteur ribo-A du gène *add* de *Vibrio vulnificus*. L'ARN est montré sous sa forme stabilisée par l'adénine. A gauche, la structure secondaire de l'ARN met en avant les tige-boucles P2 (en jaune), P3 (en bleu) et l'hélice P1 (en vert). La région d'interaction entre les boucles L2 et L3 est encadrée, la région aptamère, reconnaissant l'adénine, est ombrée en gris. A droite, structure cristallographique de l'ARN complexé à l'adénine. Le code couleur reste le même et les ions Mg^{2+} , stabilisant la structure, sont indiqués par les sphères violettes. (b) Mécanisme d'activation de la traduction de l'ARN^{add}. La fixation de l'adénine au niveau de l'aptamère de l'ARN stabilise sa structure. La formation de l'hélice P1 (verte) séquestre la séquence anti- S-D^{add} et, en conséquence, libère la séquence S-D^{add}. Figure adaptée de Serganov et al., 2004.

terminateur, la fixation de TRAP permet à la séquence anti-S-D^{trpE} d'interagir avec la séquence S-D^{trpE} en amont de l'ORF^{trpE} et d'en bloquer l'accès au ribosome (Figure 11b).

2.2.2 Les ARN interrupteurs

Les ARN interrupteurs, ou riboswitches, fonctionnent selon un principe analogue au système opéron^{trp}/TRAP de *B.subtilis*, à l'exception près que le facteur protéique est remplacé par un métabolite. En effet, la région régulatrice adopte un repliement complexe lui permettant à la fois d'accommoder un métabolite et, en réponse, d'activer ou de réprimer l'expression d'un gène.

Présentation du système. Les ARN interrupteurs peuvent être considérés comme des vestiges des premiers systèmes de régulation mis en place alors que la vie évoluait dans un monde ARN. Ce mécanisme est beaucoup utilisé chez les bactéries (2 % des gènes de *B.subtilis*) et les *archaea*, mais reste exceptionnel chez les eucaryotes (concerne seulement certains champignons et plantes). Ces éléments régulent l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de transport et de biosynthèse de vitamines (riboflavine, thiamine et cyanocobalamine), d'acides aminés (méthionine, lysine et glycine) ou des bases puriques (Nudler et Mironov, 2004). Dans chaque cas, c'est la fixation d'un métabolite (le produit final de la voie de synthèse considérée) sur l'ARNm qui active (ou réprime) la transcription (ou la traduction) du gène en aval.

Les mécanismes impliquant les ARN interrupteurs reposent sur un repliement particulier de deux domaines fonctionnels localisés dans la région 5' non-traduite des ARNm cibles. Un domaine aptamère accommode le ligand alors qu'un domaine opérateur « dynamique » active, ou réprime, l'expression du gène en aval. Ainsi, par exemple, les opérons impliqués dans la synthèse des purines possèdent un domaine aptamère (boîte G) reconnaissant spécifiquement la guanine, l'hypoxanthine ou l'adénine suivant l'opéron régulé. Récemment, des études cristallographiques ont permis d'élucider le mécanisme de reconnaissance de l'adénine (système ribo-A) et de la guanine (système ribo-G), et de proposer un modèle de régulation.

Les systèmes ribo-A et ribo-G. La structure cristallographique de l'élément ribo-A (présent dans la région 5' non-traduite de l'opéron *add* de *B.subtilis*) a été déterminée en complexe avec l'adénine (Serganov et al., 2004). L'élément Ribo-A est composé de trois

hélices P1, P2 et P3 maintenues ensemble par des interactions remarquables et qui forment une jonction à trois voies (Figure 12a). Tout d'abord, les hélices P2 et P3 sont maintenues ensemble grâce à l'association des boucles L2 et L3. Celles-ci interagissent grâce à 5 appariements, dont 3 sont non-canoniques. Un niveau supplémentaire d'organisation est apporté par un double alignement de doublets de paires de bases formant 2 tétrades. Ces interactions sont facilitées par la présence de cations (Mg^{2+}) entre les deux hélices P2 et P3 et permettent de structurer une poche de liaison de l'adénine. Le site de fixation du ligand résulte de l'agencement de 2 paires de triplets de bases entre lesquels s'intercale le noyau purique de l'adénine. Cette reconnaissance fait intervenir l'ensemble des hétéroatomes (O et N) du ligand et conduit à la formation d'un cinquième triplet de bases. En particulier, les groupements présents sur la face Watson-Crick sont reconnus spécifiquement par le résidu U74 de l'ARN interrupteur (interaction Watson-Crick classique). Ce dernier jeu d'appariements dirige la spécificité de la reconnaissance puisque la mutation de U74 en C74 est suffisante pour changer la spécificité du système de l'adénine vers la guanine. La fixation de l'adénine permet ainsi de stabiliser la jonction entre les trois hélices et indirectement de stabiliser l'hélice P1.

Dans le cas de l'ARN interrupteur présent en amont de l'ORF^{add} (codant pour une adénine désaminase) chez *Vibrio vulnificus*, l'hélice P1 séquestre une région complémentaire à la séquence S-D^{add} et au codon d'initiation de la traduction (Figure 12b). Un modèle a été proposé selon lequel, en absence de l'adénine, l'hélice P1 n'est pas stable, ce qui favorise l'appariement anti-S-D/S-D et, en conséquence, inhibe la traduction de l'ORF en aval. Au contraire, l'augmentation de la concentration en adénine stabilise P1 et libère S-D^{add}.

Ce système ribo-A est également présent, mais sous une forme adaptée, dans la région 5' non-traduite de l'ARNm^{vdhl} dont le produit de traduction entre dans la composition d'une pompe à purine. Ici l'originalité du mécanisme tient au fait que la séquence séquestrée n'est pas une séquence S-D mais le brin 5' d'un terminateur transcriptionnel. Sous sa forme active, le ribo-A est un anti-terminateur permettant à l'ARN polymérase de transcrire le gène en aval.

Comme indiqué précédemment, une mutation transformant U74 en C74 est suffisante pour basculer la spécificité du système de l'adénine vers la guanine. Cette substitution est effectivement retrouvée dans la structure aptamère des Ribo-G. Ainsi, en présence de guanine, l'ARN interrupteur en amont de l'ORF^{xpt} séquestre le brin 5' d'un antiterminateur et favorise la formation d'un terminateur transcriptionnel. Cette structure

cause un arrêt prématuré de la transcription de l'opéron des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la guanine (Batey et al., 2004; Serganov et al., 2004; Noeske et al., 2005).

En conclusion, il est intéressant de voir qu'un même mécanisme répondant à la même classe de métabolites (purine) et ne reposant que sur l'ARN puisse réguler (activer ou réprimer) différents gènes, soit au niveau traductionnel (ARNm^{add}), soit au niveau transcriptionnel (ARNm^{ydhl} et ARNm^{xpt}). L'ensemble des mécanismes en *cis* qui viennent d'être décrits pour les bactéries illustre bien le modèle selon lequel ces régulateurs agissent par l'intermédiaire de changements conformationnels importants.

2.3 Eléments mimétiques : systèmes de type « hybride » à structure de type « procaryote » et mode d'action de type « eucaryote »

Les mécanismes de régulation utilisant des structures mimétiques correspondent à une situation de type « hybride ». Dans ce cas, le site de reconnaissance adopte une structure complexe, comme chez les procaryotes, mais sa fonction n'implique pas le remodelage de sa structure, comme chez les eucaryotes. Les exemples les plus connus concernent les mécanismes d'autorégulation qui sont fréquemment utilisés chez les procaryotes pour contrôler l'expression de gènes codant pour des protéines liant les acides ribonucléiques. Ces systèmes reposent sur une reconnaissance directe entre la protéine et son propre ARNm. Le site de liaison du médiateur adopte une structure mimant le substrat ARN naturel de la protéine. Ces éléments mimétiques ont été caractérisés, par exemple, dans l'ARNm de la protéine Hfq chez les procaryotes (Vecerek et al., 2005) ou de la protéine de liaison au poly-A, PABP, chez les eucaryotes (Bag, 2001). Cependant, les cas les mieux étudiés sont les structures mimant les ARN ribosomiques 16S ou 23S (pseudo-ARNr), retrouvées dans les messagers de protéines ribosomiques (protéines r) aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Chez *E.coli*, les gènes codant pour ces protéines sont souvent transcrits en ARNm polycistroniques, ce qui permet une production de chaque composant en quantité stœchiométrique. Les voies de régulation de l'expression de trois de ces opérons (*s10*, *spc* et α) ont en commun la reconnaissance d'une structure pseudo-ARNr dans la région 5' non-traduite de l'ARNm par un des produits de traduction de ce dernier. Bien que les trois stratégies reposent sur un mimétisme de l'ARNr, le mécanisme de régulation proprement dit diffère dans chaque cas. Ainsi, le premier opéron (*s10*) est régulé au niveau transcriptionnel et les deux autres opérons sont régulés au niveau

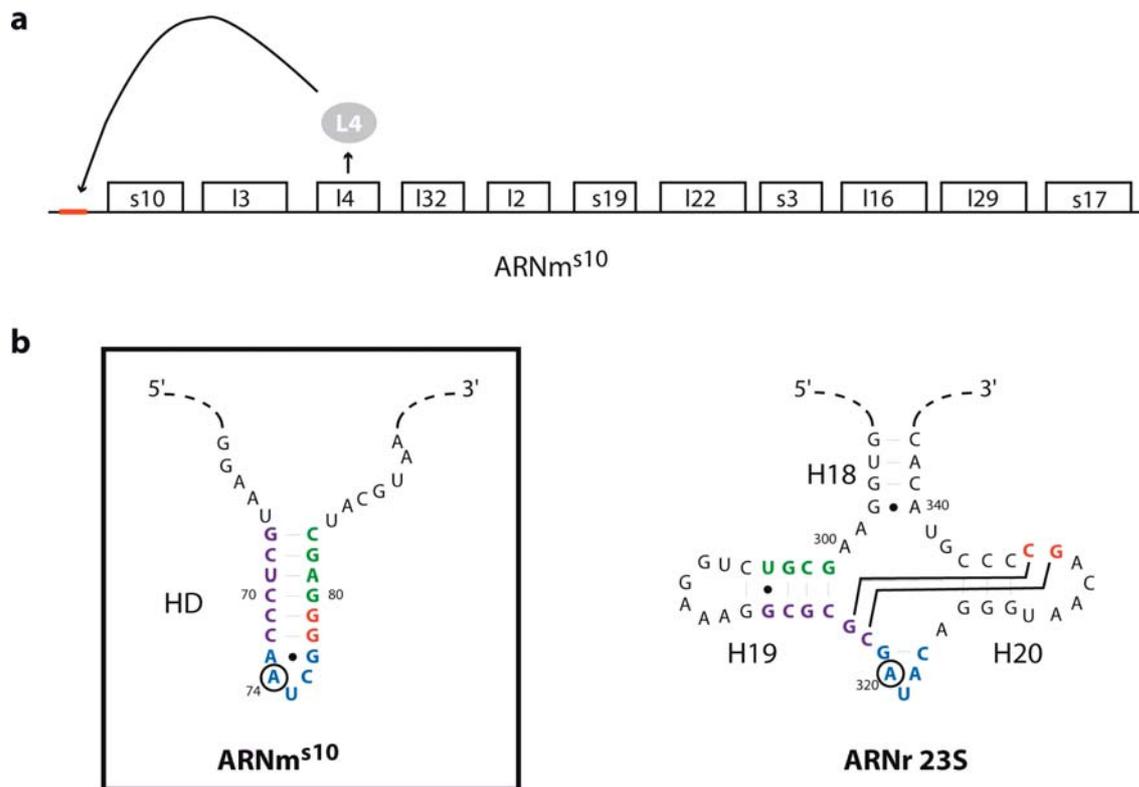


Figure 13 : Organisation génétique de l'ARNm^{S10} et repliement de l'ARN impliqué dans sa régulation. (a) L'identité de chaque cistron de l'ARNm^{S10} est indiquée, et la région opératrice reconnue par la protéine L4 est représentée en rouge. (b) Homologies structurales entre l'opérateur de l'ARNm^{S10} (à gauche) et l'ARNr 23S (à droite). Dans les deux cas, la boucle reconnue par L4 est indiquée en bleu et l'adénine reconnue spécifiquement est encerclée. Les homologies de séquences localisées dans les hélices supportant cette boucle sont représentées en violet, vert et rouge. Figure adaptée de Stelzl et al., 2003.

post-transcriptionnel soit par un encombrement stérique (*spc*), soit en capturant le ribosome dans une conformation inactive (α et *rpsO*).

2.3.1 Régulation de l'opéron *s10* par atténuation transcriptionnelle

L'opéron *s10* d'*E.coli* est composé de 11 gènes de protéines ribosomiques : S10, L3, L4, L23, L2, S19, L22, S3, L16, L29 et S17 (Figure 13a). Chez les γ -protéobactéries une seule de ces protéines, la protéine L4, est impliquée dans la régulation de l'expression de cet opéron. La protéine L4 se lie spécifiquement à son substrat naturel, l'ARNr 23S, au niveau d'une boucle particulière de trois nucléotides, contenant une adénine conservée, et présentée dans le contexte d'une jonction à 4 hélices (Figure 13b, à droite) (Stelzl et Nierhaus, 2001; Schlünzen et al., 2004). Au cours de cette régulation, la protéine L4 se fixe sur une structure équivalente présente au niveau de l'opérateur *s10*, dans la région 5' non-traduite de l'ARNm^{s10} (Figure 13b, à gauche) (Freedman et al., 1987; Allen et al., 2004). Bien que les régions structurées de l'ARNr 23S d'une part, et de l'opérateur *s10* d'autre part, présentent des organisations différentes, des expériences de structure en solution ont montré que les boucles apicales adoptent, elles, une structure originale identique. A cette forte homologie de structure, s'ajoute la capacité des deux ARN à être compétiteurs l'un pour l'autre pour la fixation de L4, indiquant que cette liaison fait intervenir les mêmes résidus de la protéine (Stelzl et al., 2003).

La fixation de la protéine L4 à la région opératrice *s10* est le point de départ d'une régulation transcriptionnelle et d'une régulation traductionnelle qui utilisent des mécanismes distincts (Freedman et al., 1987; Zengel et Lindahl, 1996). A ce jour, seul le premier mode de régulation a été étudié de manière approfondie (Sha et al., 1995a; Sha et al., 1995b). Cette étude propose un modèle comportant trois étapes. (i) Tout d'abord, l'ARN polymérase marque une pause à l'approche d'une région riche en U en amont de l'ORF^{s10}. Puis, (ii) cette pause transcriptionnelle est augmentée par l'interaction entre la protéine NusA avec l'ARN polymérase. (iii) Enfin, lorsque la protéine L4 est présente en excès, celle-ci s'associe également à l'ARNm et dirige l'ARN polymérase vers un arrêt total de la transcription. De façon intéressante, les facteurs protéiques (L4 et NusA) déterminants pour cette régulation négative, jouent un rôle antagoniste en stimulant la transcription des ARNr (Torres et al., 2001).

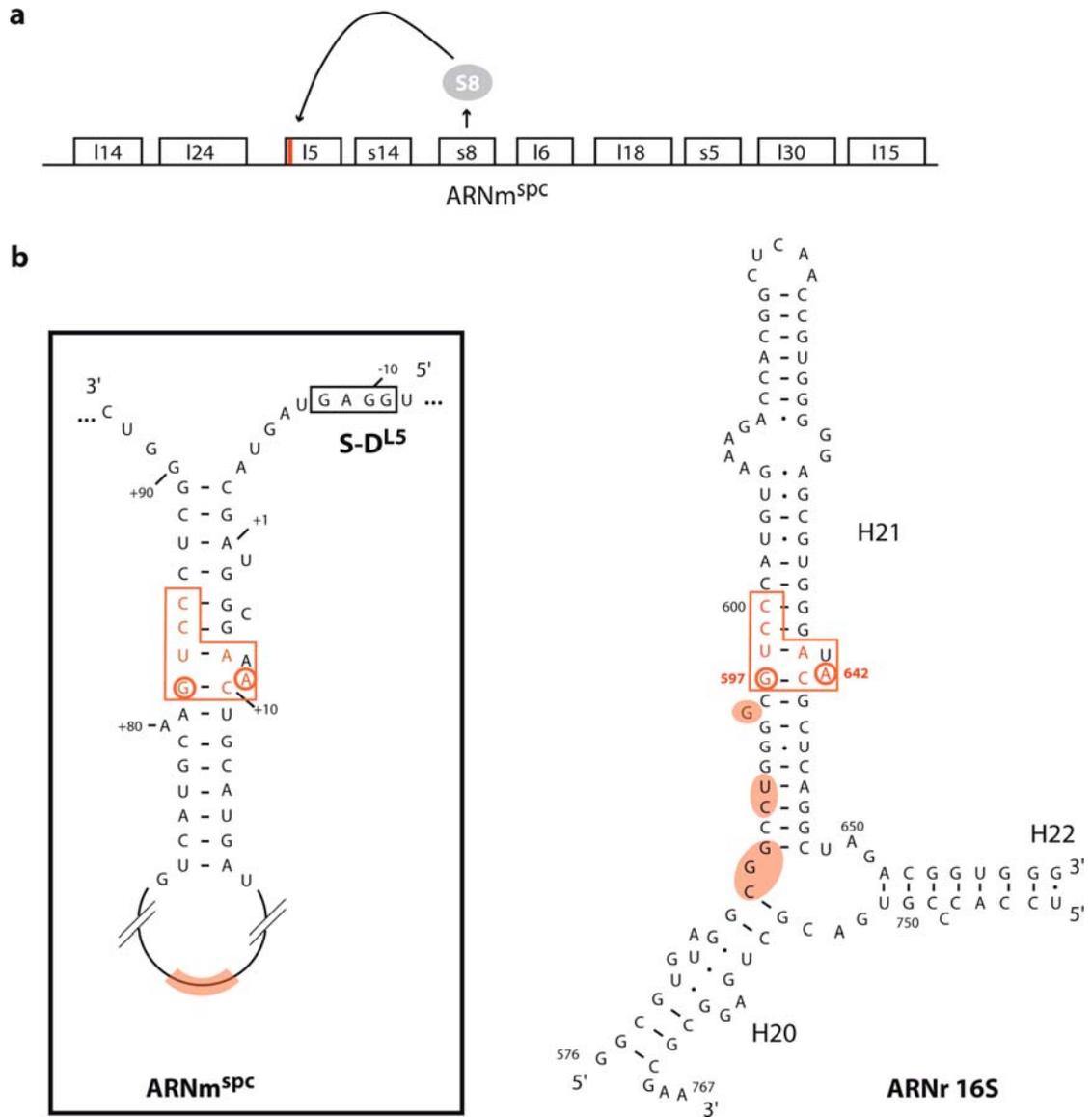


Figure 14 : Organisation génétique de l'ARNm^{SPC} et structure mimétique de l'ARN impliquée dans son autorégulation. **(a)**. L'identité de chacun des 10 cistrons est indiquée, et la région opératrice en amont du cistron I5, reconnue par la protéine S8, est représentée en rouge. **(b)** Homologies structurales entre l'opérateur de l'ARNm^{SPC} (à gauche et encadré) et l'ARNr 16S (à droite). Les portions d'hélice identiques dans les deux ARN sont encadrées en rouge. Les deux nucléotides A et G, reconnus spécifiquement par S8 dans les deux contextes différents sont encerclés. Les contacts additionnels établis entre la protéine S8 et les deux structures d'ARN sont indiqués par les régions ombrées en rouge. L'AUG initiateur de l'ORF¹⁵ est indiqué par un astérisque. Figure adaptée de Merianos et al., 2004.

2.3.2 Régulation de l'opéron *spc* par inhibition du couplage traductionnel et dégradation de l'ARNm

Chez *E.coli*, l'opéron *spc* code pour les 10 protéines ribosomiques L14, L24, L5, S14, S8, L6, L18, S5, L30 et L15. L'expression de cet ARN polycistronique est régulée par la fixation de la protéine S8 en aval de la séquence S-D^{L5} (Figure 14a). L'étude biochimique du site de liaison de S8 a conduit à l'établissement d'un modèle de repliement secondaire mettant en évidence de fortes similitudes avec la région de l'ARNr 16S, substrat naturel de S8 (Figure 14b) (Cerretti et al., 1988). Récemment, la résolution de la structure cristallographique de la protéine S8 en complexe avec un fragment de l'opérateur contenant son site de liaison a permis de confirmer ce mimétisme (Merianos et al., 2004). Le modèle suggère que cette région de l'opérateur s'organise en une tige mimant l'hélice H21 de l'ARN 16S. En particulier, les régions 7-10 et 82-85 de l'ARNm sont similaires aux régions 602-606 et 640-645 de l'ARNr 16S. De plus, non seulement les zones de contacts entre la protéine S8 et la chaîne ribose-phosphate sont identiques pour les deux ARN, mais on retrouve aussi les mêmes interactions base-spécifiques dans les deux complexes, avec les résidus A642 (N3) et G603 (N2) de l'hélice H21 de l'ARNr et les bases A9 (N3) et G82 (N2) de l'opérateur *spc*. Il a également été proposé que S8 pourrait établir des contacts supplémentaires avec la grande boucle de l'opérateur, toutefois cette dernière hypothèse reste à vérifier. Les éléments mimétiques retrouvés chez *E.coli* sont également présents chez *V.cholerae*, ce qui suggère que cette stratégie pourrait être commune à toutes les γ -protéobactéries (Allen et al., 2004).

Bien que l'interaction entre la protéine S8 et l'opérateur de *spc* soit maintenant bien caractérisée, le mécanisme par lequel cette fixation conduit à la répression des 10 cistrons n'est pas encore compris. Deux modes d'action ont cependant été proposés selon que le cistron régulé se trouve en amont ou en aval du site de fixation de S8. En amont, l'expression des 2 premières phases ouvertes de lecture (L14 et L24) seraient rétro-réglées par la fixation de S8, qui engendrerait (i) un clivage de l'ARNm et (ii) sa digestion 5' et 3' exonucléasique (Mattheakis et al., 1989). En aval, la fixation de S8 sur l'opérateur inhiberait la traduction de l'ORF^{L5} et des 7 cistrons suivants en masquant la séquence S-D^{L5} (Mattheakis et Nomura, 1988).

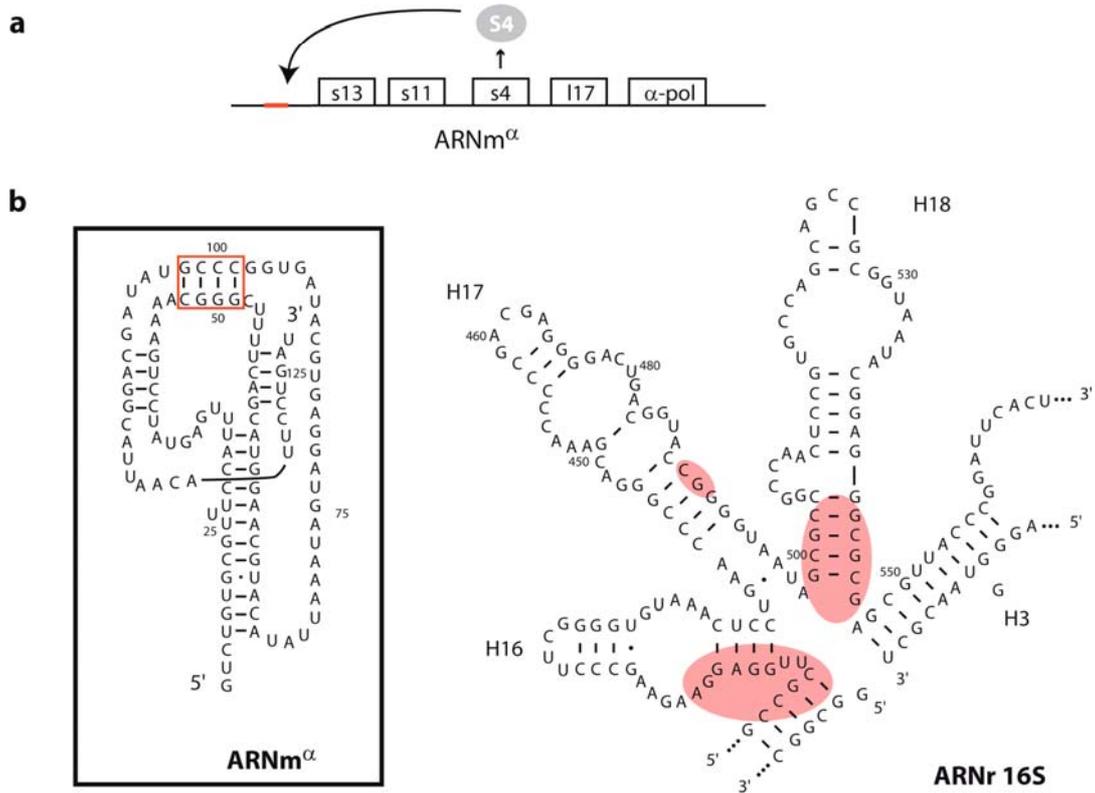


Figure 15 : Organisation génétique de l'ARNm^α et mimétisme entre l'opérateur α et l'ARNr 16S. **(a)** Chaque cistron est encadré, et la région opératrice reconnue au cours de la régulation par la protéine S4 est représentée en rouge. **(b)** Organisation structurale de l'opérateur de l'ARNm^α (à gauche et encadré) et de l'ARNr 16S (à droite). La région riche en G et en C importante pour la reconnaissance de l'ARNm^α par la protéine S4 est encadrée en rouge et les régions de l'ARNr 16S reconnues par la protéine S4 sont ombrées en rouge. Figure adaptée de Tang et al., 1989.

2.3.3 Régulation de l'opéron α et de l'ARNm^{rpsO} par capture du ribosome

Chez *E.coli*, le messager de l'opéron α est un ARNm polycistronique codant pour les protéines ribosomiques S13, S11, S4, L17 et la sous-unité α de l'ARN polymérase (Figure 15a), alors que l'ARNm^{rpsO} ne code que pour la protéine ribosomique S15. Dans chaque cas, la protéine régulatrice, S4 (pour ARNm ^{α}) ou S15 (pour ARNm^{rpsO}), reconnaît la région 5' non-traduite de l'ARNm au niveau d'un opérateur structuré en pseudo-noeud et mime une région de l'ARNr 16S. Les expressions des ces gènes sont autorégulées par une stratégie commune basée sur la capture d'un ribosome inactif (Schlax et Worhunsky, 2003). Bien que le mécanisme global soit conservé, des différences subtiles existent.

La protéine S4 reconnaît l'ARNr 16S au niveau d'une jonction à cinq voies établie entre les hélices H3, H4, H16, H17 et H18 (Figure 15b, à droite). Une organisation tout aussi complexe est retrouvée dans l'ARNm ^{α} où la région opératrice adopte une structure en double pseudo-noeud (Figure 15b, à gauche) (Tang et Draper, 1989). Aucune étude structurale n'a pu clairement établir d'homologies entre ce pseudo-noeud et la région de l'ARNr 16S reconnue par S4, toutefois différentes observations semblent indiquer qu'elles existent. (i) Les deux ARN sont compétiteurs l'un envers l'autre pour la fixation de S4, ce qui suggère l'implication d'une seule et même région au niveau de la protéine. (ii) Dans les deux cas, l'interaction ARN-protéine est affectée par la présence d'ions Cl⁻ et (iii) une séquence riche en G et en C, reconnue par S4 sur l'ARNr 16S, pourrait être mimée par une région de l'ARNm (Tang et Draper, 1989). Toutefois, étant donnée la forte divergence des deux structures d'ARN, il semble que seule une étude cristallographique de S4 en complexe avec le double pseudo-noeud de l'ARNm ^{α} soit en mesure de déterminer la vraie nature du mimétisme exercé par ce pseudo-ARNr. Bien que le mode de reconnaissance du double pseudo-noeud par S4 soit encore assez élitif, le mécanisme par lequel cette interaction réprime la traduction de l'opéron α est, lui, bien compris. Le double pseudo-noeud existe sous deux formes structurellement distinctes dont une seule est reconnue par S4 (Schlax et al., 2001). Celle-ci est qualifiée « d'inactive » car, bien qu'elle puisse accommoder la sous-unité 30S, le complexe ne fixe pas l'ARNt^{Met} initiateur et n'initie pas de la traduction de l'ARNm polycistronique α . Cette forme « inactive » est en équilibre avec une forme dite « active » qui, elle, n'est pas reconnue par S4 et permet l'initiation de la traduction.

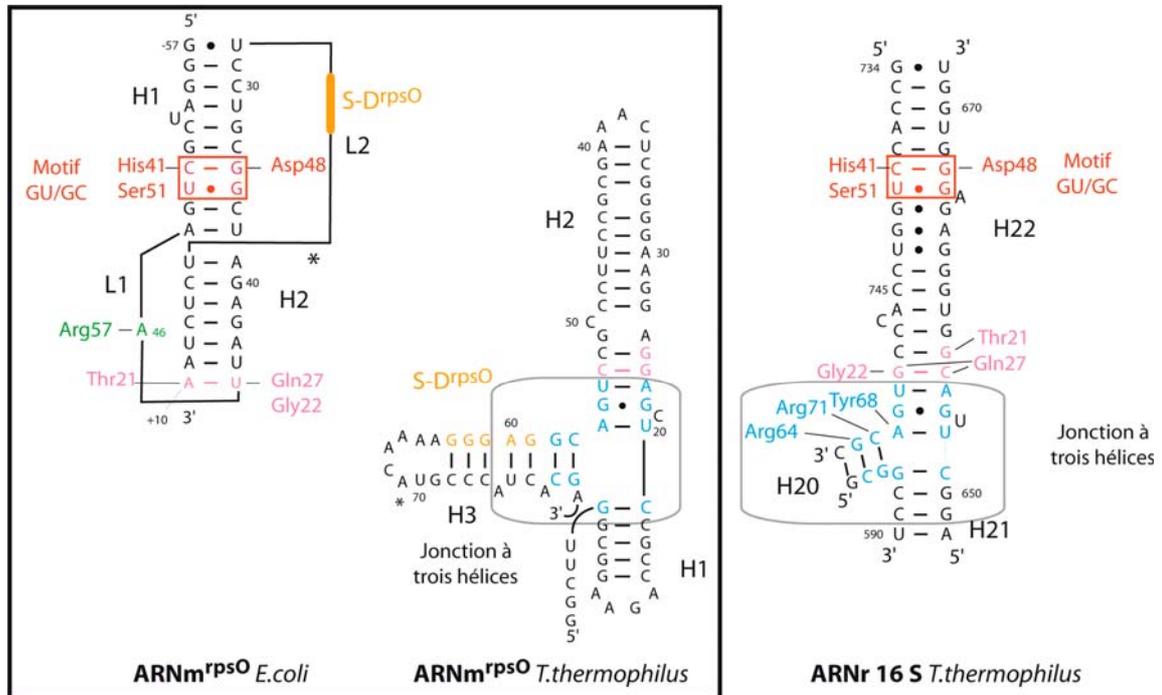


Figure 16 : Homologies structurales entre les ARNm^{tpsO} et l'ARNr 16S, reconnus par la protéine ribosomique S15 chez *E.coli* ou *T.thermophilus*. A gauche et encadrées, les structures secondaires des opérateurs des ARNm^{tpsO} d'*E.coli* et de *T.thermophilus* mettent en évidence les régions d'interaction spécifiques avec la protéine S15. Celles-ci sont indiquées en rouge (motif GU/GC) et en vert (A46) dans la structure en pseudo-nœud d'*E.coli*, alors que la structure de l'ARNm^{tpsO} de *T.thermophilus* exhibe en bleu les résidus formant la jonction à trois hélices. Sur ces deux structures, les positions reconnues de façon non-spécifique sont en rose alors que la séquence S-D^{tpsO} (en orange) et le codon initiateur (*) sont également indiqués. A droite, structure secondaire de la région de l'ARNr 16S de *T.thermophilus* reconnue par la protéine S15, où les régions mimées par les deux ARNm sont représentées suivant le même code couleur (rouge : motif GU/GC, bleu : jonction à trois hélices et rose : interactions non spécifiques). Les aa de S15 impliqués dans la reconnaissance des résidus dans l'ARNm^{tpsO} d'*E.coli* et l'ARNr 16S sont également indiqués. Figure adaptée de Serganov et al., 2003 et de Mathy et al., 2004.

Dans le ribosome, la protéine S15 reconnaît l'ARNr 16S à deux niveaux (Figure 16, à droite) : une jonction à trois hélices (élément majeur) et, de façon moindre, un motif GU/GC (Brodersen et al., 2002) (Figure 16, à droite). Des études structurales menées sur la région opératrice de l'ARNm^{tpsO} d'*E.coli*, également reconnue par la protéine S15, ont permis de mettre en évidence la présence d'un motif GU/GC identique à celui de l'ARNr 16S et crucial pour l'interaction avec S15 (Mathy et al., 2004; Serganov et al., 2002) (Figure 16, à gauche). En revanche, aucun élément mimant la jonction à trois hélices n'a été retrouvé dans le pseudo-nœud et les aa de S15, impliqués dans la reconnaissance de ce motif dans le contexte de l'ARNr 16S, n'établissent pas de contact avec le messenger (Mathy et al., 2004). Ce manque d'interaction est pallié par l'établissement de contacts supplémentaires avec la chaîne ribose-phosphate dont la géométrie originale est imposée par l'organisation en pseudo-noeud de l'ARNm^{tpsO} (mimétisme entre l'hélice H22 de l'ARN 16S et la chaîne ribose-phosphate de la partie distale de l'hélice H2 du pseudo-nœud) (Mathy et al., 2004). Un deuxième jeu d'interactions, cette fois spécifiques, est établi avec le résidu A46 de l'opérateur de l'ARNm^{tpsO}. Ce nucléotide est l'unique constituant de la boucle L1 reliant les deux hélices empilées (H1 et H2) du pseudo-nœud, et pointe vers l'extérieur de la structure (Serganov et al., 2002). Cette orientation particulière permet à la base A46 d'interagir spécifiquement avec le résidu Arg57 de la protéine S15.

L'ARNm^{tpsO} utilise la même stratégie de régulation que l'ARNm^α, toutefois, dans ce cas, le pseudo-nœud existe sous une seule forme et la fixation de la protéine S15 inhibe la traduction en piégeant le complexe de pré-initiation de la traduction (sous-unité 30S associée à l'ARNt initiateur) sous une forme inactive (Philippe et al., 1993). Au contraire, chez *Thermus thermophilus*, S15 inhibe la traduction car elle entre directement en compétition avec le ribosome en obstruant son site de liaison (Serganov et al., 2003). De façon intéressante, l'ARNm^{tpsO} de *T.thermophilus* possède une structure pseudo-ARNr (différente de celle trouvée chez *E.coli*) qui, elle, mime essentiellement la jonction à trois hélice de l'ARNr 16S (Serganov et al., 2003) (Figure 16, au milieu).

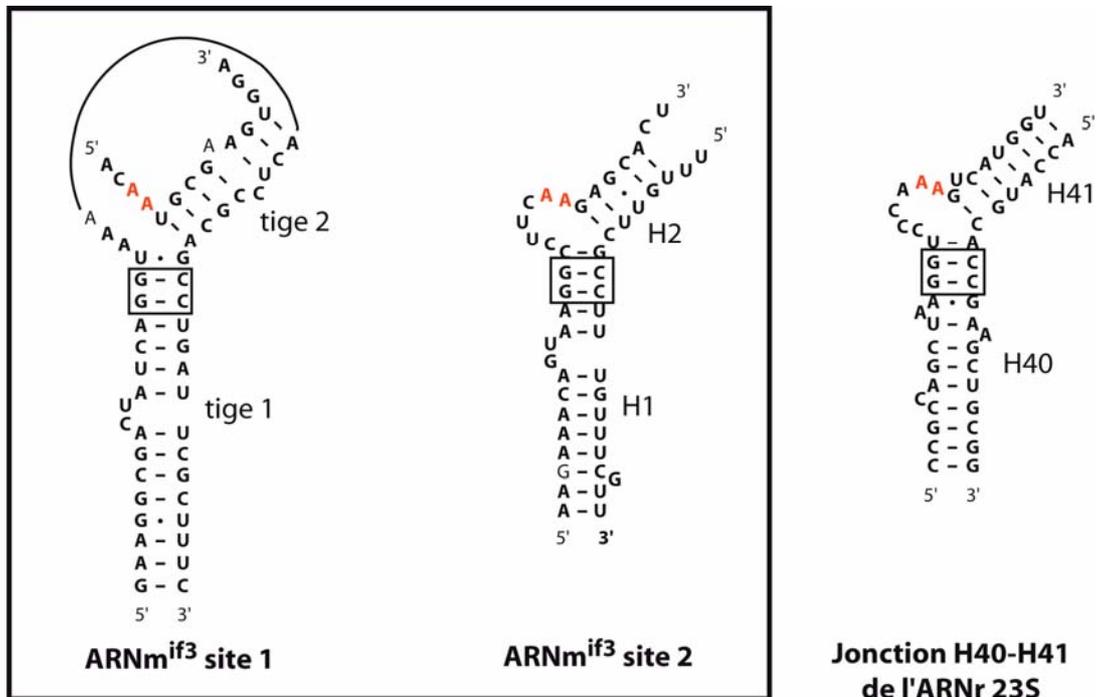


Figure 17 : Mimétismes structuraux entre les deux régions de l'ARNm^{if3} reconnues par la protéine ribosomique L20 et l'ARNr 23S. A gauche, la protéine L20 reconnaît deux sites de l'ARNm^{if3} (encadrés). Le site 1 correspond à une région en pseudo-nœud et le site 2 à une hélice interrompue par une bulle interne. A droite, la région de l'ARNr 23S reconnue par la protéine L20 s'organise également en une hélice interrompue par une bulle interne. Le doublet de A, important pour l'interaction des deux sites de l'ARNm^{if3} et de l'ARNr 23S avec la protéine L20, est représenté en rouge, et les deux paires de bases G-C communes aux 3 ARN sont encadrées. Figure adaptée de Guillet et al., 2004.

2.3.4 Autres mimétismes d'ARN ribosomique

Récemment, il a été montré chez *E.coli*, que la protéine L20 est le médiateur de la régulation traductionnelle des facteurs L35 et L20. Ces protéines font parties de l'opéron *IF3* codant pour trois protéines : IF3, L35 et L20. La reconnaissance de l'ARNm par L20 se fait en amont du cistron l35 au niveau de deux sites indépendants, le premier se repliant en pseudo-noeud et le second en tige-boucle irrégulière (Guillier et al., 2002) (Figure 17). Ces deux éléments miment la région de l'ARNr 23S reconnue par L20 dans le ribosome (Brodersen et al., 2002). En effet, dans les trois cas, on retrouve une organisation en hélice interrompue par une boucle interne dont les deux derniers résidus sont des adénines (Figure 17). De plus, des études de RMN ont montré que les trois structures d'ARN sont reconnues de façon équivalente par la protéine L20 (Raibaud et al., 2003; Guillier et al., 2005). De façon intéressante, chez *Bacillus subtilis*, cet opéron *IF3* conserve la même organisation génétique. Alors que la régulation agit au niveau traductionnel chez *E.coli*, la stratégie est différente chez *B.subtilis* (Choonee et al., 2004) qui utilise un mécanisme de terminaison/antiterminaison similaire à ceux employés par les ARN interrupteurs.

Les systèmes d'autorégulation qui viennent d'être présentés sont les exemples entérobactériens les mieux caractérisés. Toutefois, d'autres mécanismes ont été étudiés, mais de façon moins approfondie. Par exemple, chez les *archaea*, seul le mécanisme de régulation dirigé par la protéine L1 fait intervenir un mimétisme de l'ARNr 23S. Les particularités de ce système sont que le pseudo-ARNr se trouve dans la phase codante (Hanner et al., 1994) et que la répression traductionnelle s'exerce *via* un mécanisme ne faisant intervenir ni déplacement, ni capture du ribosome (Kraft et al., 1999).

Enfin, le seul élément soupçonné d'exercer un mimétisme d'ARNr chez les eucaryotes est trouvé dans l'ARNm^{rp132}, codant pour la protéine L30 de levure (Li et al., 1996). L'opérateur de cette régulation est composé de deux hélices séparées par une boucle interne, dont la richesse en purines lui confère la propriété de se structurer en « K-turn » (White et al., 2004). Cette organisation particulière est retrouvée au niveau de la jonction exon1/intron1 mais également, après épissage, au niveau de la jonction exon1/exon2. Ainsi, un même complexe ARN/protéine exerce une régulation non seulement au niveau de l'épissage mais également au niveau de la traduction d'un même ARNm. Cependant, aucune étude structurale n'a permis d'établir clairement une homologie entre l'opérateur rp132 et l'ARNr 28S.

Ces stratégies de mimétisme, très employées pour réguler l'expression des protéines ribosomiques, sont également utilisées pour réguler l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse des aa et leur incorporation dans la synthèse protéique (aminoacyl-ARNt synthétases). Cependant, dans ces voies de régulation les ARN mimés ne sont plus les ARNr mais d'autres petits ARN non codants, abondants et impliqués dans la synthèse protéique : les ARN de transfert ou ARNt.

II Les ARN de transfert : des ARN non-codant à fonctions régulatrices en *cis* et en *trans*

Les ARN de transfert (ARNt) sont les adaptateurs moléculaires permettant la conversion de l'information génétique en information protéique. Une cellule contient en règle générale 20 familles d'ARNt (une par acide aminé) qui doivent être pris en charge de façon identique par la machinerie de traduction. Cette homologie fonctionnelle implique que l'ensemble des ARNt doit posséder une organisation compacte structurale commune pour pouvoir interagir avec les différents intervenants de la voie de maturation (RNases P et Z, CCCase, endonucléase) et de la synthèse protéique (EF-TU, ribosome). Pour assurer cette dernière fonction, chaque famille d'ARNt doit être aminoacylée spécifiquement par une aminoacyl-ARNt synthétase donnée.

En plus de son rôle dans la traduction, cet arrangement structural particulier a été détourné par la cellule pour servir d'autres fonctions, intervenant notamment dans la régulation de l'expression de différents gènes. Ces fonctions sont en partie assurées par des régions d'ARNm mimant la structure caractéristique des ARNt (action en *cis*), mais certaines voies de régulation utilisent l'ARNt canonique comme ARN régulateur (action en *trans*). Dans ce second cas, l'ARNt est issu de la voie de biosynthèse classique des ARNt. Les différentes étapes décrites pour la synthèse et la maturation des ARNt dans le paragraphe suivant s'appliquent en particulier aux ARNt cytoplasmiques eucaryotes. Ces règles peuvent varier considérablement, notamment dans le cas des ARNt mitochondriaux (Helm et al., 2000), où parfois certains domaines de l'ARNt peuvent être absents (par exemple, le domaine D de l'ARNt^{Ser}).

1. Structure, biosynthèse et fonction primordiale des ARNt

Les homologies structurales partagées par les ARNt cytoplasmiques sont retrouvées tant au niveau de leur repliement secondaire, qu'au niveau de leur organisation tridimensionnelle. Le repliement secondaire canonique des ARNt consiste en une feuille de trèfle qui se divise en 5 domaines : le bras accepteur, le domaine D, le domaine T, la région variable et le domaine anticodon (Figure 18a). Chacun de ces domaines présente des caractéristiques structurales conservées parmi tous les ARNt cytoplasmiques (Sprinzl et Vassilenko, 2005), en particulier au niveau des régions hélicoïdales. Ainsi, le bras accepteur comporte presque toujours 7 paires de bases (8 dans le système histidine), le bras

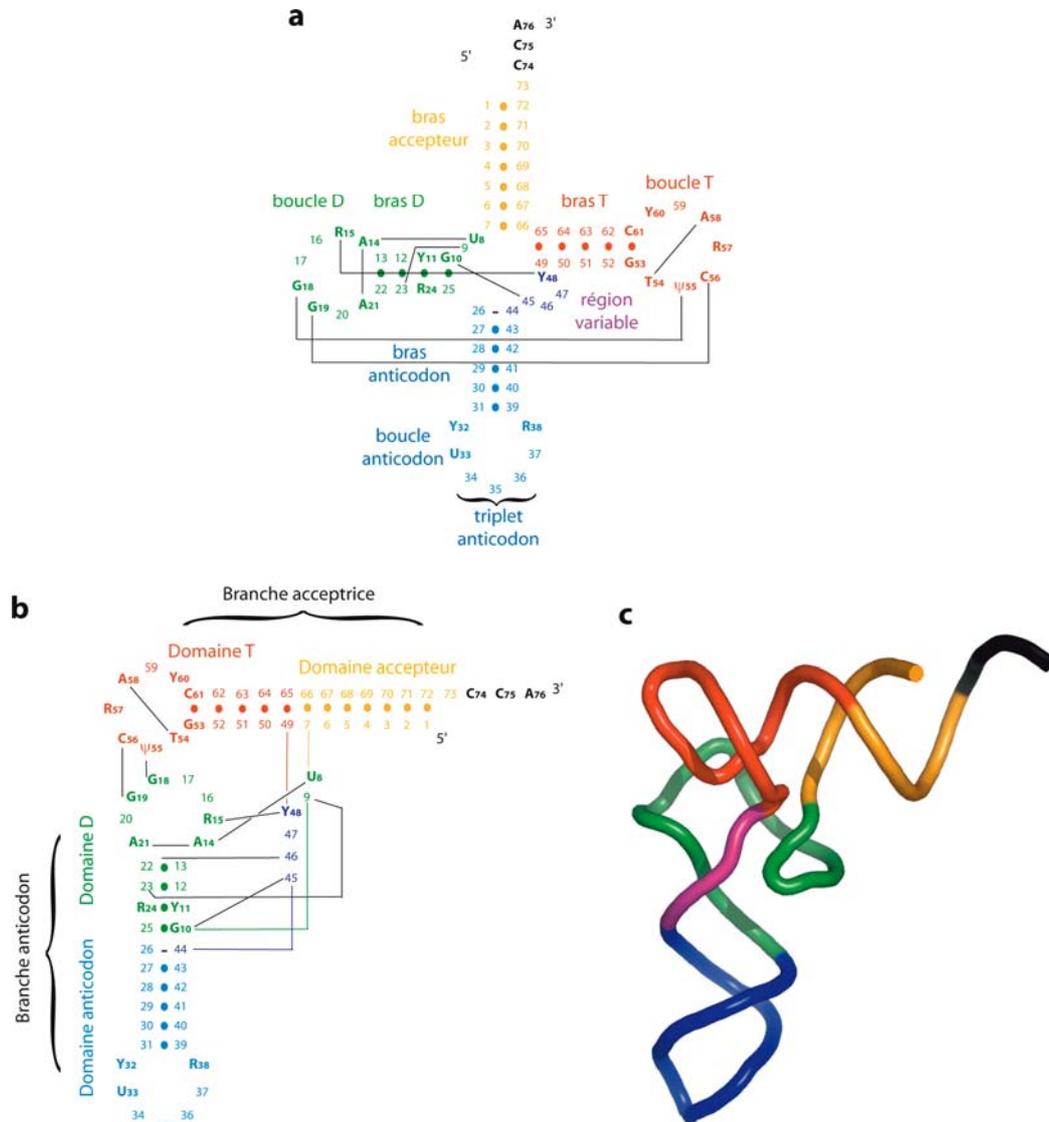


Figure 18 : Structures secondaire et tertiaire des ARN de transfert canoniques. **(a)** Repliement secondaire en feuille de trèfle et **(b, c)** repliement tertiaire en L inversé des ARNt mettant en évidence les 5 domaines structuraux caractéristiques des ARNt : le domaine accepteur (jaune), le domaine D (vert), le domaine anticodon (bleu), la région variable (violet) et le domaine T (rouge). Les résidus strictement conservés et semi-conservés sont indiqués, avec Y correspondant à une pyrimidine, R à une purine, ψ représentant une pseudo-uridine et T une thymine. Les interactions tertiaires soutenant la structure compacte des ARNt sont indiquées.

D 4 paires de bases, le bras T et la tige anticodon 5 paires de bases. Enfin, les boucles T et anticodon sont toujours des boucles heptamériques, alors que les tailles de la boucle D et de la région variable fluctuent. En plus de l'organisation structurale, un certain nombre de résidus sont strictement (A14, G18, G19, A21, G53, T54, Ψ55, C56, A58 et C61) ou partiellement (Y11, R15, R24, Y32, R38, Y48, R57, Y60) conservés. Une grande partie de ces résidus est impliquée dans l'établissement d'interactions tertiaires, conférant à l'ARNt une structure tridimensionnelle en L (revue par Giegé et Frugier, 2003) (Figure 18b et c). Cette structure très compacte a d'abord été déterminée pour l'ARNt^{Phe} (Kim et al., 1974; Robertus et al., 1974), puis pour d'autres dont l'ARNt^{Asp} (Moras et al., 1980). Elle est divisée en deux régions structurellement distinctes résultant de l'empilement co-axial des hélices des domaines accepteur et T, et d'un arrangement équivalent des domaines D et anticodon. Les branches acceptrice et anticodon, ainsi formées, placent les boucles T et D dans le coude du L, le CCA accepteur à une extrémité du L et le triplet anticodon à l'opposé. Enfin, la présence d'un U conservé à la position 33 de la boucle anticodon permet la mise en place d'un « U-turn » (Quigley et Rich, 1976; Auffinger et Westhof, 2001) similaire à celui précédemment cité dans le cas des riborégulateurs bactériens (mok et copT). Ce « U-turn » permet une présentation optimale des nucléotides de la boucle anticodon, pour interagir avec l'ARNm par des interactions Watson-Crick classiques, ou avec certaines protéines.

Ces conservations de séquences n'interviennent pas uniquement à un niveau structural, mais également à un niveau fonctionnel tout au long de la vie de l'ARNt. En effet, chez les eucaryotes, les séquences d'ADN correspondant à la partie 5' du bras D et à la boucle D (résidus 8 à 19) et la région d'ADN correspondant à la boucle T (résidus 52 à 62) sont respectivement les boîtes A et B du promoteur interne de l'ARN polymérase III (Sprague, 1995). Bien que l'ARNt fraîchement transcrit puisse déjà adopter sa structure en feuille de trèfle (Figure 19a), celui-ci subit différentes réactions de maturation (Nakanishi et Nureki, 2005). Dans un premier temps, la RNase P clive en 5' du pré-ARNt et libère un ARNt commençant au résidu 1 (Figure 19b). La partie ARN du ribozyme (de la RNase P) reconnaît l'ARN cible en s'appariant au bras T, à la boucle T et au CCA, alors que la partie protéique reconnaît la région 5' à exciser. Une fois l'extrémité 5' maturée, la RNase Z prend en charge l'ARNt (bras T et accepteur) et catalyse un clivage endonucléotidique en aval de la base discriminatrice en position 73 (Figure 19c) (Sierra-Gallay et al., 2005). Enfin, la terminale-nucléotide transférase, ou CCCase, reconnaît l'ARNt mûr (au niveau

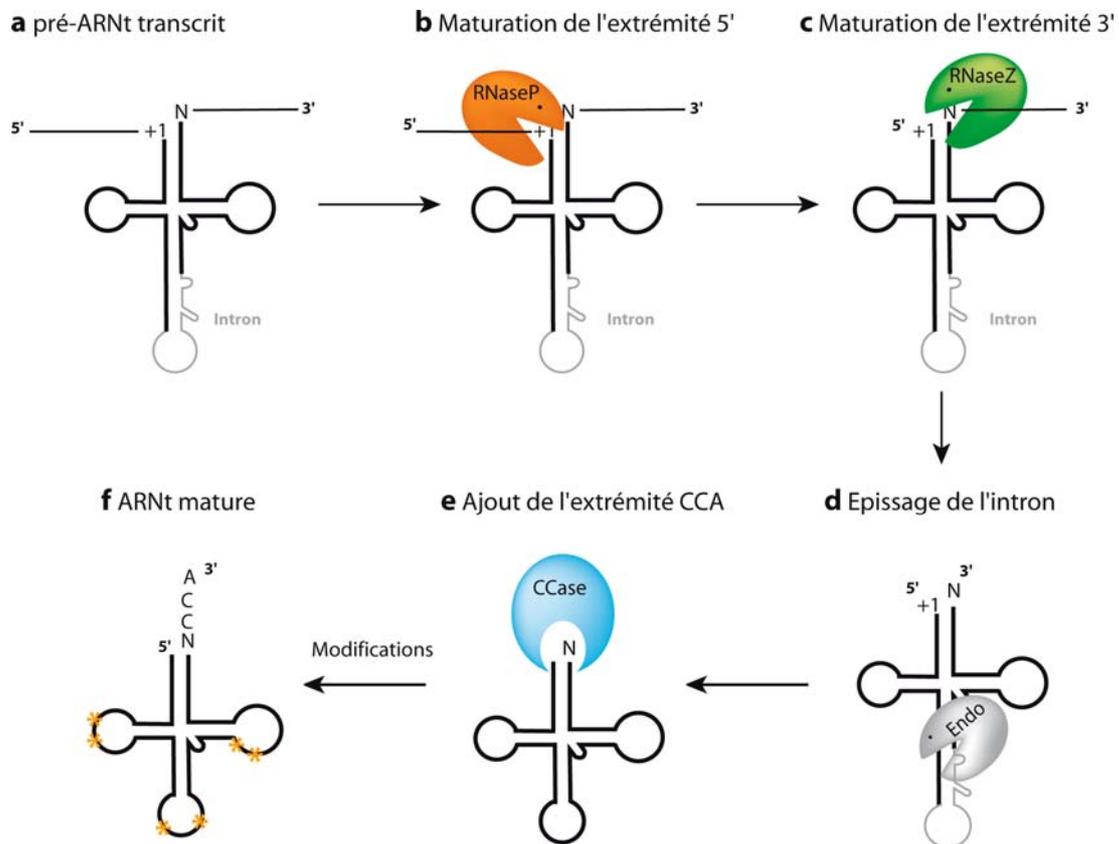


Figure 19 : Les étapes de la maturation des ARN de transfert. (a) Le précurseur d'ARNt (pré-ARNt) transcrit par l'ARN polymérase III possède des séquences additionnelles en 5', en 3', ou encore interne (intron). (b) L'action de la RNase P libère l'extrémité 5' mature de l'ARNt. (c) La RNase Z clive le précurseur en aval de la base discriminatrice (N). (d) L'action concertée d'une endonucléase et d'une ligase (non représentée) permet l'excision de la séquence intronique et la ligation de la boucle anticodon de l'ARNt. (e) L'ARNt, débarrassé de ses séquences excédentaires, est alors substrat de la terminale-nucléotide transférase (CCase) qui ajoute une extrémité CCA en 3' de l'ARNt. (f) Enfin, l'action des enzymes de modification conduit à l'obtention d'un ARNt mature et modifié (*).

du coude formé par les boucles T et D) et prolonge celui-ci de deux résidus C et un résidu A à son extrémité 3' (Figure 19e) (Tomari et al., 2002; Augustin et al., 2003). Les ARNt ainsi produits sont matures en taille, toutefois ils ne seront pleinement actifs et correctement structurés qu'après la modification de certaines de leurs bases (Figure 19f) (Ferré-D'Amaré, 2003; Nakanishi et Nureki, 2005). Ces modifications agissent notamment en rigidifiant la structure de l'ARNt (Hall et al., 1989; Perret et al., 1990a; Przykorska, 1995). Elles sont extrêmement variées chimiquement et nécessitent l'intervention d'un grand nombre d'enzymes de modification (Grosjean et Benne, 1998).

Environ le quart des ARNt exprimés dans la levure contient un intron dont la taille peut varier de 14 à 60 nucléotides. Cette séquence additionnelle interrompt la boucle anticodon immédiatement en 3' du triplet anticodon. Ainsi, dans la forme non épissée, la séquence anticodon est emprisonnée dans une hélice qui prolonge le bras anticodon (Figure 19d). L'excision de ces introns se fait en trois étapes : une endonucléase reconnaît et excise la séquence intronique, une ligase referme la boucle anticodon et une phosphotransférase élimine le phosphate excédentaire laissé par l'endonucléase (Abelson et al., 1998).

Les ARNt ainsi maturés sont des substrats efficaces de la réaction d'aminacylation catalysée par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS). Cette réaction se doit d'être spécifique afin de ne pas mettre en péril la fidélité de la traduction de l'information génétique. Cependant, la structure caractéristique en L, commune à tous les ARNt, pourrait être un obstacle à leur aminacylation spécifique. Ce problème est contourné par la mise en place de règles d'identité (second code génétique) grâce auxquelles chaque ARNt est identifié et recruté spécifiquement par son aaRS homologue (Giegé et Frugier, 2003 et section III.2.2).

2. Les structures d'ARNt dans des fonctions de régulation

Après son rôle d'adaptateur moléculaire dans la traduction de l'information génétique, la fonction la plus importante de l'ARNt est certainement son implication dans la régulation de l'expression de gènes. Dans ce rôle, l'ARNt a ceci de particulier que l'on retrouve sa structure à la fois dans des régulations basées sur l'action de séquences d'ARNt en *cis* et de structures d'ARNt en *trans*. Les ARNt impliqués dans les régulations en *trans*, sont, à une exception près (BC1), les mêmes molécules que celles intervenant dans la traduction et conserveront dans la suite de cette Introduction le nom d'ARNt. Par

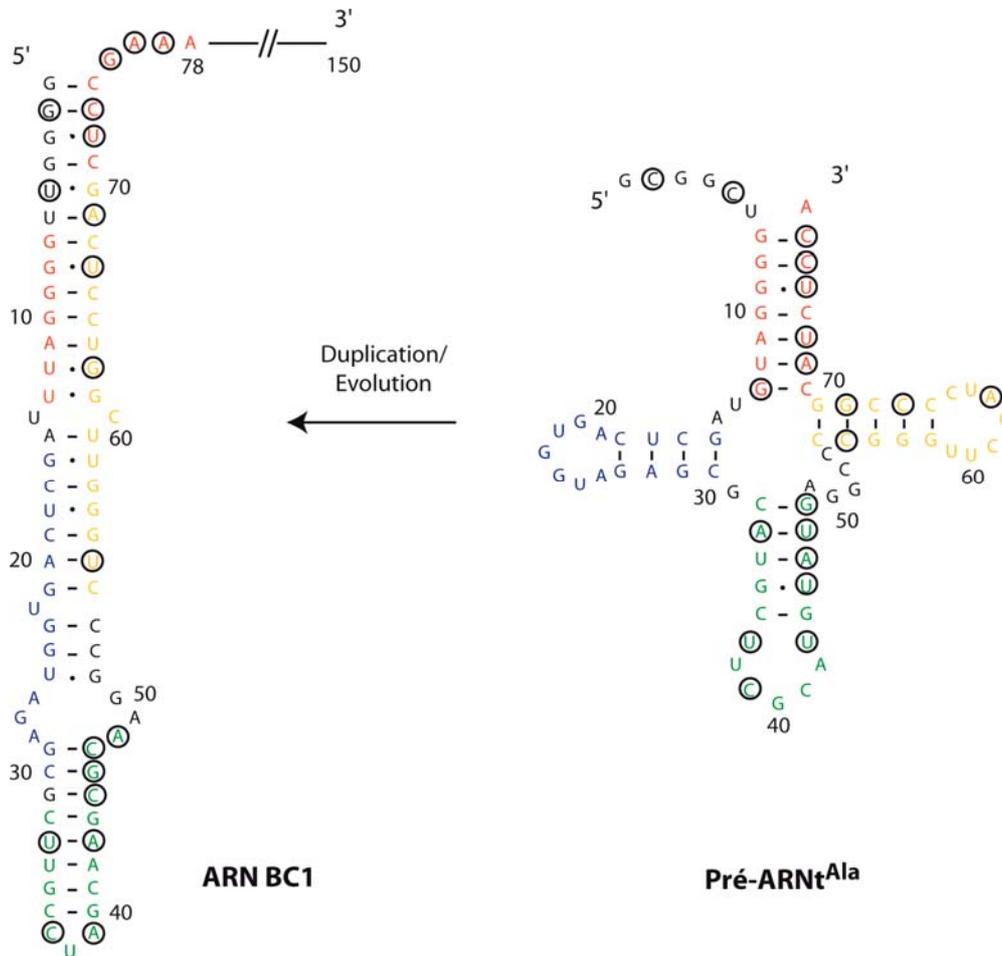


Figure 20 : Deux structures pour une « même » séquence : l'ARN BC1 et l'ARNt^{Ala} de cerveau de rongeur. La structure en longue épingle à cheveux du domaine 5' de l'ARN BC1 (à gauche) et la structure secondaire canonique en feuille de trèfle du précurseur de l'ARNt^{Ala} (à droite) sont représentées avec les séquences nucléotidiques équivalentes indiquées par les mêmes couleurs. Les résidus ayant mutés au cours de l'évolution de la séquence de l'ARN BC1 sont encerclés. Figure tirée de Brosius et al., 2001.

opposition, les structures d'ARNt agissant en *cis* seront nommées pseudo-ARNt. Ces dernières correspondent, en général, à des repliements très élaborés mimant un ARNt et sont présentes dans les ARNm régulés. Au cours de ces 20 dernières années un grand nombre de gènes, en particulier ceux codant pour des aminoacyl-ARNt synthétases ou des protéines impliquées dans le métabolisme des aa, ont été identifiés comme étant les cibles de mécanisme de régulation utilisant l'ARNt, en particulier chez les procaryotes. Comme c'est le cas pour les protéines ribosomiques, les aaRS reconnaissent des mimes moléculaires d'ARN (pseudo-ARNt, plus ou moins fidèles) dont on retrouve les traces aujourd'hui dans la régulation de leur expression.

2.1 Le pseudo-ARNt BC1, un riborégulateur en *trans*

Les exemples de structures d'ARNt agissant en *trans* dans des mécanismes de régulation autres que ceux étudiés pour le contrôle de l'expression des aaRS (Article de revue n°1) sont très rares. L'ARN non codant cytoplasmique BC1, identifié dans le cerveau des rongeurs (BC200 chez les primates) est le seul exemple connu à ce jour. Cet ARN est organisé en trois domaines structurellement indépendants. Le domaine 3' de la molécule forme une petite tige-boucle de 25 résidus et est relié au domaine 5' par une région simple-brin de 54 résidus riche en adénines. Les 74 premiers résidus constituant l'extrémité 5' de cet ARN présentent près de 75% d'homologie avec le précurseur de l'ARNt^{Ala} cytoplasmique (Figure 20). Toutefois la structure adoptée par BC1 est différente de celle qui caractérise les ARNt canoniques. L'accumulation de mutations a déplacé la structure en feuille de trèfle de l'ARNt^{Ala} vers un repliement en une longue épingle à cheveux dans l'ARN BC1 (Rozhdestvensky et al., 2001). Du fait de cette structure dégénérée et de l'absence de CCA 3' terminal, le domaine 5' de l'ARN BC1 ne peut être aminoacylé par l'AlaRS. En fait, BC1 intervient dans des mécanismes de régulation traductionnelle et semble agir au sein d'une ribonucléoparticule contenant notamment la protéine FMRP. Alors que le domaine 3' et la région centrale sont impliqués dans l'interaction de BC1 avec ses partenaires protéiques (eIF4A et FMRP en 3', et PABP au centre), l'extrémité 5' joue un rôle d'ARN guide, dirigeant le complexe de régulation sur les ARNm de séquences complémentaires au « pseudo-ARNt^{Ala} » (Zalfa et al., 2003). Le mécanisme par lequel la traduction est inhibée n'est pas encore compris, mais il est intéressant de noter qu'il existe des similarités importantes entre BC1 et les miARN, en particulier, l'implication de FMRP, constituant du complexe RISC (Siomi et al., 2004).

2.2 L'ARNt régule l'expression des aminoacyl-ARNt synthétases

Article de revue n°1 :

Les ARNt et les pseudo-ARNt fédèrent les mécanismes de régulation de l'expression des aminoacyl-ARNt synthétases

Michaël Ryckelynck, Richard Giegé et Magali Frugier

2005

Biochimie, **article sous presse**

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

tRNAs and tRNA mimics as cornerstones of aminoacyl-tRNA synthetase regulations

Michaël Ryckelynck, Richard Giegé et Magali Frugier

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2005.02.014>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

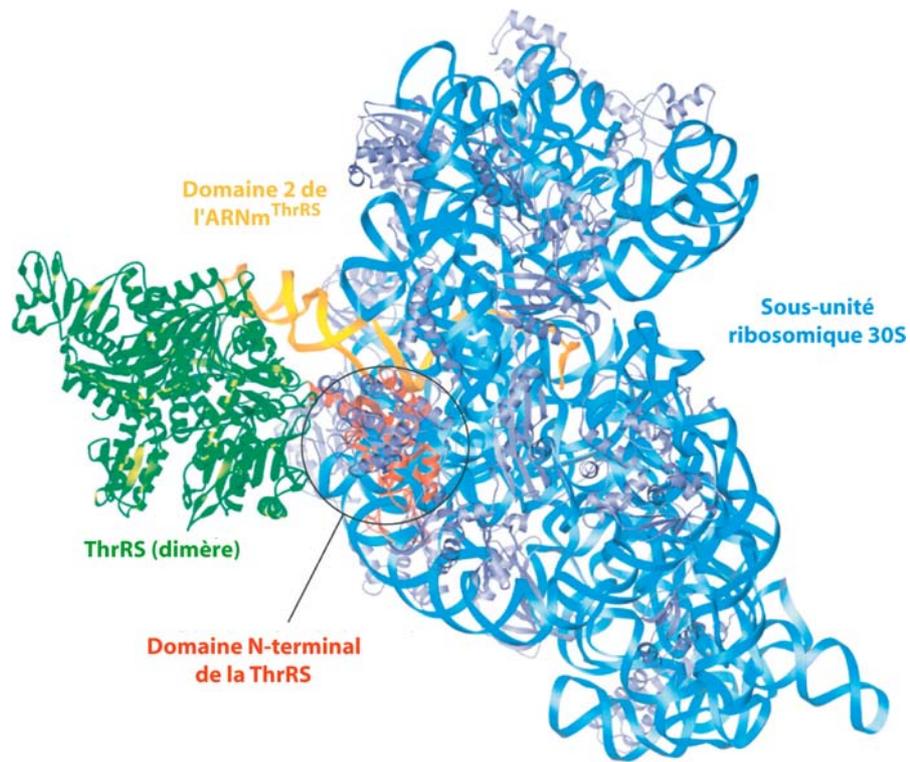


Figure 21 : Superposition des structures cristallographiques de la région de l'opérateur thrRS en complexe avec un dimère de ThrRS et la sous-unité ribosomique 30S. L'ARNm^{ThrRS} est représenté par un ruban orange, alors que la ThrRS est en rouge et vert et le ribosome en bleu. Le domaine N-terminal de la ThrRS (en rouge) occupe le même espace que la sous-unité 30S du ribosome sur l'ARNm^{ThrRS}. Figure tirée de Jenner et al., 2005.

Depuis la rédaction de cet Article de revue, les travaux de différents groupes ont été publiés apportant de nouvelles données sur le mode d'action de ces mécanismes. Cette mise à jour concerne plus particulièrement le mécanisme d'antitermison basé sur les boîtes T chez *B.subtilis*. L'activité enzymatique catalysant la coupure dans l'antitermineur de l'opérateur de l'ARNm^{ThrRS} a pu être identifiée et implique deux protéines homologues à la RNase E d'*E.coli*, baptisées J1 et J2 (Even et al., 2005). De plus, l'existence de l'interaction entre l'ARNt et l'opérateur à boîte T a pu être démontrée *in vitro* (Yousef et al., 2005). L'utilisation du système glyQS de *B.subtilis* a apporté la solution puisque non seulement l'organisation de la région opératrice est plus simple que celle du système tyr, mais en plus celui-ci fonctionne avec du transcrit d'ARNt et de l'ARN polymérase purifiée (Grundy et al., 2002). Ce système d'étude *in vitro* a permis de montrer que l'opérateur adopte un repliement compétent pour l'antitermison en l'absence d'ARNt. Ceci est vrai à n'importe quel moment de la transcription, tant que la polymérase n'a pas transcrit la séquence en aval de l'antitermineur (Grundy et Henkin, 2004; Grundy et al., 2005). L'interaction débute par la reconnaissance de l'ARNt portant un anticodon totalement complémentaire à la séquence « specifier » (Yousef et al., 2005). Une fois cette première interaction établie, l'extrémité CCA de l'ARNt reconnaît un second site de liaison. Cette séquence XCCA interagit alors avec une séquence complémentaire localisée dans une bulle interne de l'antitermineur, achevant ainsi d'ancrer l'ARNt à la région opératrice. A ce stade, la structure tridimensionnelle de l'ARNt joue un rôle prépondérant en disposant l'extrémité XCCA dans une conformation optimale pour l'interaction (Yousef et al., 2003). Cette interaction provoque une rigidification globale de cette région du messenger, notamment au niveau de la bulle interne de l'antitermineur (Yousef et al., 2005).

D'autre part, le mode de régulation dirigé par la ThrRS a été définitivement confirmé par la résolution de la structure cristallographique d'une région de l'opérateur de l'ARNm^{ThrRS} en complexe avec la sous-unité 30S du ribosome (Jenner et al., 2005). La superposition de ce complexe sur le même domaine d'ARN complexé à la ThrRS montre clairement que, le domaine N-terminal de la protéine entre en collision avec le ribosome, ce qui serait suffisant pour en bloquer la fixation sur l'ARNm^{ThrRS} (Figure 21).

Le seul mécanisme de régulation des aaRS bien caractérisé chez les eucaryotes, exception faite de l'AspRS de levure qui fait l'objet de cette thèse, est la voie GCN2. De façon intéressante, deux équipes ont montré récemment que cette voie pourrait régir le comportement alimentaire du rat (Hao et al., 2005; Maurin et al., 2005). Ainsi, le manque

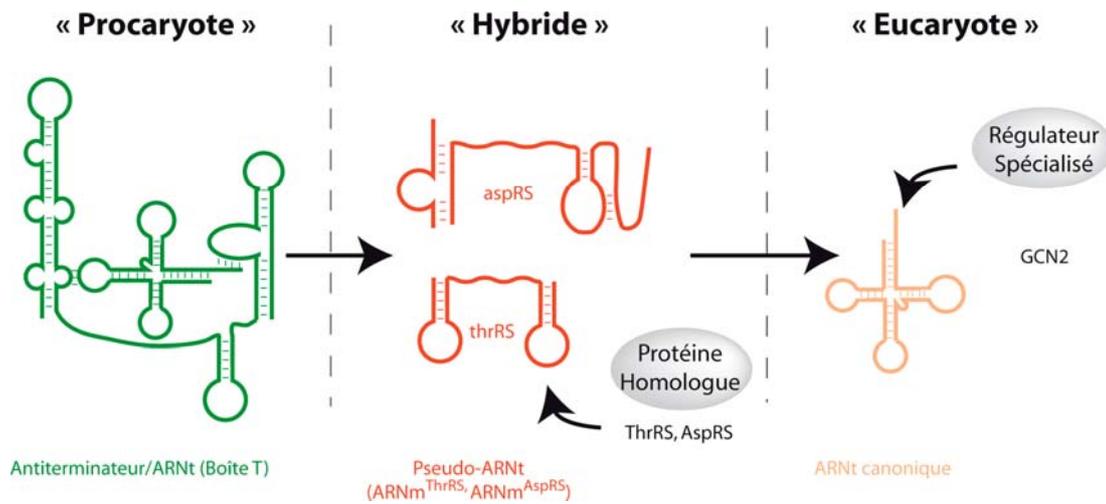


Figure 22 : L'ARNt et les structures pseudo-ARNt dans les mécanismes de régulation. Ce schéma résume les situations où la structure des ARNt est utilisée dans la régulation de l'expression des gènes. Comme les autres riborégulateurs, cette structure agit en *cis* ou en *trans* par rapport à l'ARNm régulé. Ces mécanismes ont été identifiés dans les trois règnes et permettent d'illustrer l'omniprésence des structures d'ARNt et ses dérivés.

d'un aa essentiel dans le repas de l'animal lui serait signalé par la voie GCN2, conduisant alors le rat à arrêter de consommer la nourriture déficiente.

Enfin, la récente observation que le niveau d'expression de l'arginyl-ARNt synthétase est inversement proportionnel à l'expression de miR16-1 (Calin et al., 2002; Bottoni et al., 2005) suggère que certaines aaRS, dans les organismes les plus évolués (mammifères), pourraient être soumises à un contrôle par miARN.

Lorsque l'on considère l'ensemble de ces mécanismes, dont le point commun est d'utiliser un ARNt ou une structure mimant un ARNt, on constate qu'ils illustrent parfaitement le modèle d'évolution proposé comme fil conducteur à cette Introduction et selon lequel plus un organisme est évolué, moins la structure d'ARN impliquée est complexe (Figure 22). (i) Le système d'antiterminaison à boîte-T, qui ne s'appuie que sur des composantes ARN, peut être considéré comme appartenant à la même classe que les ARN interrupteurs et, de ce fait, comme un vestige du monde de l'ARN. (ii) Les mimes d'ARNt utilisés dans les régulations font partie des systèmes de type « hybride » pour lesquels aucun remaniement structural n'est nécessaire. Enfin, chez les eucaryotes, ces régulations sont encore mal connues, mais impliquent des facteurs de régulation spécialisés (comme GCN2) prenant en charge l'ARNt sous sa forme canonique.

3. Autres structures pseudo-ARNt et fonctions non-canoniques des ARNt

En dehors des mécanismes de régulation, les structures d'ARNt ont également été largement exploitées par les virus, certaines bactéries, voir des eucaryotes unicellulaires. Dans ces exemples, les ARNt et les pseudo-ARNt participent à des fonctions variées telles que la réplication virale, le recyclage des ribosomes bactériens ou encore la synthèse des protéines membranaires et sécrétées chez Trypanosome. Les pseudo-ARNt viraux seront abordés dans les Résultats, à la suite de la présentation de l'Article n°2. Les deux autres exemples utilisent deux structures pseudo-ARNt impliquées dans des étapes cotraductionnelles, soit au niveau du recyclage des ribosomes par l'ARN transfert-message (ARNtm), soit au niveau de la reconnaissance des protéines extracellulaires en cours de traduction (ARNs-85).

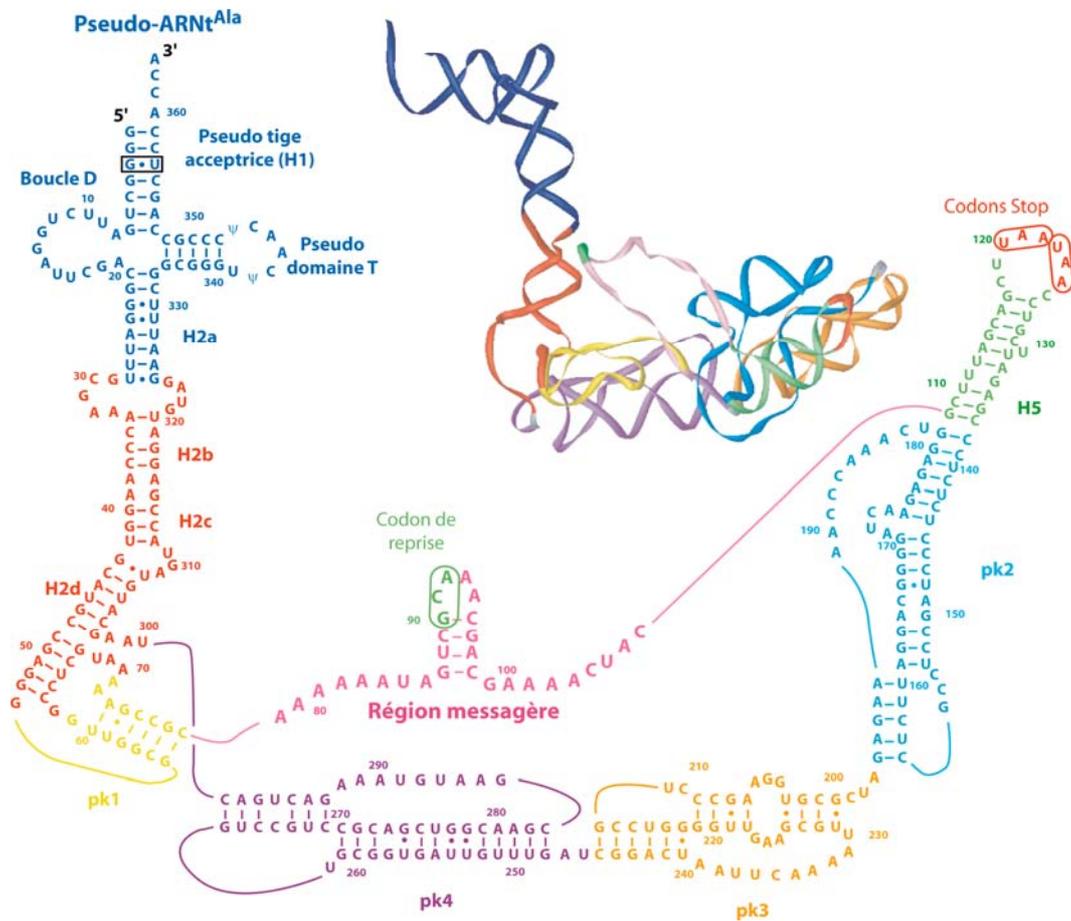


Figure 23 : Organisation structurale de l'ARN transfert-message. L'ARNtm est représenté sous sa forme libre. Les repliements secondaire et tertiaire de l'ARN utilisent les mêmes couleurs pour identifier chaque domaine structural. La région pseudo-ARNt^{Ala} est indiquée en bleu, la portion simple-brin de la région messagère est en magenta, et le réseau de pseudo-nœuds, H2, pK1, pK2, pK3 et pK4, composant la plateforme de présentation de la région messagère, sont indiqués en rouge, jaune, cyan, orange et violet, respectivement. Le codon de reprise de la traduction (vert) et les deux codons Stops (rouge) limitent l'ORF. La paire de bases G•U essentielle pour l'alanylation de l'ARNtm est encadrée. Figure adaptée de Burcks et al., 2005.

3.1 L'ARN transfert-message

Une mutation ou une coupure de la chaîne ribose-phosphate peut conduire à l'obtention d'un ARNm dépourvu de codon Stop et, dans ce cas, à la séquestration du ribosome à l'extrémité 3' de celui-ci. Pour prévenir cette situation délétère, les bactéries ont développé un mécanisme de recyclage des ribosomes bloqués, basé sur un ARN à la fois de transfert et messenger appelé ARN^tm (Saguy et al., 2005). Cet ARN s'organise en deux domaines structuraux portant chacun une fonction particulière.

Le premier domaine fonctionnel de cet ARN est le pseudo-ARN^t^{Ala}, résultant de l'appariement des extrémités 5' et 3' de l'ARN^tm (Figure 23). Cette région adopte un repliement en L ressemblant à celui de l'ARN^t, toutefois un certain nombre de différences existent entre l'ARN^t original et son mime. Bien que le bras accepteur et le domaine T soient conservés, le domaine D se réduit à une grande boucle, et le domaine anticodon est remplacé par une longue hélice connectant le pseudo-ARN^t au reste de la molécule. On retrouve une paire de bases G•U en troisième position de l'hélice acceptrice de cet ARN^tm. Cet élément constitue l'élément d'identité majeur du système alanine, permettant à l'ARN^tm d'être spécifiquement reconnu et aminoacylé par l'AlaRS au niveau de son adénine 3' terminale. La boucle D et la région variable sont reconnues par la protéine SmpB (Small protein B) (Gutmann et al., 2003). Cette protéine est toujours présente sur l'ARN^tm alanylé qui est pris en charge par le facteur d'élongation EF-Tu, comme un ARN^t classique. Celui-ci est alors amené au niveau du site A libre d'un ribosome bloqué sur l'ARNm défectueux, où il stimule la transpeptidation et permet le transfert de la chaîne peptidique sur son domaine pseudo-ARN^t^{Ala}.

L'ARN^tm permet non seulement de libérer le ribosome piégé sur l'ARN défectueux, mais également de marquer la protéine incomplète. En effet, la région messagère de l'ARN^tm code pour un peptide de dix aa correspondant à un signal de dégradation. Cette région messagère présente un dense réseau de pseudo-noeuds qui la maintient dans une conformation optimale et place le codon de reprise de la traduction à proximité de la région pseudo-ARN^t. Le mécanisme exact de la trans-traduction qui suit est encore mal connu, toutefois, il semble que SmpB y joue un rôle prédominant. La protéine ribosomique S1 intervient également dans ce changement de matrice en rendant le codon de reprise plus accessible (Saguy et al., 2005). Aux codons Stop, la traduction s'arrête et la protéine marquée sera dégradée par des protéases spécifiques.

Récemment, une étude comparative de modélisation tridimensionnelle des ARN^m de différents micro-organismes a permis de montrer une organisation structurale conservée de cet ARN dans différentes bactéries à Gram positif ou négatif (Burks et al., 2005). Dans chaque cas, on retrouve une organisation en pseudo-ARN^t^{Ala}, associée à une phase codante dont le codon de reprise varie d'une souche à l'autre (Ala chez les entérobactéries, Gly chez *Bacillus* et Asp chez *Staphylococcus*), mais qui est toujours maintenu à proximité du pseudo-ARN^t grâce à un réseau complexe de pseudo-nœuds.

3.2 L'ARNs-85 de Trypanosome

L'ARNs-85 de trypanosome est une autre structure mimant les ARN^t. Bien que l'identité de l'ARN^t mimé n'ait pu être établie, L'ARNs-85 possède le potentiel de se replier en feuille de trèfle canonique avec un domaine D, une boucle T (séquences constituant le promoteur interne de l'ARN polymérase III) et une extrémité 3' CCA. Cet ARN s'associe à l'ARN 7-sl, le composant principale de la particule de reconnaissance du signal d'excrétion des protéines (SRP). Chez les eucaryotes, l'ARN 7-sl de la SRP reconnaît les chaînes polypeptidiques en cours de synthèse, porteuses du signal d'excrétion. Cette interaction suffit, en règle générale, pour suspendre l'élongation de la traduction de la protéine ainsi identifiée, en interférant avec le ribosome, le temps de sa relocalisation sur le réticulum endoplasmique. Cependant, chez les Trypanosomes, la présence de la structure pseudo-ARN^t de l'ARNs-85 est nécessaire pour compenser une délétion apparue dans la structure de l'ARN 7-sl.

3.3 Mimétisme d'ARN^t par des facteurs protéiques

De façon remarquable, les ARN^t ne sont pas mimés uniquement par des ARN, mais le sont également par certaines protéines, en l'occurrence les facteurs impliqués dans les dernières étapes de la traduction (Nakamura et Ito, 2003). Chez les eucaryotes, l'exemple le plus révélateur est le facteur eRF1 (Facteur de relargage du peptide). Cette protéine reconnaît les codons Stop (UGA, UAA et UAG), s'y apparie et ainsi provoque l'hydrolyse de la liaison associant la chaîne polypeptidique synthétisée sur le dernier ARN^t présent dans le site P du ribosome. La détermination de la structure cristallographique du facteur eRF-1 a permis d'expliquer le mode d'action de cette protéine et de caractériser les bases structurales d'un mimétisme de l'ARN^t (Figure 24). Celui-ci repose sur la présence de deux motifs exposés en surface de la protéine. Le premier motif (TASNIKS) mime

fonctionnellement un anticodon en reconnaissant les résidus du codon Stop. Toutefois, le mode exact de reconnaissance reste à déterminer. Le second motif (GGQ) mime l'extrémité CCA non aminoacylée des ARNt qui, en interagissant avec le ribosome au niveau du site de transpeptidation, promeut l'hydrolyse de la liaison entre l'ARNt et la chaîne polypeptidique.

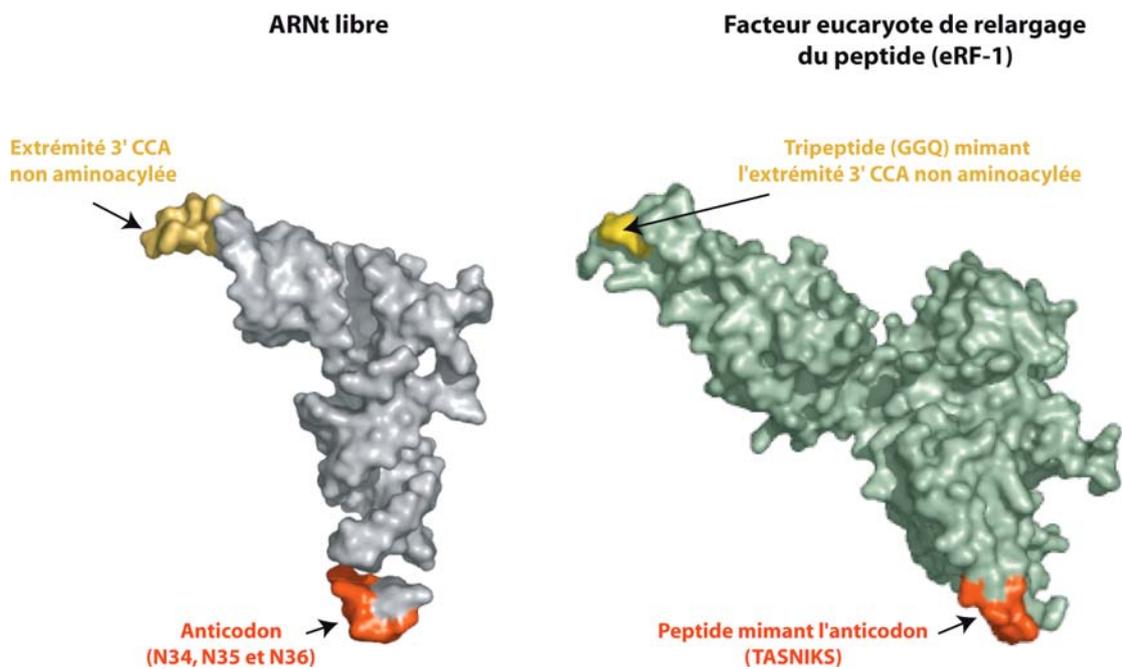


Figure 24 : Mimétisme des ARNt par le facteur eucaryote de relargage des peptides (eRF-1). Les structures cristallographiques de l'ARNt^{Asp} (à gauche) et du facteur eRF-1 (à droite) sont représentées en surfaces et permettent de mettre en valeur les domaines fonctionnels de l'ARN et de la protéine. Les régions en contact avec les codons de l'ARNm sont en rouge et celles en contact avec le site de transpeptidation du ribosome sont indiquées en jaunes. Figure adaptée de Nakamura et Ito, 2003.

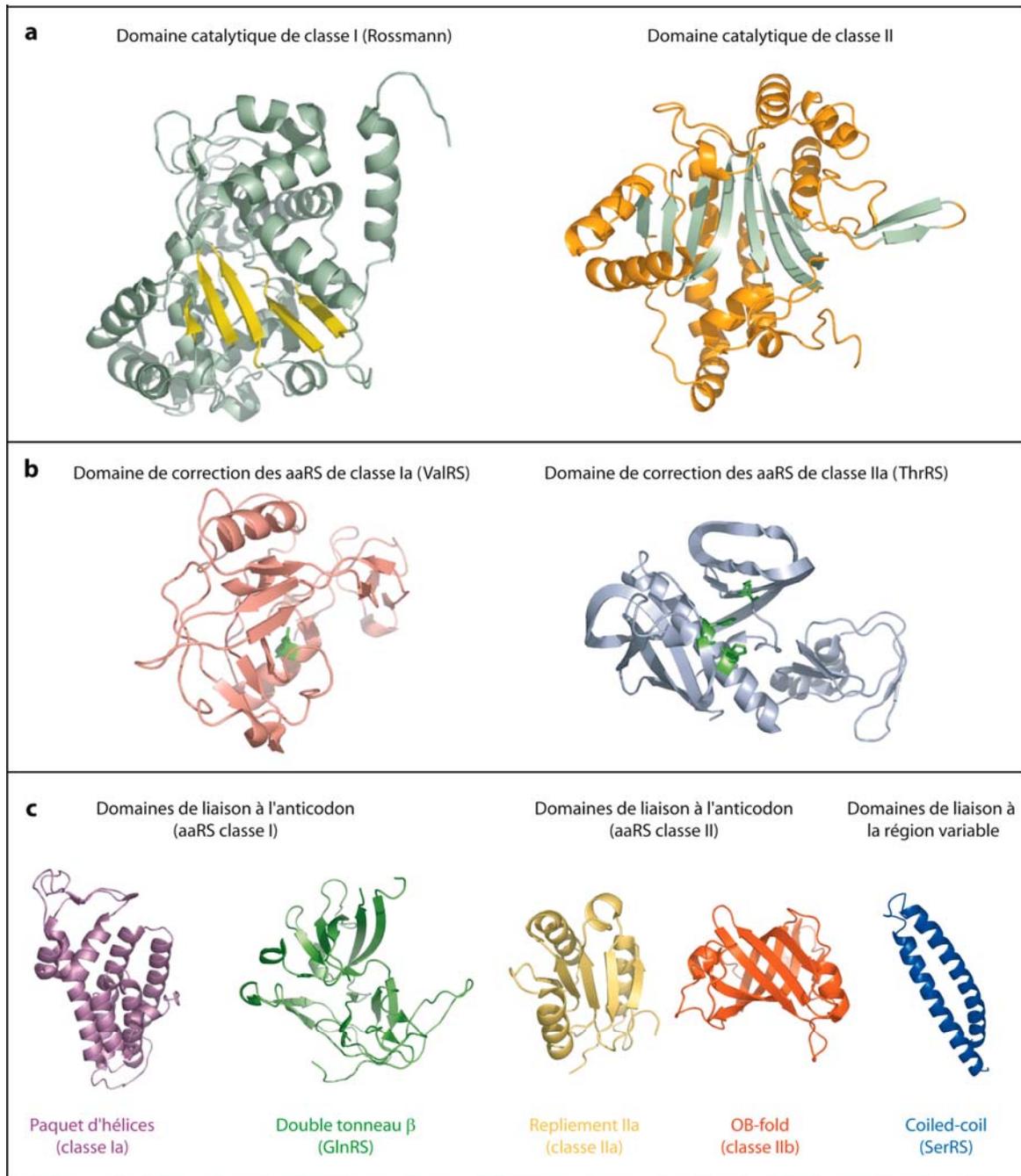


Figure 25 : Structures cristallographiques des modules entrant dans la composition des aaRS. **(a)** Organisation structurale des domaines catalytiques des aaRS de classe I et de classe II. A gauche, le repliement structural du site actif des synthétases de classe I est caractérisé par un feuillet β parallèle (repliement de Rossmann). A droite, l'organisation structurale des domaines catalytiques des aaRS de classe II correspond à un feuillet β anti-parallèle. **(b)** Organisation structurale des modules de correction des aaRS de classe Ia (ValRS, LeuRS et IleRS, à gauche) et des aaRS de la classe IIa (ThrRS, à droite). La localisation des résidus impliqués dans la sélection de l'aa incorrect à hydrolyser est indiquée en vert. **(c)** Organisation structurale des modules impliqués dans la reconnaissance spécifique des ARNt. Ces modules reconnaissent soit l'anticodon de l'ARNt (Paquets d'hélices, Double Tonneau, Repliement IIa et Oligonucleotide Binding-fold), soit la longue région variable (coiled coil).

III. L'aspartyl-ARNt synthétase

L'aspartyl-ARNt synthétase (AspRS) appartient à la famille des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS). Ces enzymes catalysent l'amination spécifique des ARNt par l'acide aminé (aa) homologue et permettent ainsi la conversion de l'information génétique (code à 4 lettres) en information protéique (comportant 20 lettres). Chaque organisme possède 20 familles d'ARNt isoaccepteurs (une pour chaque aa) et la plupart du temps les 20 aaRS correspondantes, sauf cas particuliers développés dans la partie Résultats, Article n°3. Dans ce paragraphe, les généralités concernant les aaRS seront systématiquement illustrées par le cas de l'AspRS qui a été l'objet de mon travail de thèse.

Comme la majorité des protéines, les aaRS possèdent une organisation modulaire. Ainsi, on trouve toujours le domaine catalytique fusionné à un ou plusieurs domaines additionnels, impliqués principalement dans le maintien de la fidélité de la réaction et dans la reconnaissance de l'ARNt (Arnez et Moras, 1997; Francklyn et al., 1997; Martinis et al., 1999; Wolf et al., 1999). Les domaines assurant la spécificité de la réaction (domaines de correction et domaines reconnaissant spécifiquement l'ARNt) sont, en général, conservés au cours de l'évolution d'un système. En revanche, les domaines additionnels établissant des contacts non-spécifiques ou assurant des fonctions non canoniques des aaRS sont caractéristiques de certains organismes (on parle alors d'idiosyncrasie). L'organisation modulaire de l'AspRS est particulièrement bien connue puisque sa structure cristallographique sous sa forme libre ou en complexe avec ses substrats (acide aspartique, ATP et/ou ARNt) a été résolue pour des organismes appartenant aux trois règnes du vivant (Delarue et al., 1994; Ruff et al., 1991; Sauter et al., 2000; Schmitt et al., 1998) (voir paragraphe 3). De plus, ces études structurales ont permis de mieux comprendre une des caractéristiques de cette enzyme : sa spécificité relâchée.

1. Le domaine catalytique

Le domaine catalytique de l'AspRS est extrêmement bien conservé au cours de l'évolution. Il est le siège de la catalyse de la réaction, mais est aussi impliqué dans la dimérisation de l'AspRS, un pré-requis à son activité (Eriani et al., 1993). Ce repliement structural n'est pas unique à l'AspRS, mais est commun aux neuf autres aaRS de la classe II des synthétases. Les dix enzymes restantes possèdent une organisation de leur site actif caractéristique des aaRS de la classe I. Quelle que soit la structure du site actif, ce

Tableau 1 : Répartition des aminoacyl-ARNt synthétases en deux classes équivalentes (et six sous-classes).

aaRS	Sous-classe	hydroxyle impliqué	Structure IV	Acides aminés	ARNt pour activer l'aa	Domaine de reconnaissance spécifique
* ValRS	Ia	2'	α		non	
* IleRS	Ia	2'	α		non	
* LeuRS	Ia	2'	α	souffrés/ aliphatiques	non	Paquet d'hélices
MetRS	Ia	2'	$\alpha 2$		non	
CysRS	Ia	2' et 3'	α		non	
TyrRS	Ib	2' et 3'	$\alpha 2$	aromatiques	non	Hélical
TrpRS	Ib	2'	$\alpha 2$		non	
GluRS	Ic	2'	α		oui	Cage d'hélices
GlnRS	Ic	2'	α	grands acides/ basiques	oui	Double tonneau β
ArgRS	Ic	2'	α		oui	Mixte original
LysRS	I	2'	α	Lysine	oui	Cage d'hélices
SerRS	IIa	3'	$\alpha 2$		non	Coiled-coil
* ThrRS	IIa	3'	$\alpha 2$		non	
ProRS	IIa	3'	$\alpha 2$	petits polaires/ aliphatiques	non	Mixte original caractéristique de la classe IIa
GlyRS	IIa	3'	$\alpha 2 \beta 2$		non	
HisRS	IIa	3'	$\alpha 2$		non	
AspRS	IIb	3'	$\alpha 2$		non	
AsnRS	IIb	3'	$\alpha 2$	petits acides/ basiques	non	OB-fold
LysRS	IIb	3'	$\alpha 2$		non	
PheRS	IIc	2'	$\alpha 2 \beta 2$		non	Coiled-coil + RBD de U1a
* AlaRS	IIc	3'	$\alpha 4$	hydrophobes	non	Mixte
PylRS	IIc	?	?	Pyrrolysine	non	?
SepRS	IIc	?	?	O-phosphosérine sur ARNt ^{Cys}	non	?

A chaque aaRS correspondent les caractéristiques structurales et/ou fonctionnelles ayant permis de les distribuer en classe I, ou en classe II, et en sous-classes. Ainsi, le site de transfert de l'aa sur l'ARNt, la structure quaternaire, la nature de l'aa reconnu, le mécanisme d'activation et la structure des domaines de reconnaissance spécifique de l'ARNt sont indiqués pour les 20 aaRS canoniques, la LysRS de classe I et les 2 aaRS identifiées récemment (PylRS et SepRS). Les aaRS marquées d'un astérisque correspondent aux enzymes possédant un domaine de correction de la réaction d'aminocyclation (détaillé dans le paragraphe III.1.3)

domaine est en charge d'activer l'acide aminé et de le transférer sur l'ARNt homologue. Dans certaines aaRS, le domaine catalytique est fusionné à un domaine impliqué dans le maintien de la fidélité de la réaction : le domaine de correction (ou d'editing).

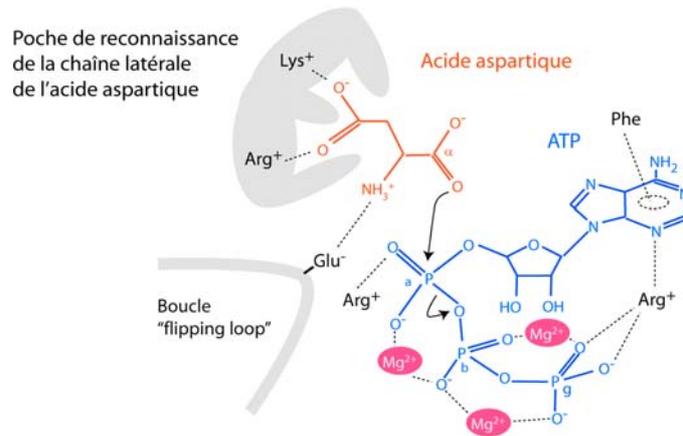
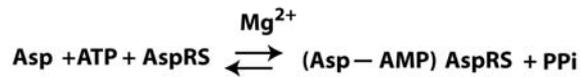
1.1 Les deux classes d'aminacyl-ARNt synthétases

Comme cela vient d'être dit, l'organisation structurale du site actif des aaRS a permis de les répartir en deux classes de 10 membres chacune et dont la composition est indiquée dans le Tableau 1 (Cusack et al., 1991; Eriani et al., 1990 et pour des revues récentes l'ouvrage « Aminoacyl-tRNA synthetases », Ibba, M., Francklyn, C. et Cusack, S. (eds.), Landes Biosciences). Cette répartition est respectée dans tous les organismes. A ce jour, seule la lysyl-ARNt synthétase (LysRS) a été montrée comme dérogeant à cette règle. En effet, alors que la LysRS appartient uniquement à la classe II chez la plupart des bactéries et chez les eucaryotes, on retrouve cette activité assurée par une enzyme de classe I chez la plupart des *archaea* et quelques bactéries (Ambrogelly et al., 2005).

Le site actif des enzymes de classe I adopte un repliement en feuillet β parallèle encadré d'hélices α appelé domaine de Rossmann (Figure 25a, à gauche) et initialement identifié dans des enzymes à co-facteur adénylate (NAD, NADH). Les aaRS arborant ce motif structural sont, en plus, caractérisées par la présence de séquences conservées HIGH et KMSKS, mais également par un mode d'action identique (Ibba et Soll, 2000). En effet, elles interagissent avec l'ARNt par le côté de son sillon mineur, et catalysent son aminoacylation au niveau du groupement hydroxyl 2' du ribose 3' terminal (Tableau 1). Pour sa part, le site actif des aaRS de classe II est construit sur la base d'un feuillet β de neuf brins antiparallèles entourés d'hélices α (Figure 25b, à droite) et renferme trois motifs plus ou moins conservés (motifs 1, 2 et 3). Au contraire de leurs équivalents de la classe I, ces enzymes reconnaissent l'ARNt par le côté du sillon majeur et charge l'aa sur le groupement hydroxyl 3' du ribose terminal (Tableau 1). Enfin chacune de ces classes est subdivisée en sous-classes en fonction de critères structuraux (structure quaternaire, structure des domaines additionnels) et fonctionnels (nature de l'aa et mode d'activation de l'aa) (Tableau 1).

Récemment, deux nouvelles aaRS de classe IIc ont été découvertes chez des *archaea* méthanogènes. Tout d'abord, la pyrrolysyl-ARNt synthétase (PylRS) (Srinivasan et al., 2002) catalyse l'aminacylation de l'ARNt^{Pyl} par la pyrrolysine, le 22^{ème} aa

a. Activation



b. Transfert

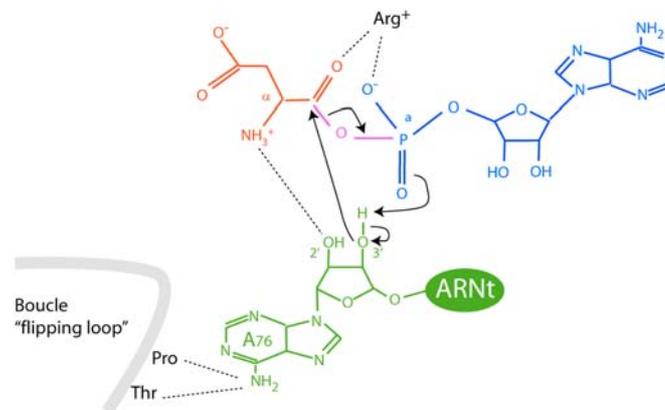
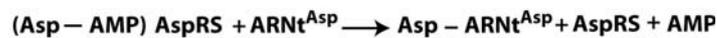


Figure 26 : La réaction d'aspartylation. (a) La première étape correspond à l'activation de l'acide aspartique (Asp) sous la forme d'un intermédiaire adénylate. Le groupement carboxyl de la chaîne latérale de l'Asp (rouge) est reconnu par l'AspRS au niveau d'une poche rigide (gris) et de la « flipping loop ». L'ATP (bleu) est maintenu dans le site actif dans une conformation courbée, stabilisée par 3 ions Mg^{2+} (magenta). Les 2 molécules ainsi disposées peuvent subir une attaque nucléophile en ligne aboutissant à la formation de l'intermédiaire adénylate et à la libération de PPi. (b) Transfert de l'Asp activé sur l'ARNt. Le site actif accommode le ribose de l'adénine 76 de l'ARNt^{Asp} (vert) et le stabilise par une interaction avec la « flipping loop ». Une série d'attaques nucléophiles conduit à la rupture de la liaison (tracé magenta) entre l'AMP et l'Asp et au transfert de ce dernier sur l'hydroxyle 3' du ribose de l'ARNt. Après transfert, l'AspRS libère l'ARNt aspartylé et une molécule d'AMP. Le mécanisme est conservé au cours de l'évolution. Figure adaptée de Giegé et Rees, 2005.

(Blight et al., 2004). Le mode d'incorporation dans les protéines de la pyrrolysine ainsi associée à son ARNt homologue a été récemment discuté dans une revue (Cobucci-Ponzano et al., 2005). La seconde aaRS atypique a été isolée d'*archaea* méthanogènes dépourvues de la voie classique de biosynthèse de la cystéine. Chez ces organismes, la cystéine est produite par une chaîne de réactions ARNt-dépendantes. La première étape fait intervenir d'abord la o-phosphoséryl-ARNt synthétase (SepRS), un paralogue de la PheRS, qui catalyse l'aminacylation de l'ARNt^{Cys} par la O-phosphosérine (Sauerwald et al., 2005). Lors de la seconde étape, l'ARNt^{Sep} : ARNt^{Cys} synthase (SepCysS) convertit la O-phosphosérine chargée sur l'ARNt^{Cys} en cystéine à partir d'un donneur de soufre encore non identifié.

1.2 La réaction d'aspartylation

L'aspartylation, comme toutes les réactions d'aminacylation se déroule *via* un mécanisme bipartite (Figure 26). Tout d'abord, l'acide aspartique (Asp) est activé par condensation avec une molécule d'ATP produisant un intermédiaire adénylate (AMP-Asp) (Figure 26a). Puis la réaction de transfert permet de déplacer l'Asp sur le groupement hydroxyle 3' du ribose 3' terminal de l'ARNt^{Asp} (Figure 26b). Les nombreuses données cristallographiques collectées au cours de ces dernières années ont permis de caractériser précisément ces deux étapes au niveau atomique. Comme c'est le cas pour la plupart des aaRS, l'activation de l'acide aspartique par l'AspRS se fait indépendamment de la présence de l'ARNt. Les exceptions à cette règle incluent les aaRS de classe Ic et la LysRS de classe I, où l'ARNt est requis pour l'activation. L'AspRS reconnaît l'ATP par l'intermédiaire de certains résidus des motifs consensus 2 et 3 et le fixe dans une conformation courbée stabilisée par trois ions Mg²⁺, ce qui est caractéristique des aaRS de classe II (Figure 26a). De son côté, l'acide aspartique est reconnu en deux étapes. Tout d'abord, la chaîne latérale de l'acide aspartique est reconnue spécifiquement par les résidus d'une petite poche suivant le modèle clé-serrure. Dans un deuxième temps, la reconnaissance du carbone α induit l'adaptation du reste de la poche plaçant les résidus de l'AspRS dans une conformation optimale pour l'étape d'activation. En particulier une boucle appelée « flipping loop » se referme sur l'Asp et le maintient dans la cavité. Dans cette conformation, la disposition relative de l'ATP et de l'Asp permet une attaque nucléophile en ligne aboutissant à la formation de l'intermédiaire adénylate. Il faut noter

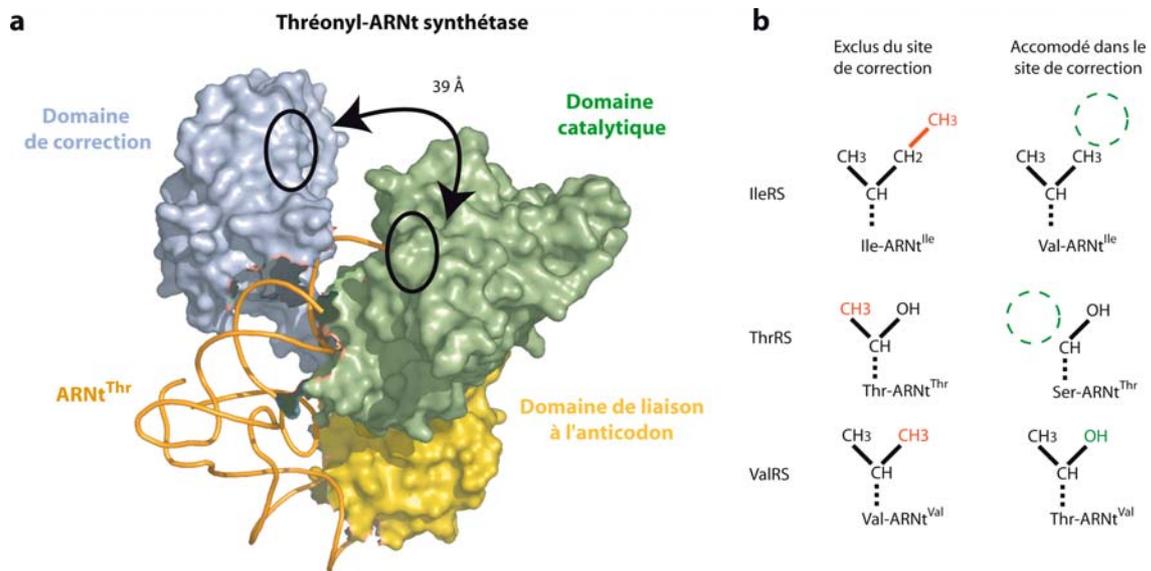


Figure 27 : Mécanismes de correction, exemple de structure et sélection des aa hétérologues par les sites de correction de l'IleRS, la ThrRS et la ValRS. **(a)** Structure cristallographique de la ThrRS en complexe avec l'ARNt^{Thr}. Les 3 principaux modules de l'enzyme sont représentés en jaune (domaine de liaison à l'anticodon), en vert (domaine catalytique) et en gris (domaine de correction). L'hydrolyse d'un Ser-ARNt^{Thr} nécessite la relocalisation de l'extrémité 3' chargée de l'ARNt dans le domaine de correction distant de 39 Å du site catalytique. Figure adaptée de Dock-Bregeon et al., 2004 **(b)** Sélection des aa par les sites de correction de l'IleRS, la ThrRS et la ValRS qui corrigent la charge de Valine, de Serine, ou de Thréonine, respectivement. Les groupements indiqués en rouge des aa homologues (Ile, Thr et Val) bloquent l'accommodation de l'extrémité 3' des ARNt correctement aminoacylés dans le site de correction, alors que, les caractéristiques des aa hétérologues (Val, Ser et Thr) reconnues par le site de correction sont montrées en vert. Figure établie d'après les mécanismes décrits par Fukai et al., 2000 et Dock-Bregeon et al., 2004.

que dans le cas particulier de l'AspRS, en absence d'ARNt, cet adénylate hautement réactif conduit à une auto-aspartylation de l'enzyme *in vitro* (Kern et al., 1985).

L'arrivée de l'adénine 76 de l'ARNt^{ASP} dans le site actif s'accompagne de la réouverture de la « flipping loop » permettant ainsi de positionner ce résidu à proximité de l'adénylate (Figure 26b). Une série d'interactions place le ribose terminal dans une conformation optimale et déclenche une attaque nucléophile en ligne pour aboutir au transfert de l'Asp sur le groupement 3' OH de l'ARNt et à la libération d'une molécule d'AMP.

1.3 Domaines impliqués dans la fidélité de la réaction

Dans le cas de l'AspRS, le maintien de la spécificité est assuré par la poche de liaison de l'acide aspartique qui discrimine efficacement les aa de taille ou de nature chimique différente. Toutefois, pour certains systèmes, l'existence d'aa de nature ou de taille équivalente à celle de l'aa homologue peut conduire à une activation erronée. Les aaRS confrontées à ce problème possèdent en général un module additionnel, à fonction correctrice, fusionné à leur domaine catalytique qui hydrolyse la liaison ester entre l'ARNt et le mauvais aa (Sankaranarayanan et Moras, 2001). De tels domaines ont été identifiés dans trois aaRS de classe I, l'IleRS, la LeuRS et la ValRS (Fukai et al., 2000; Nureki et al., 1998) et dans deux aaRS de classe II, l'AlaRS et la ThrRS (Figure 25b). Dans chaque cas, la sélection du bon aa se fait en deux étapes.

Dans un premier temps, les aa de taille supérieure à celle de l'aa homologue sont exclus du site actif de la synthétase. Cependant, lorsqu'il y a eu activation et transfert d'un aa incorrect, la réaction de correction proprement dite a lieu au cours d'une seconde étape complexe qui nécessite la relocalisation de l'extrémité 3' aminoacylée de l'ARNt au niveau du module de correction (Figure 27a). Ces domaines de correction ont la particularité de n'accommoder que l'aa incorrect. Le critère de sélection varie en fonction du système considéré (Figure 27b). Ainsi, l'IleRS et la ThrRS activent et transfèrent de façon incorrecte la valine et la sérine, respectivement, deux aa plus petits d'un seul groupement méthyl en comparaison avec les aa homologues, l'isoleucine et la thréonine. Les deux enzymes utilisent un mode de sélection où seul un aa plus petit peut être accommodé dans le module de correction et ainsi être hydrolysé de l'ARNt (Nureki et al., 1998; Dock-Bregeon et al., 2004). En revanche, la stratégie développée par la ValRS est différente. En effet, cette enzyme active deux aa isostériques, la valine (homologue) et la

thréonine (hétérologue), et dans ce cas une sélection basée sur la taille se révélerait peu efficace. Ainsi, la poche de correction sélectionne l'aa en fonction de son hydrophobicité (Fukai et al., 2003), accommodant la thréonine (hydrophile) et excluant la valine (hydrophobe).

Le criblage exercé par le domaine catalytique, assisté si nécessaire du module de correction, est suffisant pour assurer la sélection du bon aa. Toutefois, il faut transférer cet aa sur le bon ARNt. Les contacts établis entre le domaine catalytique et l'ARNt sont limités à la base discriminatrice (en position 73), à l'extrémité 3' CCA commune à tous les ARNt et, dans certains cas, aux premières paires de bases du bras accepteur. Bien que ces contacts soient suffisants *in vitro* pour diriger l'aminoacylation d'une mini-hélice (domaine T et domaine accepteur) cette dernière est souvent peu efficace à l'exception de l'alanylation (Francklyn et Schimmel, 1989; Frugier et al., 1992). Pour pallier à ce problème, des contacts supplémentaires sont établis entre l'ARNt et la protéine. Ils impliquent la reconnaissance spécifique d'autres régions de l'acide nucléique par des domaines additionnels de la synthétase.

2. Domaines impliqués dans la reconnaissance spécifique de l'ARNt

2.1 Organisation structurale

Dans la majorité des systèmes d'aminoacylation, à l'exception de l'AlaRS et de la SerRS, des contacts sont établis entre des domaines additionnels et la boucle anticodon de l'ARNt. L'AspRS n'échappe pas à cette règle et reconnaît cette région de l'ARNt à l'aide d'un module adoptant une topologie appelée « OB-fold » (Oligonucleotide Binding-fold), composé d'un feuillet β à cinq brins antiparallèles et d'une hélice α (Figure 25c). Cette topologie est commune à toutes les aaRS de la classe IIb (AspRS, LysRS et AsnRS). Les autres aaRS possèdent des domaines de reconnaissance de l'anticodon de topologie souvent très différente. Par exemple, les enzymes de la classe Ia et la GluRS possèdent un domaine de liaison à l'anticodon composé uniquement d'hélices (Crepin et al., 2004; Fukai et al., 2000; Hauenstein et al., 2004), alors que la GlnRS reconnaît l'anticodon grâce à une structure en double tonneau β (Arnez et Steitz, 1996). Des situations intermédiaires sont également retrouvées où des hélices α et des feuillets β sont mélangés et produisent les repliements caractéristiques des aaRS de classe IIa (Sankaranarayanan et al., 1999). De même, l'étendue de la région du bras anticodon reconnue varie en fonction du type de

domaine impliqué. Ainsi, alors que le domaine de classe IIa de la ProRS ne contacte que les résidus de la boucle anticodon (Cusack et al., 1998), le paquet d'hélices de la ValRS interagit avec l'ensemble de la branche anticodon, c'est-à-dire les tige-boucles D et anticodon (Fukai et al., 2000).

En ce qui concerne la SerRS, aucun contact n'est établi avec l'anticodon, mais la présence d'un module composé de deux longues hélices (coiled-coil) permet de reconnaître spécifiquement la grande région variable de l'ARNt (Cusack et al., 1996). La TyrRS bactérienne réalise le même type de reconnaissance par un domaine C-terminal homologue à la protéine ribosomique S4 (Bonfond et al., 2005). L'AlaRS ne fait pas exception et forme des contacts très spécifiques entre un petit domaine inséré dans son domaine catalytique et la paire de bases G3-U70 dans le bras accepteur de l'ARNt^{Ala} (Hou et Schimmel, 1988).

2.2 Identité des ARNt

Les nucléotides et les caractéristiques structurales reconnus spécifiquement par les modules (de reconnaissance spécifique) des aaRS confèrent l'identité à l'ARNt porteur. Ces signaux sont appelés éléments d'identité, ils sont présents en nombre restreint et sont habituellement localisés aux deux extrémités de la structure en L (lorsqu'il s'agit de nucléotides). Bien que ces éléments entrent souvent en interaction avec les aaRS, ils peuvent également agir de façon indirecte, en conférant un repliement particulier à l'ARNt.

Les éléments d'identité du système aspartate sont connus pour deux systèmes bactériens et un système eucaryote (Figure 28) (Giegé et al., 1996). Tous ont en commun la base discriminatrice G73 dans le bras accepteur et les trois bases de l'anticodon G34, U35, C36 (Pütz et al., 1991; Sprinzl et Vassilenko, 2005). A ces principaux déterminants s'ajoutent des éléments idiosyncrasiques, tels que le résidu C38 dans la boucle anticodon de l'ARNt^{ASP} de levure et de *T.thermophilus* (Becker et al., 1996; Frugier et al., 1994) ou la paire de bases G10-U25 de l'ARNt^{ASP} de levure (Pütz et al., 1991). Ce dernier élément est purement structural et n'entre pas en contact avec l'enzyme. Les deux premières paires de bases G-C dans le bras accepteur de l'ARNt^{ASP} d'*E.coli* jouent, elles aussi, un rôle dans la reconnaissance de cet ARNt qui sera abordé dans la section III.3 de cette Introduction. Le rôle de ces éléments d'identité a été confirmé par des expériences de mutagenèse et de transplantation pour le système d'*E.coli* (Nameki et al., 1992), de *T.thermophilus* (Becker et al., 1996) et de *S.cerevisiae* (Frugier et al., 1994; Pütz et al., 1991).

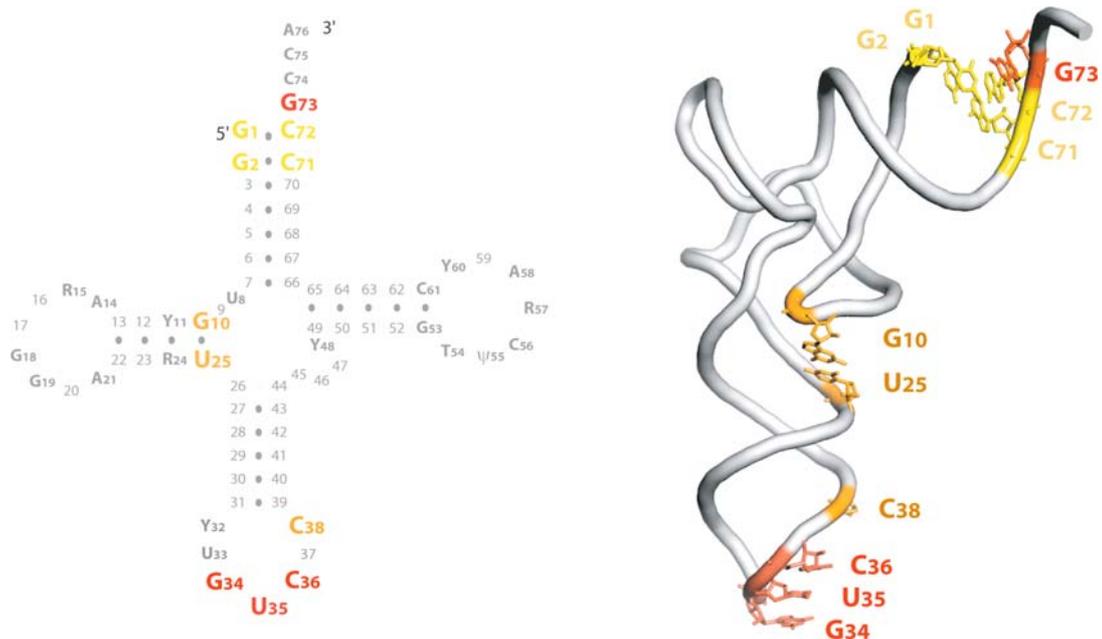


Figure 28 : Les éléments d'identité des systèmes aspartates de procaryote, d'*archaea* et d'eucaryote. A gauche, la structure secondaire en feuille de trèfle canonique des ARNt^{ASP} porte les déterminants majeurs (G73, G34, U35 et C36) communs aux trois règnes qui sont représentés en rouge. De plus, les éléments d'identité mineurs idiosyncrasiques d'*E.coli* (G1-C72 et G2-C71) sont représentés en jaune et ceux de levure (G10-U25 et C38 partagé avec *T.thermophilus*) sont en orange. A droite, les éléments d'identité aspartate sont reportés sur la structure cristallographique de l'ARNt^{ASP} de levure. Figure établie d'après les résultats présentés par Giegé et al., 1996.

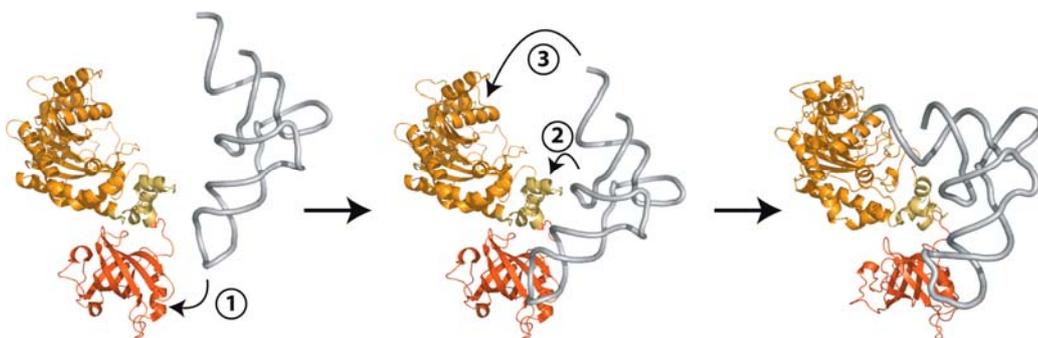


Figure 29 : Les différentes étapes de la formation du complexe entre l'ARNt^{ASP} et l'AspRS de levure. A gauche, la reconnaissance de l'ARNt par l'AspRS débute par une interaction entre l'anticodon et le domaine OB-fold de la protéine (①). Au centre, le domaine de liaison à l'anticodon subit une rotation de 6° rapprochant l'ARNt de la région charnière (②) et du domaine catalytique (③). A droite, le bras accepteur interagit avec le domaine catalytique et le A76 entre dans le site actif. L'ARNt complexé à l'enzyme présente un angle plus aigu que dans sa forme libre (90° comparé à 110°). Figure adaptée de Sauter et al., 2000.

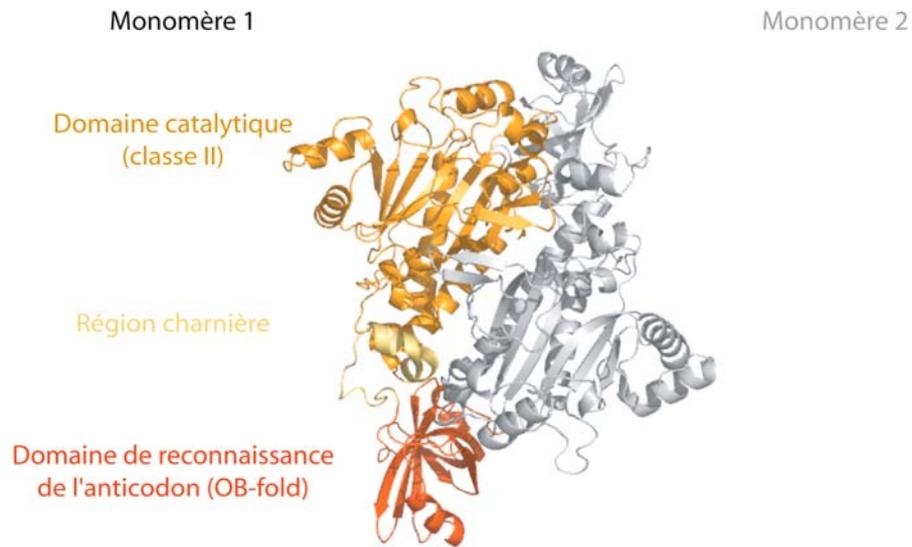
Une seconde classe d'éléments d'identité intervient dans la sélection de l'ARNt mais cette fois de façon négative. Ces antidéterminants agissent en prévenant la reconnaissance d'un ARNt par une aaRS hétérologue. La méthylation portée par la guanine 37 en position 1 présente sur l'ARNt^{Asp} de levure fait partie de ces éléments. En effet, la présence de cette modification est suffisante pour bloquer l'arginylation de l'ARNt (Perret et al., 1990; Pütz et al., 1994). De même, la modification volumineuse (queuosine) portée par le noyau guanine en position 34 de l'ARNt^{Asp} bactérien est un autre candidat pouvant jouer un rôle analogue (Giegé et Rees, 2005).

L'ARNt^{Asp} est reconnu par l'AspRS et s'y associe suivant un mécanisme en trois étapes au cours duquel l'enzyme et l'acide ribonucléique subissent des changements conformationnels permettant une adaptation réciproque (Figure 29). La première série de contacts est établie de façon spécifique avec les bases de l'anticodon, induisant un premier changement structural au cours duquel les résidus de la boucle sont exposés vers l'enzyme (Sauter et al., 2000). Puis, le domaine de reconnaissance de l'anticodon subit une rotation plaçant le bras D de l'ARNt à proximité de la région charnière de l'AspRS. Enfin, le bras accepteur de l'ARNt s'ancre au domaine catalytique de l'AspRS et l'adénine 3' terminale (A76) entre dans le site actif.

La spécificité de reconnaissance de l'ARNt est en général stricte. Toutefois, certains procaryotes, dont *T.thermophilus*, possèdent une AspRS de spécificité stricte (AspRS1) co-existant avec une AspRS de spécificité relâchée (AspRS2). Cette particularité du système aspartate sera développée dans les Résultats pour illustrer l'Article n°3.

3. Les domaines idiosyncrasiques

Par définition, la présence des domaines idiosyncrasiques est restreinte à une aaRS donnée dans un organisme donné (vraisemblablement dans une famille phylogénétique donnée). En général, ils interviennent en établissant des contacts non spécifiques avec l'ARNt et augmentent ainsi l'affinité globale de l'aaRS pour les ARNt. Ces domaines idiosyncrasiques sont des modules additionnels ajoutés à l'une des extrémités de l'aaRS ou insérés dans un des domaines de l'enzyme (Cahuzac et al., 2000; Kaminska et al., 2000; Kaminska et al., 2001). Ils sont bien illustrés dans la Figure 30, lorsque l'on compare les structures des AspRS bactériennes et eucaryotes à celle de l'AspRS d'*archaea*, constituée essentiellement des domaines catalytique, charnière et de reconnaissance de l'anticodon (Figure 30a). En effet, les AspRS procaryotiques (Delarue et al., 1994; Eiler et al., 1999)

a. AspRS *archaea* (*P.kodakarakensis*)**b. AspRS bactérienne (*E.coli*)**

Domaine d'insertion

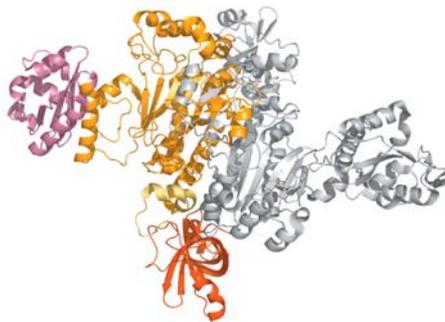
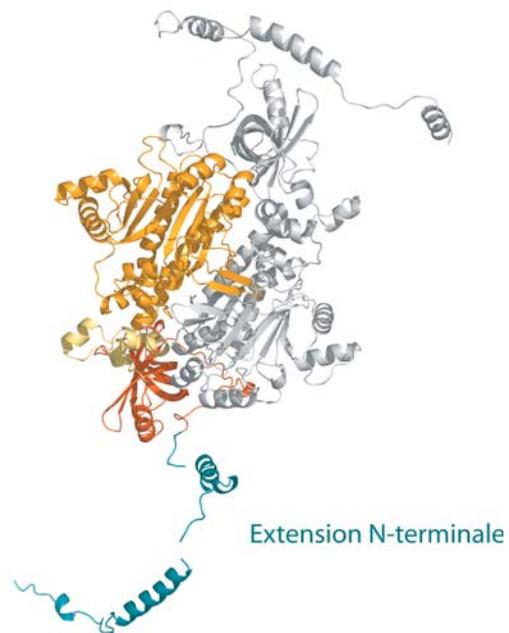
**c. AspRS eucaryote (*S.cerevisiae*)**

Figure 30 : Structures cristallographiques des AspRS de *Pyrococcus kodakarakensis*, d'*Escherichia coli* et de *Saccharomyces cerevisiae*. Dans chaque cas, l'enzyme est représentée sous sa forme dimérique avec un des deux monomères en gris. Sur l'autre monomère, le domaine catalytique est représenté en orange, la région charnière en jaune et le domaine de reconnaissance de l'anticodon en rouge. (a) L'AspRS de *Pyrococcus kodakarakensis*, représentant du règne des *archaea*, correspond à une forme minimale d'AspRS ne possédant aucun domaine additionnel. (b) L'AspRS d'*E.coli*, typique des procaryotes, possède un domaine idiosyncrasique (magenta) inséré dans le module catalytique et impliqué dans la reconnaissance du bras accepteur de l'ARNt. (c) L'AspRS de *S.cerevisiae*, exemple d'AspRS eucaryote, possède une extension N-terminale (bleu) flexible, qui se protéolyse facilement et qui n'est pas observée sur la structure cristallographique. Cette extension est représentée suivant un modèle de repliement hélicale comme proposé par Lorber et al., 1988 et Agou et al., 1995.

sont caractérisées par la présence d'un domaine de 130 résidus inséré entre les motifs 2 et 3 du site catalytique (Figure 30b). Cette région s'organise en feuillet β anti-parallèle entouré d'hélices (appelé repliement ferredoxine) et est retrouvée dans d'autres protéines (glutamine synthétase et nucléoside diphosphate kinase). Chez *E.coli*, la présence de cette insertion s'accompagne de l'apparition de deux nouveaux éléments d'identité mineurs constitués des deux premières paires de bases du bras accepteur de l'ARNt (G1-C72 et G2-C71) (Figure 28). Ces résidus sont reconnus de façon non-spécifique au niveau de leur chaîne ribose phosphate, toutefois leur nature est importante de part la géométrie qu'elles imposent au bras accepteur (Choi et al., 2003). En revanche, l'enzyme de *T.thermophilus*, qui possède également un domaine d'insertion, est moins sensible aux variations de géométrie de cette région de l'ARNt et tolère n'importe quelle séquence.

L'ensemble des AspRS eucaryotes, à l'exception des AspRS de mammifères et d'oiseaux, possède une extension N-terminale (Figure 30c). Celle-ci a été particulièrement bien caractérisée chez *S.cerevisiae* où elle est constituée de 70 résidus non-structurés à l'état libre. Cette extension adopte un repliement en trois hélices α , dont une très basique, au contact de l'ARN (Agou et al., 1995). Toutefois, seul un modèle de repliement de cette région est disponible (Frugier et al., 2000). En effet, la flexibilité et la dégradation partielle de cette extension au cours des purifications la rendent invisible dans la structure cristallographique (Lorber et al., 1987). Ce domaine est caractérisé par la présence d'un motif de liaison à l'ARN (riche en lysines) localisé dans l'hélice II de l'extension. Ces résidus basiques interagissent de façon non-spécifique avec le sillon mineur de la branche anticodon de l'ARNt et augmentent considérablement l'affinité de l'AspRS pour ce dernier (Frugier et al., 2000) (Figure 31). Enfin, chez les mammifères et les oiseaux, cette extension est sévèrement raccourcie et est impliquée dans des interactions inter-protéines, dont l'association de l'AspRS, au complexe multi-aaRS (Agou et Mirande, 1997; Rho et al., 1999) ou avec le facteur d'élongation EF-1 α (Reed et Yang, 1994).

Il existe également, dans la cellule, des protéines qui peuvent remplacer ces domaines idiosyncrasiques, et ainsi participer à la réaction d'aminacylation. Par exemple, la protéine Arc1p de levure participe à un complexe bi-synthétasique en interagissant à la fois avec la GluRS et la MetRS. Ce domaine agit principalement en interagissant de façon non-spécifique avec les ARNt et augmente ainsi leur concentration au voisinage des deux aaRS (Deinert et al., 2001; Galani et al., 2001). Trbp111 est un autre de ces facteurs

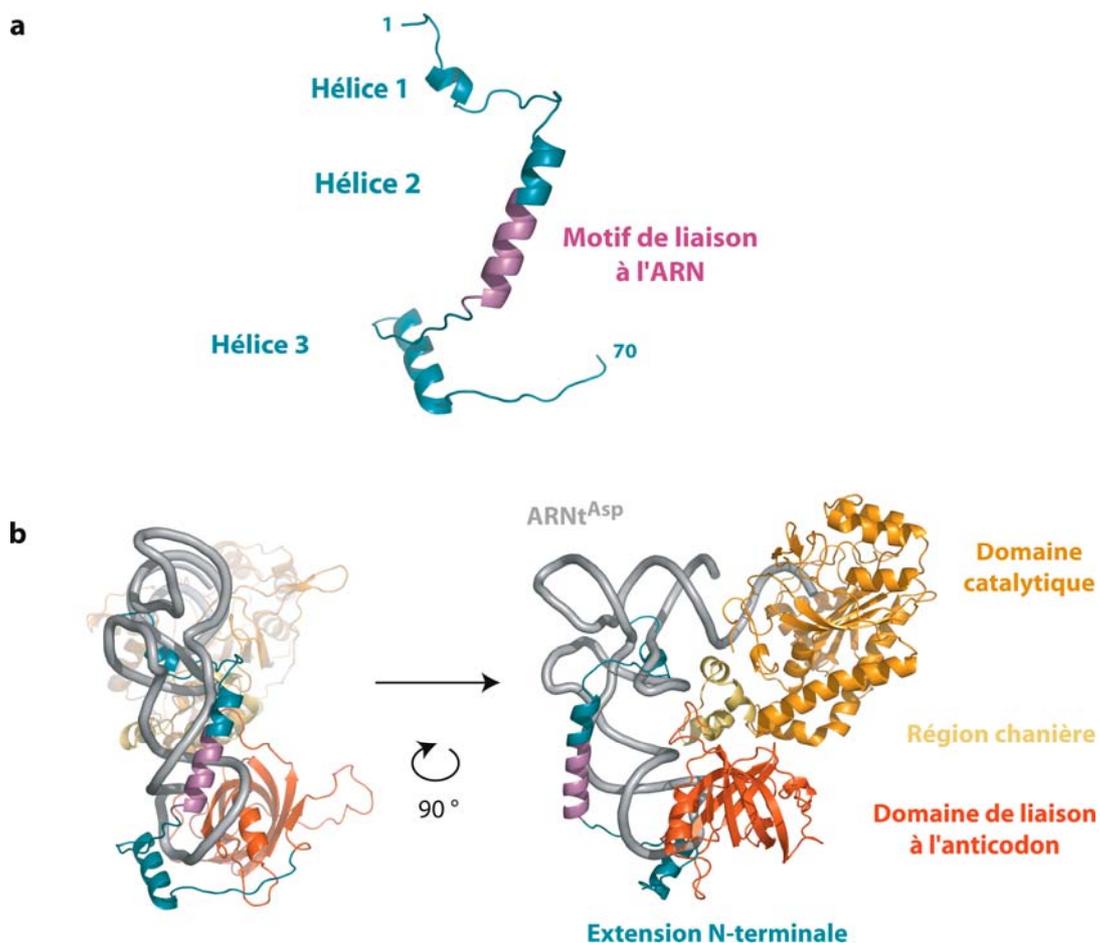


Figure 31 : Modèle de l'extension N-terminale de l'AspRS de levure et de son interaction avec l'ARNt^{Asp}. **(a)** Modèle de repliement de l'extension N-terminale de l'AspRS de levure. L'extension N-terminale (résidus 1 à 70) se structure en 3 hélices α (bleu). Le motif de liaison à l'ARN est représenté en magenta. Le module est représenté dans la conformation qu'il adopte lorsqu'il interagit avec l'ARN. **(b)** Modèle de l'interaction entre l'extension N-terminale et le sillon mineur de l'ARNt. Un seul monomère de l'enzyme est représenté en complexe avec l'ARNt (gris) selon 2 axes de vue perpendiculaires. Le domaine catalytique de l'AspRS est représenté en orange, la région charnière en jaune, le domaine de liaison à l'anticodon en rouge, l'extension N-terminale en bleu et le motif de liaison à l'ARN en magenta. Figure établie à partir des résultats obtenus par Frugier et al., 2000.

idiosyncrasiques qui est retrouvé chez certaines bactéries thermophiles. Trbp111 agit comme un chaperon et stabilise la structure tridimensionnelle des ARNt en interagissant avec la face extérieure du coude de la molécule (appariement entre les boucles D et T) (Morales et al., 1999). Sur le plan structural, Trbp111 est organisé sur la base du repliement OB-fold retrouvé dans le domaine de liaison de l'anticodon de aaRS de classe IIb (AspRS, AsnRS et LysRS) (Swairjo et al., 2000) et ne forme que des contacts non spécifiques avec les ARNt.

4. Fonctions non canoniques des aaRS

Bien que l'aminocyclation des ARNt soit la fonction principale des aaRS, celles-ci interviennent également dans des mécanismes totalement différents (Lee et al., 2004). Un certain nombre de ces rôles non-canoniques ont été décrits précédemment dans la partie 4 de l'Article de revue (effecteurs transcriptionnels, implication dans l'épissage d'introns, régulation de l'expression des gènes...). Certaines de ces fonctions non canoniques ne font pas intervenir directement des aaRS, mais plutôt des protéines résultant soit de la duplication (souvent partielle) d'un gène d'aaRS et d'un réassignement de sa fonction, soit, plus simplement, d'une protéolyse de l'enzyme native (Geslain et Pouplana, 2004).

4.1. Duplication de gènes d'aaRS

L'exemple le plus évident d'une duplication de gènes d'aaRS est sans conteste le régulateur GCN2 présenté dans l'Article de revue. En effet, cette protéine interagit avec les ARNt grâce à un domaine issu d'une duplication du gène de l'HisRS. Les propriétés de reconnaissance de ce domaine ont évolué pour sélectionner l'ARNt non plus en fonction de la présence des éléments d'identité du système histidine, mais en fonction de la présence d'un aa fixé sur l'extrémité 3' de cet ARNt ou non.

La duplication partielle d'un gène de synthétase a été récemment mise en évidence chez *E.coli* au niveau d'une phase ouverte de lecture baptisée YadB ou GluX (Blaise et al., 2005). Cette protéine présente des fortes homologues avec le domaine catalytique de la GluRS (Figure 32), mais paradoxalement de fortes divergences fonctionnelles. GluX est une enzyme de modification et si elle a conservé la capacité d'activer l'acide glutamique (de façon ARNt indépendante, contrairement à la GluRS), elle ne le transfère pas sur l'extrémité CCA, mais sur la base Q34 de l'ARNt^{Asp} procaryotique. De même, chez *Pyrococcus abyssi*, l'AsnRS2, contrairement à l'AsnRS canonique dont elle dérive (forme

délétée du domaine de reconnaissance de l'anticodon), ne catalyse pas l'aminocyclisation de l'ARNt^{Asn}, mais participe au métabolisme des aa en convertissant l'Asp libre en Asn (Roy et al., 2003).

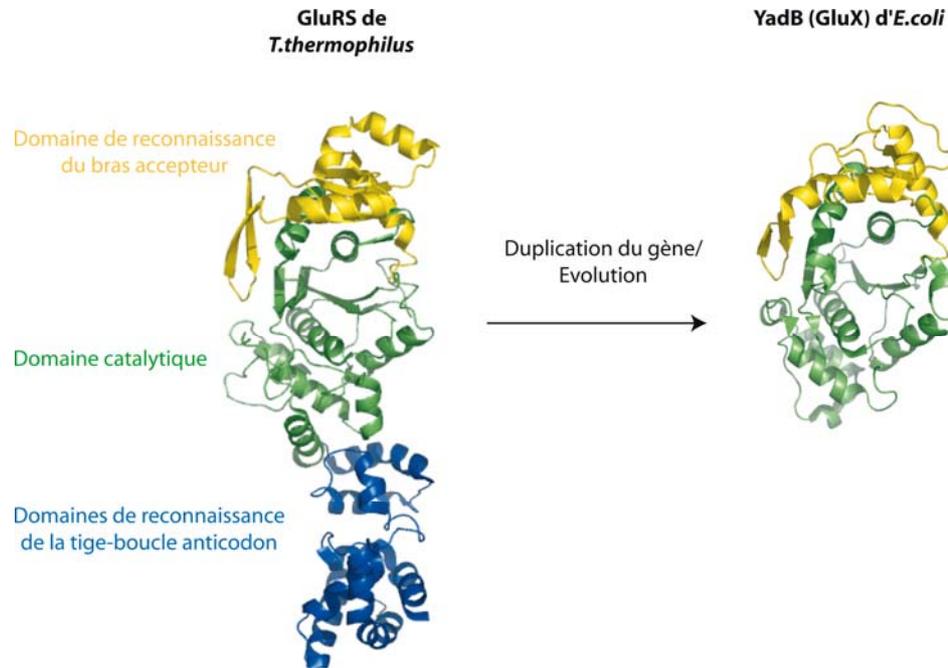


Figure 32 : Comparaison des structures cristallographiques de la GluRS de *T.thermophilus* et de YadB d'*E.coli*. Les deux molécules sont présentées dans la même orientation. A gauche, la GluRS de *T.thermophilus* est constituée d'un domaine de reconnaissance du bras accepteur de l'ARNt, d'un domaine catalytique et de deux domaines impliqués dans la reconnaissance de la tige-boucle anticodon représentés en jaune, vert et bleu, respectivement. A droite, le repliement tertiaire de YadB présente deux domaines structurellement identiques à la GluRS, d'une part au domaine de reconnaissance du bras accepteur et d'autre part au domaine catalytique qui sont indiqués suivant le même code couleur que précédemment. Figure tirée de Blaise et al., 2005.

4.2 Protéolyse partielle des aaRS

L'exemple le plus spectaculaire d'acquisition de fonction par dégradation partielle d'aaRS concerne la TyrRS et la TrpRS qui ont une activité cytokine s'exprimant après une protéolyse partielle (Yang et al., 2004). En effet, lorsque la TyrRS ou la TrpRS sont présentes dans le milieu extracellulaire, celles-ci sont reconnues et clivées en deux fragments par une élastase leucocytaire (Figure 33).

Dans le cas de la TyrRS, un premier fragment (mini-TyrRS) contient le domaine de liaison à l'anticodon et le domaine catalytique. Cette mini-TyrRS, grâce à un motif intégré au repliement de Rossmann et porteur de l'activité cytokine, agit principalement comme activateur de l'angiogenèse et comme chimio-attractant de leucocytes. Le second fragment

correspond au domaine C-terminal de l'enzyme (homologue à EMAP-II) et possède une activité chimio-attractrice des macrophages.

Une mini-TrpRS est également détectable, mais elle peut être le résultat d'une protéolyse ou d'un épissage alternatif. Contrairement à la TyrRS, un seul fragment (contenant le domaine de liaison à l'anticodon et le domaine catalytique) est actif après clivage et, de façon intéressante, a un effet antagoniste à celui de la mini-TyrRS dans la mesure où il possède une activité angiostatique.

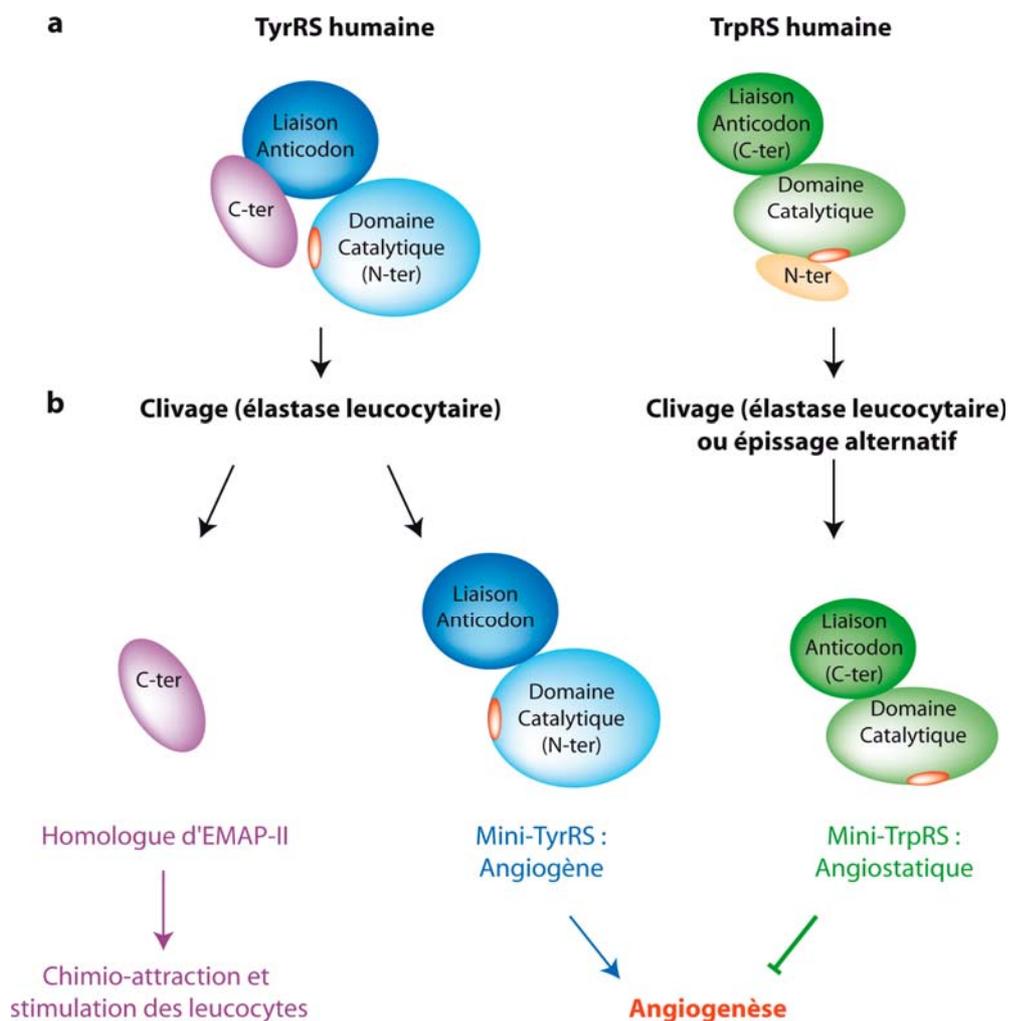


Figure 33 : Fonctions non-canoniques des TyrRS et TrpRS animales. Dans les deux cas, un seul monomère est représenté. **(a)** Organisation modulaire de la TyrRS (bleu) et de la TrpRS (vert), où les domaines catalytiques, de reconnaissance de l'anticodon et additionnels en N ou C-terminal sont représentés. Dans les deux cas, le motif participant à l'angiogenèse (rouge) est masqué soit par le domaine C-terminal de la TyrRS (violet) soit par le domaine N-terminal de la TrpRS (orange). **(b)** Dans les deux cas, l'action d'une élastase leucocytaire libère les différents fragments. D'une part, la mini-TyrRS et la mini-TrpRS qui sont impliquées dans des rôles antagonistes pour la formation des vaisseaux sanguins et d'autre part, l'extrémité C-terminale de la TyrRS, qui sous sa forme libre, a une activité cytokine. Figure établie d'après les mécanismes décrits par Yang et al., 2004.

IV. Objectif et contribution du travail de thèse

L'AspRS de *S.cerevisiae* présente la propriété de reconnaître spécifiquement son propre ARNm (ARNm^{AspRS}) avec la même affinité que l'ARNt^{Asp}. Cette interaction se fait au niveau d'un opérateur couvrant une partie de la région 5' non-traduite (nucléotides -38 à +1) et les 210 premiers résidus de l'ORF^{AspRS}. La fusion de cette séquence en amont de l'ORF d'un gène rapporteur (GFP) conduit à l'extinction *in vivo* de celui-ci lorsque l'AspRS est surproduite dans la cellule (Frugier et Giegé, 2003). Cette expérience suggérait que l'interaction AspRS/ARNm^{AspRS} intervenait dans un mécanisme d'autorégulation de l'AspRS comparable à ceux déjà décrits pour d'autres synthétases chez certaines bactéries (ThrRS d'*E.coli*).

La mise en évidence et l'étude plus fine de ce mécanisme d'autorégulation de l'AspRS de levure a constitué l'axe principal du travail entrepris au cours de cette thèse. Lors de mon arrivée au laboratoire, l'interaction entre l'AspRS et son ARNm venait d'être caractérisée. Les différents résultats obtenus montraient que l'extension N-terminale de la protéine jouait un rôle prépondérant dans cette reconnaissance. Mise à part son interaction avec l'ARNt^{Asp} et l'ARNm^{AspRS}, la richesse de cette extension en lysines avait également laissé penser que celle-ci avait une fonction de signal de localisation. La fonction d'aspartylation mitochondriale étant déjà attribuée à un second gène d'AspRS, cette séquence était soupçonnée de jouer un rôle de signal de localisation nucléaire (NLS). Cette hypothèse n'était pas aberrante puisque plusieurs aaRS avaient déjà été détectées dans le noyau (Mucha, 2002). Cette population de synthétases était jusqu'à présent impliquée dans le « contrôle qualité » des ARNt fraîchement transcrits et maturés. Ainsi, seuls les ARNt de bonne qualité sont aminoacylés et efficacement exportés dans le cytoplasme (voir Introduction de l'Article n°1).

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont permis de montrer que, si l'AspRS de levure est en partie retrouvée dans le noyau, cette localisation n'est pas liée à la séquence très basique de l'extension et que le rôle qu'elle y joue dépasse celui du « contrôle qualité » de l'ARNt^{Asp}. En effet, les résultats obtenus au cours de cette étude montrent qu'en réponse à une baisse de la quantité d'ARNt^{Asp} dans le milieu, l'AspRS participe à un mécanisme de régulation aboutissant à une diminution de la quantité d'enzymes produites. Cette régulation implique la réduction de la concentration d'ARNm^{AspRS} qui n'est pas consécutive à dégradation accélérée de celui-ci. De plus, ce

mécanisme nécessite l'intégrité de l'extension N-terminale et est corrélé, non seulement à la concentration cellulaire en ARNt^{Asp}, mais également à la présence de l'AspRS dans le noyau, suggérant un mécanisme de régulation original (Article n°1).

La prépondérance de l'interaction AspRS/ARNm^{AspRS} dans ce contrôle m'a amené à établir un modèle de structure secondaire du fragment d'ARNm reconnu. Cette approche structurale a permis de mettre en évidence les éléments dirigeant la reconnaissance de cet ARNm par la protéine. Le fragment d'ARNm minimal, contenant les 38 derniers résidus de la région 5' non-traduite et les 330 premiers nucléotides de la phase codante, a été soumis à une cartographie chimique et enzymatique. Les résultats obtenus couplés à des expériences de mutagenèse dirigée et d'empreinte de l'AspRS sur l'ARNm ont permis d'élaborer un modèle de repliement tridimensionnel de la molécule permettant d'expliquer la spécificité de sa reconnaissance par l'AspRS. En effet, l'ARN présente deux sites à liaison de l'AspRS, dont l'un partage de fortes homologies structurales (séquence et structure tridimensionnelle) avec l'ARNt^{Asp} (Article n°2).

Enfin, je me suis attaché à étudier quelles seraient les conséquences pour la cellule de la perte de ce contrôle. Sachant que la spécificité des AspRS est très relative (voir paragraphe III.1 dans la partie Résultats), j'ai tout d'abord mimé une dérégulation de l'expression de la protéine et observé les conséquences sur le maintien de la fidélité de la réaction d'aspartylation, *in vitro*. Comme espéré pour une enzyme encline à catalyser une réaction hétérologue, une augmentation de la concentration en AspRS *in vitro* s'accompagne de l'aspartylation d'ARNt hétérologues (Article n°3). Toutefois, ces aminoacylations incorrectes sont restées indétectables *in vivo* avec la méthode utilisée. Ce résultat négatif n'exclut pas cependant l'existence de taux très faibles d'aminacylation incorrecte dans la levure. J'ai alors utilisé une approche de protéomique comparative pour mettre en évidence que l'augmentation de la concentration en AspRS (3 à 4 fois) engendre une série de modifications au niveau de l'enzyme. Ces modifications semblent être post-traductionnelles et impliqueraient la présence de petites molécules fixées au niveau de l'extension N-terminale. Cette étude a été initiée très récemment et n'est pas complète, ainsi les modifications n'ont pas été formellement identifiées, mais plusieurs observations laisse à penser qu'une des caractéristiques de l'AspRS, l'auto-aspartylation (présentée dans le chapitre III 1.2 de cette Introduction), est peut-être impliquée.

I. Régulation de l'expression de l'AspRS de *S.cerevisiae in vivo*

1. Introduction

Les cellules eucaryotes sont sub-divisées en plusieurs compartiments : le noyau, les mitochondries, les chloroplastes (chez les plantes), le réticulum endoplasmique, etc... Une des conséquences est le découplage de la transcription des gènes qui a lieu dans le noyau et de la traduction des ARNm qui s'effectue principalement dans le cytoplasme. Cependant, cette dichotomie n'est pas stricte et certains composants de la machinerie traductionnelle traversent la membrane nucléaire pour se re-localiser dans le noyau. Ainsi, par exemple, des fractions du facteur d'élongation EF-1 α (Ejiri, 2002) et des aminoacyl-ARNt synthétases sont retrouvées dans le nucléoplasme (Mucha, 2002). Les signaux dirigeant l'importation des aaRS dans le noyau commencent à être connus, en revanche leur fonction exacte dans ce compartiment est encore assez hypothétique.

1.1 Importation des aaRS dans le noyau

L'importation des protéines en général, et des aaRS en particulier, dans le noyau nécessite la reconnaissance d'un signal de localisation nucléaire (NLS). Deux types de NLS sont couramment retrouvées : (i) les NLS monopartites composés de 4 résidus basiques consécutifs (4 Arg ou 4 Lys), ou de 3 aa basiques suivis d'une Pro ou d'une His, et (ii) les NLS bipartites constitués de deux régions riches en aa basiques, séparées par 10 aa (Mucha, 2002). En dehors des NLS classiques, d'autres motifs ont été décrits, mais ne sont pas fréquemment retrouvés. Ces séquences signatures sont reconnues spécifiquement par une famille de protéines, les importines (α ou β), qui prennent la synthétase en charge et lui font traverser le pore nucléo-cytoplasmique.

Avant d'initier le travail sur l'auto-régulation et la localisation nucléaire de l'AspRS de levure qui sera décrit dans l'article n°1, Wang et collaborateurs avaient proposé l'existence de séquences NLS dans de nombreuses aaRS, dont l'AspRS de *S.cerevisiae* (résidus ₃₁KKALKKLQKEQEQRKK₄₇) (Schimmel et Wang, 1999). En se basant sur l'alignement des séquences d'aaRS de plusieurs organismes, et par comparaison des régions riches en aa basiques, ils ont identifié des séquences conservées chez les eucaryotes et absentes chez les procaryotes qui répondaient aux caractéristiques énoncées précédemment pour les NLS. Cette prédiction s'est avérée fautive pour l'AspRS de levure. Nous verrons dans l'article qui suit que, si l'AspRS est bien détectable dans le noyau, son

extension N-terminale n'est pas nécessaire à cette localisation. D'autres exemples de localisation nucléaire d'aaRS ont été établis expérimentalement. C'est le cas des ArgRS, Glu-ProRS, MetRS et TrpRS chez les mammifères (Popenko et al., 1993; Popenko et al., 1994; Gunasekera et al., 2004), ainsi que des TyrRS et MetRS de *S.cerevisiae* (Azad et al., 2001; Galani et al., 2001).

1.2 Fonctions des aaRS dans le noyau

Différentes fonctions ont été associées à la localisation nucléaire des aaRS (Ko et al., 2002; Mucha, 2002). A ce jour, la fonction la mieux documentée concerne le contrôle de la qualité des ARNt produits avant leur export dans le cytoplasme (Dahlberg et Lund, 2005). Chez la levure, il a été montré que l'efficacité de l'export des ARNt nouvellement transcrits du noyau vers le cytoplasme (*via* le cargo Los1p associé à la protéine Ran-GTP) est augmentée lorsque les ARNt sont aminoacylés. Cette étape constituerait une ultime vérification de l'intégrité des molécules d'ARNt. En effet, comme cela a été présenté dans l'Introduction de cette thèse (partie III de l'Introduction), l'amination d'un ARNt par une aaRS est très sensible à la structure globale de la molécule d'ARN. Ainsi, si un ARNt est mal maturé (présence de séquences additives 3', 5', introniques ou manque de modifications post-transcriptionnelles), celui-ci sera faiblement aminoacylé par l'aaRS homologue dans le noyau et son transport dans le cytoplasme sera peu efficace (Azad et al., 2001). Cette vision est étayée par une étude récente qui a mis en évidence une voie de dégradation nucléaire des ARNt mal repliés chez la levure (Vanáčová et al., 2005). Ce mécanisme fait intervenir une poly-A polymérase qui modifie les ARNt mal repliés et les rend ainsi reconnaissables et dégradables par l'exosome nucléaire.

Une deuxième fonction, très controversée cependant, concerne l'implication des aaRS dans une machinerie traductionnelle nucléaire, où les aaRS assureraient la synthèse d'ARNt aminoacylés, qui participeraient à la synthèse de protéines dans le noyau (Iborra et al., 2001). En effet, dans cette étude, Iborra et collaborateurs ont montré qu'une lysine biotinylée, portée par un ARNt^{Lys}, est incorporée dans des chaînes polypeptidiques synthétisées au niveau du noyau, et que cette synthèse est sensible à différents inhibiteurs de la traduction ribosome dépendante (cycloheximide, acide aurintricarboxylique). Cette traduction nucléaire pourrait intervenir dans le « contrôle qualité » des ARNm (Iborra et al., 2004). Toutefois, aucun autre résultat, à ce jour, n'a confirmé l'existence de cette traduction nucléaire.

Comme nous allons le voir pour l'AspRS de levure, la présence de la MetRS dans le noyau de cellules Hela a été associée à une fonction de régulation de l'expression de gènes (Ko et al., 2000). La prolifération des cellules, consécutive à l'action de facteurs de croissance (PDGF, FGF) s'accompagne de la re-localisation d'une partie de la MetRS cytoplasmique vers le nucléole. De façon intéressante, le blocage de cette localisation (traitement par des anticorps anti-MetRS) résulte en une diminution de la transcription d'ARN ribosomiques, suggérant que la MetRS aurait une fonction d'activateur de la biogenèse des ribosomes dans les cellules en cours de croissance.

En résumé, la localisation nucléaire des aaRS serait liée, non seulement, à une fonction de contrôle de la qualité de l'expression des gènes d'ARNt, mais également à la régulation de l'expression de certains autres gènes. En ce qui concerne la localisation nucléaire de l'AspRS de levure, elle permet de réaliser les deux fonctions de façon coordonnée. En effet, l'auto-régulation de l'AspRS conduit à une expression coordonnée des ARNt^{ASP} et de l'AspRS. Plus précisément, elle implique une dépendance étroite entre l'expression de l'ARNm^{AspRS} et la concentration d'ARNt^{ASP} cellulaire. Ce mécanisme original, encore incomplet, suggère que l'AspRS en excès, non complexée à l'ARNt^{ASP}, serait importée dans le noyau où elle se lierait à son propre ARNm pour en inhiber la transcription.

2. Article n°1 :

Régulation de l'expression de l'aspartyl-ARNt synthétase de *S.cerevisiae* :
un équilibre entre ARNm et ARNt

Magali Frugier, Michaël Ryckelynck et Richard Giegé

2005

EMBO reports, **9**, 860-865

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

tRNA-balanced expression of a eukaryal aminoacyl-tRNA synthetase by an mRNA-mediated pathway

Magali Frugier, Michaël Ryckelynck & Richard Giegé

***EMBO reports*, 2005, Vol. 6, N°9, Pages 860–865**

Pages 860–865 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.nature.com/embor/journal/v6/n9/full/7400481.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

3. Discussion

Les résultats qui viennent d'être présentés ont permis de montrer que l'AspRS de *S.cerevisiae* est localisée dans le noyau, et ce, en quantité limitée. Une observation similaire a été faite pour la TyrRS de levure, dont la fraction nucléaire a été estimée à 1,5% du contenu cellulaire total en TyrRS (Azad et al., 2001). Cependant, contrairement aux prédictions de Wang et Schimmel, la localisation nucléaire de l'AspRS n'est pas liée à la présence d'une séquence NLS dans l'extension N-terminale de la protéine puisque la délétion de cet appendice n'abolit pas la présence de l'AspRS dans le noyau. Au contraire, cette délétion conduit à un déficit de régulation, donc à une surproduction d'AspRS, dont l'excès se re-localise majoritairement dans le noyau. Ce mécanisme de régulation est caractérisé par deux originalités : (i) une régulation transcriptionnelle dirigée par l'interaction de l'AspRS avec son propre ARNm et (ii) une coordination de l'expression de l'AspRS avec la concentration cellulaire en ARNt.

La première originalité correspond donc à la nature du mécanisme de régulation. Dans le noyau, l'AspRS interagirait avec son ARNm et ainsi en réprimerait la transcription. Si l'on se réfère aux exemples de régulation présentés dans l'Introduction de cette thèse, seul le système L4/s10 d'*E.coli* est comparable à ce que l'on observe pour l'AspRS. Parmi les mécanismes de régulation connus et qui n'ont pas été cités, le système TAT-tar du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) présente également de fortes homologies avec notre modèle. La particularité de ces deux mécanismes réside dans le fait que la protéine interagit avec l'ARNm pour en moduler la transcription. En fait, tous les deux agissent comme des facteurs de transcription (interagissant directement avec l'ARN polymérase) mais, au lieu de se fixer au niveau de l'ADN, ils interagissent directement avec l'ARNm. Le rôle de l'ARNm consiste à présenter une plate-forme permettant de rapprocher dans l'espace le facteur protéique régulateur (L4 ou TAT) de l'ARN polymérase.

Le premier système a été brièvement décrit dans l'Introduction et consiste en une atténuation de la transcription de l'opéron *s10* d'*E.coli* (section I.2.3.1 de l'Introduction). Ce mécanisme est séquentiel et se déroule en 3 étapes (Figure 34a). Dans un premier temps, l'ARN polymérase fait une courte pause au niveau d'un site spécifique sur l'ADN (mis en évidence *in vitro* à basse concentration en NTP). Ce complexe est stabilisé par le facteur de transcription NusA (Sha et al., 1995b). NusA se lie fortement à l'ARN polymérase, il provoque un changement de conformation de la polymérase (Greenblatt et

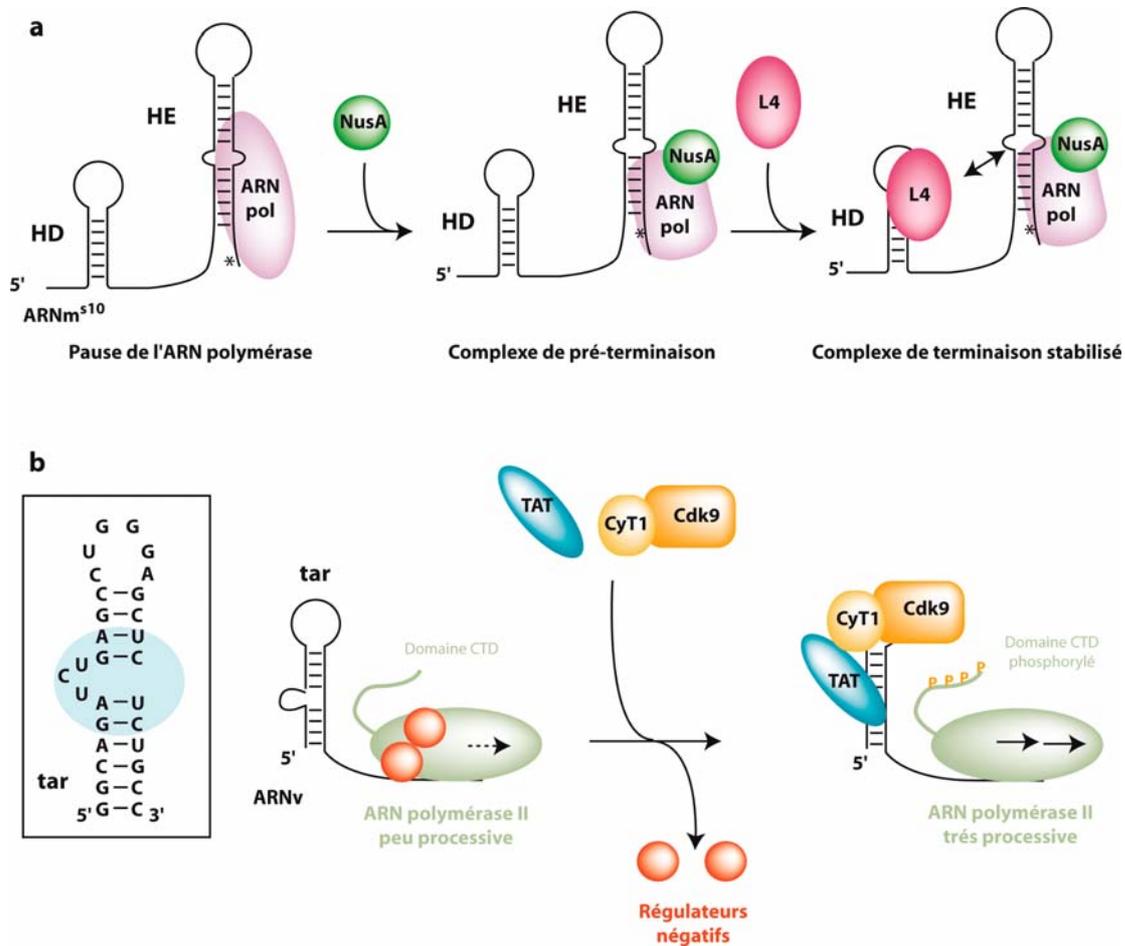


Figure 34: Mécanismes ARNm-dépendants de modulation de l'activité de l'ARN polymérase. Par soucis de simplification, les matrices ADN ne sont pas représentées. **(a)** Atténuation de la transcription de l'opéron *s10* d'*E.coli*. A gauche, après avoir transcrit les 140 premiers résidus de l'opéron *s10*, l'ARN polymérase bactérienne (rose) marque un arrêt au niveau d'un site de pause (*) à la base de l'hélice HE. Au centre, l'état de pause de l'ARN polymérase est stabilisé par l'arrivée de la protéine NusA (vert) qui forme le complexe de pré-terminaison. A droite, la protéine ribosomique L4 (magenta) reconnaît l'ARN au niveau de l'hélice HD et interagit avec le complexe de pré-terminaison pour former un complexe de terminaison stable. Figure établie d'après le mécanisme proposé par Sha et al., 1995. **(b)** Mécanisme d'activation de la transcription de l'ADNv par la protéine TAT. A gauche et encadrée, la structure secondaire de l'élément tar des ARNm du VIH est représentée avec la région reconnue par la protéine TAT, ombrée en bleu. Au centre, l'ARN polymérase II (vert pâle) est peu processive en raison de la présence d'inhibiteurs de transcription (rouge) et de l'hypophosphorylation de son domaine C-terminal (CTD). A droite, la fixation de TAT (bleu) sur tar recrute le complexe CyT1/Cdk9 (jaune/orange). L'activité kinase de la Cdk9 phosphoryle le domaine CTD de l'ARN polymérase II et déplace les inhibiteurs de transcription, ce qui augmente considérablement la processivité de l'enzyme. Figure adaptée de Liou et al., 2004.

al., 1981) avec laquelle il forme le complexe de pré-terminaison qui fait une longue pause au niveau de l'hélice HE (Sha et al., 1995a). Enfin, la protéine ribosomique L4 s'associe à l'ARNm (uniquement après l'arrivée de NusA) au niveau de la région de l'opérateur s10 mimant l'ARN 23S (hélice HD) (Stelzl et al., 2003 et section I.2.3.1 de l'Introduction) et stabilise fortement le complexe en pause. Bien que le mode d'interaction entre la protéine L4 et le complexe de pré-terminaison ne soit pas précisément connu, la protéine L4 interagirait avec l'ARN polymérase selon deux modèles : soit directement, soit par l'intermédiaire de NusA. Finalement, Le complexe formé reste fermement associé à l'ARNm au niveau du site de pause (Sha et al., 1995a) et le mécanisme de régulation s'achèverait par la terminaison de la transcription et la libération des différents composants du complexe en pause.

Le second mécanisme, comparable à ce que l'on observe avec l'AspRS de levure, est utilisé dans le cas du VIH pour activer considérablement l'efficacité de sa transcription. Lorsque le virus infecte une cellule, son ARN génomique est rétro-transcrit par la reverse transcriptase virale en ADN double-brin qui est ensuite intégré au génome de la cellule hôte. La transcription de l'ADN viral par l'ARN polymérase II cellulaire est très peu efficace et permet seulement de synthétiser la quantité d'ARN viraux (ARNv) nécessaire à la production de la protéine TransActivatrice de la Transcription (TAT) (Liou et al., 2004). Cette protéine s'organise en différents modules impliqués notamment (i) dans la reconnaissance de l'ARN et (ii) dans l'interaction avec des co-facteurs de régulation. Un domaine basique reconnaît l'ARNv au niveau d'une structure particulière, tar (transactivating responsive element), présente dans la région 5' non-traduite de tous les ARNm du VIH (Rana et Jeang, 1999). L'ARN tar se compose d'une hélice irrégulière interrompue par un bulge de 3 nucléotides "UCU". Ces 3 résidus, et de façon moindre les 4 paires de bases qui les encadrent, constituent les déterminants reconnus par la protéine TAT (Figure 34b). Une fois fixée sur l'ARN tar, TAT recrute un complexe formé de la cycline T1 (qui interagit avec TAT et avec la boucle apicale de tar) et de la protéine kinase Cdk9. Dans cette configuration, la kinase peut phosphoryler le domaine C-terminal de l'ARN polymérase. Cette phosphorylation permet (i) de déplacer les inhibiteurs de transcription associés à la polymérase et (ii) d'augmenter sa processivité. En conséquence, le niveau de transcription des ARNv est augmenté d'un facteur 100.

Dans ces deux exemples de régulations transcriptionnelles, le mécanisme recrute un facteur additionnel qui module (négativement pour NusA ou positivement pour Cdk9) l'activité de l'ARN polymérase. On peut donc raisonnablement penser que cela pourrait

également être le cas pour l'AspRS de levure qui, une fois associée à son ARNm, recruterait un facteur de régulation (restant à identifier) responsable de l'arrêt de la transcription du gène de l'AspRS par l'ARN polymérase II.

La seconde originalité de la régulation de l'AspRS réside dans la forte dépendance qui existe entre l'expression de l'AspRS et la concentration cellulaire de l'ARNt^{Asp}. Dans la Discussion de l'Article, nous proposons que l'ARNt néo-synthétisé serait responsable de cette balance. En effet, sa présence dans le noyau lui confère la proximité nécessaire pour interférer rapidement et efficacement avec le complexe de régulation (ARNm^{AspRS}/AspRS). Cependant, il a été montré récemment que, chez *S.cerevisiae*, les ARNt circulent activement entre le cytoplasme et le nucléoplasme (Shaheen et Hopper, 2005; Takano et al., 2005). Cette proposition ne va pas à l'encontre de notre modèle de régulation de l'AspRS puisque l'augmentation de la concentration en ARNt^{Asp} non-aminoacylés dans le cytoplasme s'accompagnerait d'une augmentation de la concentration d'ARNt^{Asp} non chargés également dans le noyau. A nouveau, dans ce cas l'ARNt peut interagir avec le complexe de régulation et lever l'inhibition de la transcription. En fait, que l'augmentation de la concentration d'ARNt dans le noyau soit une conséquence de la néo-synthèse d'ARNt ou de son import depuis le cytoplasme, sa capacité à s'accumuler sous sa forme non-aminoacylée dans le noyau, en fait un capteur efficace du niveau d'aminoacylation dans la cellule. Ce rôle de senseur, attribué aux ARNt non chargés, n'est pas limité à la régulation de l'expression de l'AspRS. Chez la levure, on le retrouve notamment dans la voie GCN2/GCN4 qui régule l'expression de nombreuses aaRS mais également d'enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des aa. Cette observation positionne l'ARNt comme une molécule « pivot » non seulement dans la traduction mais également dans la régulation de l'expression de nombreux gènes.

II. Structure de l'ARNm et étude de l'interaction AspRS/ARNm : mise en évidence d'un mimétisme de l'ARNt^{Asp}

1. Introduction

Le mécanisme de régulation transcriptionnelle de l'AspRS, mis en évidence dans la partie précédente, est initié par une interaction entre l'ARNm^{AspRS} et l'AspRS. Dans tous les mécanismes de rétro-régulation connus à ce jour, la protéine traduite interagit avec une région de l'ARNm (opérateur) mimant son propre substrat ARN naturel (section I.2.3 de l'Introduction). Dans certains cas, le substrat naturel et son mime possèdent une structure secondaire identique et des résidus strictement conservés (par exemple entre le site 2 de l'ARNm^{if3} et la jonction H40-H41 de l'ARNr 23S). Cependant, dans d'autres cas, l'homologie structurale est moins évidente. Par exemple, le déterminant reconnu par la protéine ribosomique L4 (boucle de trois nucléotides avec un A en position 5') est présenté dans le cadre d'une jonction à trois hélices dans l'ARNr 23 S (substrat naturel de L4) alors que l'élément mimétique est replié sous la forme d'une épingle à cheveux. Enfin, dans d'autres cas, le mimétisme n'est que partiel. Ainsi, l'opérateur de l'ARNm^{ThrRS} d'*E. coli*, mime de l'ARNt^{Thr}, ne possède pas de tige pseudo-acceptrice. Toutefois, dans ce cas, l'absence de tige pseudo-acceptrice est compensée par la présence de deux tiges pseudo-anticodons, dont l'une possède une boucle qui mime parfaitement la boucle anticodon de l'ARNt^{Thr} et contient un motif original propre à l'ARNm.

La région opératrice de l'ARNm^{AspRS} est constituée des 38 derniers résidus de la région 5' non-traduite et des 270 premiers nucléotides de la phase codante. J'ai établi la cartographie en solution de cette région de l'ARNm (environ 300 nucléotides), ce qui a permis de mettre en évidence les signaux impliqués dans le processus de régulation. En effet, j'ai montré que la région régulatrice dans l'ARNm^{AspRS} se replie en deux domaines structuraux indépendants et symétriques, séparés par deux régions simple-brins. Le domaine I comporte une structure pseudo-anticodon qui non seulement mime structurellement le domaine anticodon de l'ARNt^{Asp}, mais renferme également le triplet anticodon correspondant aux 3 éléments d'identité majeurs du système aspartate : G₃₄, U₃₅ et C₃₆. Le domaine II, quant à lui, est restreint à une courte hélice. L'ensemble des résultats de cartographie en solution et d'empreinte de l'AspRS sur l'ARNm a permis de construire un modèle tridimensionnel où chaque monomère de l'AspRS de levure lie indépendamment les deux domaines de l'ARNm^{AspRS} et ce, de façon identique à l'ARNt^{Asp}. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'Article n°2.

2. Article n°2

Un mime moléculaire de l'ARNt^{Asp} dirige la formation du complexe entre
l'aspartyl-ARNt synthétase de *S.cerevisiae* et son ARNm

Michaël Ryckelynck, Richard Giegé et Magali Frugier

2005

Journal of Molecular Biology, **354**, 614-629

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

An Intricate RNA Structure with two tRNA-derived Motifs Directs Complex Formation between Yeast Aspartyl-tRNA Synthetase and its mRNA

Michaël Ryckelynck, Benoit Masquida, Richard Giegé and Magali Frugier

Journal of Molecular Biology, 2005, Volume 354, N° 3, Pages 614-629

Pages 614-629 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.063>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

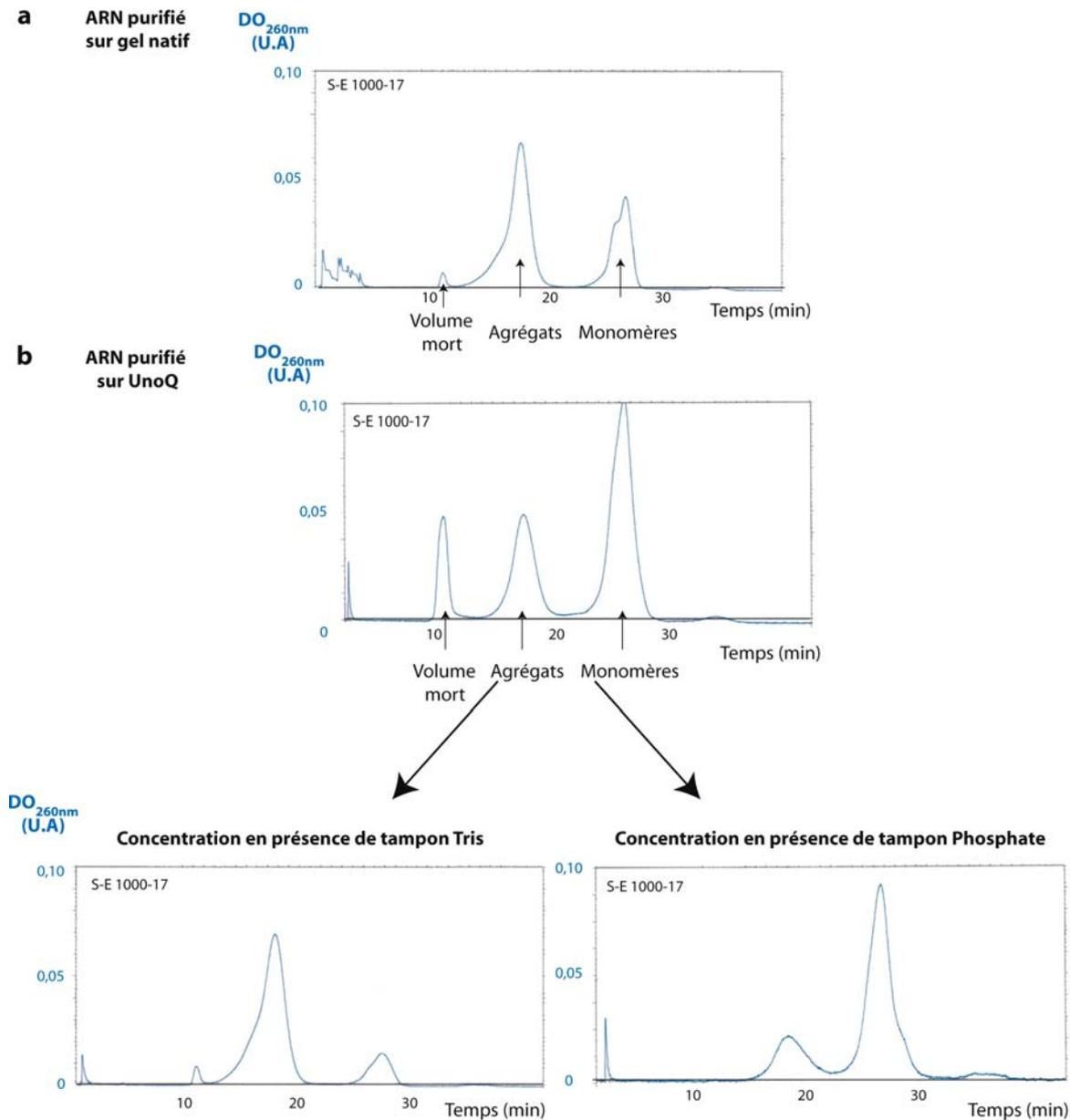


Figure 35 : Caractérisation et optimisation de la solubilité de l'ARNm^{AspRS}. **(a)** Analyse de l'état oligomérique du transcrit d'ARN purifié sur gel natif (TBE). La chromatographie sur résine de gel filtration S-E 1000-17 (Bio-RAD) révèle qu'environ 60% des ARN sont présents sous forme agrégée. **(b)** En haut, profil de fractionnement d'ARN purifiés au préalable sur colonne UnoQ (Bio-RAD). 60% des ARN sont sous forme monomérique, 20% sous forme agrégée et 20% sortent dans le volume mort (gros agrégats). Les fractions contenant l'ARN sous forme monomérique sont ensuite concentrées sur Microcon® 30K (Millipore) en présence de tampon Tris ou Phosphate. En bas, à gauche, analyse de la fraction d'ARN initialement monomérique, concentrée en présence de tampon Tris : 80% de l'ARN est à nouveau sous forme agrégée. En bas, à droite, analyse de la fraction d'ARN initialement monomérique, concentrée en présence de tampon Phosphate : 80% de l'ARN reste sous forme monomérique.

3. Limitations techniques liées à la solubilité de l'ARN

L'essentiel des résultats obtenus lors de cette étude structurale a été résumé dans l'Article n°2. J'aimerais à présent revenir sur la principale limitation technique rencontrée lors de ce travail, qui est liée aux propriétés d'agrégation de l'ARNm^{AspRS}. Comme indiqué dans l'Article, nous avons pris garde à purifier l'ARNm dans des conditions natives (en absence d'agents dénaturants tels que l'urée), afin de préserver le repliement acquis par la molécule au cours de sa transcription *in vitro*. L'analyse par gel filtration de l'état oligomérique de l'ARNm^{AspRS} purifié nous a révélé qu'une partie de cet ARN était agrégée (Figure 35a). Nous attribuons cette propriété à la présence des deux longues régions riches en purines qui composent les domaines connecteurs. Ces régions, non structurées, s'associent facilement de façon désordonnée et conduisent à une agrégation de l'ARN. Ainsi, alors qu'une molécule très structurée et très compacte (comme l'ARNt) est très soluble, une organisation plus relâchée, comme celle retrouvée au niveau des connecteurs de l'ARNm^{AspRS}, réduit substantiellement la solubilité de la molécule. Alors que l'agrégation de l'ARN n'a pas gêné les expériences de retard sur gel (dans du tampon Phosphate) ou la cartographie en solution, elle a posé un problème majeur lors des expériences d'empreinte. En effet, comme le montre le modèle que nous proposons, l'ARNm couvre une grande surface de l'AspRS et nécessite, notamment, que les régions connectrices se déploient pour que l'ancrage des deux motifs d'ARN se fasse sur chacun des monomères. Ceci implique, entre autres, que l'ARN doit être suffisamment soluble pour que l'AspRS reconnaisse efficacement une molécule individuelle. Nous avons donc été très attentif aux conditions utilisées pour purifier les ARN ayant servi dans les expériences d'empreinte. Dans un premier temps, nous avons réduit la proportion de matériel insoluble en purifiant l'ARN directement après sa transcription sur une colonne échangeuse d'anions (UnoQ, Bio-RAD). Dans ces conditions, le tampon de purification contient du MgCl₂ (10 mM), ce qui aide au repliement des ARN. De plus, l'utilisation de supports chromatographiques permet de concentrer l'échantillon et évite de passer par une étape de précipitation à l'éthanol, qui pourrait favoriser l'agrégation des molécules. Les produits de transcription ainsi purifiés sur UnoQ, ont ensuite été isolés par gel filtration et concentrés sur Microcon[®] 30K (Millipore). C'est au cours de l'étape de concentration que le tampon Tris est échangé contre du tampon Phosphate. En effet, lorsque l'ARN est concentré dans le tampon de gel filtration (Tris) celui-ci s'agrège, alors que dans un tampon Phosphate l'agrégation de la molécule est limitée (monomérique à près de 80%)

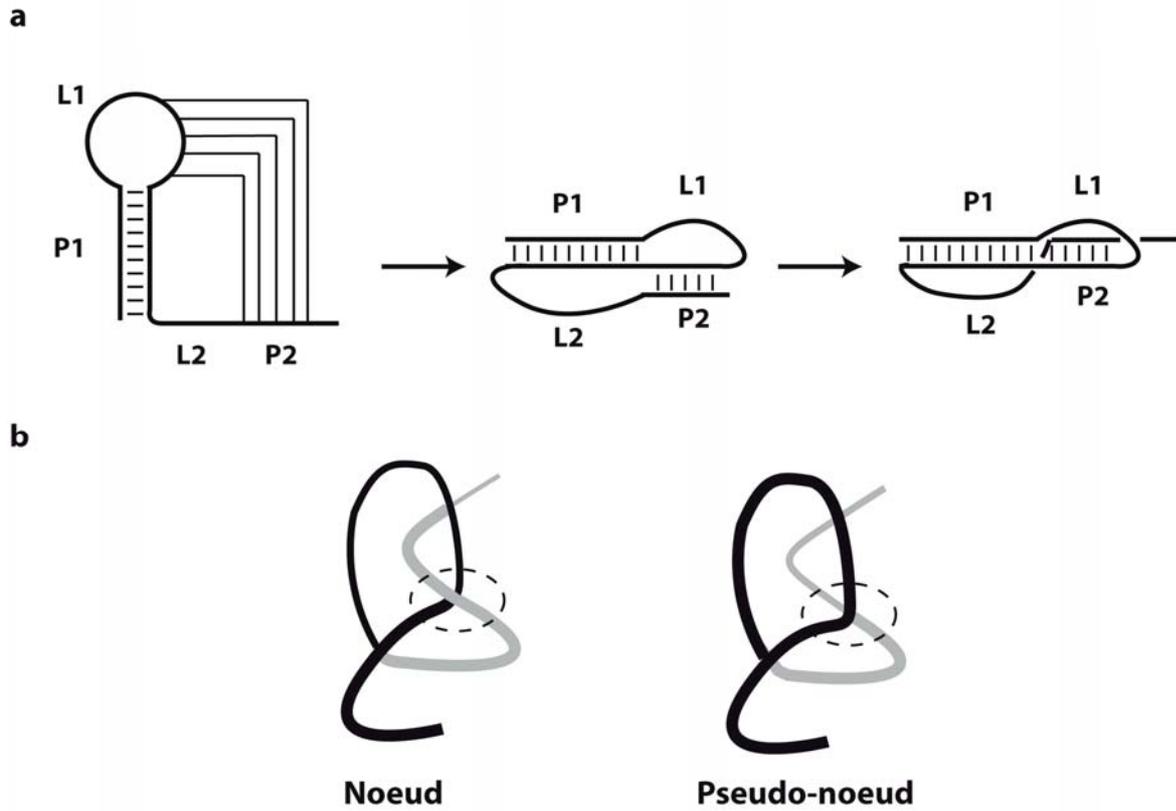


Figure 36 : Généralités : organisation structurale d'un pseudo-nœud. **(a)** L'appariement entre la boucle apicale (L1) d'une épingle à cheveux et la région simple-brin adjacente conduit à la formation de l'hélice P2. L'empilement des deux hélices (P1 et P2) forme une structure rigide et compacte en pseudo-nœud. **(b)** Représentation schématique d'un nœud (à gauche) et d'un pseudo-nœud (à droite). Alors que dans le nœud la région simple-brin traverse la boucle isolée, dans un pseudo-nœud la région simple-brin passe derrière la boucle isolée.

(Figure 35b). De part sa composition, le tampon Phosphate pourrait agir sur les régions riches en purines, en mimant l'effet de la chaîne ribose-phosphate de l'ARN. Cet effet bénéfique du tampon Phosphate (utilisé pour les expériences de retard sur gel, les cartographies et les empreintes en présence de sondes enzymatiques) a permis d'obtenir des résultats reproductibles.

4. Discussion

4.1 Généralités sur les pseudo-nœuds

L'organisation structurale en pseudo-nœud est unique à l'ARN et pleinement révélatrice de la plasticité de cette molécule. De façon générale, un pseudo-nœud résulte de l'appariement entre la boucle apicale d'une épingle à cheveux et une séquence simple-brin adjacente (Figure 36a). Les deux hélices ainsi formées s'empilent alors de façon co-axiale pour ordonner la structure et la stabiliser. Le nom de pseudo-nœud a été choisi car, si la structure isole effectivement une boucle, la région simple-brin adjacente ne traverse pas cette boucle, au contraire d'un vrai nœud (Figure 36b). Ces éléments structuraux sont impliqués dans un grand nombre de fonctions. Ainsi, par exemple, ils jouent un rôle prépondérant dans des mécanismes de recodage associés à un décalage du cadre de lecture du ribosome (Sung et Kang, 2003). Ils interviennent également dans le rallongement des télomères (Chen et Greider, 2005) et dans des mécanismes de régulation (ARNtm, opérateur d'ARN codant pour des protéines ribosomiques, voir Introduction). Ces repliements d'ARN sont aussi fréquemment employés pour la mise en place de structures pseudo-ARN^t que l'on retrouve plus particulièrement à l'extrémité 3' des ARN génomiques de virus de plantes. D'ailleurs, la première structure en pseudo-nœud a été identifiée en 1982 par Rietveld et collaborateur à l'extrémité 3' de l'ARN du Virus de la Mosaïque Jaune du Navet (VMJN) (Rietveld et al., 1982).

4.2 Organisation structurale de pseudo-ARN^t de virus de plantes

A ce jour, trois systèmes viraux, présentant des structures mimétiques plus ou moins complexes, sont particulièrement bien caractérisés. Il s'agit (i) des tymovirus représentés par le virus de la mosaïque jaune du navet (VMJN), (ii) des bromovirus représentés par le virus de la mosaïque du brome (VMB) et enfin des tobamovirus représentés par le virus de la mosaïque du tabac (VMT). Dans chaque cas, le pseudo-ARN^t est reconnu et aminoacylé

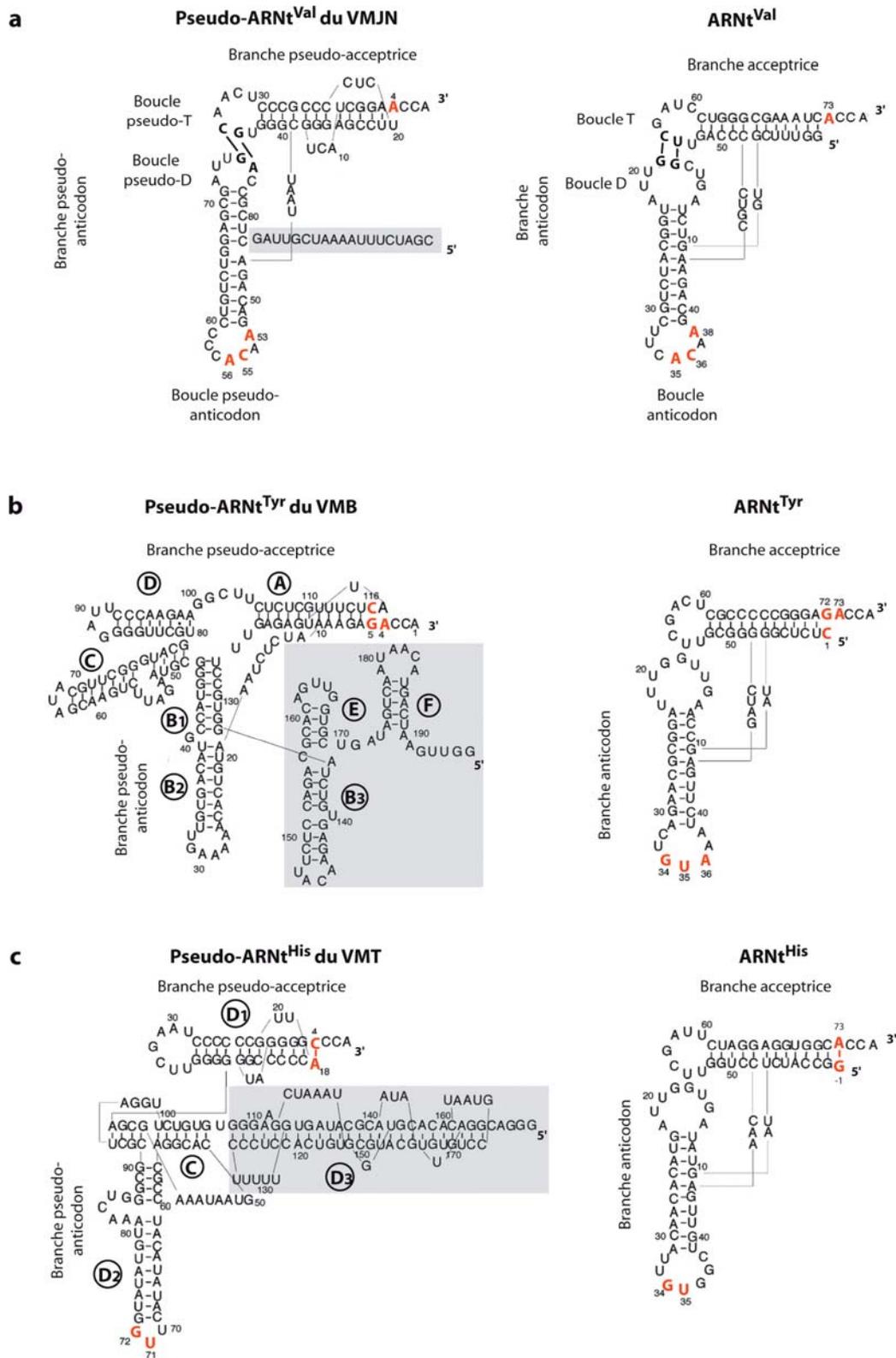


Figure 37 : Homologies structurales entre les pseudo-ARNt de virus de plantes et les ARNt canoniques. (a) Homologies entre le pseudo-ARNt de la mosaïque jaune du navet (VMJN) et l'ARNt^{Val} de levure. (b) Homologies entre le pseudo-ARNt du virus de la mosaïque du brome (VMB) et l'ARNt^{Tyr} de levure. (c) Homologies entre le pseudo-ARNt du virus de la mosaïque du tabac (VMT) et l'ARNt^{His}. Les ARN sont représentés suivant leur repliement tertiaire où les nucléotides conférant l'identité valine (a), tyrosine (b) ou histidine (c) sont indiqués en rouge. Les régions ombrées en gris à l'extrémité 5' des ARN viraux ne participent pas à l'élaboration de la structure du pseudo-ARNt. Figure tirée de Fechter et al., 2001.

par une aaRS dont l'identité varie en fonction de la famille de virus considérée (Fechter et al., 2001b).

Le virus de la mosaïque jaune du navet (VMJN). L'extrémité 3' de l'ARN du VMJN possède le pseudo-ARNt dont la structure secondaire est la plus « simple » et pour laquelle l'analogie avec les ARNt canoniques est la plus évidente (Figure 37a). Dans ce cas, on différencie de façon non ambiguë une structure en L, présentant les deux domaines structuraux caractéristiques des ARNt canoniques (Rietveld et al., 1982; Dumas et al., 1987). La branche anticodon est mimée par l'empilement de deux hélices, d'une boucle pseudo-D et d'une boucle apicale constituée de 7 nucléotides (caractéristique des boucles anticodons), dont 5 sont communs avec la séquence de la boucle anticodon de l'ARNt^{Val}. La branche acceptrice, seconde région fonctionnelle de l'ARNt, est mimée par l'empilement d'un pseudo-noeud et d'une structure en épingle à cheveux possédant une boucle pseudo-T. Enfin, des interactions tertiaires identiques à celles présentes dans l'ARNt entre les boucles D et T sont établies entre les boucles pseudo-D et pseudo-T, renforçant le mimétisme à un niveau tridimensionnel (Smit et al., 2002). De façon intéressante, le pseudo-ARNt du VMJN et l'ARNt^{Val} possèdent des résidus communs connus pour constituer le jeu d'identité du système valine, nucléotides A35, C36 et C38 dans la boucle anticodon et la base A73 dans la branche acceptrice (Dreher et al., 1988; Fukai et al., 2003). Du fait de cette conservation dans l'ARN viral, ce dernier est efficacement reconnu et aminoacylé par la ValRS au niveau de son extrémité CCA 3' terminale, une autre homologie, mais cette fois fonctionnelle, avec l'ARNt^{Val}.

Le virus de la mosaïque du Brome (VMB). Le pseudo-ARNt retrouvé à l'extrémité 3' de l'ARN du VMB présente une organisation bien plus complexe que celle du VMJN (Figure 37b) (Joshi et al., 1983; Perret et al., 1989; Felden et al., 1993). Tout d'abord, on retrouve la structure virale caractéristique mimant le bras accepteur de l'ARNt et résultant de l'empilement d'une épingle à cheveux sur un pseudo-noeud terminé par un CCA 3' (Domaine A). Cependant, contrairement aux autres pseudo-ARNt viraux, aucune boucle pseudo-anticodon n'est retrouvée, et ce n'est que récemment que l'hélice B2 a pu être assignée comme la région mimant la branche anticodon de l'ARNt (Felden et al., 1998; Fechter et al., 2001a). Le pseudo-ARNt du VMB est aminoacylable par la TyrRS et de ce fait, possède certainement les signaux de reconnaissance du système tyrosine. Toutefois, le jeu d'identité tel qu'on le connaît dans l'ARNt^{Tyr} eucaryote (levure) n'est que partiellement

présent. Ainsi, en se basant sur ces données, la reconnaissance de l'extrémité 3' de l'ARN viral par la TyrRS n'est dirigée que par la présence des résidus mimant la base A73 et la paire de bases C1-G72.

Le virus de la mosaïque du Tabac (VMT). L'ARN du VMT possède une extrémité 3' bipartite composée d'une région riche en pseudo-noeuds et d'un pseudo-ARNt (Figure 37c). Comme pour les autres ARN viraux décrits précédemment, la région 3' terminale (D1) se structure sur la base d'un pseudo-noeud et mime la branche acceptrice d'un ARNt (Joshi et al., 1985; Felden et al., 1994). Ce domaine est raccordé par une région connectrice (C) au domaine D2 qui mime la branche anticodon. Enfin, la région riche en pseudo-noeuds (D3) s'intercale entre D1 et D2 et impose leur orientation relative, les disposant perpendiculairement l'un par rapport à l'autre (Belkum et al., 1985). La structure du pseudo-ARNt du VMT lui permet de recruter l'HisRS, principalement en raison de la présence d'une paire de bases mimant le A73 apparié au nucléotide -1 de l'ARNt^{His}. La présence d'un nucléotide en position -1 dans une structure d'ARNt (ou pseudo-ARNt) constitue en soit un élément majeur de reconnaissance de la molécule par l'HisRS (Rudinger et al., 1994; Nameki et al., 1995). La nature de la base à cette position n'a pas d'importance, pourvu qu'elle présente un groupement 5' phosphate. De plus, la présence de résidus dans la boucle apicale de D2 mimant les éléments d'identité de la boucle anticodon de l'ARNt^{His} renforce la nature histidinylable de ce pseudo-ARNt.

Etant donné que la structure pseudo-noeud mimant l'interaction A73/X-1 est commune à tous les pseudo-ARNt viraux, ceux-ci sont tous des substrats potentiels de l'HisRS. Toutefois, *in vivo* la présence de signaux d'identité correspondant à d'autres systèmes prend le dessus et dicte la nature de l'aa qui sera associé au A76 3' terminal de l'ARN^{viral} (Rudinger et al., 1992; Felden et al., 1998).

4.3 Fonctions des pseudo-ARNt de virus de plantes

Les structures en pseudo-ARNt trouvées à l'extrémité des ARN viraux jouent un rôle fondamental dans le cycle d'amplification du virus. En effet, le site de liaison de la réplicase virale se situe au niveau des pseudo-ARNt et implique la région C du VMB (Sivakumaran et al., 2003) et les régions C et D2 du VMT (Osman et Buck, 2003). Une fois en place, l'enzyme initie la réplication de l'ARN⁺ en ARN⁻ au niveau du CCA 3' terminal. Toutefois, le cycle viral doit débiter par une traduction de l'information portée

par l'ARN viral afin que les enzymes virales (réplicase, hélicase...) soient produites. La coordination entre traduction et réplication de l'ARN viral est en partie liée à l'aminoylation de la structure pseudo-ARNt. En effet, le bras pseudo-accepteur aminoylé est efficacement reconnu par EF-1 α qui, une fois fixé à l'ARN, interfère avec la fixation de la réplicase et donc bloque la réplication au profit de la traduction (Matsuda et al., 2004). De plus, certains pseudo-ARNt agiraient comme stimulateurs de la traduction par un mécanisme peu compris, en interagissant avec la coiffe et circularisant l'ARN viral (Barends et al., 2004; Matsuda et Dreher, 2004). Dans le cas du VMJN et du VMT, cette association entre les extrémités 5' et 3' ferait intervenir le facteur d'élongation EF-1 α (Matsuda et al., 2004; Zeenko et al., 2002).

L'extrémité 3' du VMJN intervient également dans un mécanisme de reprogrammation du ribosome. Selon ce modèle, le pseudo-ARNt valinylé capture un ribosome et le place sur le codon d'initiation d'une phase de lecture normalement « silencieuse » (Barends et al., 2003). Ce système s'apparente au mécanisme d'entrée direct du ribosome (IRES) observé pour certains virus animaux, tels que le virus de l'hépatite C. Réciproquement, l'IRES de l'hépatite C contient une structure pseudo-ARNt (Piron et al., 2005).

Enfin, les pseudo-ARNt peuvent également être vus comme des télomères assurant le maintien de l'intégrité des extrémités 3' des génomes viraux. Ces structures possédant un repliement proche du repliement canonique des ARNt, elles sont efficacement reconnues par la terminal-nucléotide transférase (CCase), ce qui garantit une réparation immédiate en cas de délétion de l'extrémité CCA (Hema et al., 2005).

Il faut noter que le détournement des ARNt de leur fonction canonique n'est pas restreint aux virus de plantes. En effet, une classe de virus d'animaux, les rétrovirus utilisent également les ARNt mais sous leur forme native. La rétrotranscription de l'ARN génomique viral en ADN double-brin est une étape majeure du cycle de réplication des rétrovirus. Cette réaction est catalysée par la rétrotranscriptase virale (RT) et nécessite la présence d'une amorce pour être initiée. Cette dernière est toujours composée d'un ARNt cellulaire détourné de sa fonction dans la traduction (Marquet et al., 1995; Grice, 2003). Parmi les exemples les plus connus on retrouve l'ARNt₃^{Lys} (amorce de la RT du virus de l'immunodéficience humaine), l'ARNt^{Trp} (amorce de la RT de rétrovirus aviaires), l'ARNt^{Pro} (amorce de la RT du virus de leucémie murine) ou encore les ARNt^{Met} et ARNt^{Asn} (amorce de la RT de rétrotransposons). L'appariement entre ces ARNt et l'ARN

viral à rétrotranscrire se fait au niveau d'une région d'appariement de l'amorce (PBS) qui se situe toujours en amont de la région codante de l'ARN viral et fait intervenir le bras accepteur de l'ARNt. Cette interaction s'étend à l'ensemble de la séquence de l'ARNt pour former un complexe compact d'initiation de la rétrotranscription (Isel et al., 1995).

Comme cela vient d'être dit, une caractéristique structurale commune aux ARN viraux (de virus de plantes, plus particulièrement) est l'utilisation intensive de structures en pseudo-nœuds. Cependant, dans ce cas précis, les pseudo-nœuds miment essentiellement la branche acceptrice des ARNt. A notre connaissance, notre modèle de repliement de l'ARNm^{AspRS} est le premier exemple de pseudo-nœud mimant une branche anticodon.

4.4 Modèle d'interaction entre l'AspRS et l'ARNm^{AspRS}

La caractérisation structurale de l'opérateur de l'ARNm^{AspRS} de *S.cerevisiae* et de son mode d'interaction avec l'AspRS a permis de proposer un modèle de reconnaissance entre ces deux molécules. La région de l'ARN impliquée dans la formation du complexe avec la protéine est composée de deux domaines indépendants et séparés par deux longs connecteurs riches en purines (Figure 2b de l'Article n°2). Chaque domaine contient le même motif hélical constitué, dans les deux cas, par un brin de la région 5' non-traduite et un brin de la phase codante de l'ARN. Ce motif serait accommodé par l'AspRS entre le domaine de reconnaissance de l'anticodon et l'extension N-terminale de la protéine (Figure 6 de l'Article n°2). Ce type d'interaction impliquant une reconnaissance double est également retrouvé dans l'opérateur de l'ARNm^{ThrRS} (Graffe et al., 1992) et de l'ARNm^{if3} (Guillier et al., 2005), deux exemples de mécanismes d'autorégulation. On peut imaginer trois fonctions potentielles à cette double reconnaissance. (i) D'une part, la présence de deux sites de fixation pourrait augmenter l'affinité globale entre l'ARN et la protéine dans le complexe, tout en conservant des affinités localement faibles, rendant chaque site de l'ARNm facilement dissociable en présence de l'ARNt^{Asp} compétiteur. (ii) La fixation des deux sites de l'ARNm neutraliserait les deux monomères de la protéine et éviterait la fixation d'un ARN hétérologue. (iii) Enfin, la reconnaissance des deux sites pourrait engendrer un changement conformationnel au niveau de l'ARN ou de la protéine.

En plus du motif hélical, le domaine I contient une boucle ressemblant à la boucle anticodon de l'ARNt^{Asp}, en particulier au niveau du triplet de base (G₃U₄C₅) mimant le triplet anticodon de l'ARNt^{Asp}. Cette boucle serait reconnue par l'AspRS de façon

similaire à la boucle anticodon de l'ARNt, cependant elle n'est pas présentée dans le contexte d'une épingle à cheveux, mais au sein d'une structure en pseudo-nœud. Cette situation rappelle celle rencontrée pour les substrats ARN de la protéine ribosomique S15 d'*E.coli*. En effet, un des sites de fixation (motif GU/GC) de la protéine S15 est présenté dans le cadre d'une longue hélice (H22) dans l'ARNr 16S, alors qu'il est retrouvé dans un pseudo-nœud (hélice H1) dans l'ARNm (voir Introduction). Dans ce cas, cette organisation permet de présenter le motif dans une conformation optimale, mais également de rapprocher une autre région de l'ARN reconnue spécifiquement par la protéine S15 (résidus A₄₆ de la boucle L1). La même fonction pourrait être assurée par le pseudo-nœud du domaine I de l'ARNm^{AspRS}. Dans notre cas, cette structure rigide pourrait, tout d'abord, permettre de présenter la boucle pseudo-anticodon dans une conformation identique à celle de l'ARNt^{Asp}. En effet, comme cela est mentionné dans l'Article, on peut prédire que l'absence du pseudo-nœud conduirait à la formation d'une hélice étendue emprisonnant le triplet pseudo-anticodon et le rendant inaccessible à la protéine (Figure 38). L'organisation en pseudo-nœud pourrait également maintenir le motif hélicial dans une conformation optimale pour sa reconnaissance par le domaine de liaison de l'anticodon et/ou l'extension N-terminale de la protéine.

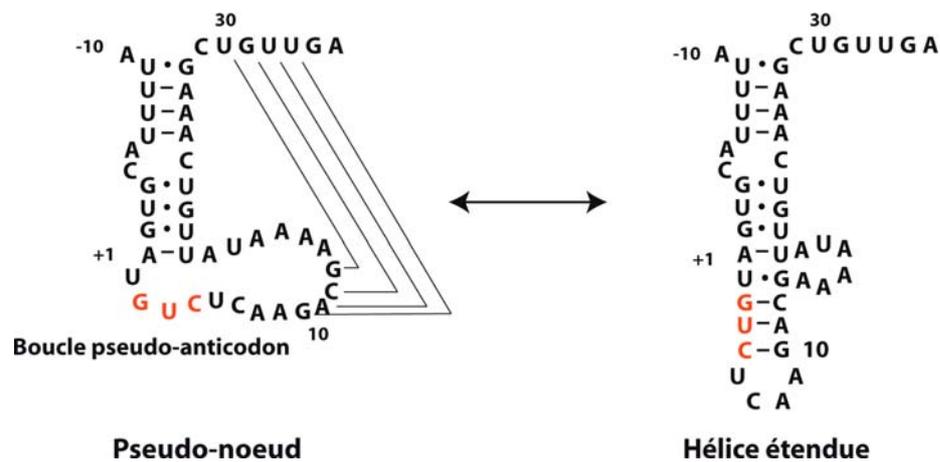


Figure 38 : Structure secondaire du domaine I de l'ARNm^{AspRS} en présence et en absence du pseudo-nœud. La perte de la conformation pseudo-nœud de l'ARN au profit d'une hélice étendue conduit à l'emprisonnement de la boucle pseudo-anticodon. Les nucléotides mimant le triplet anticodon de l'ARNt^{Asp} sont montrés en rouge.

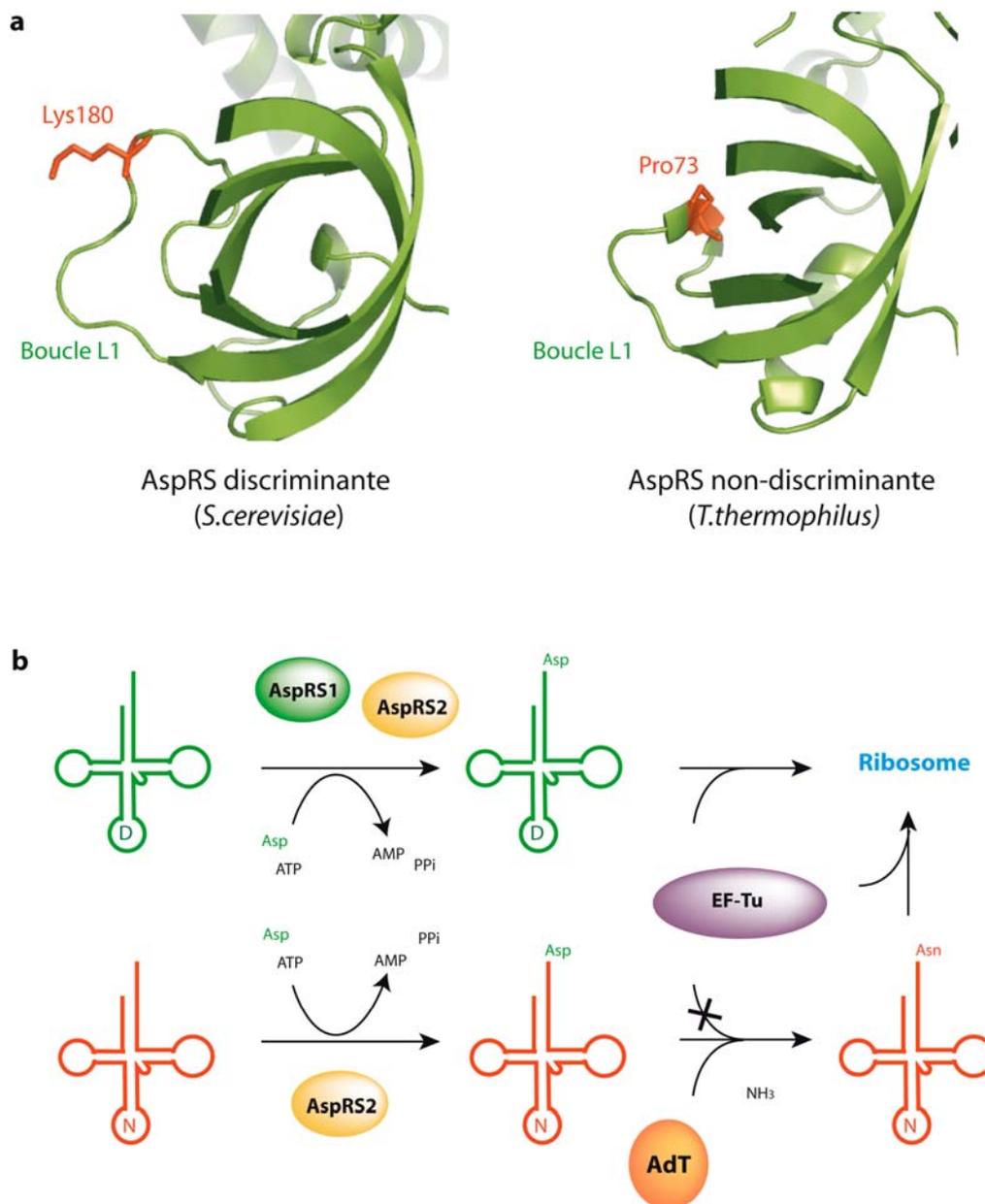


Figure 39 : Domaines de reconnaissance de l'anticodon des AspRS discriminante et non-discriminante et réactions d'aspartylation hétérologues. (a) Comparaison des boucles L1, impliquées dans la spécificité de reconnaissance de la boucle anticodon de l'ARNt^{Asp}, de l'AspRS de *S.cerevisiae* (AspRS discriminante) et de l'AspRS2 de *T.thermophilus* (non-discriminante). La lysine 180 de l'AspRS discriminante et la proline 73 de l'AspRS non-discriminante sont représentées en rouge. (b) Aspartylations catalysées par les deux types d'AspRS. En haut, les deux AspRS (AspRS1, discriminante et AspRS2, non-discriminante) catalysent l'aspartylation spécifique de l'ARNt^{Asp} qui est pris directement en charge par le facteur d'élongation EF-Tu (en violet). En bas, l'AspRS2 (non-discriminante) catalyse en plus l'aspartylation de l'ARNt^{Asn} (en rouge). La prise en charge de cet Asp-ARNt^{Asn} par le facteur EF-Tu nécessite l'action préalable d'une amidotransférase (AdT en orange) qui convertit l'Asp en Asn.

III. Aminoacylations incorrectes in vitro

1. Introduction

La spécificité de reconnaissance de l'ARNt est en général stricte. Toutefois, certains procaryotes, dont *T.thermophilus*, possèdent une AspRS de spécificité stricte (AspRS1) co-existant avec une AspRS de spécificité relâchée (AspRS2). Cette duplication de gènes et, en particulier, la baisse de spécificité de l'AspRS2 n'est pas fortuite, mais au contraire répond à un besoin de la cellule. En effet, certains des organismes possédant une AspRS non-discriminante sont dépourvus de la voie de biosynthèse de l'asparagine, qui est remplacée par une voie dont le point de départ est l'aspartylation incorrecte de l'ARNt^{Asn}. Les bases de cette tolérance ont été récemment élucidées grâce à la résolution de la structure cristallographique de l'AspRS2 de *T.thermophilus* (Charron et al., 2003). L'AspRS2, non discriminante aspartyle donc, en plus de son ARNt homologue, l'ARNt^{Asn} qui possède 3 des 4 déterminants majeurs du système aspartate (G34, U35 et G73), alors que le 4^{ème} élément (à la position 36) diffère entre les deux ARNt (C pour l'ARNt^{Asp} et U pour l'ARNt^{Asn}). Dans les AspRS discriminantes, ce résidu C36 est reconnu par la Lysine 180 présente dans la boucle L1 (Cavarelli et al., 1993). Ici, le manque de discrimination de l'AspRS2 est lié à la fois, à une réduction de la taille d'une boucle dans le module de reconnaissance de l'anticodon, la boucle L1, mais surtout à la mutation de la lysine 180 en proline (Figure 39a). En plus d'exclure la reconnaissance du groupement O2 de C36, cette mutation réduit la flexibilité de la boucle, empêchant toute autre interaction avec C36 (Charron et al., 2003; Feng et al., 2005).

Contrairement à un ARNt correctement aminoacylé, l'Asp-ARNt^{Asn} n'est pas pris en charge directement par le facteur d'élongation EF-Tu mais par une amidotransférase (AdT) qui convertit le groupement carboxylique de la chaîne latérale de l'acide aspartique en fonction amine pour obtenir une Asn (Figure 39b). L'Asn-ARNt^{Asn} ainsi formé est finalement reconnu par EF-Tu et conduit au niveau du ribosome pour participer à la synthèse des protéines.

Cette voie de synthèse n'est pas restreinte au système aspartate/asparagine. Elle est également utilisée par le système glutamate/glutamine et permet la synthèse de glutamine dans les organismes dépourvus de la voie directe de synthèse de celle-ci (Becker et al., 2000; Tumbula et al., 2000). Enfin, la voie d'incorporation de la sélénocystéine dans les protéines débute également par l'amination d'un ARNt hétérologue. Dans ce cas, la SerRS reconnaît l'ARNt sélénocystéine (Sec) et le charge avec une sérine, qui est ensuite

convertie en sélénocystéine par la sélénocystéine synthase. Le Sec-ARNt^{Sec} est alors pris en charge par un facteur d'élongation particulier (SelB) et incorporé en réponse à un codon Stop placé dans un contexte particulier dont le mécanisme a été récemment décrit dans deux revues (Krol, 2002; Cobucci-Ponzano et al., 2005).

Les résultats obtenus précédemment montrent qu'une forte surproduction d'un variant d'AspRS ne reconnaissant plus son ARNm (donc n'initiant plus son autorégulation) est toxique pour la levure. De même, la surproduction d'une GluRS non-discriminante, dans une souche ne possédant pas d'amido-transférase, est également toxique pour la bactérie et conduit à un arrêt de sa croissance (Baick et al., 2004). Sur la base de cette observation, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la toxicité liée à une importante surproduction de l'AspRS de *S.cerevisiae* pourrait également être la conséquence d'une aminoacylation (asparylation) hétérologue. L'AspRS de levure ne possède pas les caractéristiques structurales associées aux AspRS non-discriminantes (petite boucle L1 et mutation Lys180→Pro). Toutefois, elle arbore un motif d'interaction non spécifique avec l'ARN (au niveau de son extension N-terminale) qui augmente considérablement l'affinité de l'enzyme pour les ARNt (Frugier et al., 2000). Les résultats collectés au cours des travaux qui vont être présentés dans l'Article n°3 montrent que la présence de l'extension N-terminale dans l'AspRS de levure la transforme en une AspRS non-discriminante (malgré un domaine de liaison à l'anticodon de type discriminant). Ainsi, *in vitro*, l'AspRS de levure peut, dans certaines conditions expérimentales (concentrations élevées en enzyme et concentrations en Asp comparables aux concentrations déterminées *in vivo*) asparyler efficacement, en plus de son substrat naturel (ARNt^{Asp}), l'ARNt^{Asn} et l'ARNt^{Glu}. Ces deux ARNt hétérologues possèdent 3 des 4 éléments majeurs du jeu d'identité aspartate, c'est-à-dire un résidu guanine à la position discriminatrice (73) et deux nucléotides dans l'anticodon : U35 et G34 pour l'ARNt^{Asn} ou C36 pour l'ARNt^{Glu}.

2. Article n°3 :

La précision de la charge de l'ARNt^{Asp} de levure est menacée par l'extension N-terminale de l'asparyl-ARNt synthétase

Magali Frugier, Michaël Ryckelynck et Richard Giegé

2003

Journal of Biological Chemistry, **278**, 9683-9690

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Yeast tRNA^{Asp} Charging Accuracy Is Threatened by the N-terminal Extension of Aspartyl-tRNA Synthetase

Michaël Ryckelynck, Richard Giegé and Magali Frugier

The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol. 278, N° 11, Pages 9683-9690

Pages 9683-9690 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/M211035200v1>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

3. Discussion

Le travail présenté dans cette partie a permis de mettre en évidence une spécificité relaxée de l'AspRS de levure, en utilisant une stratégie en deux étapes comprenant : (i) la caractérisation de la tolérance de l'AspRS envers des mutations introduites aux positions d'identité aspartate et (ii) la mise en relation de cette prédiction avec une réalité fonctionnelle : la charge incorrecte d'ARNt hétérologues.

Tout d'abord, le suivi de l'aspartylation de différents variants du transcrite de l'ARNt^{Asp} a permis de mettre en évidence une tolérance de l'AspRS vis-à-vis d'une variabilité dans la nature des bases occupant les positions d'identité, un effet considérablement favorisé par la présence de l'extension N-terminale de l'enzyme. Si les différents variants d'ARNt, mutés à la position 73 sont reconnus avec une efficacité comparable par l'enzyme sous sa forme native ou délétée de son extension N-terminale (gain inférieur ou égal à 10), en revanche, la présence du domaine idiosyncrasique rend l'enzyme moins sensible aux mutations dans la boucle anticodon de l'ARNt (avec une différence de plus de 100 fois). Cette différence peut s'expliquer par l'organisation structurale des domaines protéiques impliqués dans la reconnaissance de la branche anticodon. En effet, celle-ci interagit dans une crevasse formée entre le domaine de reconnaissance de l'anticodon et l'extension N-terminale. Dans ce contexte, l'influence négative d'une mutation dans l'anticodon pourrait être compensée par la proximité du motif de liaison non-spécifique à l'ARN (de l'extension N-terminale).

Dans un second temps, l'analyse par oxydation périodique d'un mélange d'ARNt totaux de levure aminoacylé par l'AspRS de *S.cerevisiae* a permis de constater que, lorsqu'elle est présente en excès, l'enzyme aspartyle efficacement l'ARNt^{Asn} et l'ARNt^{Glu}. Ces ARNt possèdent tous deux un G en position 73, un U en position 35 et une seconde base de leur anticodon identique à celle trouvée dans l'ARNt^{Asp}. Ces expériences confirment la capacité de l'AspRS de levure à reconnaître et aminoacyler des ARNt hétérologues de séquence proche (en identité) de celle de son ARNt homologue. Ce phénomène est observé *in vitro* en se plaçant dans des conditions proches de l'état physiologique (concentration en Asp de l'ordre du mM et compétition entre les différents ARNt). Néanmoins d'autres investigations doivent être menées *in vivo* pour pouvoir conclure quant à l'existence de ce phénomène dans une cellule où la concentration de l'AspRS serait augmentée. Il est intéressant de noter qu'un même domaine protéique, l'extension N-terminale, est à la fois la source et la solution d'un problème. D'une part, la

présence de l'extension N-terminale favorise l'infidélité de l'enzyme et, d'autre part, elle est essentielle pour l'interaction de l'AspRS avec son ARNm, ce qui est le point de départ de la régulation transcriptionnelle. Enfin, ces résultats démontrent que, connaissant le mode d'interaction entre un ARN et une protéine, en particulier les bases de la spécificité de cette interaction, il est possible de prédire quel type d'ARN hétérologue peut être efficacement reconnu par la protéine.

IV. Conséquences de l'augmentation de la concentration de l'AspRS *in vivo* : reconnaissance d'ARNt hétérologues et aminoacylations incorrectes

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, j'ai montré qu'une activité d'aspartylation hétérologue catalysée par l'AspRS de levure peut être mise en évidence *in vitro* dans un milieu réactionnel simplifié. Cependant, ces données ne démontrent pas que ce phénomène a effectivement lieu dans la cellule. En effet, bien que les expériences d'oxydation périodique aient été réalisées en présence de l'ensemble des ARNt isoaccepteurs de levure et de l'AspRS, l'absence des 19 autres aaRS contribue certainement à accentuer le phénomène de charge hétérologue observé. Dans la cellule, les aaRS sont toutes compétitrices les unes pour les autres (Sherman et al., 1992), ce qui augmente la spécificité globale des réactions d'aminacylation et réduit la quantité d'ARNt hétérologues libres, disponibles pour une éventuelle aspartylation croisée. Une autre limite à la toxicité de l'aminacylation incorrecte d'un ARNt est sa prise en charge par la machinerie traductionnelle. Si on se base sur les résultats obtenus chez les bactéries, le facteur d'élongation EF-Tu (équivalent à EF-1 α chez les eucaryotes) assurerait un second niveau de sélection en accommodant préférentiellement les ARNt correctement aminoacylés (LaRiviere et al., 2001). Ainsi, chez *T.thermophilus*, l'Asn-ARNt^{Asn} est reconnu efficacement par EF-Tu, alors que l'aminacylation de ce même ARNt^{Asn} par l'AspRS2 (voir section III.1 des Résultats) conduit à un rejet de l'Asp-ARNt^{Asn} produit. En revanche, toujours selon les mêmes prédictions, l'ARNt^{Glu} aspartylé (Asp-ARNt^{Glu}) pourrait être pris en charge efficacement par le facteur d'élongation et donc participer activement à la synthèse protéique. Si tel est le cas, l'incorporation d'acide aspartique au niveau d'un codon Glu serait possible. Malheureusement, à ce jour, les données sur le facteur d'élongation EF-1 α sont restreintes concernant ses exigences pour la reconnaissance d'un ARNt aminoacylé. De plus, certaines études tendent à indiquer qu'EF-1 α ne se comporterait pas forcément comme son homologue procaryote. Par exemple, alors qu'EF-Tu n'interagit pas avec les ARNt non chargés, EF-1 α , lui, reconnaît les ARNt qu'ils soient chargés ou non (Petrushenko et al., 2002). Dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons pas prédire le devenir d'ARNt^{Asn} ou d'ARNt^{Glu} aspartylés dans la levure. On peut tout de même imaginer que le remplacement des résidus Asn ou Glu par un Asp pourrait

conduire la cellule à subir un stress traductionnel qui devrait se répercuter sur le protéome global de la levure (Santos et al., 1999).

Afin de pouvoir conclure de façon non ambiguë sur la réalité biologique de l'aspartylation croisée de l'ARNt^{Asn} et/ou de l'ARNt^{Glu}, nous avons utilisé deux stratégies. La première est basée sur la construction d'un gène rapporteur conférant à la levure une résistance à la généticine. L'enzyme de détoxification choisie (l'aminoglycoside-3'-phosphotransférase II-a) est active à la seule condition que le codon à la position 190 soit décodé par un ARNt porteur d'un acide aspartique. En conséquence, l'activité de cette enzyme ne dépend pas de la nature de l'ARNt porteur de l'acide aspartique. Cette approche permet de tester (i) l'existence d'un (ou plusieurs) ARNt chargé incorrectement par l'AspRS, (ii) sa prise en charge par le facteur d'élongation et (iii) son incorporation dans la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. Dans une seconde stratégie, nous avons suivi le devenir du protéome de la levure lorsque l'AspRS est surproduite. Si nous avons été surpris de n'observer aucune altération de celui-ci dû à un éventuel stress traductionnel, cette approche nous a permis d'observer, dans le détail, les conditions d'accumulation de l'AspRS dans la cellule et d'en tirer de premières conclusions quant à l'existence d'un verrou supplémentaire pour contenir l'aspartylation et assurer la survie de la cellule.

2. Recherche d'une aminoacylation croisée *in vivo*

2.1 Mise au point d'un système rapporteur d'une aspartylation croisée *in vivo*

Pour mettre en évidence une incorporation incorrecte d'un aa en lieu et place d'un autre aa, il est intéressant d'utiliser une stratégie où cette erreur résulte en l'apparition d'une activité enzymatique favorable pour la survie de la cellule et quantifiable. Notre choix s'est porté sur la mise au point d'un système basé sur la résistance des cellules à la présence d'un antibiotique. Cette méthode (en milieu solide) présente de nombreux avantages. Tout d'abord, elle permet de distinguer facilement les révertants (qui apparaissent sous forme de colonies isolées) des levures résistantes à l'antibiotique (qui, elles, forment un tapis). De plus, les résultats sont facilement quantifiables en mesurant et en comparant les diamètres des halos d'inhibition de croissance obtenus.

Parmi les nombreux gènes codant pour des activités de résistance aux antibiotiques, nous avons choisi le gène codant pour l'aminoglycoside-3'-phosphotransférase (Aph-3'IIa). Cette enzyme catalyse la phosphorylation d'une grande variété d'antibiotiques appartenant à la famille des aminoglycosides (et ainsi les inhibe). Certains de ces composés agissent

uniquement sur les bactéries (kanamycine, streptomycine ou paromomycine) (Vicens et Westhof, 2003) alors que d'autres, tels que la généticine, sont actifs à la fois sur les procaryotes et les eucaryotes (bien que nécessitant des concentrations plus élevées chez les eucaryotes) (Chen et Fukuhara, 1988). Comme tous les aminoglycosides, la généticine agit au niveau du ribosome en augmentant la fréquence des erreurs réalisées au cours de la traduction. Nous avons choisi d'utiliser le gène *aph3'-IIa* (appelé par la suite *gen^r*) car l'activité de l'enzyme pour laquelle il code dépend de la présence d'un acide aspartique (en position 190) strictement conservé et essentiel au niveau du site actif de la protéine (Nurizzo et al., 2003). La mutation de ce résidu en Ala inactive complètement l'enzyme et ne permet pas à des bactéries transformées par le gène muté, de se développer sur un milieu contenant de la kanamycine (Hon et al., 1997). De notre côté, nous avons testé l'activité de l'Aph-3'-IIa lorsque l'Asp 190 essentiel est muté en Asn ou en Glu par mutagenèse dirigée. Chez *E.coli*, ces mutations sont suffisantes pour rendre les bactéries sensibles à la kanamycine (50 µg/mL).

Ces différents variants du gène ont également été clonés dans le vecteur de levure pRS425 (vecteur multicopie) sous la dépendance du promoteur GPD (promoteur fort constitutif de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et testés en présence de différentes concentrations de généticine. Des halos d'inhibition de croissance des levures sont observés à partir d'une concentration en généticine de 25 mg/mL, toutefois nous avons choisi de travailler à une concentration plus élevée (100 mg/mL) afin d'augmenter la lisibilité des boîtes. Comme cela avait été observé avec les bactéries, l'introduction du gène *gen^r* sauvage permet la croissance des levures, alors que les mutants (D_A, D_E ou D_N) résultent en une inhibition plus ou moins efficace de leur croissance (Figure 40). Le mutant D_E forme un halo d'inhibition moins net en comparaison des deux autres mutants (D_A et D_N). Ce résultat peut être interprété comme suit : le gène mutant *gen^{r, D-E}* code pour une enzyme toujours fonctionnelle, mais dont l'activité est très réduite en comparaison de l'enzyme sauvage. En conséquence, la détoxification du milieu par cette enzyme mutante est moins efficace, ce qui ralentit considérablement la croissance des levures en présence de fortes concentrations en généticine. Nous disposons à présent d'un système répondant aux critères initialement fixés, c'est à dire une activité enzymatique essentielle (résistance à la généticine) quantifiable (par mesure du halo d'inhibition de la croissance) et où seule l'incorporation d'Asp permet la survie efficace des cellules. Ainsi, la présence d'aminacylation incorrecte, telle que nous l'avons observé *in vitro*, c'est-à-dire

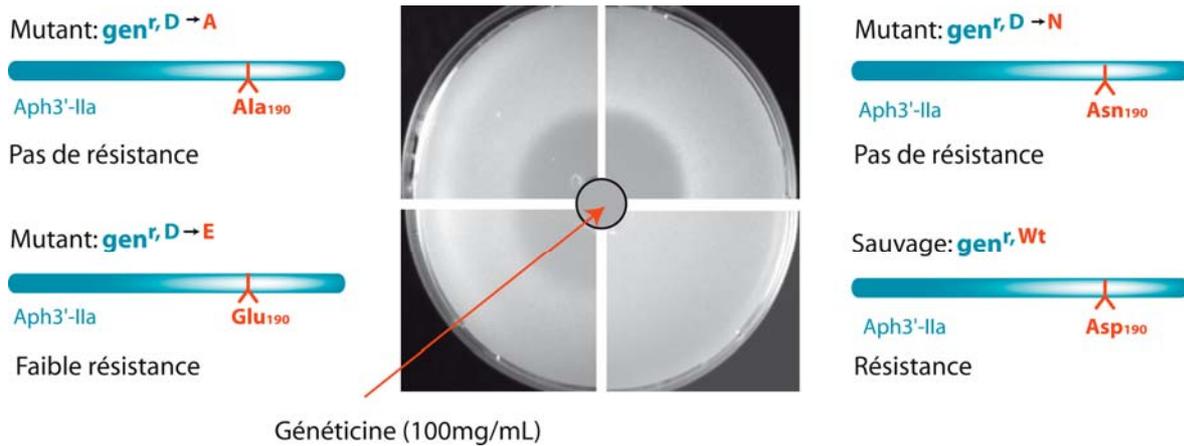


Figure 40 : Principe du test de résistance à la généticine. Les levures testées expriment différents variants de la protéine Aph-3'-IIa, mutés à la position 190 (D_A, D_E et D_N). Le gène *aph-3'-IIa* (*gen'*) a été amplifié à partir du vecteur pCR 2.1 (InVitroGene) et les mutations ont été introduites par mutagenèse dirigée (QuickChange Site Directed Mutagenesis kit, Stratagene). Le gène sauvage et ses versions mutées ont ensuite été sous-clonés dans le vecteur de levure pRS425 (2 μ , [Leu+]), sous le contrôle du promoteur GPD, et transformés dans les levures YBC 603 (*ade2::hisG his3 Δ 200 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 met15 Δ 0 trp1 Δ 63 ura3 Δ 0*) contenant déjà le vecteur pRS416 vide (Cen, [Ura+]). Les cellules transformées (1,2.10⁷) ont été mélangées à 6 mL de milieu YNB supplémenté avec 2% de glucose, 1% d'agarose (à bas point de fusion) et tous les aa et nucléotides sauf la leucine et l'uracile. Cette suspension est étalée sur un milieu de même composition et la solution de généticine (100 mg/mL) est déposée dans le puit central. Les halos d'inhibition, d'une part, reflètent la concentration locale en antibiotique qui diffuse dans la gélose et, d'autre part, caractérisent le niveau de résistance des levures à l'antibiotique. Ils sont obtenus après 24 heures de croissance à 30°C. Chaque quartier de boîte correspond à un mutant de Aph3'-IIa dont la séquence est spécifiée sur le côté.

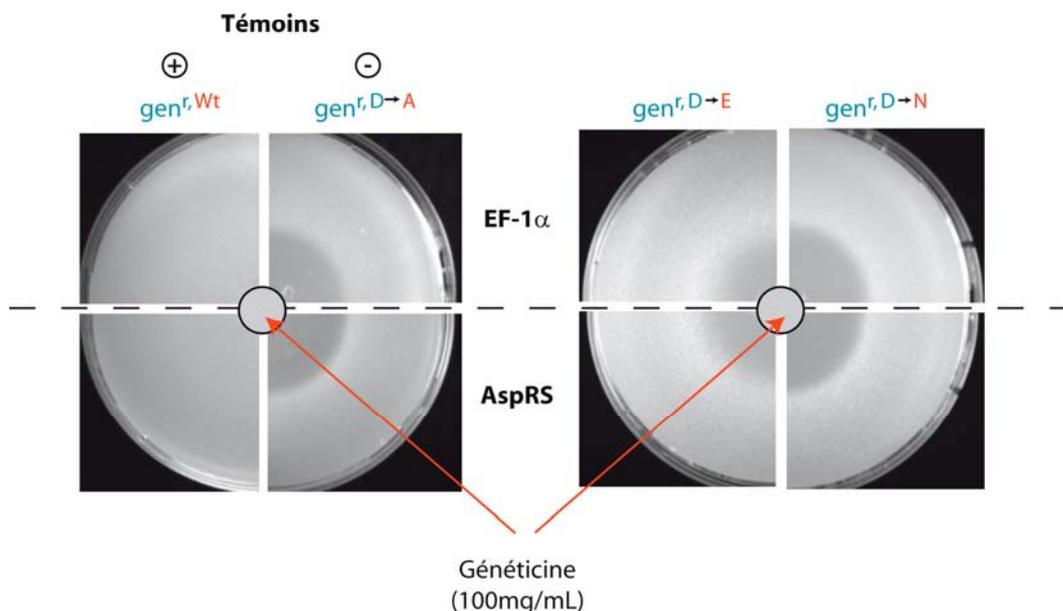


Figure 41 : La surexpression de l'AspRS peut-elle compenser les mutations introduites dans *gen'*? A gauche, les levures contenant $gen^{r,Wt}$ et $gen^{r,D \rightarrow A}$ correspondent aux témoins positif et négatif de croissance, respectivement, co-transformés avec le plasmide de surexpression contrôle (pRS416-TEF-EF-1 α , en haut) ou surexprimant l'AspRS (pRS416-TEF-AspRS, en bas). A droite, sont indiqués les résultats obtenus avec les mutants de *gen'*, conçus pour mettre en évidence une éventuelle aspartylation incorrecte *in vivo* de l'ARNt^{Asn} ($gen^{r,D \rightarrow N}$) et/ou de l'ARNt^{Glu} ($gen^{r,D \rightarrow E}$). Les halos d'inhibitions sont obtenus après 24 heures de croissance à 30°C.

l'aspartylation des ARNt^{Asn} et ARNt^{Glu} devrait conduire à la synthèse d'Aph-3'-IIa active, dans le cas des gènes mutants D_N et D_E.

2.2 Détection d'une aspartylation croisée

In vitro, l'aspartylation hétérologue est observée lorsque l'enzyme est excédentaire par rapport à l'ARNt^{ASP}. L'abolition du système de régulation de l'expression de l'AspRS est donc un pré-requis à l'observation de ce phénomène *in vivo*. Le contrôle de la synthèse de l'enzyme repose sur la reconnaissance de l'ARNm^{AspRS} par l'AspRS, faisant notamment intervenir la région 5' non-traduite du premier et l'extension N-terminale de la protéine. Ainsi, la mutation de l'enzyme au niveau du motif de liaison à l'ARN (de son extension N-terminale) inhibe efficacement la régulation. Toutefois, une forte surproduction (un vecteur multicopie et soit un promoteur fort constitutif, GPD, soit un promoteur fort inductible, Gal 1, promoteur de la β -galactosidase) de ce variant est extrêmement toxique pour la cellule et entraîne un arrêt rapide de la croissance. Pour limiter cet effet néfaste, nous avons placé le gène de l'AspRS ne contenant que la phase codante (sans la région 5' non-traduite) de la protéine sous le contrôle du promoteur du gène du facteur EF-1 α (promoteur constitutif modéré) et introduit l'ensemble dans un vecteur centromérique (faible nombre de copies, pRS416). Ainsi, l'AspRS produite est identique à l'enzyme endogène et elle peut s'accumuler dans la cellule puisque son expression ne peut plus être régulée. De plus, la surexpression de l'AspRS est suffisamment contenue pour éviter un effet toxique dommageable dans la suite de nos expériences.

La mise en évidence de l'existence d'une aspartylation infidèle *in vivo*, basée sur le système rapporteur décrit dans la section précédente, a donc nécessité la co-transformation des levures porteuses des gènes codant pour une Aph-3'-IIa sauvage (gen^r , ^{Wt}) ou mutante (gen^r , ^{D-A}, gen^r , ^{D-N}, gen^r , ^{D-E}) par le plasmide pRS416-TEF-AspRS. Un vecteur vide (pRS416-TEF) ou exprimant le gène du facteur d'élongation EF-1 α (pRS416-TEF-EF1 α) ont été utilisés comme témoins négatifs. La surproduction d'EF-1 α , naturellement abondant dans la levure, n'est en principe pas toxique pour la cellule. De plus, ce contrôle nous permet d'observer un éventuel retard de croissance dû à l'épuisement des levures lorsqu'elles surproduisent une protéine, quelle qu'elle soit.

Après 24 heures de culture, des halos d'inhibition de tailles équivalentes sont observés pour tous les mutants de gen^r , que l'AspRS soit surexprimée ou non (Figure 41), indiquant que, dans ces conditions, l'aspartylation incorrecte des ARNt^{Asn} et ARNt^{Glu} n'est

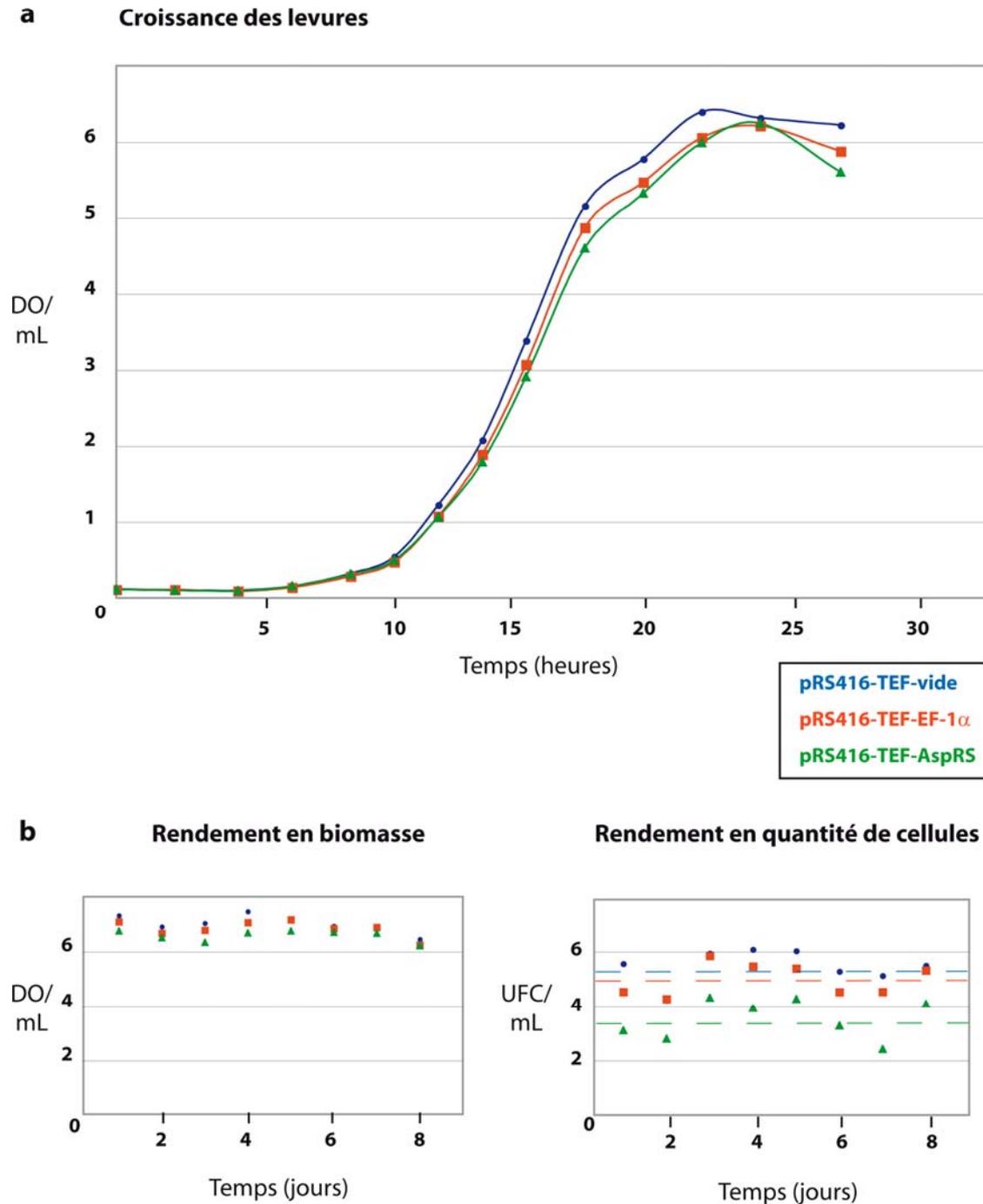


Figure 42 : Courbes de croissance et suivi des cultures sur 8 jours. **(a)** Courbes de croissance des levures ne surproduisant rien ou surproduisant soit EF-1 α , soit l'AspRS. Les protéines (EF-1 α et AspRS) sont exprimées à partir du plasmide pRS416 (Cen, Ura+) sous le contrôle du promoteur TEF. Les levures ont été inoculées à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules transformées/mL dans un milieu liquide YNB supplémenté avec 2% de glucose et tous les aa et nucléotides sauf l'uracile, et ont poussé pendant les temps indiqués à 30°C sous agitation (170 rpm). La concentration cellulaire a été suivie par la mesure de la DO_{580nm} par mL de culture. **(b)** Rendements en biomasse et en quantité de cellules au cours du temps. Par tranches de 24 heures, les cellules en phase stationnaire sont utilisées pour ré-inoculer du milieu frais (voir composition ci-dessus) à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. Toutes les 24 heures, systématiquement, la densité cellulaire de la culture est estimée par mesure de la DO_{580nm} (biomasse) et 200 μ L d'une dilution au 1/50000 sont étalés sur milieu gélosé et incubés 24 heures à 30 °C. Le rendement en quantité de cellules est exprimé en Unités Formant Colonie (UFC) par mL et correspond au nombre de colonies produites par mL de culture.

pas détectable. Ces résultats ne permettent donc pas de conclure quant à l'existence d'une aspartylation infidèle *in vivo*. Néanmoins, l'ensemble des expériences a été poursuivi sur 48 heures. Ceci a permis d'amplifier un phénomène propre à la souche $gen^{r, D-E}$, au cours duquel, un profil de croissance légèrement différent apparaît selon que la protéine surproduite soit l'AspRS ou EF-1 α . En effet, alors que le diamètre du halo reste constant pour les levures, $gen^{r, D-A}$ et $gen^{r, D-R}$, on observe un envahissement progressif du halo par les cellules porteuses du gène mutant $gen^{r, D-E}$. Cependant, cet envahissement est moins rapide lorsque l'AspRS est surproduite. Ce retard de croissance (reproductible) est raisonnablement imputable à la surproduction contrôlée d'AspRS qui pourrait être à l'origine d'un léger stress traductionnel qui, en s'additionnant à l'effet de la mutation introduite dans le gène gen^r , ralentit encore la croissance des cellules. La suite de cette étude a donc consisté à suivre des vitesses de croissance des différents transformants surexprimant ou non l'AspRS.

2.3 Influence de la surproduction de l'AspRS sur la croissance cellulaire

La comparaison des courbes de croissance de cellules transformées soit par un vecteur portant le gène de l'AspRS, soit par des vecteurs témoins (vide ou portant le gène $ef-1\alpha$) n'a pas permis de mettre en évidence un effet toxique dû à l'augmentation de la concentration en AspRS dans la cellule. Ces expériences ont été réalisées avec le promoteur d'expression TEF en raison des problèmes de toxicité causés par l'expression de l'AspRS à partir de promoteurs plus forts (restreignant leur usage à de courtes périodes de temps). Dans les conditions expérimentales utilisées, les différences de vitesse de croissance observées ne sont pas significatives (Figure 42a). Il semble que la surproduction raisonnable d'AspRS n'affecte pas la croissance des levures, ni sur 24 heures (Figure 42a), ni sur des temps prolongés par tranches de 24 heures, et ce jusqu'à 8 jours (Figure 42b). A chaque fois, la culture est diluée 70 fois dans un milieu frais et ré-incubée 24 heures à 30°C. A l'issue de chaque passage, les rendements de ces cultures ont été déterminés en biomasse (exprimée en DO/mL) et en concentration cellulaire (exprimée en Unité Formant Colonie/mL) (Figure 42b). Les rendements en biomasse sont constants (durant les 8 jours) et équivalents pour les 3 souches (vide, EF-1 α et AspRS). De son côté, le rendement cellulaire fluctue beaucoup plus d'un jour à l'autre. Cependant, l'écart entre les rendements en cellules des différentes souches reste constant. Les valeurs des levures contrôles (transformées par un vecteur vide ou par un vecteur portant le gène $ef-1\alpha$) sont identiques,

alors que le rendement en cellules est systématiquement 1,5 fois plus faible pour les levures surproduisant l'AspRS. L'explication la plus probable à cette différence d'UFC/mL (la biomasse restant constante) serait que les cellules surproduisant l'AspRS atteignent une taille supérieure (1,5 fois plus grosse) à celle des cellules témoins. Une étude par microscopie optique menée en parallèle nous a indiqué que la population de levures surproduisant l'AspRS semble effectivement enrichie en cellules de grande taille (comparées aux témoins).

En conclusion, ces travaux ont révélé que les cellules surproduisant l'AspRS à une concentration raisonnable (excès de 3 à 5 fois) ne semblent pas être affectées significativement dans leur vitesse de croissance, mais en revanche sont caractérisées par l'augmentation de leur volume. Il est intéressant de constater que les effets observés sont relativement faibles en comparaison de ce que l'on pourrait attendre de la surproduction, même modérée, d'une enzyme toxique pour la cellule. La limitation de ces effets pourrait être expliquée par l'existence d'un « second niveau de régulation » du système aspartate.

3. Second niveau de régulation possible de l'expression de l'AspRS

Une répression double ciblant deux étapes différentes de l'expression d'un même gène permet une extinction rapide et efficace de celui-ci. Selon le cas, les deux régulations peuvent être dirigées contre la même molécule (en général l'ARNm) ou deux molécules différentes (l'ARNm et la protéine). Le premier cas est parfaitement illustré par la régulation de la protéine L30 de *S.cerevisiae* (Li et al., 1996), dont l'expression est inhibée, d'une part par une séquestration nucléaire de l'ARNm sous forme non épissée et, d'autre part, par l'inhibition de sa traduction. Les eucaryotes utilisent largement la seconde stratégie qui, elle, cible à la fois l'ARNm et la protéine codée et qui est utilisée, par exemple, dans la régulation de l'expression de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (c-fos) (Bhattacharya et al., 1999; Acquaviva et al., 2001). Dans ce cas, l'extinction du gène se fait, tout d'abord, au niveau de la stabilité de l'ARNm par l'intermédiaire des séquences riches en A et en U (décrites dans l'Introduction). Dans un second temps, la protéine synthétisée est la cible d'une régulation qui, suite à une modification post-traductionnelle (phosphorylation, ubiquitinylation), est inactivée et rapidement dégradée.

Je rappellerai ici, que les levures utilisées dans nos expériences sont transformées par une forme incomplète du gène de l'AspRS, synthétisant un ARNm^{AspRS} dépourvu de sa

région 5' non-traduite. Elles ne sont donc plus compétentes pour l'autorégulation de l'expression de l'AspRS par le mécanisme décrit dans l'Article n°1. Ces constructions sont alors utiles pour mettre en évidence d'éventuels effets de l'augmentation de la concentration en AspRS, soit sur le protéome entier, soit sur l'AspRS elle-même. Il faut noter que, contrairement à l'étude de l'autorégulation de l'expression de l'AspRS où les expériences étaient faites au cours de la phase exponentielle de croissance, ici les expressions ont été étudiées en phase stationnaire après 24 heures de culture (Figure 42a).

3.1 Profil d'accumulation de l'AspRS au cours du temps

Au cours des expériences de culture de levures prolongées sur 8 jours, la vérification systématique de la surproduction de l'AspRS par Western-blot nous a permis de mettre en évidence l'apparition progressive d'une nouvelle population d'AspRS (Figure 43). La culture initiale (inoculum) présente déjà un profil différent de ceux observés jusque là en phase exponentielle de croissance. En effet, comme attendu l'AspRS est surproduite (au total, 2 à 5 fois) en comparaison d'une souche témoin (EF-1 α) mais seule une portion de cette AspRS présente une taille identique à l'AspRS endogène. Le reste de la protéine migre plus lentement (100 à 200 kDa). Ce phénomène est observable tout au long de

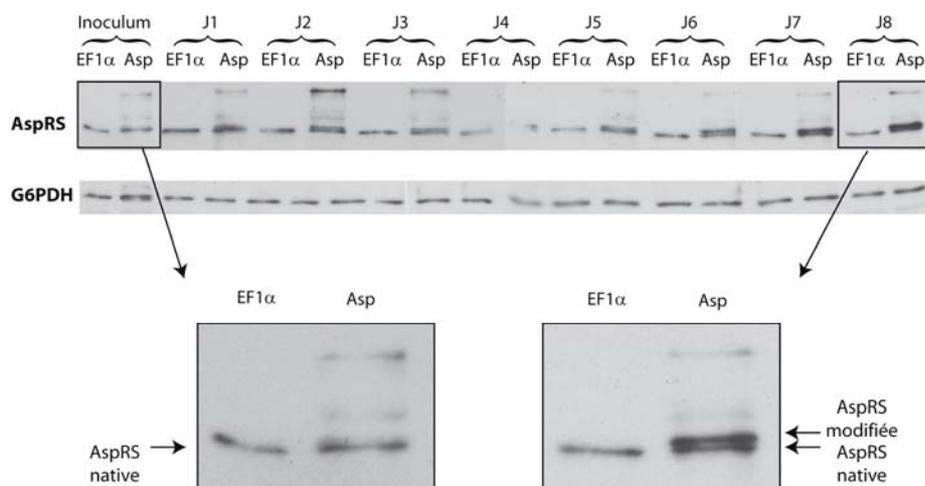


Figure 43 : Taux de surexpression et qualité de l'AspRS au court du temps. Les souches surproduisant EF-1 α (contrôle) ou l'AspRS ont été quotidiennement testées pour déterminer leur contenu en AspRS par Western-blots (réalisés sur des extraits totaux de levures). Les cellules ont été quantifiées, centrifugées, lavées, et lysées dans le tampon de dépôt (en présence de SDS et de DTT, à 85°C pendant 5 minutes). Des quantités équivalentes d'extraits bruts (0,01 DO) ont été séparées sur un SDS gel 10% polyacrylamide, transférées sur une membrane Immobilon-P (Millipore) et détectées avec l'anticorps anti-AspRS (1/20000) ou anti-G6PDH (1/5000, Sigma). L'utilisation d'anticorps anti-Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) a servi de contrôle interne.

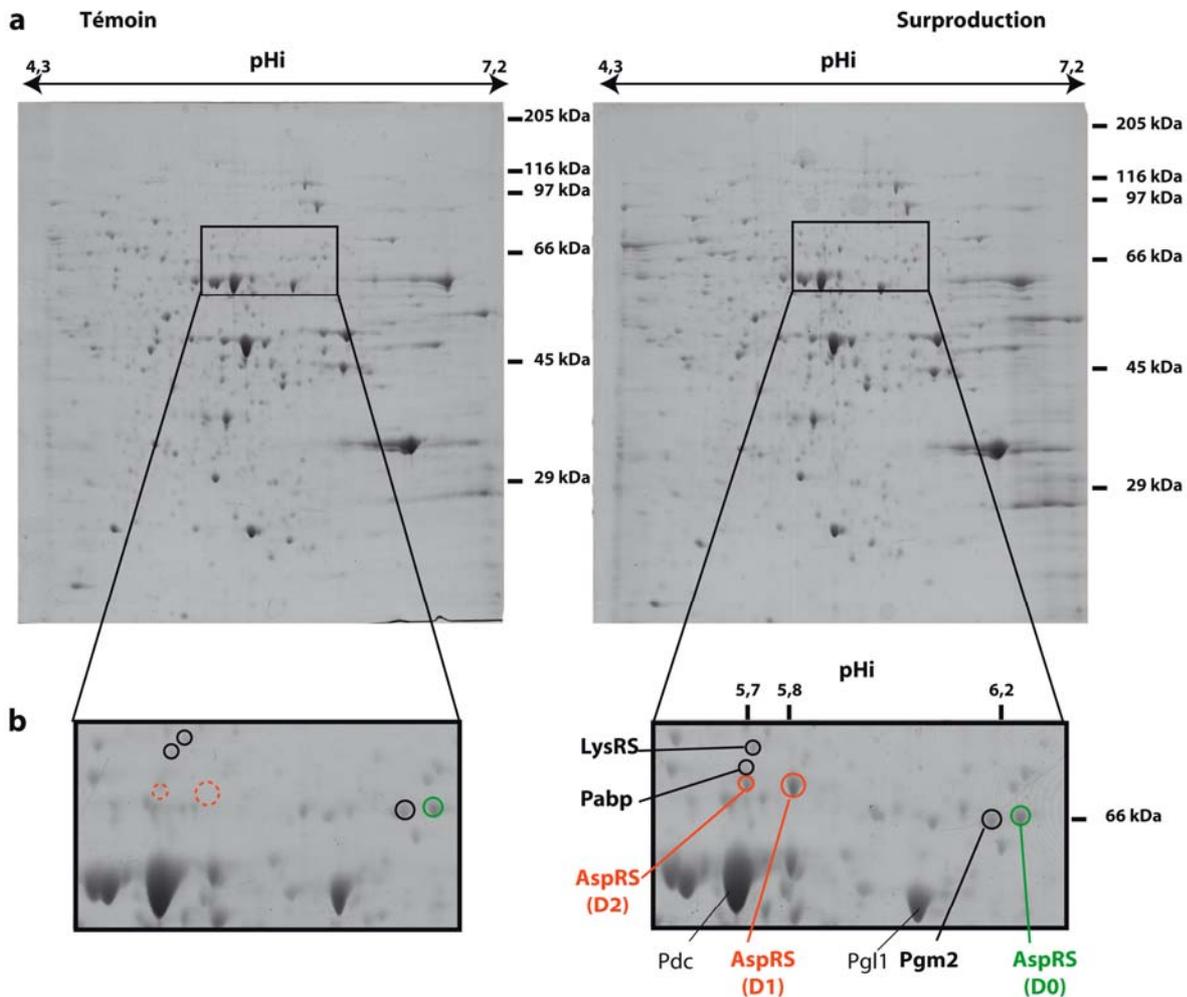


Figure 44 : Protéomique comparative. (a) Deux gels bidimensionnels obtenus à partir de levures témoins (à gauche) ou surproduisant l'AspRS (à droite) sont comparés. Cette technique permet de séparer l'ensemble des protéines de levure (300 μ g de protéines totales) selon leur pHi (isoélectrofocalisation pH 5 à 8, horizontalement) et selon leur taille (sur gel polyacrylamide-SDS 10%, verticalement). (b) Agrandissement de la région présentant des variations significatives entre les deux gels. L'AspRS endogène (D0) est indiquée en vert et les formes modifiées (D1 et D2) en rouge. Certaines protéines invariantes (LysRS, Pabp et Pgm2) ont été assignées par spectrométrie de masse et sont indiquées en gras, alors que Pdc et Pgl1 ont été identifiées directement par comparaison avec un protéome de référence. Leur identification a permis de corriger la gamme de pH (par rapport à leur pHi théorique). Les poids moléculaires ont été déterminés par co-migration d'un marqueur de poids moléculaire.

l'expérience, et peut correspondre à la formation d'agrégats covalents dans la cellule. De plus, dès le premier passage (à J1) et au cours du temps, une seconde bande apparaît, puis son intensité devient comparable (à J3), voir supérieure (à J8) à celle de l'AspRS endogène. Considérant que l'anticorps anti-AspRS est très spécifique, la seconde population de protéines pourrait correspondre à une AspRS modifiée post-traductionnellement.

3.2 Analyse comparative du contenu protéique des levures

La détection d'une modification post-traductionnelle sur l'AspRS nous a conduit à analyser les différentes populations d'AspRS par électrophorèse bidimensionnelle. Notre choix s'est porté sur la protéomique comparative qui permet (i) d'isoler chaque population d'AspRS et (ii) d'étudier l'impact de la surproduction de l'enzyme sur l'ensemble des protéines exprimées dans la levure (protéome).

Les protéines totales ont été extraites de levures surproduisant l'AspRS (ou de levures contrôles) comme décrit par Boucherie et collaborateurs (Boucherie et al., 1995) et séparées dans un premier temps par isoélectrofocalisation (IEF) (de pH 4 à 7, ou de pH 5 à 8, Bio-RAD). Dans un second temps, les protéines pré-isolées ont été séparées par une électrophorèse classique sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Pour une raison encore indéterminée (peut être la qualité des strips ou la composition du tampon de lyse, voir matériel et méthodes), la valeur des pHi apparents que nous obtenons pour les différents spots identifiés diffère systématiquement de 0,5 à 1 unité par rapport aux pHi théoriques de ces protéines ou aux pHi apparents déterminés par Boucherie et collaborateur (protéome de référence et valeurs disponibles sur <http://www.ibgc.u-bordeaux2.fr/YPM/>). Cependant, la position relative de chaque spot est correcte, donc nous avons poursuivi l'analyse en corrigeant la valeur de notre gamme de pH (par rapport aux pHi de quelques protéines connues et localisées sur les gels, LysRS, Pabp et Pgm2, identifiées par spectrométrie de masse et Pdc et Pgl1, identifiées directement sur le protéome de référence).

Une analyse comparative menée sur 3 couples de gels pRS416-TEF-AspRS/pRS416-TEF-vide (avec en moyenne 445 spots par gel) n'a révélé aucune altération ou modification significative du protéome global des levures due à la surproduction de l'AspRS (Figure 44a). La seule variation reproductible constatée est

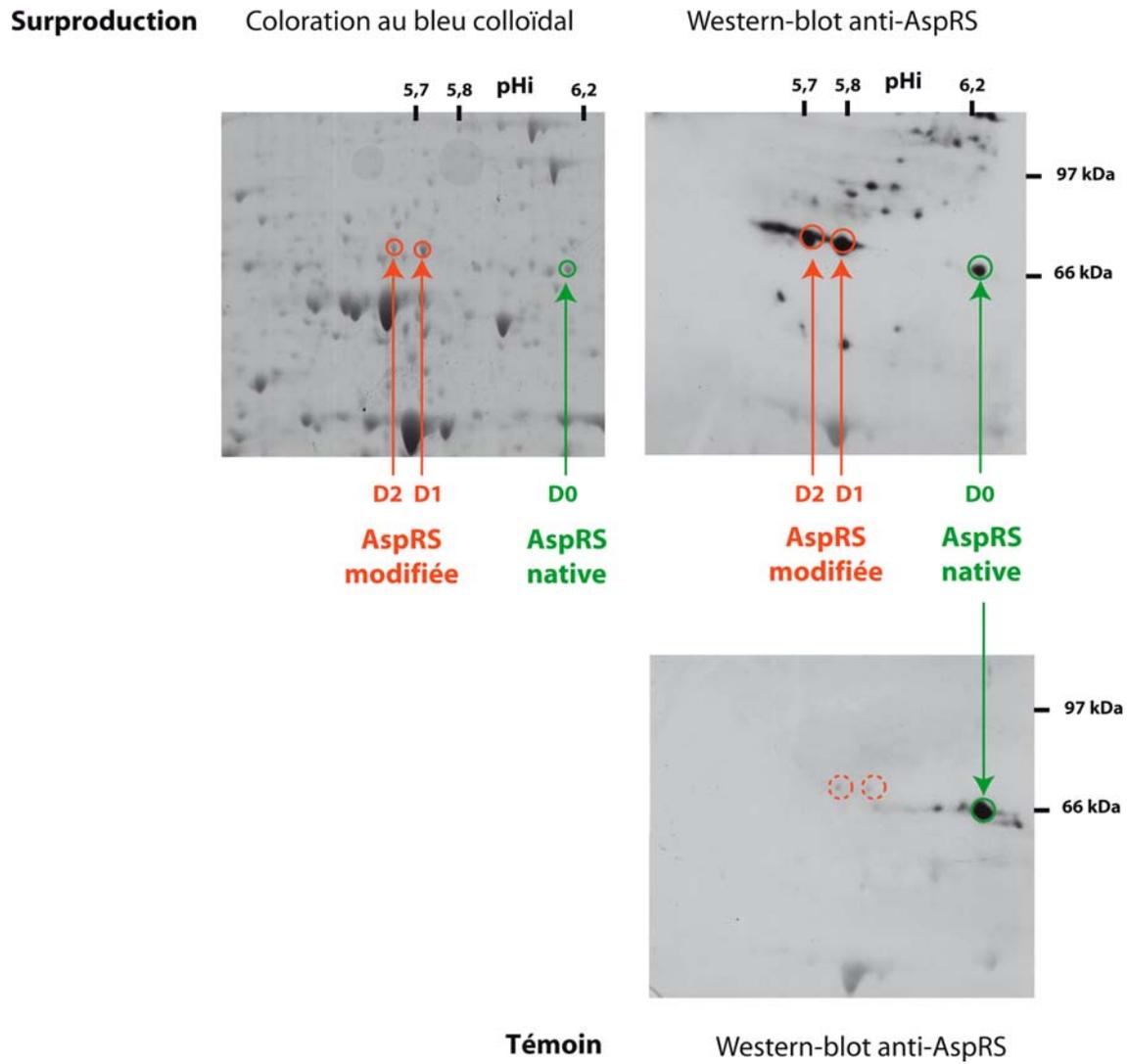


Figure 45 : Mise en évidence des différentes formes de l'AspRS sur gels bidimensionnels. En haut, à gauche, détail de la zone du gel bidimensionnel, coloré au bleu colloïdal, contenant les 3 formes d'AspRS. A droite, détection des différentes formes d'AspRS par Western-blot réalisés après séparation des extraits protéiques sur gels bidimensionnels (15 µg de protéines totales) réalisés soit à partir d'une souche surproduisant l'AspRS (en haut), soit à partir d'une souche témoin (en bas). L'AspRS endogène (D0) est indiquée en vert et les formes modifiées (D1 et D2) en rouge.

l'apparition de deux spots, D1 et D2, d'environ 70 kDa sur les gels « AspRS » et absents des gels Témoins (Figure 44b).

3.3 Caractérisation de la modification post-traductionnelle de l'AspRS

L'analyse par Western-blot d'un couple de gels (témoin/AspRS) correspondant à des levures ayant poussées pendant 7 jours (J7) a permis de localiser l'AspRS endogène, D0, et d'identifier les spots D1 et D2 comme étant des formes modifiées de celle-ci (Figure 45). Une caractérisation de ces spots (D0, D1 et D2) par spectrométrie de masse a permis d'en confirmer l'identité. Les Western-blots n'ont pas été faits dans des conditions quantitatives et la présence des formes modifiées d'AspRS s'accompagne de nombreux signaux détectés par l'anticorps anti-AspRS correspondant aux complexes de hauts poids moléculaires. Comme cela était le cas pour les premiers Westerns (Figure 43), ces signaux pourraient correspondre à des agrégats d'AspRS invisibles sur les gels colorés, donc en petite quantité par rapport à D0, D1 et D2.

La mobilité électrophorétique des formes modifiées de l'AspRS (D1 et D2) nous fournit de précieux renseignements quant à la nature de la (ou des) modification. Dans un premier temps, le faible retard de migration de D1 et D2 en comparaison de D0 (environ 1 kDa) nous indique que la/les modification(s) sont de petite taille. D'autre part, le sens de déplacement des formes modifiées vers des pH plus acides est révélateur, soit d'une modification chargée négativement, soit d'une modification neutralisant des charges positives de la protéine. Enfin, l'important saut de pHi observé (0,5 unité), ainsi que l'existence de deux AspRS modifiées (D1 et D2), laisse à penser que nous sommes en présence de deux intermédiaires et que la protéine subit vraisemblablement plusieurs modifications successives.

Identification du site de modification. L'extension N-terminale de l'AspRS, en particulier son motif de liaison à l'ARN (LSKKALKKLQK), pourrait être la cible de ces modifications dans la mesure où ce domaine présente de nombreuses charges positives qui se succèdent, exposées au solvant et donc facilement accessibles. De façon intéressante, en spectrométrie de masse, alors qu'il est possible de recouvrir la quasi-totalité de la séquence de l'AspRS (en utilisant trois protéases : trypsine, chymotrypsine ou AspN), nous n'avons jamais pu observer le fragment portant ce motif de liaison à l'ARN avec les formes modifiées de l'AspRS (D1 et D2). En revanche, ce fragment est visible, bien que

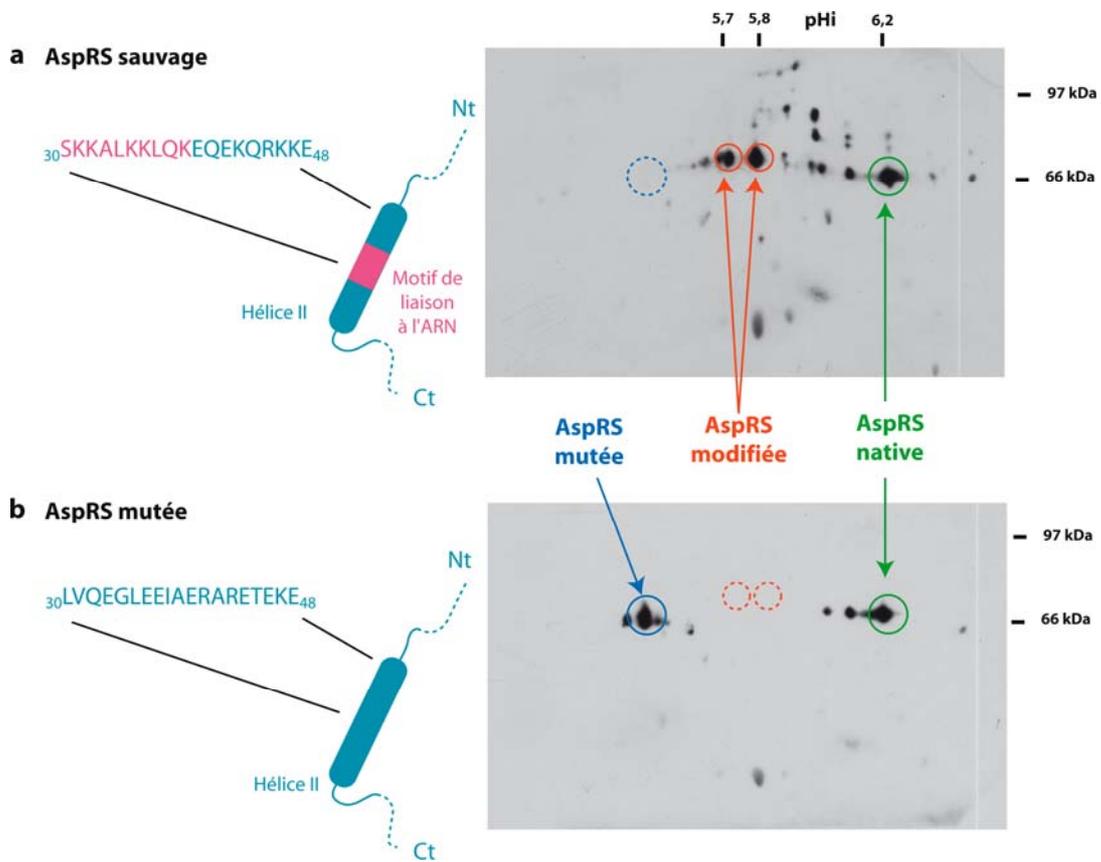


Figure 46 : Profils de surexpression des AspRS sauvage ou mutée. Détection par Western-blot des différentes formes d'AspRS présentes dans une levure surproduisant (a) une AspRS sauvage ou (b) une AspRS mutée dans son motif de liaison à l'ARN. Les AspRS sauvages native et modifiées, sont montrées en vert et rouge, respectivement alors que la forme mutée de l'enzyme est indiquée en bleu. Les séquences des résidus 30 à 48 de chaque protéine (sauvage et mutée) sont également indiquées.

faiblement isolé du bruit de fond, avec la forme native de l'enzyme (D0). Ceci suggère que la modification pourrait se situer, au moins en partie sur ce motif, le rendant non-assignable sur le spectre de masse (altération de la masse du fragment).

Afin de tester plus directement l'implication du motif de liaison à l'ARN comme étant le site de modification de la protéine, nous avons transformé des levures par un plasmide qui surexprime un variant de l'AspRS dont le motif de liaison à l'ARN est non-fonctionnel (Figure 46 et décrit dans l'Article n°1). La comparaison par Western-blot de la localisation de l'AspRS mutée par rapport à l'AspRS sauvage sur gel bidimensionnel (à J4) confirme d'une part l'implication des nombreuses lysines du motif de liaison à l'ARN dans le pHi basique de l'AspRS native et d'autre part, le rôle de l'extrémité N-terminale dans la modification de l'AspRS. Alors que la surproduction de la forme sauvage entraîne l'apparition des formes d'AspRS modifiées dont les migrations sont caractéristiques sur gel bidimensionnel (spots D1 et D2, les formes intermédiaires et les agrégats de hauts poids moléculaires) (Figure 46a), il n'en est rien pour la surexpression de l'AspRS mutante où ne sont détectés que deux spots majeurs : l'AspRS endogène (D0) et l'AspRS mutée (Figure 46b). Comme attendu, la forme mutée présente une taille apparente identique à l'AspRS endogène mais est caractérisée par un pHi inférieur de près de 0,7 unité en raison non seulement de la perte de 5 aa basiques, mais également du gain de 4 aa acides dans son extension N-terminale par rapport à l'AspRS sauvage. La surexpression de la forme mutée de l'AspRS ne s'accompagne donc pas de spots supplémentaires, indiquant que le site de modification de l'AspRS a disparu. En conclusion, cette expérience a révélé que les modifications post-traductionnelles observées sur l'AspRS sont certainement localisées au niveau de son extension N-terminale et qu'elles neutralisent les nombreuses lysines du motif de liaison à l'ARN.

Identification de la modification. Le glucose et l'acide aspartique sont connus pour s'associer covalamment à l'AspRS *in vitro* (Colas et Boulanger, 1983; Kern et al., 1985). De plus, ces molécules possèdent toutes deux les propriétés requises (petite taille et s'associent à la molécule au niveau de charges positives) pour être des candidats modifiant l'AspRS.

Il y a quelques années, un attachement covalent de glucose à l'AspRS a été mis en évidence sur une AspRS purifiée à partir de levure (Colas et Boulanger, 1983). En général, ce type de glycosylation se produit au niveau de fonctions amines libres de la molécule, telles que des lysines. Afin de vérifier cette première hypothèse, l'ensemble des

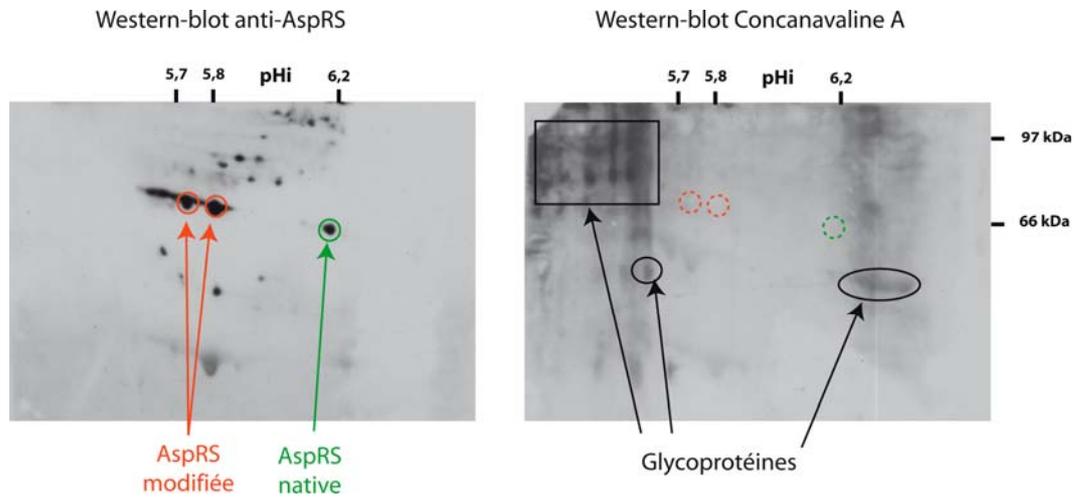


Figure 47 : Détection des glycoprotéines dans une levure surexprimant l'AspRS. A gauche, Western-blot révélant l'emplacement des différentes formes d'AspRS, native (vert) ou modifiées (rouge). A droite, Western-blot indiquant l'emplacement des glycoprotéines (entourées en noir) localisées à l'aide d'un conjugué concanavaleine A-peroxidase. 150 μ g de protéines totales de levures ont été déposés par gel bidimensionnel.

glycoprotéines ont été localisées sur gels bidimensionnels par Western-blot en utilisant un conjugué concanavoline A-peroxidase. Cette lectine permet de mettre en évidence la présence de glucose ou de mannose en surface des protéines. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence plusieurs protéines glycosylées dans la levure, mais aucun signal n'apparaît au niveau des coordonnées des AspRS D0, D1 ou D2 (Figure 47). Le retard de migration des spots D1 et D2 étant conservé, il semble peut probable que la modification ait été perdue au cours des séparations électrophorétiques. Une explication plus plausible serait que la glycation de l'AspRS n'existe pas *in vivo* et que sa caractérisation *in vitro* résulte d'un artefact de purification. En effet, cette dernière ayant été réalisée sur des supports chromatographiques à base de cellulose, il se pourrait qu'une dégradation de la matrice ait libéré du glucose, conduisant à la glycation artificielle de la protéine (communication personnelle du Dr. B. Lorber).

L'éventuelle addition de résidus aspartate sur l'AspRS serait liée à la propriété d'auto-aspartylation de la synthétase (Kern et al., 1985). En 1985, Kern et collaborateurs ont fait un travail très complet, *in vitro*, où ils ont montré qu'en présence d'acide aspartique, d'ATP et de $MgCl_2$, l'AspRS catalyse la formation d'un aspartyl-adénylate très labile et réactif. En l'absence d'ARNt, l'aspartyl-adénylate est capable de réagir avec différents accepteurs nucléophiles présents dans le milieu réactionnel. En effet, l'acide aspartique activé peut être transféré sur du Tris, sur des aa libres, sur des protéines telles que la BSA (Bovin Serum Albumin) ou encore sur l'AspRS elle-même. 2 à 8 résidus aspartate peuvent être détectés par dimère d'AspRS en présence de pyrophosphatase « inorganique » et dans du tampon HEPES (ou MES).

Les caractéristiques structurales et cinétiques de l'AspRS aspartylée ont été étudiées et comparées à celles de l'enzyme native. Ainsi, les auteurs ont montré que, le poids moléculaire apparent des sous-unités de l'AspRS aspartylée augmente légèrement et que le pHi de la protéine est déplacé vers des valeurs plus acides (exactement comme nous l'observons pour les modifications détectées *in vivo*). Ainsi, de fortes similarités existent entre les comportements électrophorétiques d'une AspRS auto-aspartylée *in vitro* et d'une AspRS surproduite *in vivo*. D'autre part, une étude cinétique poussée montre que le taux maximal de charge de l'ARNt^{ASP} et la réaction d'échange ATP-PPi (représentative de l'étape d'activation) catalysées par l'AspRS ne sont pas significativement affectés par l'auto-aspartylation et que celle-ci affecte uniquement l'affinité de l'AspRS pour son ARNt^{ASP} (Kern et al., 1985). Une étude ultérieure a montré que les résidus aspartates ajoutés post-traductionnellement, *in vitro*, étaient détectables, entre autres, au niveau de

certaines lysines présentes dans l'extension N-terminale de l'enzyme (Mejdoub et al., 1987). Cependant, bien que ces résultats nous encouragent à poursuivre l'hypothèse d'une auto-aspartylation *in vivo*, nous serons amenés à reproduire une partie de cette étude. D'une part, les temps d'incubation utilisés au cours de ces expériences *in vitro* (24 heures à 30°C) ne reflètent pas ce que l'on attend d'une régulation post-traductionnelle efficace. D'autre part, les conditions dans lesquelles ont été faites les expériences *in vitro*, en particulier l'homogénéité de l'AspRS testée, doivent être améliorées. L'AspRS, utilisée dans ces expériences, a été purifiée directement de la levure. Or, nous savons qu'au cours de ces étapes de purification, l'extension N-terminale est partiellement hydrolysée et conduit à la purification de lots d'AspRS dépourvues, dans le meilleur des cas, des 13 à 32 aa directement à proximité du site de liaison à l'ARN (résidus 29 à 39) (Lorber et al., 1988). Par exemple, cette hétérogénéité empêche la cristallisation de l'AspRS seule (Lorber et al., 1987).

Dans notre cas, si notre hypothèse est juste, l'intégrité de l'extension N-terminale est essentielle pour observer la capacité d'auto-aspartylation de l'AspRS *in vivo* en réponse à une accumulation de l'enzyme dans la cellule. Ces modifications pourraient neutraliser les lysines du motif de liaison à l'ARN et ainsi réduire la capacité de l'AspRS à interagir avec des ARNt hétérologues (voir Article n°3). Les observations de nos collègues, que je viens de résumer, vont également dans ce sens, en montrant *in vitro* que l'auto-aspartylation de l'enzyme ne modifie que le K_M de l'ARNt (réduit d'un facteur 10 à 80, selon les conditions expérimentales utilisées). Toutefois, par manque de temps, nous n'avons pas pu mener plus en avant les expériences nécessaires pour compléter cette étude et confirmer ou infirmer définitivement cette hypothèse séduisante.

4. Discussion

L'ensemble du travail de caractérisation structurale et fonctionnelle de l'enzyme que nous avons réalisé *in vivo* et *in vitro* nous permet d'observer plusieurs phénomènes. Les résultats obtenus *in vitro* suggèrent que l'AspRS de levure catalyse efficacement l'aspartylation d'ARNt hétérologues (majoritairement ARNt^{Glu} et ARNt^{Asn}) lorsqu'elle est présente en grande quantité. Cette propriété de l'enzyme est principalement associée à la présence d'un motif de liaison non-spécifique à l'ARN localisé dans l'extension N-terminale de la protéine. Toutefois, nos tentatives pour démontrer l'existence de cette charge croisée *in vivo* se sont révélées infructueuses. La surproduction ménagée de

l'AspRS a pour unique phénotype une augmentation du volume moyen des cellules que nous sommes, pour l'instant, incapable d'expliquer. Nous attribuons l'absence de résultat à l'existence d'un second niveau de verrouillage de l'aspartylation dans la levure. L'AspRS, lorsqu'elle s'accumule dans le cytoplasme, a deux alternatives complémentaires pour réduire à tout prix le risque d'aspartylation incorrecte qu'elle pourrait provoquer. La première possibilité consiste pour une partie de l'enzyme à retourner dans le noyau où l'arrêt de la synthèse de l'ARNm^{AspRS} peut alors avoir lieu. Pour le reste de la synthétase, l'auto-aspartylation serait un moyen rapide et efficace de neutraliser les fonctions de liaison à l'ARN de son extension N-terminale et de réduire considérablement l'affinité de la synthétase pour l'ensemble des ARNt dans le cytoplasme. De façon intéressante, l'auto-aspartylation de l'enzyme ne se manifeste qu'en absence de l'ARNt^{Asp} (Kern et al., 1985) ce qui est compatible avec le système de régulation nucléaire répondant à un excès d'AspRS par rapport à l'ARNt^{Asp} disponible dans la cellule à un moment donné.

Bien que ce mécanisme ne soit pas encore validé et reste hypothétique, son existence soulèverait un grand nombre de questions, notamment en ce qui concerne le mécanisme de reconnaissance de la région à modifier. L'apparition de spots bien isolés suggère que la modification ne se fait pas au hasard mais sur une région bien définie et dans des proportions maîtrisées. Etant donné la flexibilité de l'extension lorsque l'enzyme n'est pas complexée à l'ARNt (Agou et al., 1995), on peut anticiper que l'aspartyl-adénylate formé par le site actif d'un monomère peut modifier sans difficulté soit sa propre extension N-terminale, soit celle de l'autre monomère. On peut également se demander si la modification du motif de liaison à l'ARN de l'AspRS permet encore à celle-ci de se lier efficacement à son ARNm lors de la régulation de l'expression.

Enfin, des phénomènes d'auto-aminoacylation ont également été caractérisés *in vitro* pour la PheRS et la TyrRS de levure. Dans le premier cas, l'activation incorrecte de la tyrosine par la PheRS produit un tyrosyl-adénylate extrêmement réactif dont la libération dans le milieu aboutit à la tyrosylation de l'enzyme (Kern et al., 1985). Le second exemple est différent puisque l'auto-tyrosylation de la TyrRS serait induite lors de la réaction de tyrosylation du pseudo-ARNt du VMJN (Barends et al., 2004). Cependant, aucune expérience *in vivo* n'a permis de confirmer l'existence de ces réactions dans la cellule, et aucune fonction n'y a été associée.

Les travaux entrepris au cours de cette thèse ont permis d'identifier de nouvelles fonctions non-canoniques de l'AspRS de *S.cerevisiae* s'exprimant lorsque la concentration en enzyme est excédentaire par rapport à celle de l'ARNt homologue. Ce type de situation est néfaste pour la cellule non seulement sur un plan économique, mais aussi et surtout sur un plan fonctionnel. En effet, la spécificité des systèmes biologiques repose sur l'interaction préférentielle (dont l'affinité définit la force) entre au moins deux molécules présentes parmi une grande variété d'autres molécules. Ainsi, dans la cellule, l'AspRS reconnaît et aspartyle préférentiellement l'ARNt^{Asp}. Cependant, l'augmentation de la concentration cellulaire en enzyme peut surmonter les barrières cinétiques liées à l'affinité et conduire à des interactions non-spécifiques. Dans le cas de l'AspRS, la levure *S.cerevisiae* a développé au moins deux systèmes de régulations dont les conséquences sont complémentaires (résumés dans la Figure 48) permettant, soit d'arrêter la production d'enzyme (régulation transcriptionnelle), soit de la neutraliser (régulation post-traductionnelle).

Les résultats présentés dans l'Article n°1 suggèrent que lorsque l'AspRS est surproduite, elle se relocalise dans le noyau où elle déclenche un mécanisme de régulation au niveau transcriptionnel, nécessitant l'interaction spécifique entre l'enzyme et son propre ARNm. Nous pensons que la répression de la transcription du gène de l'AspRS est maintenue jusqu'à ce que la concentration nucléaire en ARNt^{Asp} non aminocylé soit suffisante pour dissocier le complexe formé entre l'AspRS et l'ARNm. Cet ARNt^{Asp} peut avoir deux origines : (i) il peut être directement issu d'une production (transcription et maturation) d'ARNt *de novo* (néo-synthèse) ou (ii) être importé directement du cytoplasme. Dans ce dernier cas, l'enzyme pourrait mesurer le rapport ARNt chargé/ARNt non chargé et ainsi ajuster sa propre production aux besoins de la cellule. Bien que les principales étapes de cette régulation aient été déterminées au cours de cette étude, certains points restent à être étudiés plus précisément.

1. Interaction entre l'AspRS et l'ARNm^{AspRS} et mécanisme de régulation transcriptionnelle

L'interaction entre l'AspRS et la région opératrice de son ARNm est l'étape initiale et essentielle de la régulation. Les acteurs principaux de cette reconnaissance sont, d'une part, l'extension N-terminale de l'AspRS et, d'autre part, la région opératrice de l'ARNm^{AspRS}. La cartographie en solution de cette région de l'ARNm a permis de proposer

un modèle de repliement tridimensionnel où deux domaines structurellement indépendants sont reconnus par les deux monomères de l'enzyme (Article n°2). Le domaine I se replie en pseudo-nœud et expose une boucle pseudo-anticodon pouvant, d'une part, se structurer de façon identique à la boucle anticodon de l'ARNt et, d'autre part, présentant aux positions équivalentes un triplet de nucléotides (G3, U4, C5) identique à l'anticodon aspartate. Bien que le modèle d'interaction suggère que les deux boucles, anticodon de l'ARNt^{Asp} et pseudo-anticodon de l'ARNm^{AspRS}, soient reconnues de façon identique par le module « OB-fold » de l'AspRS, un certain nombre d'observations laisse supposer que la reconnaissance des deux ARN diffère légèrement : (i) l'extension, qui est accessoire pour l'aminacylation homologue, est cruciale pour la régulation et (ii) la boucle anticodon, qui est d'une importance majeure pour l'interaction entre l'ARNt et l'AspRS, devient accessoire pour la reconnaissance de l'ARNm.

Or, cette reconnaissance implique également un motif hélicoïdal de 4 paires de bases, dans l'ARNm, qui est conservé dans toutes les levures proches de *S.cerevisiae* (*stricto sensu*) et qui est présenté à chaque monomère d'AspRS dans un contexte structural différent (le pseudo-nœud du domaine I et une hélice dans le domaine II). La richesse en paires de bases non-canoniques G•U de ce motif hélicoïdal, pourrait constituer un signal reconnu par l'enzyme. En effet, les paires de bases G•U n'étant pas isostériques des appariements canoniques A-U et G-C (Leontis 2002), elles introduisent des irrégularités dans les hélices. De façon intéressante, dans le complexe, ce motif riche en G•U est localisé au voisinage immédiat du motif de liaison à l'ARN de l'extension N-terminale. Cependant, les données dont nous disposons ne nous permettent pas d'évaluer le degré d'implication de chaque paire de bases G•U, ni d'affirmer qu'elles sont effectivement, directement et spécifiquement reconnues par l'hélice II de l'extension N-terminale de l'AspRS. Une caractérisation plus fine par mutagenèse dirigée est nécessaire pour déterminer quels sont les résidus de la protéine et de l'ARNm qui entrent en contact.

La méthode la plus fiable pour confirmer notre modèle d'interaction serait de déterminer la structure cristallographique de la région opératrice de l'ARNm en complexe avec l'AspRS. Cependant, dans l'état actuel de notre étude, plusieurs contraintes restreignent nos espoirs. Dans un premier temps, la faible solubilité de l'ARN nous contraint à l'utilisation de tampon Phosphate, ce dernier étant peu indiqué pour la cristallisation en raison de sa tendance à former lui-même des cristaux en présence de MgCl₂. D'autres part, les longs connecteurs non-structurés, présents dans la molécule sont des régions très flexibles pouvant empêcher la formation de cristaux de bonne qualité.

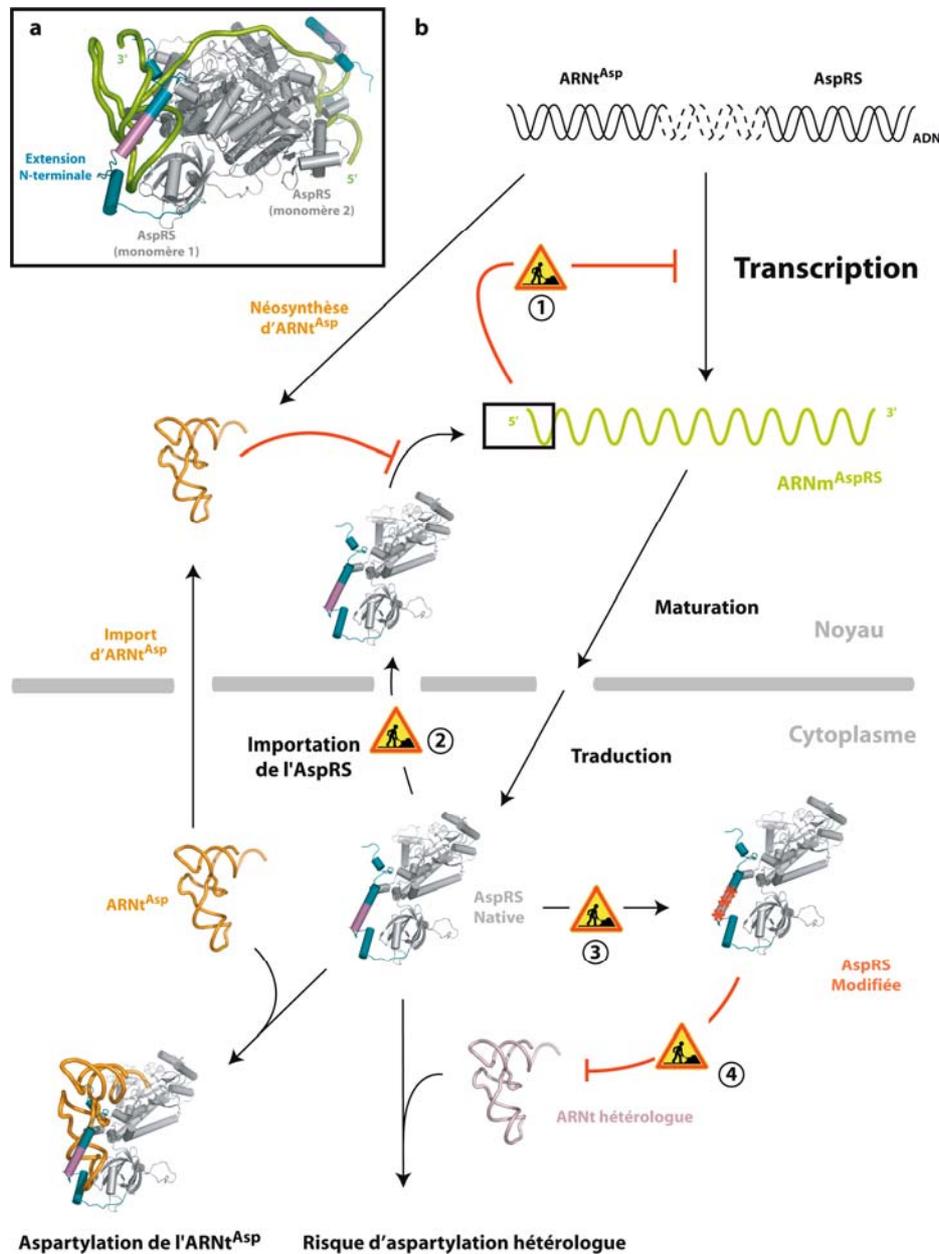


Figure 48 : Modèle d'interaction entre l'AspRS de *S.cerevisiae* et son ARNm et implication de l'enzyme dans les mécanismes d'aspartylation et les voies d'auto-régulation. (a) Modélisation tridimensionnelle du complexe AspRS/ARNm^{AspRS}. Le dimère d'AspRS (en gris) est représenté avec son extension N-terminale (en bleu) et son motif de liaison non-spécifique à l'ARN (en magenta). La portion de la région 5' de l'ARNm à proximité de l'enzyme est également montrée (tube vert). (b) Un seul monomère d'AspRS est représenté suivant le même code couleur que précédemment. Le gène de l'AspRS (en noir) est transcrit en ARNm^{AspRS} (en vert) puis, après maturation, est traduit dans le cytoplasme. A basse concentration, l'AspRS non-complexée à l'ARNt^{Asp} se re-localise au noyau où elle reconnaît l'extrémité 5' de son propre ARNm et dirige ainsi la répression transcriptionnelle de son propre gène. Cette régulation est inhibée par des ARNt^{Asp} non chargés néo-synthésés ou importés du cytoplasme. Dans le cytoplasme, l'AspRS en excès serait modifiée (*) au niveau du motif de liaison à l'ARN présent dans son extension N-terminale. Cette dernière caractéristique est supposée inhiber la capacité de l'AspRS à reconnaître des ARNt hétérologues (en rose) tels que l'ARNt^{Glu} et l'ARNt^{Asn}. Les étapes du cycle de régulation de l'AspRS à développer sont indiquées par le panneau de signalisation dont les numéros renvoient aux différentes sections de la partie Conclusions et Perspectives.

Avant d'entreprendre ces expériences, il serait nécessaire de produire un ARN de taille minimale dont la structure soit suffisamment rigide (par exemple le domaine I en pseudo-nœud) pour permettre la formation du complexe avec l'AspRS et sa cristallisation. Cependant, ne conserver qu'un seul domaine de l'ARNm réduit incontestablement l'affinité entre l'ARNm et la synthétase. De plus, l'interaction AspRS/ARNm nécessite la présence de l'extension N-terminale de l'AspRS. Or, à ce jour, aucune structure cristallographique n'a pu être obtenue en présence de cet appendice du fait de son hétérogénéité de taille (Lorber et al., 1987) (problème depuis résolu en surproduisant la protéine dans *E.coli*, comme c'est le cas dans cette étude), mais surtout du fait du désordre introduit dans le cristal par ce domaine très flexible.

A notre connaissance, seuls deux mécanismes de régulation transcriptionnelle dirigés par une interaction entre l'ARNm et une protéine liant l'ARN sont caractérisés à ce jour : la régulation de l'opéron *s10* d'*E.coli* et l'activation de la transcription des ARNm du VIH. Dans chaque cas, la protéine régulatrice (L4 ou TAT) associée à l'ARNm conduit à une modification de l'activité de l'ARN polymérase (arrêt de la transcription ou augmentation de la processivité) faisant intervenir au moins un facteur additionnel (NusA ou CyT1/Cdk9). Le système AspRS/ARNm^{AspRS} pourrait également s'appuyer sur le recrutement d'un second facteur protéique. La recherche de ce dernier est en cours au laboratoire.

2. Localisation nucléaire de l'AspRS

Nos expériences montrent que, quel que soit le variant d'AspRS surproduit dans la levure, la population d'AspRS cytoplasmique reste stable alors qu'elle augmente significativement dans le noyau (Article n°1). La mise en évidence d'une localisation nucléaire efficace, et ce, même en absence de l'extension N-terminale, indique que, contrairement aux prédictions, le motif de liaison à l'ARN n'est pas une séquence NLS. Nous en déduisons que cette fonction est assurée par une autre région de la protéine qu'il nous reste à caractériser. Néanmoins, on peut prédire que cette séquence NLS est masquée en présence de l'ARNt, donc qu'elle est certainement présente au voisinage du site de liaison de l'ARNt ou au niveau d'une région dont la conformation est modifiée au cours de l'interaction entre l'AspRS et l'ARNt (par exemple le module de liaison à l'anticodon).

Outre la caractérisation des signaux présents dans l'AspRS et dirigeant cette localisation, il nous faudra également identifier le transporteur impliqué. En effet, la taille

importante du dimère d'AspRS (130 kDa) ne lui permet pas de traverser le pore nucléaire de façon passive. En général les macromolécules transitant par ces pores utilisent des transporteurs comme, par exemple, le tandem exportin T/Ran-GTP pour les ARNt.

3. Régulation post-traductionnelle de l'AspRS de levure

La régulation transcriptionnelle de l'expression du gène de l'AspRS a été possible car son étude a été faite au cours de la phase exponentielle de croissance des cellules. Cependant, la caractérisation du contenu protéique de levures en phase stationnaire nous a permis de proposer l'existence d'un second niveau de verrouillage de l'expression de ce gène (section IV-3 des Résultats). En effet, la surproduction modérée de l'enzyme s'accompagne de l'apparition, au cours du temps, d'une nouvelle population d'AspRS (identifiée par Western-blot et spectrométrie de masse) caractérisée par un léger retard de migration sur gel de polyacrylamide et une réduction de pHi de 0,5 unité. Bien que nous n'ayons pas pu formellement identifier cette modification post-traductionnelle, nous proposons qu'il pourrait s'agir d'une auto-aspartylation de l'enzyme. En effet, les formes modifiées de l'AspRS que nous observons *in vivo* et l'AspRS auto-aspartylée *in vitro* (Kern et al., 1985) partagent des propriétés électrophorétiques très proches. De plus, nous proposons que cette modification post-traductionnelle serait localisée au niveau du motif de liaison à l'ARN de l'extension N-terminale de la protéine. (i) Ce motif est riche en lysines dont les fonctions amines des chaînes latérales pourraient être acceptrices du groupement aspartate activé par l'aspartyl-adénylate libéré du site actif. (ii) L'auto-aspartylation est inhibée par la présence de l'ARNt^{Asp}, comme l'est la régulation transcriptionnelle et, finalement, (iii) la surproduction *in vivo* d'un variant d'AspRS ne possédant pas le motif de liaison à l'ARN ne permet pas d'observer l'accumulation d'enzymes dont les caractéristiques électrophorétiques correspondraient à des formes modifiées. Néanmoins, de nombreuses expériences seront encore nécessaires pour valider et affiner notre modèle.

Dans un premier temps, il faut confirmer la nature de la modification. La comparaison des mesures des temps de vol de la forme native de l'AspRS et de ses dérivés modifiés, par spectrométrie de masse, devrait apporter des renseignements quant au nombre de modifications présentes par monomère d'enzyme. D'autre part, il faudrait caractériser plus finement les sites de modification. En effet, l'extension N-terminale contient un grand nombre de résidus basiques susceptibles d'être accepteur d'aspartate. Le

suivi du profil électrophorétique de variants d'AspRS mutés au niveau des différentes lysines (une à une, mutants disponibles au laboratoire) composant le motif de liaison à l'ARN devrait permettre de déterminer quelles sont les positions acceptrices des modifications. De même, les expériences d'auto-aspartylation *in vitro* devront, au moins en partie, être refaites avec des enzymes dont les extensions N-terminales sont homogènes (enzyme native et délétants). Finalement, une approche *in vivo* consisterait à incuber des levures en présence de cycloheximide (bloque la traduction par le ribosome) et d'acide aspartique radio-marqué (^3H ou ^{14}C). Si la modification résulte bien d'une auto-aspartylation, la radioactivité devrait être incorporée uniquement dans les formes modifiées de l'AspRS. Cependant, cette approche nécessite de grandes quantités d'Asp radioactif puisque la concentration d'Asp endogène dans la levure est déjà très élevée (1 mM) (Messenguy et al., 1980).

Une autre question concerne le compartiment dans lequel cette modification a lieu. En effet, nos résultats suggèrent que (i) l'AspRS en excès et non-complexée à l'ARNt se relocalise au noyau et que (ii) l'AspRS en excès est modifiée. A ce jour, rien ne nous permet de savoir si la modification précède ou suit l'arrivée de l'AspRS dans le noyau. De plus, si elle a lieu dans le cytoplasme, la modification empêche-t-elle, ou facilite-t-elle la localisation nucléaire? Nous pensons que cette modification permet de neutraliser le motif de liaison à l'ARN présent dans l'extension N-terminale de l'AspRS libre. Il nous faut vérifier cette hypothèse en mesurant l'activité d'aspartylation de l'enzyme ainsi modifiée. Les résultats obtenus par Kern et collaborateurs (Kern et al., 1985) montrent que l'auto-aspartylation (si telle est la modification observée *in vivo*) affecte essentiellement l'affinité de l'enzyme pour l'ARNt. En réduisant la force de cette interaction, l'auto-aspartylation compense l'effet de l'extension vis-à-vis de l'ARNt, ce qui irait pleinement dans le sens de notre modèle. Dans ce cas, il nous faut également tester l'effet de ces modifications dans la formation du complexe de régulation entre l'AspRS et son ARNm.

4. Risque d'aspartylation d'ARNt hétérologues

Ces dispositifs de régulation pourraient permettre à la cellule de réaliser une importante économie d'énergie en limitant une production excessive d'AspRS. Toutefois, une autre fonction pourrait être associée à ces systèmes. En effet, nous avons observé qu'une forte surproduction d'AspRS (en l'absence du motif de liaison à l'ARN de l'extension) est toxique pour la cellule. Dans ce cas, le système de régulation post-

traductionnelle ne peut pas agir et l'AspRS surproduite pourrait catalyser l'aspartylation incorrecte d'ARNt hétérologues. Cette hypothèse est confortée par les résultats que nous avons collectés *in vitro* (Article n°3) suggérant que, lorsque l'AspRS est excédentaire par rapport à l'ARNt^{Asp}, celle-ci catalyse efficacement l'aspartylation croisée de l'ARNt^{Asn} et de l'ARNt^{Glu}. Si l'extension augmente cette aspartylation incorrecte, elle n'est pas essentielle (propriété intrinsèque à l'AspRS). Ainsi, les deux mécanismes de régulation pourraient également prévenir cette situation délétère pour la cellule en réduisant la concentration en AspRS, d'une part, et en neutralisant son motif de liaison à l'ARN, d'autre part.

5. Considérations évolutives

La Figure 48 résume l'ensemble des fonctions impliquant l'AspRS de *S.cerevisiae*. On constate aisément que l'extension N-terminale de la protéine est au centre de tous ces mécanismes. Ce module apparaît de façon concomitante à une autre caractéristique fonctionnelle de l'AspRS de *S.cerevisiae* : sa faible affinité pour l'acide aspartique. En effet, le K_M de l'AspRS de levure pour l'Asp est de l'ordre de 1 mM, alors que la même enzyme chez les procaryotes (*T.thermophilus*), dépourvue d'extension N-terminale, présente une affinité 100 fois plus forte pour l'Asp (10 μ M) (Becker 1997). Sur la base de ce constat, deux scénarii sont envisageables. (i) On peut tout d'abord imaginer que l'extension (gain d'affinité de 100 fois pour l'ARNt) soit apparue et a compensé la chute d'affinité de l'enzyme pour l'Asp et a ainsi maintenue une aspartylation efficace de l'ARNt^{Asp}. Toutefois, l'arrivée de ce module s'est accompagnée d'une nouvelle propriété (aspartylation hétérologue) contre laquelle la cellule s'est prémunie en développant un double système de régulation. (ii) Au contraire, dans un second modèle, on peut imaginer que l'extension N-terminale soit initialement apparue et a augmenté l'affinité de l'enzyme pour l'ARNt^{Asp} et l'ARNm^{AspRS}, et que la chute du K_M de l'AspRS pour l'Asp soit une adaptation de l'enzyme qui a permis de prévenir les risques d'aminocyclations croisées associés à la présence du motif de liaison à l'ARN. En effet, la mauvaise affinité de l'enzyme pour l'Asp résulte en un relargage plus efficace de l'intermédiaire adénylate et favorise considérablement la propriété d'auto-aspartylation de l'AspRS de levure.

Enfin, une dernière question concerne la situation dans les autres eucaryotes. Cette extension N-terminale est présente chez tous les eucaryotes sauf chez les mammifères et les oiseaux. Dans ces organismes pourvus d'extension, l'affinité de l'AspRS pour l'Asp est-elle toujours aussi faible? Chez les mammifères, l'extension N-terminale est

considérablement réduite en taille, et surtout elle est dépourvue du motif de liaison à l'ARN. Cette courte extension est impliquée dans la formation du complexe multi-synthétasique et interagit également avec EF-1 α (Escalante et Yang, 1993; Reed et Yang, 1994). De plus, l'affinité de l'AspRS humaine pour l'Asp est intermédiaire ($K_M = 300\mu\text{M}$) (Rho et al., 1999). Etant données ces différences de composition entre l'extension de l'AspRS de *S.cerevisiae* et son équivalent chez l'Homme, il semble que, si l'expression de l'AspRS humaine est régulée, les mécanismes mis en jeu sont différents de ceux qui ont été caractérisés au cours de cette thèse.

I. Clonages et Mutagenèses

1. Clonages : Principes généraux

Les gènes de l'AspRS et de Aph-3'-IIa (*gen'*) ont été clonés de façon similaire. Les gènes ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN de levure (pour l'AspRS) ou d'un plasmide commercial (pCR2.1 pour *gen'*). Les oligonucléotides (ou amorces) ont été choisis pour s'hybrider spécifiquement à la matrice et contiennent les sites de restriction nécessaires pour insérer le produit de PCR dans les vecteurs correspondants. Le gène de l'AspRS est flanqué des sites SphI et BglII, ou BamHI et EcoRI, pour être inséré dans pQE-70 (Qiagen) ou pRS416-TEF, respectivement. Le gène *gen'* est, lui, flanqué des sites BamHI et HindIII pour son insertion dans le vecteur pRS425-GPD.

Les étapes d'amplification, de purification, de ligation de l'insert et de préparation des vecteurs restent les mêmes quel que soit le clonage effectué.

1.1 Amplification de gènes par PCR

1 µg d'ADN génomique de levure ou 50 ng d'ADN plasmidique sont utilisés comme matrice dans une réaction d'amplification par PCR, réalisée dans un milieu contenant : le tampon pour dynazyme II (10 mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100) supplémenté de 50 mM MgCl₂, de 0,16 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), de 1 µM de chaque amorce, et 4 unités d'ADN polymérase ADN-dépendante (Dynazyme II). La réaction se fait en thermocycleur et débute par une incubation de 5 minutes à 95°C, suivie de 25 cycles : 1 minute à 95°C, 1 minute à 55°C, 2 minutes à 72°C. Les produits de la réaction sont visualisés sur gel d'agarose 1%. Ces conditions sont conservées pour l'ensemble des réactions de PCR effectuées au cours de cette étude, sauf cas exceptionnel (mutagenèse selon Stratagene) où les conditions seront à nouveau précisées.

1.2 Digestion et purification des fragments

Les fragments de PCR et les vecteurs (pQE-70, pRS416-TEF ou pRS425-GPD) ont été digérés entre 2 et 12 heures à 37°C, dans un volume de 100 µL contenant 0,1 µg/µL d'ADN, 20 unités de chaque enzyme de restriction dans le tampon correspondant. Après digestion complète, dont l'efficacité est suivie sur gel d'agarose, les extrémités 5' du

vecteur sont déphosphorylées pendant 30 minutes en présence de phosphatase alcaline de crevette (SAP, Fermentas) à raison de 5 unités/ μg d'ADN. Cette étape réduit considérablement l'éventuelle « recircularisation » du vecteur lors de l'étape de ligation. La réaction est arrêtée par une extraction phénolique et l'ADN est précipité à l'éthanol en présence de sels (acétate de Na 0,3 M pH 6,0). Les produits de PCR, après digestion, sont purifiés sur gel natif 6% (acrylamide/bisacrylamide 37,5/1) en présence de TBE (0,89 M Tris-HCl pH 8,3, 0,89 M borate, 20 mM EDTA). Après 1 heure de migration à 150 V, les bandes sont colorées au BET (Bromure d'éthidium) et découpées sous UV. L'ADN est extrait du gel par électro-élution durant 30 minutes à 150 V dans du TBE, précipité à l'éthanol et les culots sont repris dans 20 μL d'eau. On obtient des solutions dont la concentration est estimée à 5 ng/ μL pour l'insert, et de 100 ng/ μL pour le vecteur.

1.3 Ligation

Les réactions de ligation (10 μL) sont incubées entre 6 et 12 heures à 16°C, et contiennent 100 ng de vecteur, 25 ng d'insert, le tampon de ligation (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 1 mM ATP) et 5 unités d'ADN ligase T4 (Q-biogen). La réaction est arrêtée par extraction phénolique, suivie d'une précipitation à l'éthanol en présence de sels. Le culot sec est repris dans 10 μL d'eau stérile. Un contrôle négatif (sans insert) est systématiquement réalisé.

1.4 Transformation de bactéries électro-compétentes

La souche bactérienne utilisée en général est *E.coli* Top10 (Invitrogen). Cette souche est génétiquement stable et faiblement mutagène. Les bactéries sont cultivées et rendues électro-compétentes comme suit : 1 L de milieu Luria-Bertani (LB : 10 g/L Bactotryptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L d'extraits de levure) complété par 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tétracycline est inoculé avec 4 mL d'une pré-culture (12 heures). Les cellules sont incubées à 37°C sous agitation vive jusqu'à obtenir une densité optique, mesurée à 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$), de 0,4-0,6. L'ensemble des étapes suivantes ont été réalisées dans la glace ou à 4°C : les cellules sont d'abord lavées 2 fois (1 L et 0,5 L) dans un tampon contenant 1 mM HEPES-NaOH pH 7,5, puis dans 20 mL de glycérol 10%. Le culot est alors repris dans un volume final de 600 μL de glycérol 10%, les cellules sont aliquotées, et stockées à -80°C.

5 μL de réaction de ligation (précipitée à l'éthanol et lavée, afin d'éliminer toutes traces de sels) sont utilisés pour électroporer 50 μL de cellules électro-compétentes (2,2

kV, 25 μ Fd, 200 Ω) et plusieurs dilutions de la suspension bactérienne transformée sont étalées sur milieu sélectif (LB, 0,1 mg/mL d'ampicilline, 50 μ g/mL de tétracycline) en présence de 2% glucose (verrouille l'expression du gène) et incubées une nuit à 37°C.

1.5 Criblage des colonies

Les clonages ne se faisant pas avec une efficacité absolue, il est nécessaire de sélectionner les colonies contenant le gène correctement inséré dans le vecteur. Pour chaque construction, 10 colonies en moyenne sont testées pour la présence de l'insert, son orientation et sa séquence selon un processus en trois étapes.

Dans une première étape, une PCR (25 μ L, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment) est réalisée directement sur les colonies isolées remises en suspension dans le milieu réactionnel, en présence des amorces adéquates. L'analyse des produits de PCR sur gel d'agarose 1% permet de mettre en évidence la présence de l'insert et son orientation si les deux amorces choisies s'hybrident d'une part dans le vecteur et d'autre part dans l'insert. En parallèle, chaque colonie est mise en culture (LB, 2% glucose, ampicilline, tétracycline) à 37°C sous agitation (180 rpm). Une préparation plasmidique (Qiaprep spin, miniprep, Qiagen) est réalisée pour chaque souche donnant un résultat positif par PCR. Un dixième de l'ADN extrait (environ 0,5 μ g) est digéré par deux enzymes de restriction (0,2 unité) encadrant le gène pendant 45 minutes à 37°C dans un volume total de 10 μ L. Le profil de restriction et la taille de chaque fragment sont analysés sur gel d'agarose 1%. Finalement, l'insert est entièrement séquencé pour s'assurer que l'étape de PCR n'a pas introduit de mutations. Pour cela, le reste de l'ADN est dénaturé en présence 0,2 N NaOH et 0,2 mM EDTA, à 37°C pendant 20 minutes, puis est précipité à l'éthanol. Le séquençage est réalisé selon le protocole de la Sequenase[®] 2.0 (United States Biochemical) en présence de dATP- α^{35} S et d'une amorce spécifique. Les produits de séquençage radiomarqués sont séparés sur un gel de polyacrylamide 8% (acrylamide/bisacrylamide 19/1) dénaturant, 8 M urée, TBE (0,4 mm d'épaisseur). La migration est faite à 75 W pendant 3 heures 30 (en général le xylène cyanol est à 10 cm du bas du gel). Le gel est séché et les séquences sont révélées par autoradiographie (Film Biomax, Kodack).

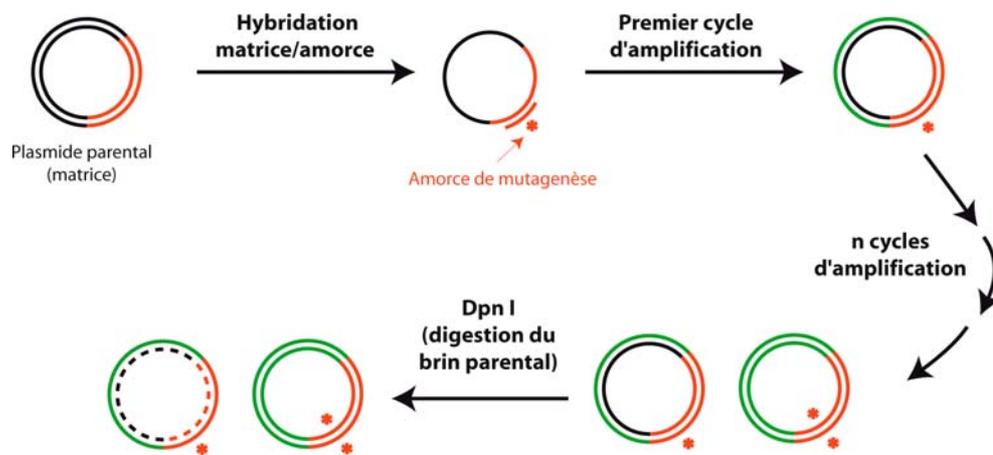


Figure 49 : Principe de la mutagenèse dirigée selon Stratagene. Le plasmide parental utilisé comme matrice est purifié de bactéries sous sa forme méthylée. La première étape consiste en une réaction de PCR. L'amorce de mutagenèse portant la mutation (*) à introduire dans le gène est hybridée à un des brins du plasmide parental (méthylé) portant la séquence sauvage du gène (rouge). Un premier cycle d'amplification permet de produire un plasmide chimérique composé d'un brin parental méthylé (noir) et d'un brin néo-synthétisé non méthylé (vert) porteur de la mutation. La répétition de plusieurs cycles permet d'enrichir la population de vecteurs en plasmides portant la mutation sur les deux brins. Enfin, l'efficacité de la réaction globale est augmentée en digérant le brin parental par DpnI (coupe uniquement les brins méthylés).

2. Mutagenèses

2.1 Mutagenèse dirigée (selon Stratagene)

L'introduction de mutations ou de délétions dans un gène est possible par mutagenèse dirigée par PCR, technique résumée dans la Figure 49. Pour cela, un couple d'oligonucléotides (sens et antisens) est utilisé. Ces oligonucléotides doivent présenter certaines caractéristiques : (i) la région portant la mutation doit être encadrée par au moins 15 résidus de part et d'autre, (ii) les paires de bases distales doivent être des G-C et (iii) la température de fusion de l'oligonucléotide doit être supérieure à 75°C. Dans un premier temps, une PCR est réalisée dans 50 µl de milieu (20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 et 0,1 mg/mL de BSA) contenant 0,25 pmol de chaque oligonucléotide, 0,2 mM dNTP, 10 ng/µL de plasmide matrice et 2,5 unités de Pfu Turbo® polymérase (Stratagene). 18 cycles d'amplification (30 secondes 95°C, 1 minute 55°C, 7 minutes 72°C) sont réalisés. Le brin parental est ensuite digéré spécifiquement par une enzyme reconnaissant l'ADN méthylé. Pour cela, le milieu est additionné de 10 unités de DpnI pendant 1 heure à 37°C. Enfin, 3 µL de ce milieu sont utilisés pour transformer 50 µL de cellules électro-compétentes (section 1.4).

2.2 Mutagenèse par remplacement de cassette

Cette approche (résumée dans la Figure 50) permet d'introduire des mutations, ou des délétions, dans un gène à partir du moment où la séquence à muter est encadrée par deux sites de restriction uniques. Elle consiste à amplifier le fragment en question au cours d'une première étape de PCR utilisant une amorce portant la mutation. La deuxième étape correspond à une autre réaction d'amplification où le produit de la première PCR sert d'amorce.

Par exemple, la séquence d'ADN codant pour l'AspRS entre les nucléotides 1 et 650 (sur un gène de 1671 paires de bases) est caractérisée par la présence d'un site SphI (5'-GCATGC_{3'}) à l'extrémité 5' du gène et d'un site PstI (5'-CTGCAG_{3'}) unique à la position 650 qui ont permis la substitution des différentes extrémités codant pour l'extension N-terminale dans les différentes AspRS construites. Selon les étapes précisées dans la Figure 50, deux PCR successives sont nécessaires pour produire le fragment d'ADN muté et permettre sa ligation dans le vecteur, en lieu et place de la séquence sauvage.

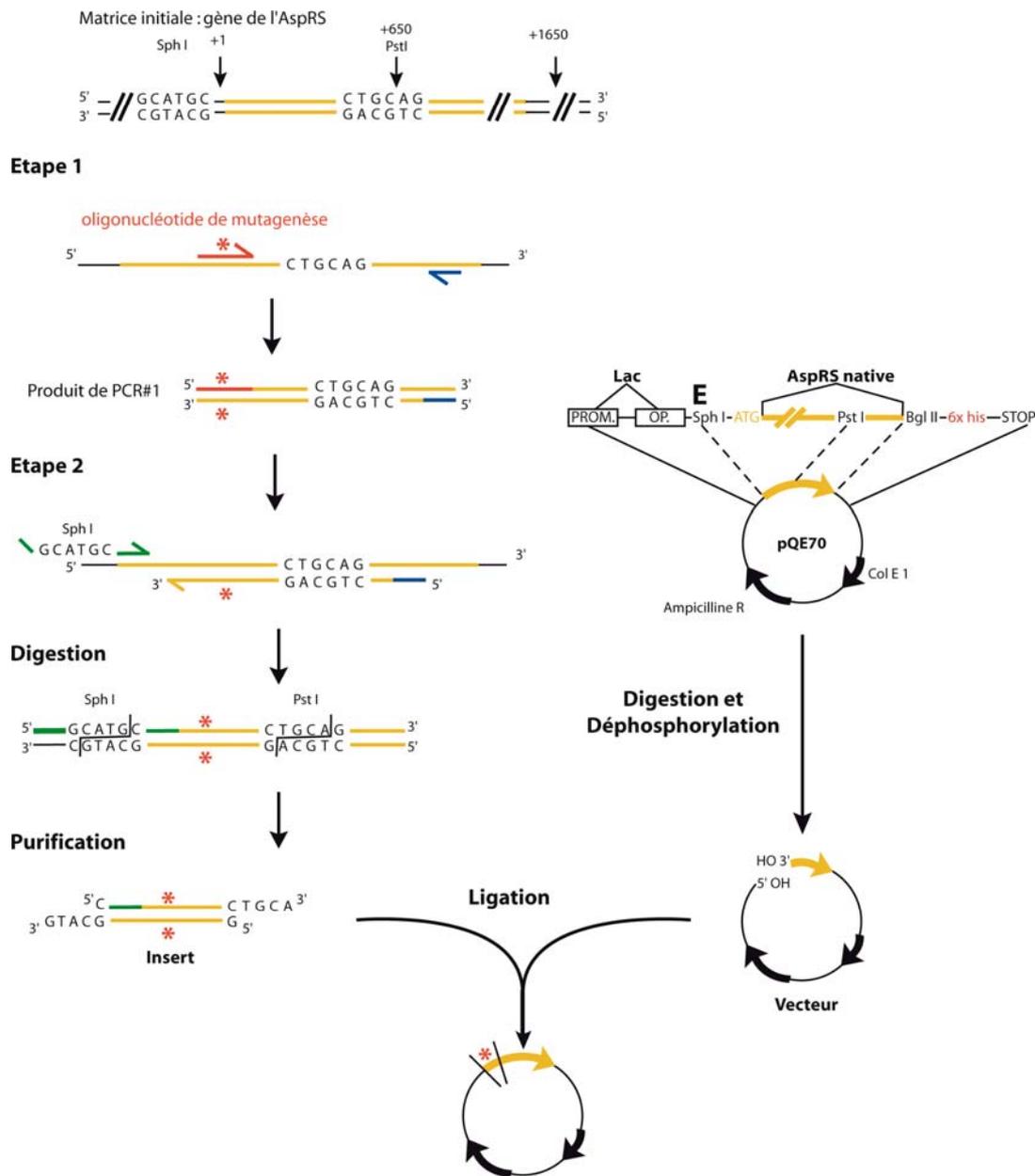


Figure 50 : Principe de la mutagenèse par remplacement de cassette. Cette technique utilise 2 étapes de PCR. La première étape permet d'introduire la mutation (*) portée par un oligonucléotide de mutagenèse (rouge). Le produit de cette première PCR sert d'amorce à une seconde PCR (étape 2). Le produit de cette seconde réaction (insert) porte la mutation sur ses deux brins et deux sites de restriction uniques (SphI et PstI dans le cas de l'AspRS). Le produit de PCR est digéré et purifié sur gel de polyacrylamide. Un vecteur portant la séquence sauvage, digéré par les mêmes enzymes de restriction, déphosphorylé et purifié en parallèle de l'insert est utilisé pour la ligation.

II. Purification des protéines

1. Purification de l'AspRS de levure

1.1 Surexpression

Les différents variants d'AspRS sont clonés dans le vecteur pQE-70 sous le contrôle du promoteur Lac, réprimé en présence de 2% de glucose et activé en présence d'IPTG (IsoPropyl- β -ThioGalactoside). L'AspRS de levure est une protéine qui surproduit très bien et pour obtenir de grandes quantités nous induisons en phase stationnaire. 500 mL de milieu de culture frais (LB, 0,1 mg/mL ampicilline, 50 μ g/mL tétracycline, 2% glucose) sont inoculés par 50 mL de pré-culture (Top10 transformées par pQE-70-AspRS) et incubés pendant 2 heures à 37°C, sous agitation vive. Lorsque la $DO_{600nm}=2$, les bactéries sont transférées dans du milieu dépourvu de glucose (levée de la répression du promoteur) et contenant 1 mM d'IPTG (stimule la transcription du gène). Les cellules surproductrices sont maintenues dans ces conditions pendant 4 heures à 37°C, et sont culotées par centrifugation.

1.2 Purification

Les protéines surproduites à partir du plasmide pQE-70 portent à leur extrémité C-terminale 6 résidus histidine (6-His). Cette queue 6-His a la propriété de se lier fortement aux ions nickel (Ni^{2+}) et permet une rétention spécifique des protéines ainsi « marquées » sur une matrice couplée au nickel. La présence de cette queue histidine permet de purifier l'AspRS en une seule étape chromatographique (Figure 51). Dans un premier temps, les culots de cellules sont repris dans 20 ml de tampon (50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl). Après sonication (7 fois 45 secondes à 80 V), l'extrait brut est centrifugé à 4°C pendant 45 minutes à 30000 rpm (rotor Ti-45) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est déposé sur 5 mL de résine agarose-NiNTA (Qiagen), équilibrée au préalable avec le même tampon. La colonne est lavée avec ce tampon contenant 10 mM d'imidazole, ce qui permet d'éliminer les protéines retenues de façon aspécifique sur la résine.

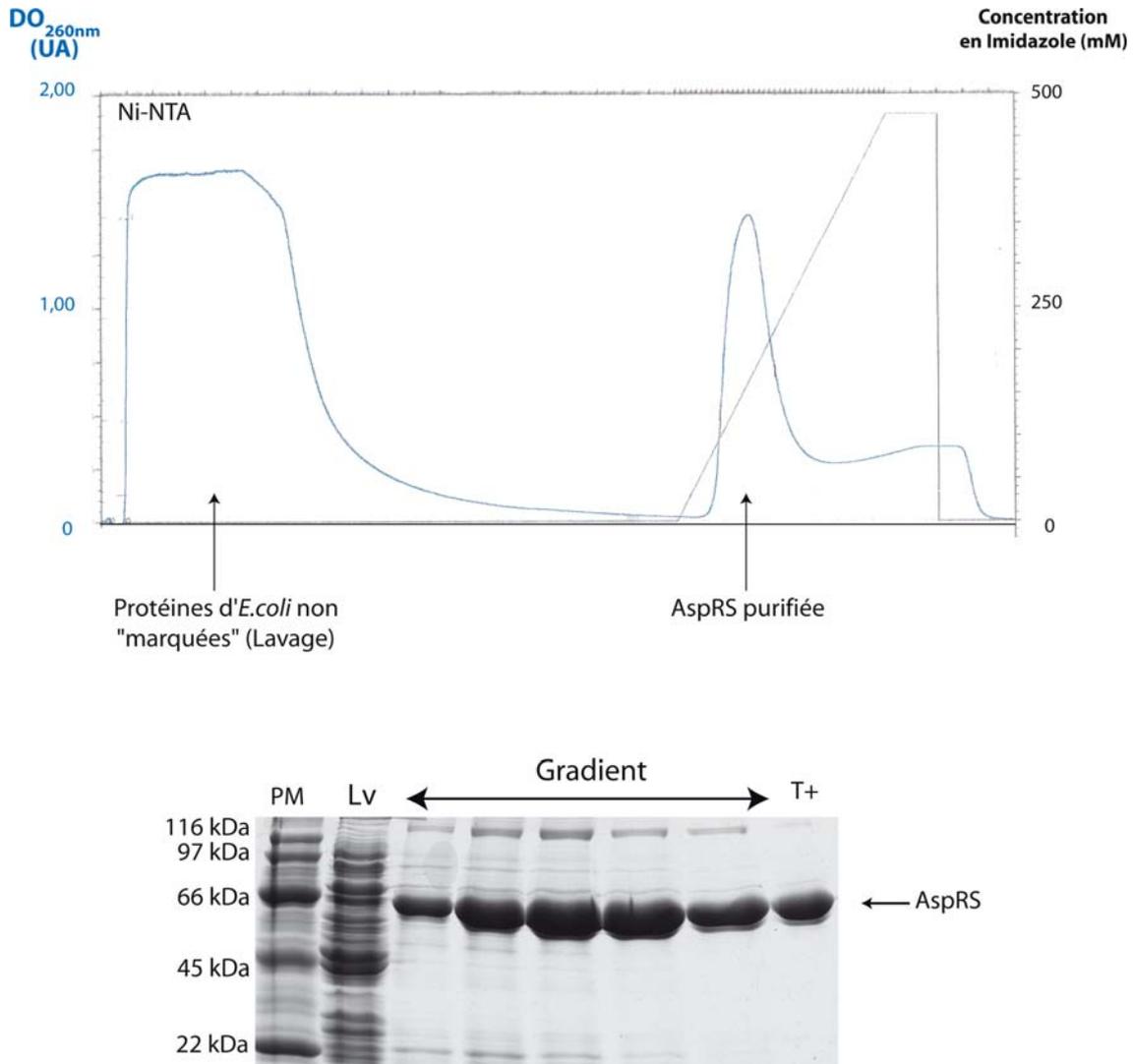


Figure 51 : Purification de l'AspRS par chromatographie d'affinité. En haut, le profil de purification de l'AspRS sur une résine substituée par du nickel (Ni-NTA, Qiagen) est indiqué avec les pics caractéristiques correspondant (i) aux protéines n'interagissant pas spécifiquement avec la résine et éliminées par le lavage et (ii) l'AspRS éluée au cours d'un gradient d'imidazole (10 à 500 mM). En bas, la pureté de la protéine est vérifiée sur gel de polyacrylamide. Les contenus protéiques des fractions de lavage (Lv) et du pic élué durant le gradient d'imidazole (gradient) sont analysés sur un gel 10%. Un marqueur de poids moléculaire (PM) et une AspRS pure (T+) sont déposés en parallèle.

Finalement, l'AspRS est éluée en utilisant un gradient linéaire d'imidazole (de 10 mM à 250 mM). Tout au long de la chromatographie, le débit est maintenu à 2 mL/min. Les effluents sont collectés par fractions de 2,5 mL et l'absorbance à 280 nm (DO_{280nm}) est enregistrée (système Biologic Duoflow™, Bio-Rad). Le profil d'absorption représenté dans la Figure 51 permet de suivre le déroulement des différentes étapes et en particulier de détecter l'élution de la protéine. Les fractions correspondant au pic d'élution sont analysées par migration sur gel dénaturant 10% acrylamide/bisacrylamide (37,5/1), 375 mM Tris-HCl pH 8,8 et 0,1% SDS dans le tampon Tris/glycine/SDS (25 mM Tris-base, 140 mM glycine, 0,1% SDS) (Figure 51). Les fractions contenant de l'AspRS pure sont regroupées et dialysées contre le tampon de conservation (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,2, 150 mM KCl, 50% Glycérol (v/v), 1 mM EDTA, 1 mM DTE) une nuit à 4°C et le dialysat est stocké à -20°C.

2. Surproduction, purification et caractérisation de l'ARN polymérase T7

L'ARN polymérase T7 a été purifiée à partir d'une souche surproductrice (gène sous le contrôle du promoteur Lac) fournie par W.Studier (Brookhaven, USA) et selon un protocole mis au point par Becker et collaborateur (1996).

2.1 Surproduction de l'ARN polymérase T7

La souche surproduisant l'ARN polymérase T7 est mise en culture dans 4 litres de milieu LB, ampicilline 0,1 mg/mL, glucose 2%. Après 3 heures 30 d'incubation ($DO_{600nm} = 1,4$), la surproduction est induite pendant 5 heures en présence d'IPTG. Les cellules sont récoltées par centrifugation (10 minutes à 3200g) et lavées dans du PBS (7,65 g/L NaCl, 0,724 g/L Na_2HPO_4 , 0,210 g/L NaH_2PO_4). Les 4 litres de cultures ont permis l'obtention de 20 g de cellules.

2.2 Préparation de l'extrait brut

L'ensemble des tampons utilisés au cours de la lyse des cellules et les premières étapes de purification de l'enzyme contient un cocktail d'anti-protéases composé de bacitracine (10 µg/mL), benzamidine (0,1 mM), de PMSF (0,2 mM) et de DTT (0,1 mM). Le culot de cellules est remis en suspension dans 144 mL de tampon (50 mM Tris-HCl pH 8,1, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA) auxquels on rajoute 3,5 mL solution de lysozyme à

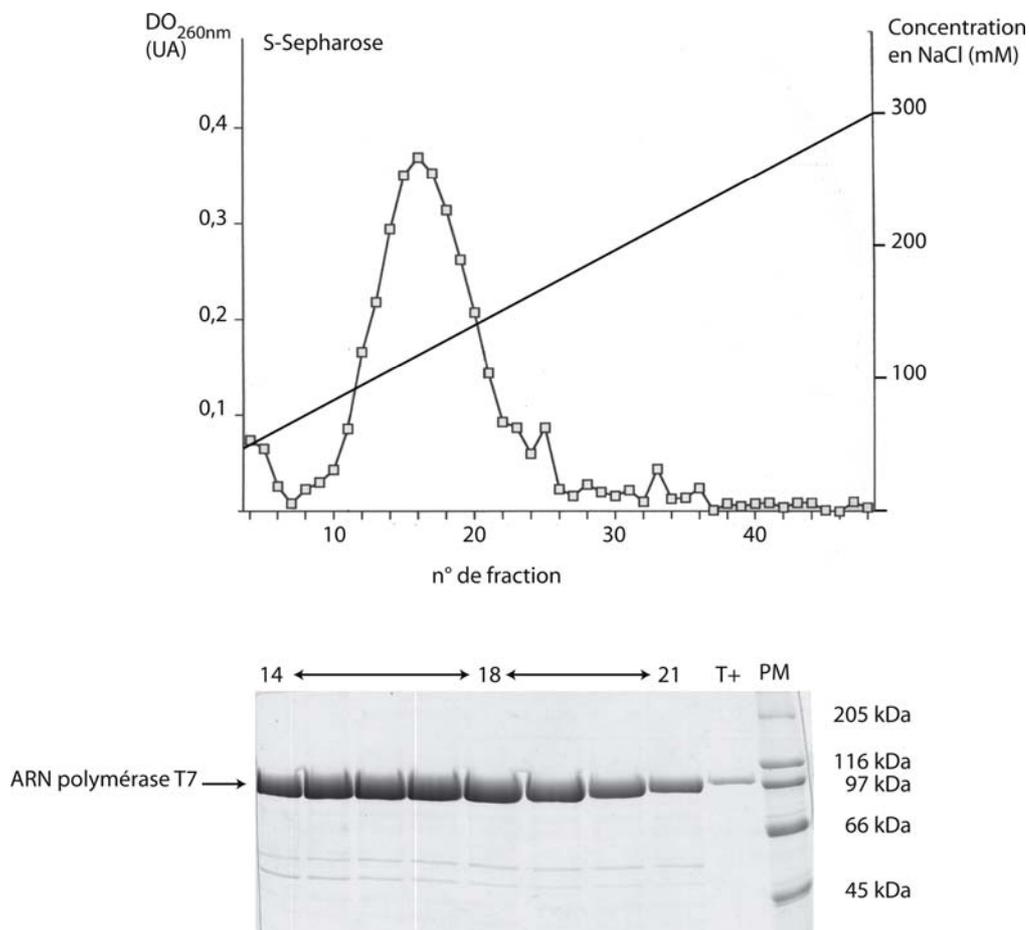


Figure 52 : Purification de l'ARN polymérase T7 par chromatographie d'échange d'ions. En haut, le profil d'éluion de l'ARN polymérase T7 sur résine échangeuse de cations (S-Sépharose, Sigma) est représenté. La protéine pré-purifiée (précipitation au sulfate d'ammonium) est immobilisée sur la résine, les contaminants sont éliminés par un lavage (non représenté sur le profil) et l'ARN polymérase T7 est éluée au cours d'un gradient de NaCl (50 à 300 mM). En bas, la pureté de la protéine est vérifiée sur gel de polyacrylamide. Les fractions 14 à 21 du gradient sont analysées sur un gel 10%. Un marqueur de poids moléculaire (PM) et une ARN polymérase T7 pure (T+) sont déposés en parallèle.

1,5 mg/mL (fragilisation de la paroi bactérienne). Après une incubation de 20 minutes sous agitation dans la glace, les cellules sont lysées pendant 20 minutes en ajoutant 1,3 mL de désoxycholate de sodium à 0,8%. La viscosité du milieu est ensuite réduite par 4 sonications de 20 secondes à 100 volts à l'aide d'une sonde moyenne de sonication (diamètre de 0,5 cm). Les débris cellulaires sont ensuite culotés par ultracentrifugation de 3 heures à 105000g (45000 rpm, rotor Ti-45).

2.3 Purification et concentration de l'ARN polymérase T7

L'extrait brut (150 ml) est débarrassé des acides nucléiques par précipitation en ajoutant lentement, sous agitation, 30 mL d'une solution de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M, et 30 mL d'une solution de polyimine P à 10% pH 8,0. Après 20 minutes d'incubation dans la glace, le précipité est éliminé par centrifugation, 10 minutes à 3200g. La fraction protéique contenant l'ARN polymérase T7 est précipitée en ajoutant 0,8 volume d'une solution saturée (à température ambiante) en sulfate d'ammonium pendant 15 minutes, sous agitation douce, dans la glace. Le précipité est centrifugé 20 minutes à 3200g, redissout dans 100 mL de tampon (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,7, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl et 5% de glycérol) et dialysé une nuit contre 5 L de tampon de dialyse (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,7, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5% de glycérol, 11 mM β -mercaptoéthanol). Au cours de la dialyse, des précipités se sont formés et sont éliminés par 30 minutes d'ultracentrifugation à 30000 rpm (rotor Ti-45).

Le surnageant est déposé (débit de 2 mL/min) sur 100 mL de résine échangeuse de cations (S-sepharose cation exchanger Fast Flow, Sigma) équilibrés au préalable avec le tampon de lavage (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,7, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl et 5% glycérol). L'ARN polymérase T7 est retenue spécifiquement sur la résine et les contaminants sont éliminés par lavage (4 volumes de colonne). La protéine est ensuite éluee au cours d'un gradient de NaCl (50 à 300 mM dans 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,7, 1 mM EDTA et 5% glycérol). La protéine sort à partir d'une concentration de 100 mM NaCl (Figure 52), et est dialysée une nuit contre 5 L de tampon de dialyse (20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,7, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 5% de glycérol et 11 mM de β -mercaptoéthanol). Le dialysat (250 mL) est à nouveau chargé sur la même résine S-sépharose (6,5 mL) équilibrée avec le tampon de lavage contenant 10 mM de NaCl.

La protéine est éluée avec 20 mL de tampon contenant 300 mM de NaCl et est récupérée dans un volume total de 10 mL.

Une dernière étape de purification consiste à précipiter l'ARN polymérase T7 à faible force ionique en la dialysant contre 4 L de tampon de dialyse contenant 10 mM NaCl pendant une nuit à 4°C. Après 25 minutes de centrifugation à 105000g (42000 rpm, Ti-45), la protéine est récupérée sous la forme d'un important précipité. Ce dernier est dissout dans 10 mL de tampon de dialyse contenant 100 mM NaCl, puis la protéine est concentrée trois fois par dialyse contre 1 L de tampon (20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,7, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl et 50% glycérol) pendant 5 heures.

2.4 Caractérisation de l'ARN polymérase T7

La protéine produite a été quantifiée par la méthode de Bradford et son activité a été testée dans des réactions de transcription *in vitro* en présence d'ATP- α ³²P. Le dépôt de 5 μ L de milieu de transcription sur gel dénaturant de polyacrylamide (12%, urée 8 M) montre que la quantité d'ARN transcrits par l'enzyme est stable à partir de 1 heure de réaction et qu'une concentration de l'enzyme à 0,6 μ g/ μ L permet de limiter la quantité de produits secondaires. La concentration de l'enzyme est donc ajustée à 0,6 μ g/ μ L, aliquotée et conservée à -20°C.

3. Quantification des protéines (Bradford, BCR)

Les protéines utilisées dans cette étude ont été quantifiées par la méthode de Bradford. En particulier, l'AspRS, dont on connaît pourtant le coefficient d'extinction ($A_{280\text{nm}}=0,60 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) car celle-ci, selon la taille de l'extension N-terminale, absorbe plus ou moins à 280 nm. En milieu acide, les protéines (grâce à leurs Lys, Arg et His) forment des complexes avec certains colorants organiques comme le bleu de Coomassie G-250 et en modifient la couleur par une réaction d'oxydo-réduction. Ainsi, l'ajout de réactif de Bradford (8,5% acide phosphorique, 5% éthanol, 0,1 μ g bleu de Coomassie G-250) à une solution de protéine présente une coloration bleue d'autant plus intense que la solution est concentrée en protéines. Plusieurs dilutions de la solution protéique sont utilisées et l'absorbance à 595 nm est comparée à une gamme étalon de BSA variant de 0 à 10 mg/mL. Pour l'AspRS, cette concentration est exprimée en concentration de dimères.

Une seconde technique est utilisée pour doser les protéines. Elle utilise le réactif de Lowry composé de cuivre et d'acide bicinchoninic (Micro BCA™, Protein Assay Kit, Pierce). Cette technique présente l'avantage de doser directement la quantité de liaisons peptidiques (également influencé par la présence de Cys, Trp et Tyr).

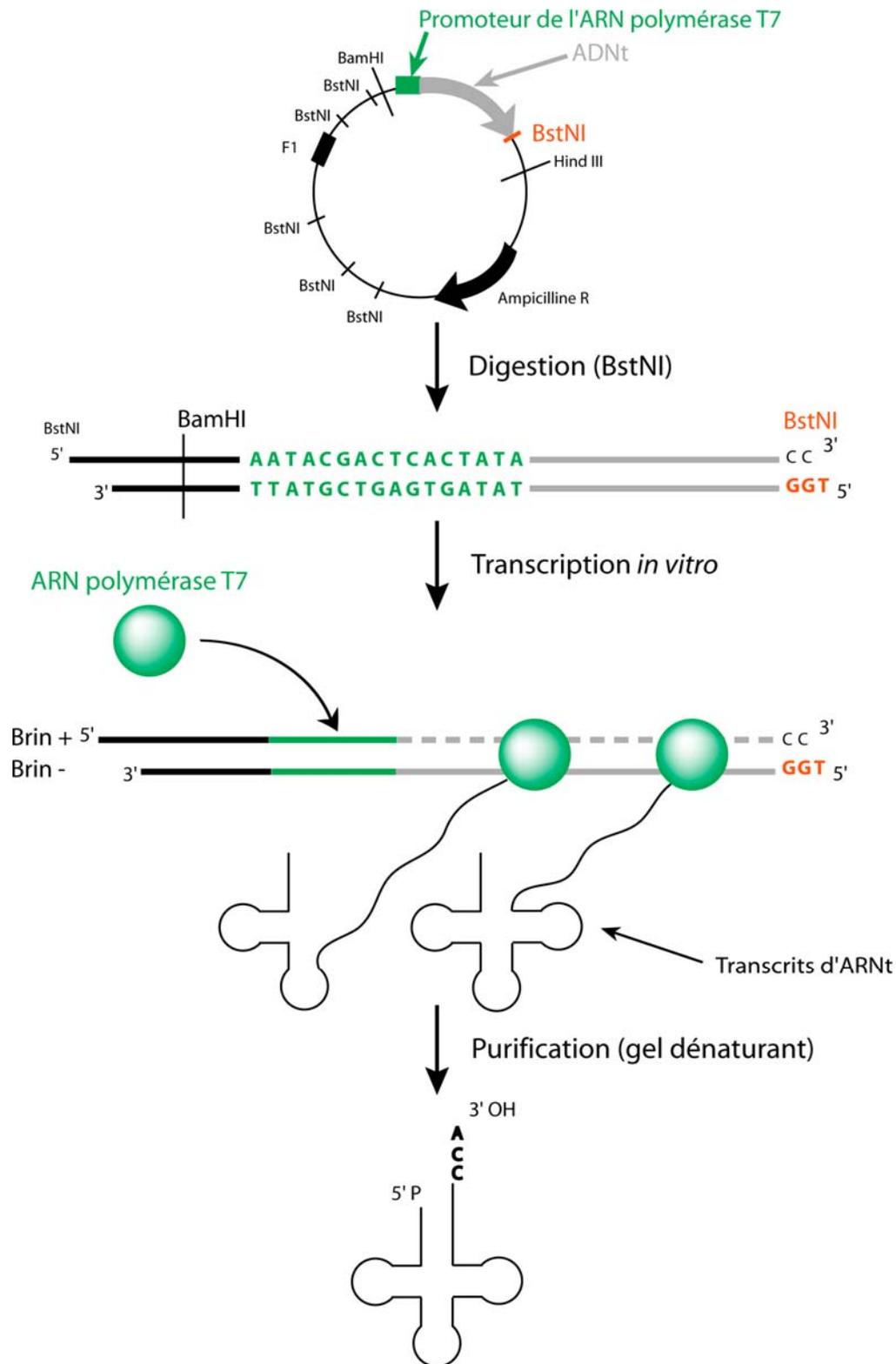


Figure 53 : Principe de la production d'ARN par transcription *in vitro* par l'ARN polymérase T7. La technique est illustrée par la synthèse d'un ARNt. Le gène codant pour l'ARNt (ADNt) se trouve sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase T7. La digestion du plasmide par BstNI permet la linéarisation du gène de l'ARNt avec une extrémité 5' du brin codant terminée par GGT (rouge). Ce fragment sert de matrice à l'ARN polymérase T7 qui transcrit un ARNt se terminant par une séquence CCA. Les produits de transcription sont ensuite purifiés sur gels de polyacrylamide dénaturants et le transcrit de bonne taille est électro-élué du gel.

III. Préparation des ARN

1. Transcription *in vitro*

1.1 Préparation de la matrice

L'ensemble des ARN utilisés au cours de ces études a été produit par transcription *in vitro* en utilisant comme matrice un plasmide contenant le promoteur de l'ARN polymérase T7 en amont du gène à transcrire. De grandes quantités d'ADN plasmidique ont été obtenues par maxi-préparation (Jet-Star™, Genomed). Ces constructions ne contenant pas de terminateur de transcription, une étape préalable de linéarisation de la matrice est nécessaire. Les vecteurs contenant les séquences codant pour les différents variants de l'ARNm^{AspRS} ont été digérés par les enzymes EcoRI (5'-GATTC₃') ou HaeIII (5'-GGCC₃') suivant que l'on souhaite obtenir une forme entière ou raccourcie de l'ARNm. D'autre part, le plasmide portant le gène de l'ARNr 5S (fournie par C.Brunel) est digéré par l'enzyme DraI (5'-TTTAAA₃'). Cette étape de linéarisation est doublement importante pour la production des ARNt puisque leur extrémité 3' doit être un CCA. Dans ce cas, le choix de l'enzyme de restriction utilisée pour digérer la matrice est BstNI, qui libère une extrémité 5' GGT (Figure 53). Les clones des ARNt utilisés ont été construits lors d'une étude antérieure (Pütz et al., 1991). Les gènes ont été introduits dans le vecteur pTFMa (dérivé de pUC18) entre les sites de restriction BamHI et HindIII.

100 µg d'ADN plasmidique sont digérés dans un volume réactionnel de 250 µl en présence du tampon adéquat et de 50 unités de l'enzyme de restriction pendant 2 à 12 heures. La réaction est arrêtée par une extraction phénolique, et l'ADN digéré est précipité à l'éthanol en présence de 0,3 M d'acétate de Na pH 6,0. Le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans de l'eau MilliQ afin d'obtenir une solution à 1 µg/µL. Après vérification de l'efficacité de la digestion des plasmides sur gel d'agarose 1%, ceux-ci sont directement utilisables dans les réactions de transcription *in vitro*.

1.2 Transcription par l'ARN polymérase T7

La transcription *in vitro* se fait, en général, dans un volume réactionnel de 1 mL contenant 50 µg d'ADN digéré, 40 mM Tris-HCl pH 8,1 (à 37°C), 22 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 4 mM ATP, 4 mM CTP, 4 mM GTP, 4 mM UTP, 5 mM GMP, 1 mM spermidine et 6 µg d'ARN polymérase T7. La réaction est incubée 2 à 3 heures à 37°C. L'ajout de GMP

dans le milieu permet la production de transcrits avec des extrémités 5' monophosphates. Le mode d'arrêt de la réaction dépend du type de purification choisi.

2. Purification des ARN transcrits

Une étape de purification des ARN transcrits est nécessaire pour éliminer l'ADN matrice, les nucléotides non incorporés et les sels. Le mode de purification est adapté au type d'ARN et à l'expérience à laquelle il est destiné. Un premier mode de purification est basé sur l'utilisation de gels (natifs ou dénaturants). Ces méthodes permettent de purifier plusieurs ARN en parallèle et de les séparer selon leur repliement (gel natif) ou selon leur taille (gel dénaturant). Si l'ARN doit être purifié sur gel, la réaction de transcription est arrêtée par une extraction phénolique, suivie d'une précipitation à l'éthanol. En revanche, une centrifugation de 10 minutes à 12000g, permettant de clarifier le milieu de transcription (culotage du pyrophosphate formé au cours de la transcription), suffit si l'ARN doit être purifié par chromatographie. La purification des ARN par cette méthode est rapide et permet de récupérer une grande quantité de transcrits dans des conditions natives.

2.1 Purification sur gel natif

Le gel natif a servi à purifier les ARNm^{AspRS} utilisés au cours des expériences de cartographie en solution. Cette technique permet de préserver le repliement acquis par les ARN de façon co-transcriptionnelle.

Les culots secs de transcrits (un culot pour 500 µL de milieu de transcription) sont repris dans 100 µL d'eau et 100 µL de bleu de dépôt natif (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol et 0,1% de xylène cyanol). Le mélange est déposé sur gel de polyacrylamide 6% (acrylamide/bisacrylamide 37,5/1, TBE) de 15 x 17 cm, et de 1,5 mm d'épaisseur. La migration s'effectue à 200 V et à 4°C. La position de la bande d'ARN est révélée par ombrage aux UV, elle est découpée et les ARN sont électro-élués du gel (système BiotrapTM, Schleicher & Schuell) en appliquant un champ électrique de 150V pendant 1 heure 30. L'éluat est ensuite précipité à l'éthanol, lavé et le culot repris dans l'eau. Le spectre d'absorbance de la solution de 220 nm à 320 nm permet d'estimer la qualité de l'ARN, et la valeur maximale (260 nm) permet de déterminer la concentration de la solution d'ARN (sachant que 1 DO/mL = 40 µg/mL d'ARN).

2.2 Purification sur gel dénaturant

La purification sur gel dénaturant est utilisée pour isoler les ARNt. L'utilisation d'un gel très résolutif (12%) permet une séparation fine des bandes au nucléotide près. Ceci permet d'isoler la population d'ARNt se terminant au nucléotide A76 (la seule active en aminoacylation) des populations dont la taille supérieure résulte de l'ajout arbitraire d'un ou plusieurs nucléotides à la fin du transcrit (une propriété de l'ARN polymérase T7).

Pour ce type de purification, les culots d'ARN (un culot pour 500 μ L de milieu de transcription) sont repris par 500 μ L de bleu formamide (80% formamide, 10 mM EDTA, 0,1% bleu de bromophénol et 0,1% xylène cyanol) et sont déposés sur un grand gel de polyacrylamide 12% dénaturant (acrylamide/bisacrylamide 19/1, TBE, 8 M urée) de 2 mm d'épaisseur. La migration se fait une nuit à 650 V, 55 mA, 60 W. La détection des bandes d'ARN, leur élution et leur quantification se fait comme dans le cas des ARN purifiés sur gel natif.

2.3 Purification des ARN par chromatographie (HPLC/FPLC)

Purification sur colonne échangeuse d'anions. Les ARNm^{AspRS} et l'ARNr 5S purifiés par chromatographie ont été utilisés dans les expériences d'empreinte ou comme compétiteurs dans les expériences de retard sur gel. La purification se fait sur une résine échangeuse d'anions UnoQ™ (Bio-RAD) qui retient fortement les composés chargés négativement comme les ARN. Le milieu de transcription (débarrassé du précipité de PPi par centrifugation) est directement chargé sur la colonne pré-équilibrée avec le tampon de lavage (50 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM NaCl). La colonne est lavée avec 5 volumes de tampon de lavage, puis l'ARN est élué avec un gradient de sel (20 à 1000 mM de NaCl). Le transcrit d'ARN sort à une concentration de 400 mM de NaCl (Figure 54). Tout au long de la purification, le débit est maintenu constant à 2 mL/min, des fractions de 2,5 mL (0,5 mL pendant le gradient) sont collectées et la DO est suivie à 280 nm (système Biologic Duoflow, BioRad). Dans le cas des ARN compétiteurs utilisés dans les expériences de retard sur gel, les fractions contenant l'ARN sont regroupées, précipitées et l'ARN est quantifié par mesure du spectre d'absorbance entre 220 et 320 nm. En revanche, pour l'ARNm^{AspRS}, utilisé dans les expériences d'empreinte, la fraction contenant l'ARN (pic de DO) est récupérée et conservée en vue de sa re-purification sur gel-filtration.

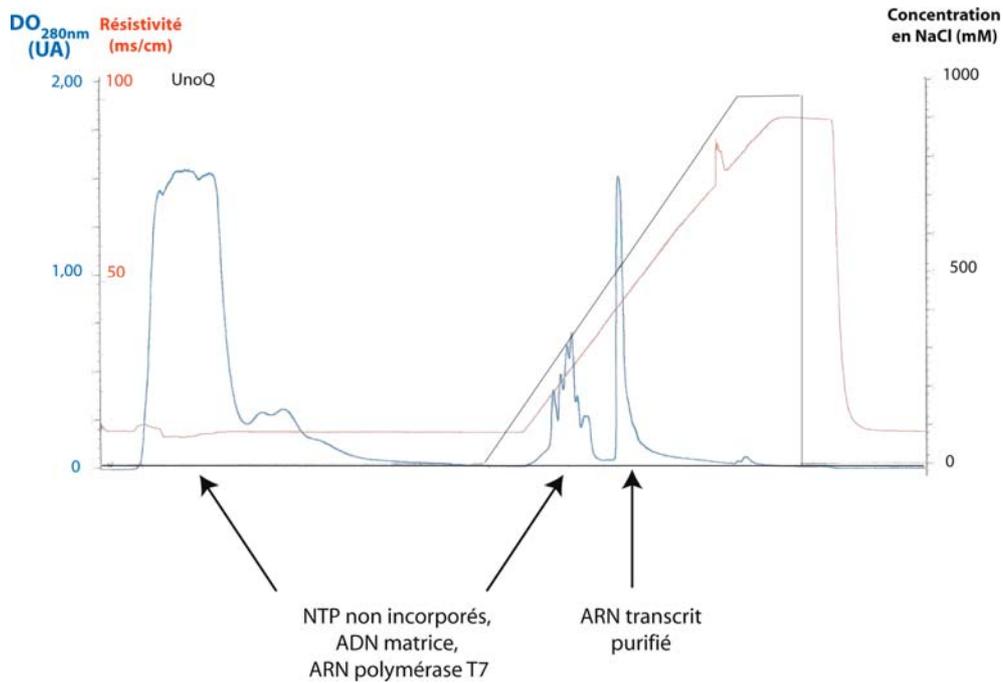


Figure 54 : Purification des transcrits d'ARN par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Le milieu de transcription, centrifugé, est déposé sur une résine Uno-Q échangeuse d'anions (BioRad). Un lavage permet d'éliminer les nucléotides (NTP) non incorporés, l'ADN matrice et l'ARN polymérase T7. Les molécules d'ARN immobilisées sur la résine sont éluées par un gradient de NaCl (de 20 mM à 1000 mM, indiqué par le trait rouge). Les contaminants sont éliminés entre 20 et 300 mM de NaCl, et les ARN transcrits sont élués à 400 mM de sel.

Purification et analyse de l'ARN par gel filtration. Un niveau supplémentaire de purification est apporté par le fractionnement des ARN en fonction de leur état oligomérique (monomères, multimères ou agrégats) sur une colonne de gel-filtration. La difficulté à obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans les expériences d'empreinte nous a amené à vérifier la solubilité de l'ARNm^{AspRS} produit par transcription *in vitro*. Pour cela les ARNm ont été purifiés sur gel-filtration SE-1000/17TM (Bio-RAD). L'échantillon (dans un volume maximum de 0,5 mL) est déposé sur la colonne pré-équilibrée avec le tampon (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 300 mM KCl). L'ensemble de la purification est fait avec ce même tampon, le débit est maintenu constant à 0,5 mL/min. Des fractions de 4 mL (0,5 mL à au moment de l'élution de l'ARN) sont collectées et la DO est suivie à 280 nm (système Biologic Duoflow, BioRad).

Les fractions contenant l'ARN dans sa forme monomérique sont alors concentrées sur Microcon® 30K (Millipore). La membrane du système est d'abord équilibrée par 0,5 mL d'eau. Puis 0,25 mL de fraction (contenant l'ARN monomérique) et 0,25 mL de tampon Phosphate (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 150 mM KCl, 20 mM MgCl₂) sont déposés sur la membrane. Après 10 minutes de centrifugation à 12000g, l'opération est renouvelée, et ainsi de suite jusqu'à avoir concentré l'ensemble des fractions. La solution concentrée est alors lavée en faisant passer 2 mL de tampon Phosphate pour éliminer toutes traces de tampon Tris (tampon de lavage de gel filtration). L'ARN est récupéré dans un volume final de 100 à 200 µL et quantifié par mesure de sa DO. IL est directement utilisable pour les expériences d'empreinte en présence de RNases.

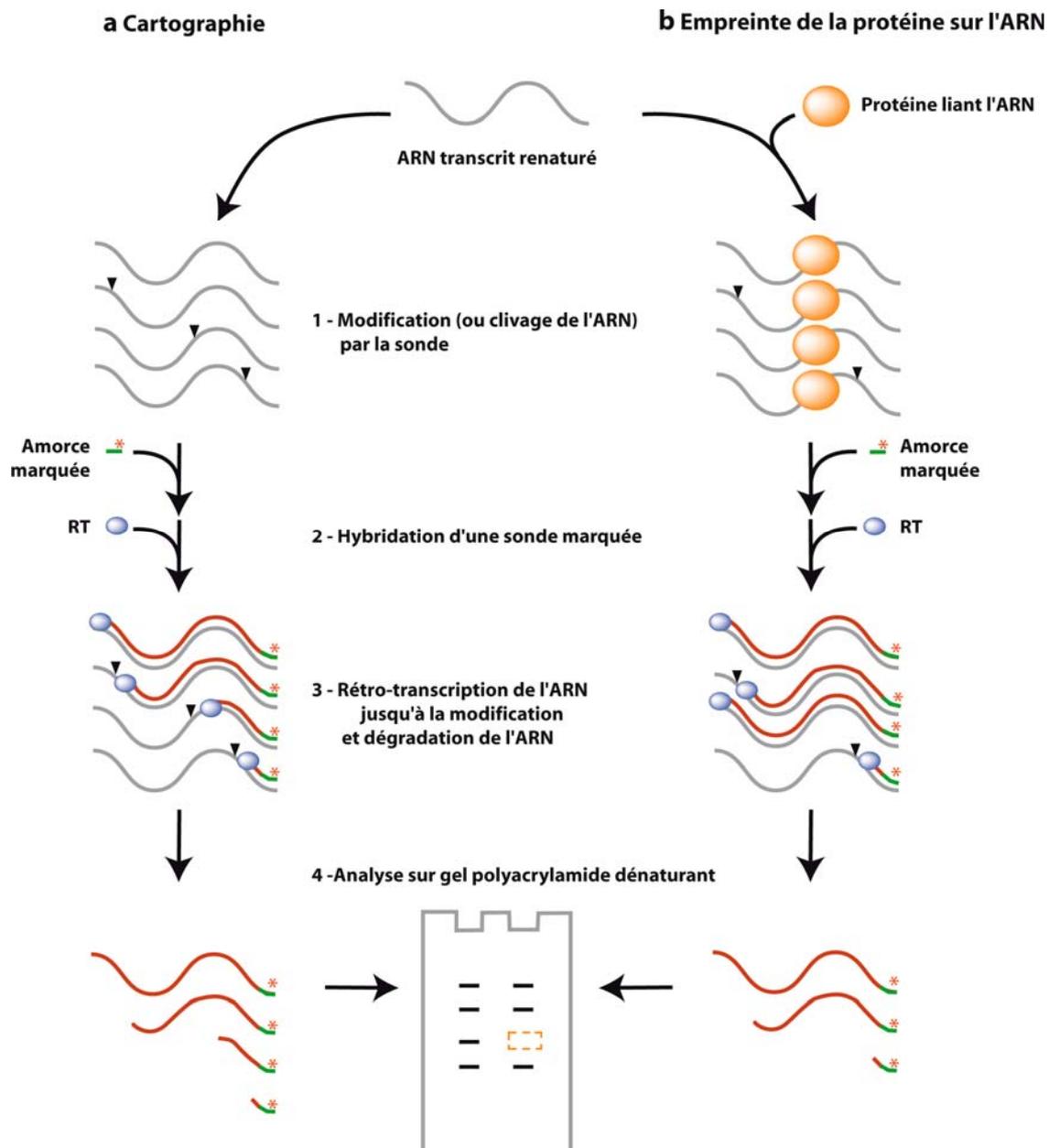


Figure 55 : Principe de la technique de cartographie en solution d'ARN et technique d'empreinte de la protéine sur l'ARN. L'ARN transcrit est renaturé par chauffage suivi d'un refroidissement en présence de $MgCl_2$. (a) Principe de la cartographie en solution. (1) L'ARN est incubé avec des sondes structurales qui le modifient ou le coupent (▼). (2) Après précipitation, une amorce (en vert) marquée radioactivement (*) est hybridée à l'ARN, (3) elle est allongée par la reverse transcriptase (RT, en bleu) jusqu'au site de coupure ou de modification. (4) Après dégradation de l'ARN, les fragments d'ADN rétro-transcrits (en rouge) sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant et révélés par autoradiographie. (b) Principe de détection d'une empreinte de la protéine sur l'ARN. L'ARN est pré-incubé avec une protéine (orange), puis est soumis à l'action des sondes. Les régions de l'ARN en interaction avec la protéine sont protégées. Les ARN modifiés sont alors traités comme dans les expériences de cartographie. La co-migration des expériences de cartographie avec les expériences d'empreinte, révèle la position des protections qui correspondent aux nucléotides de l'ARN localisés à proximité de la protéine dans le complexe (pointillés oranges).

IV. Etudes structurales des ARN

1. Cartographie en solution

La caractérisation de la structure de l'ARN en solution est basée sur l'utilisation de sondes structurales chimiques ou enzymatiques reconnaissant une conformation de l'ARN (simple-brin ou appariée) avec une spécificité de nucléotide ou non (Brunel et Romby, 2000). La stratégie globale de cartographie en solution est résumée dans la Figure 54.a. Les réactions sont optimisées pour produire au plus une coupure (ou une modification) par molécule d'ARN. La réaction est révélée par rétro-transcription à l'aide d'oligonucléotides radio-marqués, suivie d'une séparation sur gel de polyacrylamide.

1.1 Sondes chimiques

Un grand nombre de composés chimiques peuvent être utilisés pour déterminer la structure de l'ARN, en fonction de sa flexibilité (plomb), ou de façon plus fine, en fonction de l'implication ou non des groupements chimiques des bases dans certaines interactions. Le DMS (DiMéthylSulfate) et le CMCT (N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-Méthylmorpholino)-éthyl]-Carbodiimid-4 Toluolsulfonate) appartiennent à cette seconde classe de sondes et révèlent les fonctions N1 des adénines ou N3 des cytosines (DMS) et les fonctions N1 des guanines ou N3 des uridines (CMCT) non-impliquées dans des interactions Watson-Crick. L'ARN purifié sur gel natif (0,5 µg) est renaturé dans l'eau 1 minute à 65°C, refroidi 1 minute dans la glace (limite la formation d'appariements intermoléculaires) et 10 minutes à température ambiante. Les milieux réactionnels varient en fonction du composé utilisé. Pour la cartographie en présence de CMCT, l'ARN (25 ng/µL) est incubé dans un tampon Borate (50 mM borate-NaOH pH 8,0, 5 mM (acétate)₂ de Mg, 15 mM acétate de K, 5 mM β-mercaptoéthanol, 3,2 ng/µL d'ARNt total de levure) en présence de 40 à 600 µg de CMCT (Merck, Schuchardt) pendant 20 minutes à 30°C. En revanche, la cartographie en présence de DMS s'effectue dans un tampon Tris (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 5 mM β-mercaptoéthanol, 3,2 ng/µL d'ARNt total de levure) en présence de 0,25 à 2% de DMS (v/v dilué dans l'éthanol, Acros Organics, Geel) pendant 5 minutes à 30°C. Les réactions sont stoppées par précipitation à l'éthanol en présence de 0,3 M acétate de Na pH 6,0.

1.2 Sondes enzymatiques

La structure de l'ARN peut également être caractérisée au moyen de sondes enzymatiques, des endoribonucléases (RNases) qui reconnaissent spécifiquement les régions simple-brins (RNases S1, T1, T2) ou les régions appariées et structurées (RNase V1).

40 ng/μL d'ARN renaturé sont incubés 10 minutes dans la glace dans 25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,5, 75 mM KCl, 10 mM MgCl₂, en présence de RNase V1 ou T2 (8.10⁻⁴ à 4.10⁻³ U/μL). Les réactions sont arrêtées par ajout d'un volume de solution « Stop » (0,6 mM Acétate de Na pH 6,0, 20 mM EDTA, 6 ng/μL ARNt total de levure, Roche), suivi d'une extraction phénolique et d'une précipitation à l'éthanol.

2. Révélation des cartographies en solution (et séquençages) par rétro-transcription

Les fragments d'ARN produits par cartographie enzymatique, ou la présence des modifications apportées par cartographie chimique, sont détectés par rétro-transcription. Le marquage radioactif des différentes amorces utilisées pour couvrir l'ensemble de la séquence testée est nécessaire à la visualisation des produits (résumé dans la Figure 55).

2.1 Marquage et purification des amorces

100 pmoles d'oligonucléotide sont incubées (volume total de 10 μL) 30 minutes à 37°C en présence de 1 U/μL de polynucléotide kinase T4, de 30 μCi d'ATP-γ³²P (3000 Ci/mmol), dans le tampon de marquage (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTE, 1 mM ATP). La réaction est arrêtée par ajout d'1 volume de bleu « formamide » (80% v/v formamide, 10 mM EDTA, 0, 1% p/v de xylène cyanol et de bleu de bromophénol) et déposée sur gel (0,6 mm d'épaisseur) de polyacrylamide 12 % (acrylamide/bisacrylamide 19/1) dénaturant (8 M urée). La migration est faite à 1500 V pendant 45 minutes. Le marquage est révélé par autoradiographie et la bande correspondant à l'oligonucléotide radioactif intègre est découpée. L'ADN est récupéré par élution passive durant une nuit à 4°C contre 800 μL de tampon d'élution (0,5 M NH₄OAc, 5 mM MgOAc₂, 0,1 mM EDTA, 0,1% SDS) sous agitation vive (1400 rpm). Le matériel élué est précipité à l'éthanol et quantifié par comptage Cerenkov (compteur à scintillation LS6500, Beckman Coulter).

2.2 Extension d'amorce par la rétro-transcriptase

La rétro-transcriptase (RT) est une enzyme isolée de rétrovirus, qui est capable, à partir d'une amorce, de transcrire spécifiquement un brin d'ARN en un brin d'ADN complémentaire. J'ai utilisé la RT du Virus du Myéloblastome Aviaire (AMV) pour révéler les modifications introduites dans l'ARN, mais aussi pour réaliser son séquençage. Le séquençage de la molécule est essentiel pour localiser précisément les coupures et les modifications au cours de l'analyse des gels.

L'ARN modifié est repris dans un volume de 8 μL contenant 100000 cpm d'oligonucléotide marqué (dans de l'eau). L'hybridation des deux molécules se fait par un chauffage de 2 minutes à 95°C, suivi de 2 minutes dans la glace. 2 μL de tampon RTB 5X (250 mM Tris-HCl pH 8,5, 30 mM MgCl_2 , 200 mM KCl) sont ajoutés et le mélange repose 10 minutes à température ambiante. La réaction est initiée par ajout de 5,5 μL de milieu de rétro-transcription ($6 \cdot 10^{-3}$ u/ μL RT, 0,3 mM de chaque dNTP, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 6 mM MgCl_2 , 40 mM KCl). Quatre séquençages de l'ARN sont réalisés en parallèle avec une réaction par nucléotide. Dans ce cas, l'ARN n'a pas été modifié et la rétro-transcription est stoppée statistiquement par la présence dans le milieu réactionnel de didésoxyribonucléotides. La réaction est faite dans les mêmes conditions que précédemment, mais les dNTP sont remplacés par un des quatre mélanges : par exemple, le mélange « ATP » contient 0,5 mM dC/G/TTP, 0,1 mM dATP, 20 μM ddATP. Les réactions sont incubées 30 minutes à 42°C. L'ARN est ensuite dégradé (améliore considérablement la résolution des gels) en ajoutant 5 μL de tampon de dénaturation (1 N NaOH, 10 mM EDTA) et en chauffant 2 minutes à 95°C, suivi d'une incubation de 30 minutes à 42°C. Après extraction phénolique, l'ADN radioactif rétro-transcrit est précipité, repris dans du bleu formamide et quantifié par comptage Cerenkov.

2.3 Séparation des fragments sur gel

La séparation et la visualisation des produits d'extension des amorces radioactives se fait sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. La migration des fragments se fait en présence d'urée et à haute température ce qui permet un dépliage des molécules d'ADN, donc de les séparer selon leur taille. 20000 cpm Cerenkov sont déposés sur un gel de polyacrylamide 12% (acrylamide/bisacrylamide 19/1) dénaturant (8 M urée). La migration est réalisée à 75 W jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol. Le gel est ensuite

démoulé, transféré sur une autoradiographie usagée (soutien le gel) et recouvert d'un film « saran wrap ». Le gel est conservé ainsi à -80 °C et révélé par autoradiographie.

V. Etudes fonctionnelles et structurales des complexes ARN/protéines

1. Expériences de retard sur gel

1.1 Marquage co-transcriptionnel des ARN

Afin de mesurer l'affinité entre l'ARN et la protéine par retard sur gel, l'ARN doit être marqué radioactivement. J'ai choisi un marquage co-transcriptionnel. En effet, la nature particulière de l'ARNm^{AspRS} interdit l'utilisation de protocoles de marquages post-transcriptionnels qui impliquent des étapes de dénaturation de l'ARN à haute température. Ici, l'incorporation uniforme de nucléotides radiomarqués au cours de la transcription *in vitro*, permet d'isoler un ARNm natif structuralement. De plus, cette technique permet l'obtention d'ARN dont l'activité spécifique est très élevée, un pré requis pour faire des expériences de retard sur gel (nécessite des concentrations limitantes en ARN).

La réaction est réalisée dans un volume de 100 µL en présence de 5 µg d'ADN digéré, de 5 µL de CTP- $\alpha^{32}\text{P}$ (10 mCi/mL, Amersham Bioscience), dans un milieu réactionnel identique à celui de la transcription classique (voir III.1), à l'exception de la concentration en CTP qui est réduite à 150 µM (4 mM dans la transcription classique). La réaction est incubée 2 heures à 37°C. Notre choix s'est porté sur l'utilisation du CTP radio-marqué en raison de la distribution homogène du nucléotide dans la molécule (contrairement aux longues répétitions de A trouvées au niveau des régions connectrices de l'ARNm^{AspRS}). Finalement, les ARN radiomarqués sont sommairement purifiés sur des colonnes de dessalage Nap-5TM (Amersham), suivant le même principe d'exclusion de taille que les chromatographies sur gel-filtration.

1.2 Retard sur gel

L'ARN radiomarqué (20000 cpm Cerenkov) est renaturé dans l'eau en chauffant 2 minutes à 95°C et refroidissant 10 minutes à température ambiante. La réaction (interaction ARN/protéine) se fait dans un volume total de 20 µL contenant, outre l'ARN renaturé, 10 mM de MgCl₂, 50 mM de K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,5, 150 mM KCl, 10% glycérol et 40 à 160 ng/µL d'ARNr 5S de *Xenopus leavii* (quantité adaptée en fonction de la concentration de la protéine dans le test). L'AspRS est ajoutée à une concentration variant de 15 à 4000 nM, et le mélange est incubé 20 minutes dans la glace. 15 µL de milieu réactionnel sont déposés sur un gel de polyacrylamide natif 6% (acrylamide/bisacrylamide, 37,5/1) et migrent dans du TBE, 90 minutes à 140 V et à 4°C.

Après migration, le gel est séché et révélé par autoradiographie. La quantification des différentes bandes radiomarquées, correspondant à l'ARN libre et à l'ARN complexé à la protéine, est effectuée sur une station Bioimager Bas 2000 (Fuji) et est exprimée sous la forme de la constante de dissociation (K_d , concentration en protéine permettant de déplacer la moitié de l'ARN libre vers une forme associée à l'enzyme).

Les expériences de compétitions ont été réalisées suivant le même protocole. Toutefois dans ce cas, un ARN compétiteur, non marqué, est ajouté à des concentrations variant de 30 à 8000 nM dans le milieu réactionnel (en plus de l'ARNr 5S). Les résultats sont alors exprimés en constante d'inhibition (K_i , concentration en ARN compétiteur permettant de déplacer la moitié de l'ARN associé à l'enzyme vers une forme libre).

2. Expériences d'empreinte

La mise en évidence d'empreintes spécifiques laissées par une protéine sur un ARN est une autre approche pour caractériser structurellement la formation d'un complexe. Il s'agit d'une variante de la technique de cartographie en solution qui consiste à réaliser la réaction en présence d'une protéine fixée sur l'ARN : dans notre cas l'AspRS complexée à son ARNm. La technique est résumée dans la Figure 55b. La présence de la protéine protège localement l'ARN vis-à-vis des coupures catalysées par les sondes enzymatiques, ce qui conduit à la disparition d'une bande sur le gel lorsqu'on le compare à un contrôle effectué sans protéine. Les propriétés de solubilité particulières de l'ARNm^{AspRS} nous ont uniquement permis l'utilisation des sondes enzymatiques (RNases T2 et V1).

L'ARN (40 ng/ μ L) purifié par UnoQ et gel-filtration a été renaturé et est pré-incubé 10 minutes à 37°C dans le tampon de cartographie (25 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,5, 75 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$) en présence de 8 μ M d'AspRS native. La réaction est initiée en ajoutant les RNases V1 ou T2, et exécutée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour la cartographie en solution en présence de sondes enzymatiques (paragraphe IV.2).

3. Détection de l'aminocyclation des ARNt *in vitro*

3.1 Aspects techniques de la méthode

La méthode d'aminocyclation *in vitro* exploite le caractère acido-précipitable des ARNt, ce qui permet de séparer les aa chargés sur l'ARNt (précipités) des aa libres (solubles). La réaction d'aminocyclation d'un ARNt peut être aisément suivie et quantifiée grâce à l'utilisation d'aa radioactifs. Dans le cas de l'AspRS, l'aspartylation est suivie *in vitro* en quantifiant l'acide L-aspartique tritié (H^3) (814 Gbq/mmol, Amersham Life Science) fixé sur l'ARNt^{Asp}.

Avant chaque réaction, l'ARNt est systématiquement renaturé dans l'eau, en chauffant 2 minutes à 85°C suivi par un refroidissement lent 10 minutes à température ambiante. L'enzyme est préparée dans un tampon de dilution (100 mM HEPES-KOH pH 7,4, 10% glycérol, 1 mM DTE, 5 mg/mL BSA) de façon à obtenir un stock à 10 fois la concentration finale souhaitée. La réaction d'aminocyclation est alors initiée par l'ajout de 5 μ L de solution enzymatique aux 45 μ L de milieu réactionnel (pré-incubé 1 minute à 37°C) contenant 21 μ L d'ARNt renaturé, à différentes concentrations, et 24 μ L du mélange réactionnel contenant 100 mM HEPES-KOH pH 7,4, 30 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 5 mM ATP et 25 μ M d'acide L-aspartique tritié à 4000 cpm/pmol (en conditions limitantes) ou 500 μ M à 200 cpm/pmol (en conditions semi-saturantes). Le milieu d'aminocyclation est plus ou moins limitant en aspartate. En effet, l'affinité de l'AspRS pour son acide aminé étant particulièrement faible (de l'ordre du mM), nous sommes dans l'incapacité de travailler en conditions saturantes ($> 10 K_M$) tout en conservant une activité spécifique d'aspartate tritié suffisante pour suivre la réaction. Cependant, en utilisant 500 μ M d'aspartate dans certaines réactions, nous nous plaçons dans des concentrations comparables à celles qui ont été déterminées dans la levure (Messenguy et al., 1980).

Aux temps voulus, 10 μ L de milieu réactionnel sont prélevés, déposés sur papier Wattman 3MM et l'ARN est précipité dans 5% de TCA (Roth). Les papiers sont lavés 3 fois 10 minutes dans le TCA, suivi d'une déshydratation par rinçage dans l'éthanol. Ils sont séchés et placés dans des fioles de comptage, en présence de 2,5 mL de liquide de scintillation Ecoscint 0TM (National Diagnostics). Le comptage de la radioactivité (compteur à scintillation LS6500, Beckman Coulter) permet de déterminer la quantité d'acide aminé marqué fixé sur l'ARNt entraîné lors de la précipitation. Lorsque l'aa est tritié (comme dans le cas de l'acide aspartique), une correction des valeurs de comptage de

l'activité spécifique (AS) de l'aa libre doit être apportée. Une partie des rayons β du tritium est arrêtée par le papier (contrairement au rayonnement ^{14}C). Cette extinction (« quenching ») est liée à la distribution différentielle de l'ARNt aminoacylé et de l'acide aminé libre dans le papier. En effet, l'ARNt précipité est retenu à la surface du papier, alors que l'acide aminé libre diffuse dans les fibres du papier. L'ampleur de cette extinction est mesurée en comparant des plateaux d'aminocyclation d'ARNt effectués exactement dans les mêmes conditions mais en présence de l'aa tritié ou de l'aa marqué au ^{14}C . Le nombre de pmoles aminoacylées étant identique, il est ainsi possible de quantifier le « quenching » de l'aa tritié. Dans le cas de l'acide aspartique le facteur de correction est de 3,36. (1,9 pour Lys, 3 pour Gly et Thr).

3.2 Exploitation des résultats

Selon les conditions expérimentales (concentrations en ARNt, en aaRS et le temps d'incubation) trois paramètres de la réaction peuvent être déterminés : les constantes cinétiques k_{cat} , K_M ainsi que les plateaux de charge.

- Les plateaux de charge représentent l'équilibre entre la forme aminoacylée et non aminoacylée de l'ARNt. Cet équilibre dépend des vitesses (i) d'aminocyclation, (ii) de déacylations spontanée et enzymatique et (iii) de la réaction inverse. Classiquement, les mesures de plateaux d'aminocyclation sont réalisées avec $1 \mu\text{M}$ d'ARNt et de $0,1$ à $1 \mu\text{M}$ d'enzyme pendant des temps relativement longs (10 à 30 minutes).

- Les mesures cinétiques sont effectuées dans des conditions de vitesses initiales (le produit s'accumule de façon linéaire en fonction du temps). Les constantes K_M et k_{cat} sont déterminées à partir de la représentation en doubles inverses de Lineweaver et Burk :

$$1/v = K_M/V_{\text{max}} \times 1/[S_0] - 1/V_{\text{max}}$$

La constante de Michaelis-Menten (K_M) reflète l'inverse de l'affinité, alors que la vitesse de la réaction est directement reliée au k_{cat} ($V_{\text{max}}/[\text{enzyme}]$), et le rapport k_{cat} / K_M indique l'efficacité catalytique du système. Le rapport (k_{cat} / K_M) sauvage sur (k_{cat} / K_M) mutant représente la perte d'efficacité catalytique (P) du mutant relative au système sauvage. Les conditions de vitesses initiales sont obtenues en présence de concentrations d'ARNt (sauvage ou mutant) de 10^{-3} à 3 fois le K_M et de 10 à 100 nM d'AspRS (1-577), ou de 50 à 200 nM d'AspRS (71-577). Chaque expérience est reproduite au moins trois fois.

3.3 Identification des ARNt aspartylables par oxydation periodique

L'identification des ARNt (présents dans un mélange d'ARNt totaux) reconnus et aspartylés par l'AspRS se fait selon une procédure en 5 étapes résumées dans la Figure 56.

Protection des bases thiolées. De nombreuses modifications d'ARNt contiennent des groupements thiol. Ces fonctions doivent être préalablement protégées contre de l'action du periodate (qui pourrait les modifier). Pour cela, 20000 pmoles d'ARNt total de levure (Roche Molecular Biochemicals) sont incubées 20 minutes à température ambiante dans 25 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,8, en présence de 0,3 mM de DiThioNitroBenzoate (DTNB, Sigma). L'excès de DTNB et le tampon sont éliminés par dialyse contre 2 L d'eau durant la nuit.

Aspartylation des ARNt totaux. Les ARNt dialysés sont précipités et repris à une concentration de 20 μ M (environ 1 μ M d'ARNt^{Asp}) dans un milieu d'aspartylation (100 mM HEPES-KOH pH 7,4, 30 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP) contenant 500 μ M d'acide aspartique froid. La réaction d'aspartylation est incubée 25 minutes à 37°C en présence de 5 μ M d'AspRS (excès de 5 fois par rapport à l'ARNt^{Asp}). La réaction est arrêtée par extraction phénolique des ARNt en conditions acides (pH 5,0). Puis les ARNt sont précipités.

Oxydation des ARNt non aminoacylés. Le ribose 3' terminal des ARNt non-aspartylés est oxydable par l'acide periodique (HIO_4) au niveau de ses fonctions hydroxyles (OH). Lorsque deux groupements OH sont vicinaux et en *cis* comme dans le cas des hydroxyles 2' et 3' du ribose, l'oxydation conduit à la rupture du cycle furane (dans le cas du ribose) et à la formation de deux fonctions aldéhydes.

Les ARNt (80 μ M) sont incubés 25 minutes à température ambiante et à l'obscurité dans 50 mM d'acétate de Na pH 5,0 et en présence de 40 mM d'acide periodique (Sigma). Un large excès (500 fois) d'acide periodique est utilisé en raison de la présence dans le milieu d'ATP et d'AMP provenant de la réaction d'aminocyclation. La réaction est arrêtée par ajout de 5% de glycérol. L'acide periodique et le glycérol sont ensuite éliminés par deux dialyses d'une heure contre 2 L d'acétate de Na 5 mM, pH 5,0, puis les ARNt sont précipités.

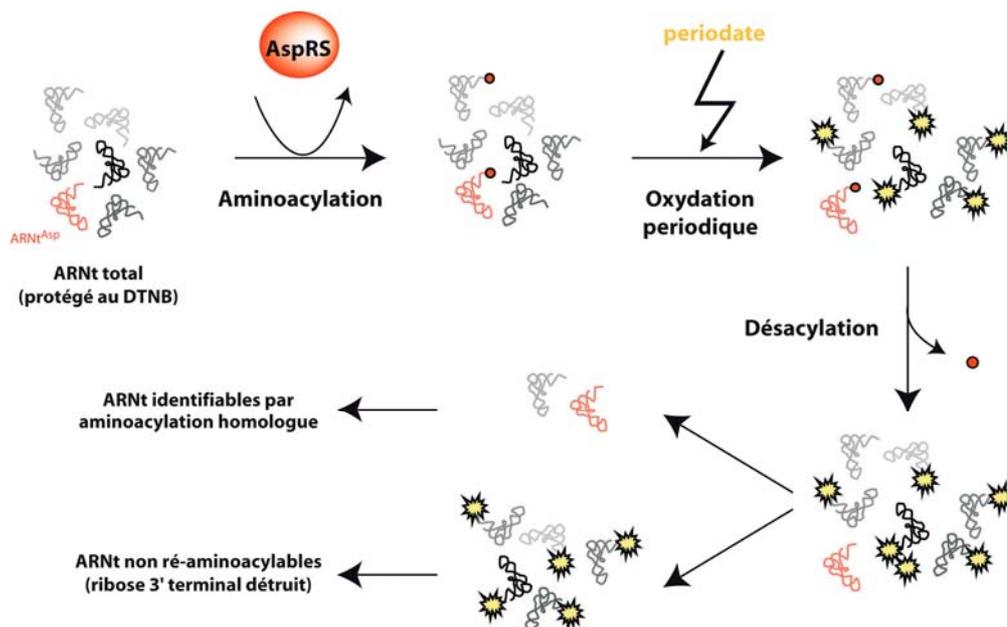


Figure 56 : Identification des ARNt aspartylés par oxydation periodique. Un mélange contenant l'ensemble des ARNt de levure (protégé au DTNB) est incubé en présence d'un excès d'AspRS qui catalyse l'aminocyclation de l'ARNt^{Asp} (rouge) et d'un (ou plusieurs) autre ARNt hétérologue. Les ARNt sont ensuite soumis à l'action du periodate qui détruit le ribose terminal des ARNt non-aminoacylés (*). Après désacylation des ARNt et réduction des fonctions aldéhydes, deux populations d'ARNt sont obtenues : (i) une population dont le ribose terminal est détruit (non aspartylée au départ) et qui n'est pas aminoacylable et (ii) une population dont l'extrémité 3' est restée active (car protégée par une aspartylation initiale) et qui pourra être identifiée par aminoacylation homologue.

Désacylation, déprotection et stabilisation des ARNt. Avant d'identifier les ARNt protégés de l'oxydation périodique (ARNt aspartylés), il est nécessaire d'éliminer les groupements protecteurs (acide aspartique) et de réduire les fonctions aldéhydes formées lors de la destruction du ribose par le periodate. Les ARNt sont désacylés par une incubation de 30 minutes à 37°C en présence 1,8 M de Tris-HCl pH 8,0 et sont précipités. Le pH basique du tampon fragilise la liaison ester entre l'Asp et l'ARNt et le Tris agit comme un accepteur nucléophile prenant en charge l'aa. Une seconde incubation en présence de 0,1 M de DTT pendant 3 heures dans la glace permet de retirer le DTNB des bases thiolées. Les ARNt sont précipités, repris dans de l'eau en présence de 100 mM de NaBH₄, incubés 20 minutes à température ambiante, puis dialysés une nuit contre de l'eau et reprécipités. Ce dernier traitement réduit les fonctions aldéhydes, évitant une altération de la protéine, notamment au niveau des lysines (formation de bases de Schiff).

Identification des ARNt aspartylés. Les échantillons traités contiennent deux populations d'ARNt, selon qu'ils aient été protégés (aspartylés) de l'action du periodate ou non. Les ARNt protégés ont conservé un ribose 3' terminal intègre et sont donc aminoacylables par leur aaRS homologue. Cette aminoacylation est réalisée en présence de l'aa radioactif correspondant (³H ou ¹⁴C) et d'un extrait brut de levure contenant les 20 aaRS. Les réactions d'aminacylation sont réalisées comme décrit dans le paragraphe V.3.a, en présence de 20 µM d'ARNt traité (équivalent à 1 µM de l'isoacceptance testée), de 25 µM d'aa homologue et de 0,15 µg/µL d'extrait brut de levure. Les aa sont marqués au ³H (Asp, Asn, Lys, Gly et Thr) ou au ¹⁴C (Ala, Arg, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr et Val).

La comparaison des plateaux d'aminacylation des ARNt traités au periodate avec (i) les plateaux obtenus pour des ARNt aspartylés et non traités (100% des isoaccepteurs ré-aminoacylables) et (ii) des ARNt non aspartylés et traités (en théorie 0 % des isoaccepteurs ré-aminoacylable) permet de déterminer l'identité et la proportion d'ARNt initialement aminoacylés par l'AspRS.

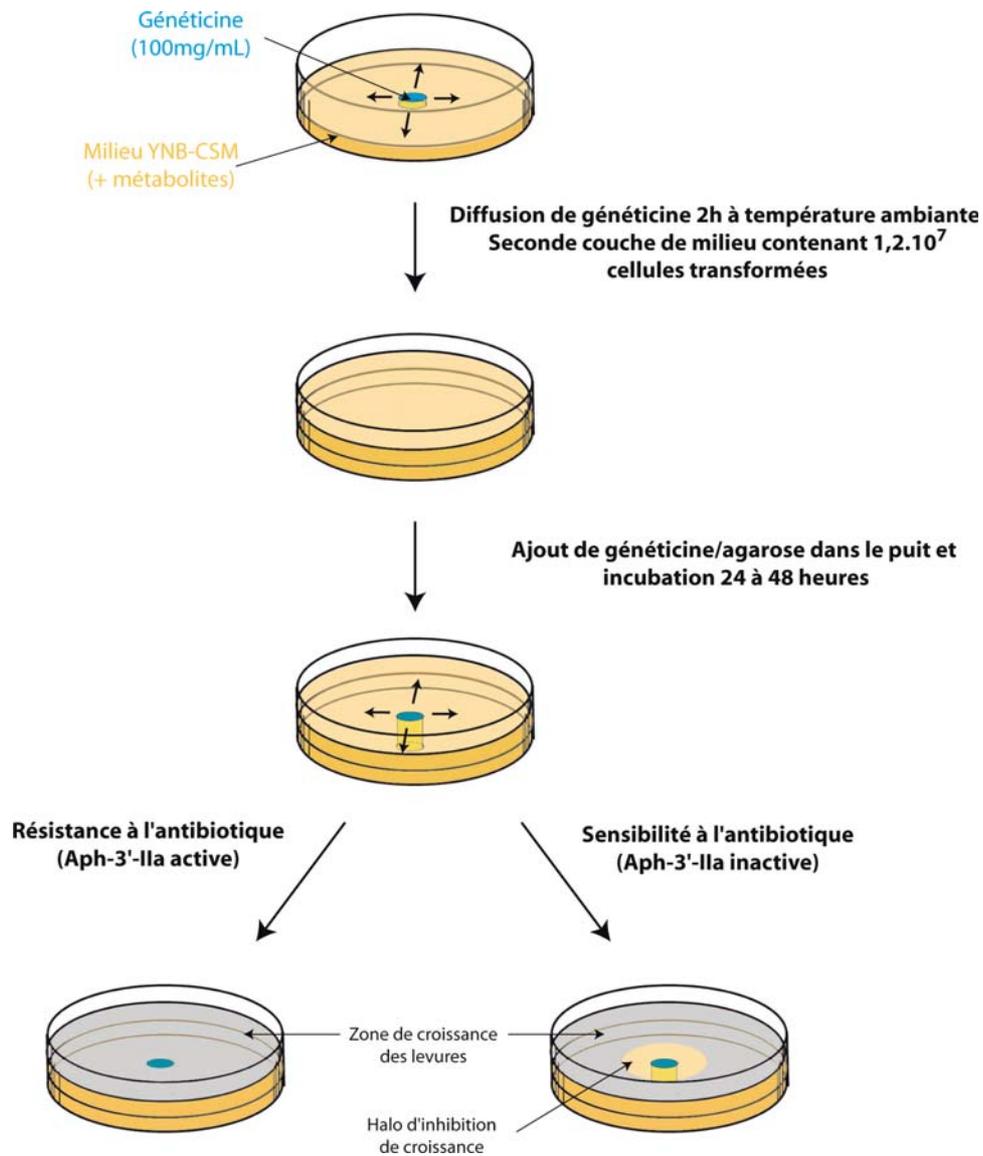


Figure 57 : Mesure de la résistance des levures à la généticine. Dans un premier temps, les boîtes contenant un milieu de culture gélosé sont pré-traitées pendant 2 heures en présence d'une solution de généticine (100 mg/mL). Ces boîtes sont ensuite recouvertes d'une seconde couche de milieu contenant $1,2 \cdot 10^7$ cellules transformées. Une fois le milieu consolidé, le puit est creusé à nouveau et rempli d'une solution gélosée de généticine (100 mg/mL). La généticine diffusera dans le milieu durant les 24 à 48 heures de croissance des levures à 30°C . Si le plasmide introduit dans la levure confère une résistance à la généticine, une croissance homogène est observée sur toute la boîte. En revanche, si la levure est sensible à l'antibiotique, un halo d'inhibition de la croissance des levures apparaît dans la zone où la généticine est la plus concentrée (autour du puit). Le diamètre de ce halo d'inhibition est inversement proportionnel au degré de résistance des levures à l'antibiotique.

VI. Etudes *in vivo*

1. Transformation de levures

La souche de levure utilisée dans nos études est *S.cerevisiae* YBC 603 (*ade::2hisG his3Δ200 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0*). Avant transformation, les levures sont cultivées et rendues compétentes. La souche YBC 603 est inoculée à raison de 0,4 DO/mL (correspond à 2.10^8 cellules issues d'une pré-culture d'une nuit) dans 50 mL de milieu complet YPD (1% extrait de levure, 2% peptone, 2% glucose) et cultivée sous agitation à 30°C. Après environ 5 heures, les cellules sont récoltées par centrifugation à 2500 rpm, lavées deux fois avec 50 mL de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). Les cellules sont reprises dans 2 mL de tampon LiAc/TE (100 mM acétate de Li pH 7,5, 5 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA) et incubées 10 minutes à température ambiante. Les levures compétentes sont transformées en mélangeant 1 µg de plasmide à 100 µL de cellules en présence de 100 µg d'ADN de sperme de saumon et 700 µL de tampon contenant 100 mM acétate de Li pH 7,5, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA et 40% de PEG-3350. Le mélange est incubé 30 minutes à 30°C, puis subit un choc thermique de 7 minutes à 42°C en présence de 88 µL de DMSO. Les cellules transformées sont centrifugées, lavées avec 1 mL de tampon TE, reprises dans 50 µL de tampon TE et étalées sur milieu sélectif.

2. Suivi de la croissance des levures

Les levures YBC 603 transformées par le vecteur pRS416 ([Ura⁺]) sont cultivées dans un milieu minimum (6,7 g/L YNB, 2% de glucose, 0,54 g/L de CSM, 0,02 g/L, Met de 0,02 g/L d'Ade, 0,03g/L d'His, 0,05 g/L de Lys, 0,05 g/L de Trp, 0,1g/L de Leu et 0,08 g/L d'Asp). Le milieu (50 ml) est inoculé avec 2.10^6 cellules/mL (0,1 DO/mL) et incubé à 30°C sous agitation vive (170 rpm). Les courbes de croissance sont établies en suivant la DO_{580nm} , toutes les 2 heures sur une durée totale de 30 heures. Lorsqu'une dilution est nécessaire (DO supérieure à 0,8), celle-ci est réalisée dans 10 mM EDTA. Le rendement en quantité de cellules produites par la culture est déterminé en nombre d'Unité Formant Colonie par mL. Pour cela, 200 µL d'une dilution au 1/50000 sont étalés sur milieu gélosé de composition identique au milieu liquide.

3. Résistance à la généticine

Nous avons mis au point un système rapporteur permettant de mettre en évidence une aspartylation hétérologue éventuelle *in vivo*. Ce système utilise des levures co-transformées par le vecteur pRS416 ([Ura+]) portant le gène de l'AspRS ou vide et le vecteur pRS425 ([Leu+]) portant le gène *aph-3'-IIa* sauvage ou muté (gène de résistance à la généticine). Les expériences sont faites en milieu solide et demandent la préparation minutieuse de boîtes de culture selon un ordre résumé dans la Figure 57. Dans un premier temps, des boîtes contenant du milieu minimum gélosé (même composition que le milieu décrit dans le paragraphe 2 sans Ura et sans Leu) sont préparées. Pour cela un puit de 0,5 cm de diamètre est creusé au centre des boîtes et est rempli d'une solution de généticine à 100 mg/mL. Après 2 heures de diffusion à température ambiante, le puit est vidé et rebouché (avec de l'agarose 1% à bas point de fusion). Dans un second temps, 6 mL de milieu de même composition contenant 1% d'agarose à bas point de fusion sont d'abord inoculés avec $1,2 \cdot 10^7$ cellules transformées (0,6 unité de DO_{580nm}) et ensuite étalés sur les boîtes pré-traitées à la généticine. Une fois la nouvelle couche consolidée, le puit central est réouvert et rempli à nouveau d'une solution d'agarose 1% à bas point de fusion contenant 100 mg/mL de généticine. Après consolidation, les boîtes sont incubées 24 à 48 heures à 30°C dans une étuve saturée en humidité.

4. Immunodétections

La technique de Western-blot permet de détecter directement l'AspRS à l'aide d'un anticorps de lapin anti-AspRS spécifique (don de G. Eriani). Les composants protéiques contenus dans un extrait brut de levure sont d'abord séparés sur gels mono ou bi-dimensionnels. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Immobilon P™ (Millipore) équilibrée avec 50 mM Tris-base, 40 mM Glycine, 0,004% SDS, 20% méthanol (et placée dans un sandwich de 4 feuilles de papier Whatmann imprégnées du même tampon) par transfert semi-sec (Transblot Semi-Dry Transfert Cell, Bio-RAD) pendant 1 heure à 10 V. La membrane est ensuite bloquée pendant au moins 1 heure à température ambiante dans du TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20) contenant 3% de BSA. Elle est rincée deux fois 10 minutes avec du TBST et incubée 2 heures à température ambiante (ou la nuit à 4°C) en présence de l'anticorps primaire anti-AspRS (1/20000 dans TBST). La membrane est encore lavée et incubée 1 heure avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à une peroxidase (dilué au

1/5000 dans TBST). Enfin, après lavages, l'immuno-détection est révélée à l'aide d'un kit ECL™ (Amersham).

La même approche est utilisée pour détecter les glycoprotéines. Dans ce cas, les deux anticorps sont remplacés par la concanavine A couplée à la peroxidase (Sigma) (à une concentration de 1 mg/mL dans du TBST contenant 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂ et 1mM CaCl₂).

La révélation d'une même membrane par différents anticorps est possible et nécessite une étape de « déshybridation » de la membrane par une incubation de 30 minutes à 55°C dans un tampon contenant 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS et 100 mM β-mercaptoéthanol avec une agitation toutes les 5 minutes.

5. Protéomique comparative

La technique de protéomique comparative consiste à séparer l'ensemble des protéines de la cellule en exploitant les propriétés physiques propres à chaque protéine : sa charge nette (reflétée par son pHi) et son poids moléculaire (reflété par son encombrement). Ainsi, après extraction, les protéines sont d'abord séparées par isoélectrofocalisation (première dimension) et ensuite par migration sur gel de polyacrylamide (seconde dimension).

5.1 Préparation des échantillons

Les échantillons correspondent à des culots de cellules provenant, en général, de 10 à 20 mL de culture de levures en phase stationnaire (environ 7 DO/mL). Les culots sont lavés dans du PBS et les protéines sont extraites selon un protocole adapté de Boucherie et collaborateurs.

Dans un premier temps, les cellules sont équilibrées dans du tampon Tris-HCl 100mM pH 8,0 et transférées dans des tubes hermétiques et résistants (type cryotube). Après 10 minutes de centrifugation à 1250g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 60 µL de Tris-HCl 100 mM pH 8,0. Environ 100 µL de billes de verre stériles (0,2 mm de diamètre) sont ajoutés. Les cellules sont alors soumises à 5 cycles de lyse par Fast-prep (FP 120, ThermoSavant). Chaque cycle comprend 30 secondes d'agitation à la vitesse 4, suivi de 3 minutes de repos de l'échantillon dans la glace. Le lysat cellulaire obtenu est additionné de 60µL de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 700 mM β-mercaptoéthanol et 0,6% de SDS) pré-chauffé à 95°C. Le tout est « vortexé » et incubé

30 secondes à 95°C. Après 1 minute de repos dans la glace, l'extrait est mélangé avec 10 µL d'une solution de RNase A (Qiagen) à 0,2 U/µL (dans 500 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM MgCl₂) et 2 µL d'une solution de DNase I à 10 U/µL (dans 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM CaCl₂, 40% glycérol). Après 1 minute d'incubation à température ambiante, les billes sont éliminées par une centrifugation rapide de 5 minutes à 12000g à température ambiante (cette température est nécessaire pour éviter une précipitation du SDS qui entraînerait les protéines dans le culot). Le surnageant est ensuite soumis à une seconde centrifugation de 10 minutes à 12000g, toujours à température ambiante ce qui permet d'éliminer les débris cellulaires résiduels. L'extrait de levure ainsi clarifié est quantifié par la méthode de Bradford, aliquoté par fraction de 300 µg et conservé à -80°C.

5.2 Isoélectrofocalisation (première dimension)

L'isoélectrofocalisation est réalisée sur des bandes de gels présentant un gradient de pH (strip), commercialisées par Bio-Rad. Soumises à un champ électrique, les protéines migrent dans ce strip jusqu'à atteindre une valeur de pH (pHi) correspondant à leur point isoélectrique, c'est à dire le pH où la charge nette de chaque protéine est nulle. Ainsi, cette première dimension permet de séparer l'ensemble des protéines du mélange en fonction de la valeur de leur pHi donc de leur composition en aa.

L'extrait protéique (300 µg pour une coloration au bleu colloïdal ou 15 à 30 µg pour les western-blot), dans un volume de 100 µL, est mélangé à 400 µL de tampon de lyse contenant 9 M d'urée, 2,5 M de thiourée, 5% de CHAPS, 12,5 mM de DTT et 0,5% d'ampholytes porteurs (pH 3-10, Bio-RAD). L'urée et le thiourée dénaturent et solubilisent les protéines en déstructurant les régions ioniques, alors que le DTT permet d'ouvrir les ponts di-sulfures. D'autre part, le CHAPS est un détergent non-ionique qui accroît la solubilité des protéines. Enfin les ampholytes porteurs permettent d'assurer une conductivité uniforme tout le long du strip au cours de la focalisation, sans altérer le gradient de pH. L'échantillon ainsi traité est alors déposé dans une cuve de réhydratation avec un strip de 17 cm de long (pH de 4 à 7, ou de 5 à 8). L'ensemble est recouvert de 3 mL d'huile de paraffine protégeant le strip de la déshydratation et de l'oxydation. L'imprégnation du gel par l'échantillon dure en moyenne 14 à 16 heures et se réalise à 20°C.

Une fois réhydraté, le strip (imprégné de l'échantillon) est débarrassé de son excès d'huile et est disposé sur un plateau d'isoélectrofocalisation avec son côté acide en contact avec l'électrode positive et son côté basique en contact avec l'électrode négative. Le strip est alors recouvert de 3 mL d'huile de paraffine et l'électrofocalisation proprement dite débute (Protean IEF Cell, Bio-RAD). Celle-ci est effectuée à 20°C, à une intensité maximale de 25 μ A/strip et se déroule en plusieurs étapes. Une première migration à 300 V pendant 2 heures permet d'éliminer les sels du gel. Le voltage est ensuite augmenté de manière linéaire pendant 2 heures jusqu'à atteindre 1500 V. Enfin, l'étape de focalisation des protéines s'effectue pendant 16 heures à 3000 V. Une électrofocalisation correcte est indiquée par une quantité de Vhrs (Volt x heures) comprise entre 50000 et 55000. C'est durant cette première dimension que nous avons observé des différences significatives dans la migration des protéines (avec une différence de 0,5 U de pH vers les valeurs acides). Nous pensons que cette variation est la conséquence de la présence de SDS à l'état de traces dans les échantillons ou à un défaut des strips.

5.3 Equilibration des strips

Avant de procéder à la séparation sur gel de polyacrylamide, les strips sont équilibrés 15 minutes dans un tampon contenant 125 mM Tris, 0,1 M HCl, 2,5% SDS, 6 M urée, 30% glycérol et 65 mM de DTT. Cette première étape permet d'ioniser les protéines (par fixation du SDS) et de les réduire. Cependant, une seconde équilibration dans le même tampon, mais contenant en plus 216 mM d'iodo-acétamide, est nécessaire afin d'alkyler le DTT et ainsi de prévenir une ré-oxydation des protéines et l'apparition de traînées verticales gênantes lors de l'analyse des gels.

5.4 Séparation sur gel de polyacrylamide (seconde dimension)

Contrairement aux gels de protéines classiques, les gels utilisés ici n'utilisent pas le bisacrylamide comme agent réticulant mais le PDA (Pipérazine DiAcrylamide) qui confère une plus grande résistance aux gels. Le gel de seconde dimension est un gel (20 x 20 cm) 10% acrylamide, 0,26%PDA, 200 mM Tris-HCl pH 8,1. Le strip équilibré est déposé en haut du gel et est maintenu en place dans une solution à 1% d'agarose à bas point de fusion contenant 200 mM Tris-HCl pH 8,1, 0,4% SDS et 0,1% bleu de bromophénol. La migration s'effectue dans un tampon Tris-Taurine (50 mM Tris-base, 200 mM taurine, 0,1% SDS) pour la cuve supérieure (anode) et un tampon Glycine (50 mM

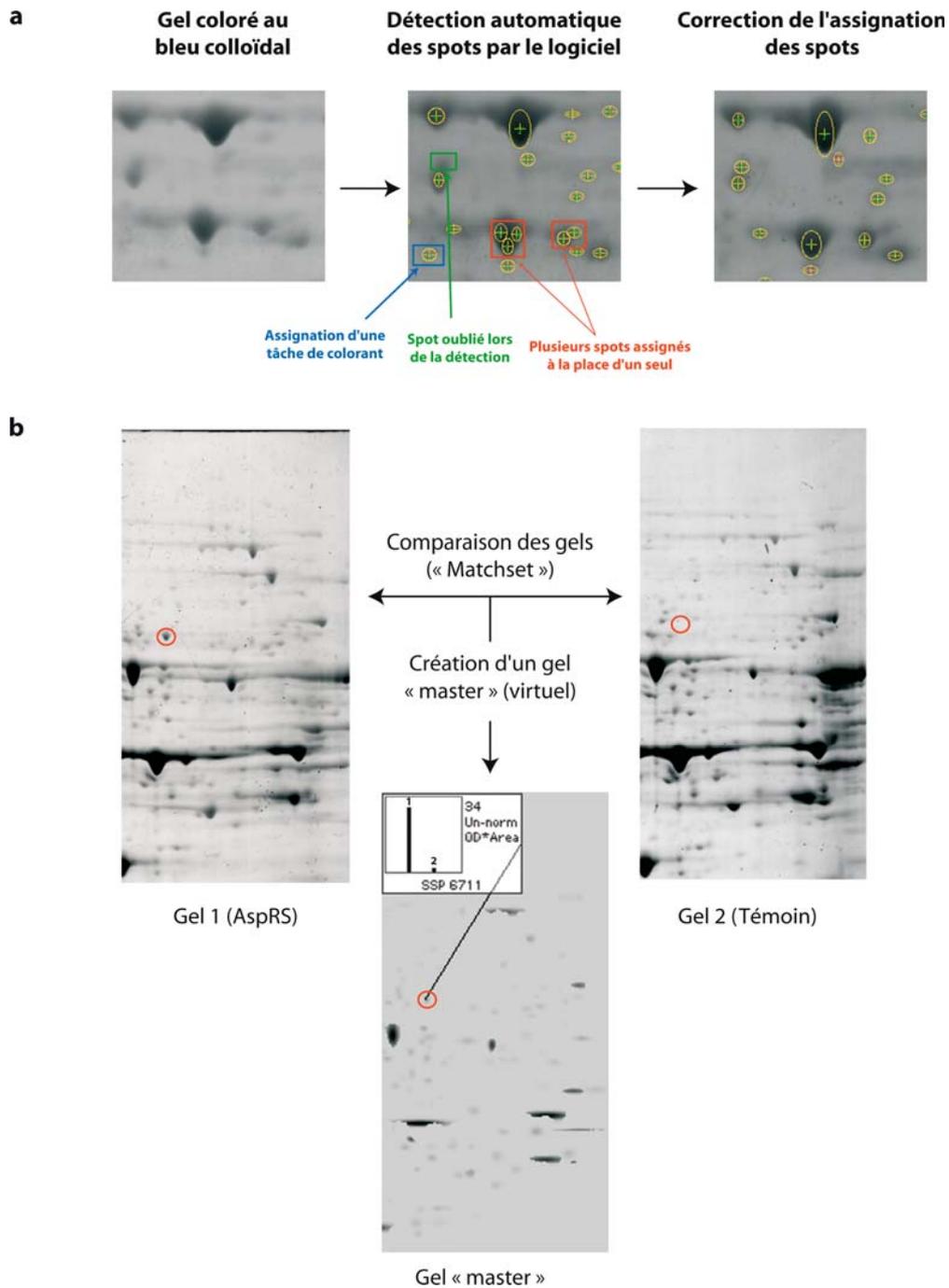


Figure 58 : Exemples d'analyse et de comparaison de gels bidimensionnels (par le logiciel PD-Quest). **(a)** Assignation des spots. A gauche, le gel coloré au bleu colloïdal est scanné (scanner GS-710, Bio-RAD) au format du logiciel PD-Quest (Bio-RAD). Au centre, une fois paramétré, le logiciel détecte automatiquement les spots selon les critères fixés. Cette étape peut conduire à plusieurs types d'erreurs : assignation de plusieurs spots à la place d'un seul (encadré en rouge), assignation d'une poussière ou d'une tâche de colorant (encadré en bleu) voir plus rarement oublié d'un spot (encadré en vert). A droite, après correction des erreurs, le gel est prêt à être comparé à d'autres gels. **(b)** La comparaison de deux gels nécessite la création d'un gel virtuel appelé gel « master ». Ce dernier contient les coordonnées et les intensités de l'ensemble des spots de chaque gel (gels 1 et 2). Ainsi, par exemple, le spot 6711 (encercle en rouge) est surexprimé sur le gel 1 (AspRS) par rapport au gel 2 (témoin).

Tris-base, 400 mM glycine, 0,1% SDS) pour la cuve inférieure (cathode). L'électrophorèse débute par une première phase d'1 heure à 25 V pour permettre aux protéines d'entrer dans le gel en limitant l'apparition de traînées verticales, puis se poursuit par une deuxième phase de 2 heures 30 à 15 W (correspond à la sortie du bleu de bromophénol), ou de 4 heures pour avoir une meilleure résolution de l'AspRS et de ses formes modifiées. L'ensemble de la migration est réalisé en conditions thermostatées permettant d'éviter tout échauffement du gel.

5.5 Coloration des gels au bleu colloïdal

Les gels obtenus ont été révélés soit par coloration directe, soit par Western-blot (décrit dans le paragraphe VI.3). Ici, la technique de coloration au bleu colloïdal présente l'avantage d'être très reproductible d'un gel à l'autre, limitant les écarts d'intensité liés à des artefacts de coloration. Cette méthode a été décrite par Neuhoff et collaborateurs (Neuhoff et al., 1988) et est basée sur la faible solubilité du bleu de Coomassie en conditions acides. Le gel est fixé 2 fois 30 minutes dans 500 mL de solution de fixation (30% éthanol, 2% acide phosphorique). Après 2 rinçages de 10 minutes dans 500 mL d'acide phosphorique à 2%, les gels sont équilibrés 30 minutes dans une solution d'acide phosphorique à 2% contenant 15% (p/v) de sulfate d'ammonium. Cette étape permet d'ouvrir les domaines hydrophobes des protéines pour faciliter l'accessibilité uniforme du colorant. Enfin, 25 mL de bleu de Coomassie brillant G-250 (Sigma) à 0,2% (p/v) dans l'eau sont ajoutés au tampon d'équilibration. L'acidité du gel et du tampon décroît la solubilité du bleu de Coomassie. Seule la fraction soluble peut s'associer aux protéines et le reste du gel reste incolore. La coloration se développe pendant une nuit et atteint un équilibre après 12 à 16 heures d'incubation sous agitation lente. Après ce délai, les spots correspondant aux différentes protéines apparaissent clairement et sont directement caractérisables par spectrométrie de masse. Les gels sont rincés 2 fois 10 minutes dans de l'eau avant d'être scannés en vue de leur analyse.

5.6 Analyses des gels

L'analyse comparative des gels a été menée à l'aide du logiciel PD-Quest (Bio-RAD) et se déroule en plusieurs étapes. La première étape consiste en une détection des spots présents sur le scan du gel. Le logiciel détecte automatiquement les spots selon des critères de taille (minimum et maximum) et d'intensité. Un groupe de coordonnées (x, y et z) est

attribué à chaque spot et définissent sa localisation (x, y) et son intensité (z). Cette opération permet une acquisition rapide des spots, mais peut assigner également de façon erronée des traces de colorant, des poussières, des traînées et des zones de fracture du gel (exemples dans la Figure 58a). Une intervention humaine est donc essentielle pour éliminer manuellement ces spots incorrects. Un second type d'erreur d'assignation résulte de la détection de plusieurs spots en lieu et place d'un seul et nécessite également une intervention manuelle pour les regrouper.

Une fois l'assignation des spots vérifiée et corrigée, les couples de gels sont comparés et superposés par le logiciel pour créer un gel « master » (Figure 58b). Ce dernier sert de référence en faisant correspondre les spots de mêmes coordonnées x, y (même protéine). Cette étape conduit à la création d'un « matchset » faisant apparaître les spots communs aux deux gels et la présence ou l'absence éventuelle de spots sur l'un des gels. Comme précédemment, le logiciel peut commettre un certain nombre d'erreurs au cours de cette étape, principalement liées à la déformation des gels, et nécessite encore une fois une intervention humaine.

Le gel « master » corrigé contient l'ensemble des informations relatives à la position et à l'intensité des spots et permet de visualiser l'augmentation (ou la diminution) de l'expression de certaines protéines d'une souche par rapport à l'autre.

- A**belson, J., Trotta, C.R. et Li, H. (1998) tRNA splicing. *J Biol Chem*, **273**, 12685-12688.
- Acquaviva, C., Ferrara, P., Bossis, G., Brockly, F., Salvat, C., Jariel-Encontre, I. et Piechaczyk, M. (2001) Degradation of cellular et viral Fos proteins. *Biochimie*, **83**, 357-362.
- Agou, F. et Mirande, M. (1997) Aspartyl-tRNA synthetase from rat: in vitro functional analysis of its assembly into the multisynthetase complex. *Eur J Biochem*, **243**, 259-267.
- Agou, F., Yang, Y., Gesquière, J.C., Waller, J.P. et Guittet, E. (1995) Polyanion-induced alpha-helical structure of a synthetic 23-residue peptide representing the lysine-rich segment of the N-terminal extension of yeast cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **34**, 569-576.
- Allen, T.D., Watkins, T., Lindahl, L. et Zengel, J.M. (2004) Regulation of ribosomal protein synthesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, **186**, 5933-5937.
- Ambrogelly, A., Frugier, M., Ibba, M., Söll, D. et Giegé, R. (2005) Transfer RNA recognition by class I lysyl-tRNA synthetase from the Lyme disease pathogen *Borrelia burgdorferi*. *FEBS Lett*, **579**, 2629-2634.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, **431**, 350-355.
- Arnez, J.G. et Moras, D. (1997) Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci*, **22**, 211-216.
- Arnez, J.G. et Steitz, T.A. (1996) Crystal structures of three misacylating mutants of *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP. *Biochemistry*, **35**, 14725-14733.
- Auffinger, P. et Westhof, E. (2001) An extended structural signature for the tRNA anticodon loop. *RNA*, **7**, 334-341.
- Augustin, M.A., Reichert, A.S., Betat, H., Huber, R., Mörl, M. et Steegborn, C. (2003) Crystal structure of the human CCA-adding enzyme: insights into template-independent polymerization. *J Mol Biol*, **328**, 985-994.
- Azad, A.K., Stanford, D.R., Sarkar, S. et Hopper, A.K. (2001) Role of nuclear pools of aminoacyl-tRNA synthetases in tRNA nuclear export. *Mol Biol Cell*, **12**, 1381-1392.

- B**abitzke, P. (2004) Regulation of transcription attenuation and translation initiation by allosteric control of an RNA-binding protein: the *Bacillus subtilis* TRAP protein. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 132-139.
- Bag, J. (2001) Feedback inhibition of poly(A)-binding protein mRNA translation. A possible mechanism of translation arrest by stalled 40 S ribosomal subunits. *J Biol Chem*, **276**, 47352-47360.
- Bagni, C. et Greenough, W.T. (2005) From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 376-387.
- Baick, J.-W., Yoon, J.-H., Namgoong, S., Söll, D., Kim, S.-I., Eom, S.-H. et Hong, K.-W. (2004) Growth inhibition of *Escherichia coli* during heterologous expression of *Bacillus subtilis* glutamyl-tRNA synthetase that catalyzes the formation of mischarged glutamyl-tRNA^{Gln}. *J Microbiol*, **42**, 111-116.

- Balaban, N. et Novick, R.P. (1995) Translation of RNAlII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. *FEMS Microbiol Lett*, **133**, 155-161.
- Barends, S., Bink, H.H.J., Worm, S.H.E.v.d., Pleij, C.W.A. et Kraal, B. (2003) Entrapping ribosomes for viral translation: tRNA mimicry as a molecular Trojan horse. *Cell*, **112**, 123-129.
- Barends, S., Rudinger-Thirion, J., Florentz, C., Giegé, R., Pleij, C.W.A. et Kraal, B. (2004) tRNA-like structure regulates translation of Brome mosaic virus RNA. *J Virol*, **78**, 4003-4010.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- Batey, R.T., Gilbert, S.D. et Montange, R.K. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature*, **432**, 411-415.
- Becker, H.D., Giegé, R. et Kern, D. (1996) Identity of prokaryotic and eukaryotic tRNA(Asp) for aminoacylation by aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, **35**, 7447-7458.
- Becker, H.D., Min, B., Jacobi, C., Racznik, G., Pelaschier, J., Roy, H., Klein, S., Kern, D. et Söll, D. (2000) The heterotrimeric *Thermus thermophilus* Asp-tRNA(Asn) amidotransferase can also generate Gln-tRNA(Gln). *FEBS Lett*, **476**, 140-144.
- Belkum, A.v., Abrahams, J.P., Pleij, C.W. et Bosch, L. (1985) Five pseudoknots are present at the 204 nucleotides long 3' noncoding region of tobacco mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Res*, **13**, 7673-7686.
- Benito, Y., Kolb, F.A., Romby, P., Lina, G., Etienne, J. et Vandenesch, F. (2000) Probing the structure of RNAlII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. *RNA*, **6**, 668-679.
- Bhattacharya, S., Giordano, T., Brewer, G. et Malter, J.S. (1999) Identification of AUF-1 ligands reveals vast diversity of early response gene mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1464-1472.
- Blaise, M., Becker, H.D., Lapointe, J., Cambillau, C., Giegé, R. et Kern, D. (2005) Glu-Q-tRNA^{Asp} synthetase coded by the *yadB* gene, a new paralog of aminoacyl-tRNA synthetase that Glutamylates tRNA^{Asp} anticodon. *Biochimie*, **in press**.
- Blight, S.K., Larue, R.C., Mahapatra, A., Longstaff, D.G., Chang, E., Zhao, G., Kang, P.T., Green-Church, K.B., Chan, M.K. et Krzycki, J.A. (2004) Direct charging of tRNA(CUA) with pyrrolysine in vitro and in vivo. *Nature*, **431**, 333-335.
- Blomberg, P., Nordström, K. et Wagner, E.G. (1992) Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J*, **11**, 2675-2683.
- Blomberg, P., Wagner, E.G. et Nordström, K. (1990) Control of replication of plasmid R1: the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically in vivo and in vitro by RNase III. *EMBO J*, **9**, 2331-2340.
- Bonnefond, L., Giegé, R. et Rudinger-Thirion, J. (2005) Evolution of the tRNA^{Tyr}/TyrRS aminoacylation systems. *Biochimie*, **in press**.
- Bottoni, A., Piccin, D., Tagliati, F., Luchin, A., Zatelli, M.C. et Uberti, E.C.d. (2005) miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*, **204**, 280-285.
- Boucherie, H., Dujardin, G., Kermorgant, M., Monribot, C., Slonimski, P. et Perrot, M. (1995) Two-dimensional protein map of *Saccharomyces cerevisiae*: construction of a gene-protein index. *Yeast*, **11**, 601-613.

- Brescia, C.C. et Sledjeski, D.D. (2003) We are Legion: Noncoding Regulatory RNAs and Hfq. In Barciszewski, J. et Erdmann, V.A. (eds.), *Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine*. Landes Bioscience.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Wimberly, B.T. et Ramakrishnan, V. (2002) Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J Mol Biol*, **316**, 725-768.
- Brunel, C. et Romby, P. (2000) Probing RNA structure and RNA-ligand complexes with chemical probes. *Methods Enzymol*, **318**, 3-21.
- Burks, J., Zwieb, C., Müller, F., Wower, I. et Wower, J. (2005) Comparative 3-D modeling of tmRNA. *BMC Mol Biol*, **6**, 14.

- C**ahuzac, B., Berthonneau, E., Birlirakis, N., Guittet, E. et Mirande, M. (2000) A recurrent RNA-binding domain is appended to eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *EMBO J*, **19**, 445-452.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. et Croce, C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15524-15529.
- Cavarelli, J., Rees, B., Ruff, M., Thierry, J.C. et Moras, D. (1993) Yeast tRNA(Asp) recognition by its cognate class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Nature*, **362**, 181-184.
- Cerretti, D.P., Mattheakis, L.C., Kearney, K.R., Vu, L. et Nomura, M. (1988) Translational regulation of the *spc* operon in *Escherichia coli*. Identification and structural analysis of the target site for S8 repressor protein. *J Mol Biol*, **204**, 309-329.
- Charron, C., Roy, H., Blaise, M., Giegé, R. et Kern, D. (2003) Non-discriminating and discriminating aspartyl-tRNA synthetases differ in the anticodon-binding domain. *EMBO J*, **22**, 1632-1643.
- Chen, J.-L. et Greider, C.W. (2005) Functional analysis of the pseudoknot structure in human telomerase RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8080-8085; discussion 8077-8089.
- Chen, S., Zhang, A., Blyn, L.B. et Storz, G. (2004) MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **186**, 6689-6697.
- Chen, X.J. et Fukuhara, H. (1988) A gene fusion system using the aminoglycoside 3'-phosphotransferase gene of the kanamycin-resistance transposon Tn903: use in the yeast *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **69**, 181-192.
- Choi, H., Gabriel, K., Schneider, J., Otten, S. et McClain, W.H. (2003) Recognition of acceptor-stem structure of tRNA(Asp) by *Escherichia coli* aspartyl-tRNA synthetase. *RNA*, **9**, 386-393.
- Choonee, N., Even, S., Zig, L. et Putzer, H. (10-13 Octobre 2004) Régulation de l'expression de l'opéron ribosomique *infC-rpmI-rplT* chez *B.subtilis*. *5ème Rencontre sifrARN: ARN, le nouveau monde.*, Arcachon.
- Cobucci-Ponzano, B., Rossi, M. et Moracci, M. (2005) Recoding in archaea. *Mol Microbiol*, **55**, 339-348.
- Colas, B. et Boulanger, Y. (1983) Glycosylation of yeast aspartyl-tRNA synthetase. Affinity labelling by glucose and glucose 6-phosphate. *FEBS Lett*, **163**, 175-180.

- Crepin, T., Schmitt, E., Blanquet, S. et Mechulam, Y. (2004) Three-dimensional structure of methionyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus abyssi*. *Biochemistry*, **43**, 2635-2644.
- Cullen, B.R. (2004) Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*, **16**, 861-865.
- Cusack, S., Härtle, M. et Leberman, R. (1991) Sequence, structural and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res*, **19**, 3489-3498.
- Cusack, S., Yaremchuk, A., Krikiliviy, I. et Tukalo, M. (1998) tRNA(Pro) anticodon recognition by *Thermus thermophilus* prolyl-tRNA synthetase. *Structure*, **6**, 101-108.
- Cusack, S., Yaremchuk, A. et Tukalo, M. (1996) The crystal structure of the ternary complex of *T.thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA(Ser) and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site. *EMBO J*, **15**, 2834-2842.

- D**ahlberg, J. et Lund, E. (2005) tRNA Turnaround. *Mol Cell*, **19**, 292-294.
- Darnell, J.C., Jensen, K.B., Jin, P., Brown, V., Warren, S.T. et Darnell, R.B. (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, **107**, 489-499.
- Deinert, K., Fasiolo, F., Hurt, E.C. et Simos, G. (2001) Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J Biol Chem*, **276**, 6000-6008.
- Delarue, M., Poterszman, A., Nikonov, S., Garber, M., Moras, D. et Thierry, J.C. (1994) Crystal structure of a prokaryotic aspartyl tRNA-synthetase. *EMBO J*, **13**, 3219-3229.
- Delihias, N. et Forst, S. (2001) MicF: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J Mol Biol*, **313**, 1-12.
- Dock-Bregeon, A.-C., Rees, B., Torres-Larios, A., Bey, G., Caillet, J. et Moras, D. (2004) Achieving error-free translation; the mechanism of proofreading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution. *Mol Cell*, **16**, 375-386.
- Dreher, T.W., Florentz, C. et Giege, R. (1988) Valylation of tRNA-like transcripts from cloned cDNA of turnip yellow mosaic virus RNA demonstrate that the L-shaped region at the 3' end of the viral RNA is not sufficient for optimal aminoacylation. *Biochimie*, **70**, 1719-1727.
- Dumas, P., Moras, D., Florentz, C., Giegé, R., Verlaan, P., Belkum, A.V. et Pleij, C.W. (1987) 3-D graphics modelling of the tRNA-like 3'-end of turnip yellow mosaic virus RNA: structural and functional implications. *J Biomol Struct Dyn*, **4**, 707-728.

- E**iler, S., Dock-Bregeon, A., Moulinier, L., Thierry, J.C. et Moras, D. (1999) Synthesis of aspartyl-tRNA(Asp) in *Escherichia coli*--a snapshot of the second step. *EMBO J*, **18**, 6532-6541.
- Ejiri, S.-i. (2002) Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 1-21.

- Eriani, G., Cavarelli, J., Martin, F., Dirheimer, G., Moras, D. et Gangloff, J. (1993) Role of dimerization in yeast aspartyl-tRNA synthetase and importance of the class II invariant proline. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10816-10820.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. et Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347**, 203-206.
- Escalante, C. et Yang, D.C. (1993) Expression of human aspartyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*. Functional analysis of the N-terminal putative amphiphilic helix. *J Biol Chem*, **268**, 6014-6023.
- Even, S., Pellegrini, O., Zig, L., Labas, V., Vinh, J., Bréchemmier-Baey, D. et Putzer, H. (2005) Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B.subtilis* with functional homology to *E.coli* RNase E. *Nucleic Acids Res*, **33**, 2141-2152.

- F**echter, P., Giegé, R. et Rudinger-Thirion, J. (2001a) Specific tyrosylation of the bulky tRNA-like structure of brome mosaic virus RNA relies solely on identity nucleotides present in its amino acid-accepting domain. *J Mol Biol*, **309**, 387-399.
- Fechter, P., Rudinger-Thirion, J., Florentz, C. et Giegé, R. (2001b) Novel features in the tRNA-like world of plant viral RNAs. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 1547-1561.
- Felden, B., Florentz, C., McPherson, A. et Giegé, R. (1994) A histidine accepting tRNA-like fold at the 3'-end of satellite tobacco mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2882-2886.
- Felden, B., Florentz, C., Westhof, E. et Giegé, R. (1993) Non-canonical substrates of aminoacyl-tRNA synthetases: the tRNA-like structure of brome mosaic virus genomic RNA. *Biochimie*, **75**, 1143-1157.
- Felden, B., Florentz, C., Westhof, E. et Giegé, R. (1998) Transfer RNA identity rules and conformation of the tyrosine tRNA-like domain of BMV RNA imply additional charging by histidine and valine. *Biochem Biophys Res Commun*, **243**, 426-434.
- Feng, L., Yuan, J., Toogood, H., Tumbula-Hansen, D. et Söll, D. (2005) Aspartyl-tRNA synthetase requires a conserved proline in the anticodon-binding loop for tRNA(Asn) recognition in vivo. *J Biol Chem*, **280**, 20638-20641.
- Ferré-D'Amaré, A.R. (2003) RNA-modifying enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 49-55.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A. et Pillai, R.S. (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 331-341.
- Franch, T., Petersen, M., Wagner, E.G., Jacobsen, J.P. et Gerdes, K. (1999) Antisense RNA regulation in prokaryotes: rapid RNA/RNA interaction facilitated by a general U-turn loop structure. *J Mol Biol*, **294**, 1115-1125.
- Francklyn, C., Musier-Forsyth, K. et Martinis, S.A. (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and disease: new evidence for structural and functional diversity in an ancient family of enzymes. *RNA*, **3**, 954-960.
- Francklyn, C. et Schimmel, P. (1989) Aminoacylation of RNA minihelices with alanine. *Nature*, **337**, 478-481.
- Freedman, L.P., Zengel, J.M., Archer, R.H. et Lindahl, L. (1987) Autogenous control of the S10 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: genetic dissection of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6516-6520.
- Frugier, M., Florentz, C. et Giegé, R. (1992) Anticodon-independent aminoacylation of an RNA minihelix with valine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3990-3994.

- Frugier, M. et Giegé, R. (2003) Yeast aspartyl-tRNA synthetase binds specifically its own mRNA. *J Mol Biol*, **331**, 375-383.
- Frugier, M., Moulinier, L. et Giegé, R. (2000) A domain in the N-terminal extension of class IIb eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases is important for tRNA binding. *EMBO J*, **19**, 2371-2380.
- Frugier, M., Söll, D., Giegé, R. et Florentz, C. (1994) Identity switches between tRNAs aminoacylated by class I glutamyl- and class II aspartyl-tRNA synthetases. *Biochemistry*, **33**, 9912-9921.
- Fukai, S., Nureki, O., Sekine, S., Shimada, A., Tao, J., Vassylyev, D.G. et Yokoyama, S. (2000) Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-isoleucine and L-threonine by the complex of tRNA(Val) and valyl-tRNA synthetase. *Cell*, **103**, 793-803.
- Fukai, S., Nureki, O., Sekine, S.-I., Shimada, A., Vassylyev, D.G. et Yokoyama, S. (2003) Mechanism of molecular interactions for tRNA(Val) recognition by valyl-tRNA synthetase. *RNA*, **9**, 100-111.

- G**alani, K., Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E.C. et Simos, G. (2001) The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J*, **20**, 6889-6898.
- Gendrel, A.-V. et Colot, V. (2005) Arabidopsis epigenetics: when RNA meets chromatin. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 142-147.
- Gerdes, K., Rasmussen, P.B. et Molin, S. (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3116-3120.
- Geslain, R. et Pouplana, L.R.d. (2004) Regulation of RNA function by aminoacylation and editing? *Trends Genet*, **20**, 604-610.
- Giegé, R., Florentz, C., Kern, D., Gangloff, J., Eriani, G. et Moras, D. (1996) Aspartate identity of transfer RNAs. *Biochimie*, **78**, 605-623.
- Giegé, R. et Frugier, M. (2003) Transfer RNA structure and identity. In Lapointe, J. et Brakier-Gringas, L. (eds.), *Translation mechanisms*. Landes Sciences, Georgetown, TX.
- Giegé, R. et Rees, B. (2005) The Aspartyl-tRNA Synthétases. In Ibba, M., Francklyn, C. et Cusack, S. (eds.), *The Aminoacyl-tRNA Synthétases*. Landes Bioscience, pp. 210-226.
- Graffe, M., Dondon, J., Caillet, J., Romby, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B. et Springer, M. (1992) The specificity of translational control switched with transfer RNA identity rules. *Science*, **255**, 994-996.
- Greenblatt, J., McLimont, M. et Hanly, S. (1981) Termination of transcription by nusA gene protein of Escherichia coli. *Nature*, **292**, 215-220.
- Grice, S.F.J.L. (2003) "In the beginning": initiation of minus strand DNA synthesis in retroviruses and LTR-containing retrotransposons. *Biochemistry*, **42**, 14349-14355.
- Grosjean, H. et Benne, R. (1998) *Modification and Editing of RNA*. ASM Press, Washington.
- Grundy, F.J. et Henkin, T.M. (2004) Kinetic analysis of tRNA-directed transcription antitermination of the Bacillus subtilis glyQS gene in vitro. *J Bacteriol*, **186**, 5392-5399.

- Grundy, F.J., Winkler, W.C. et Henkin, T.M. (2002) tRNA-mediated transcription antitermination in vitro: codon-anticodon pairing independent of the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11121-11126.
- Grundy, F.J., Yousef, M.R. et Henkin, T.M. (2005) Monitoring uncharged tRNA during transcription of the *Bacillus subtilis* glyQS gene. *J Mol Biol*, **346**, 73-81.
- Guillier, M., Allemand, F., Dardel, F., Royer, C.A., Springer, M. et Chiaruttini, C. (2005) Double molecular mimicry in *Escherichia coli*: binding of ribosomal protein L20 to its two sites in mRNA is similar to its binding to 23S rRNA. *Mol Microbiol*, **56**, 1441-1456.
- Guillier, M., Allemand, F., Raibaud, S., Dardel, F., Springer, M. et Chiaruttini, C. (2002) Translational feedback regulation of the gene for L35 in *Escherichia coli* requires binding of ribosomal protein L20 to two sites in its leader mRNA: a possible case of ribosomal RNA-messenger RNA molecular mimicry. *RNA*, **8**, 878-889.
- Gunasekera, N., Lee, S.W., Kim, S., Musier-Forsyth, K. et Arriaga, E. (2004) Nuclear localization of aminoacyl-tRNA synthetases using single-cell capillary electrophoresis laser-induced fluorescence analysis. *Anal Chem*, **76**, 4741-4746.
- Gutierrez-Preciado, A., Jensen, R.A., Yanofsky, C. et Merino, E. (2005) New insights into regulation of the tryptophan biosynthetic operon in Gram-positive bacteria. *Trends Genet*, **21**, 432-436.
- Gutmann, S., Haebel, P.W., Metzinger, L., Sutter, M., Felden, B. et Ban, N. (2003) Crystal structure of the transfer-RNA domain of transfer-messenger RNA in complex with SmpB. *Nature*, **424**, 699-703.

- H**all, K.B., Sampson, J.R., Uhlenbeck, O.C. et Redfield, A.G. (1989) Structure of an unmodified tRNA molecule. *Biochemistry*, **28**, 5794-5801.
- Hanner, M., Mayer, C., Köhrer, C., Golderer, G., Gröbner, P. et Piendl, W. (1994) Autogenous translational regulation of the ribosomal MvaL1 operon in the archaeobacterium *Methanococcus vannielii*. *J Bacteriol*, **176**, 409-418.
- Hao, S., Sharp, J.W., Ross-Inta, C.M., McDaniel, B.J., Anthony, T.G., Wek, R.C., Cavener, D.R., McGrath, B.C., Rudell, J.B., Koehnle, T.J. et Gietzen, D.W. (2005) Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science*, **307**, 1776-1778.
- Harfe, B.D. (2005) MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 410-415.
- Hauenstein, S., Zhang, C.-M., Hou, Y.-M. et Perona, J.J. (2004) Shape-selective RNA recognition by cysteinyl-tRNA synthetase. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1134-1141.
- Helm, M., Brulé, H., Friede, D., Giegé, R., Pütz, D. et Florentz, C. (2000) Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA*, **6**, 1356-1379.
- Hema, M., Gopinath, K. et Kao, C. (2005) Repair of the tRNA-like CCA sequence in a multipartite positive-strand RNA virus. *J Virol*, **79**, 1417-1427.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. et Andrews, N.C. (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, **117**, 285-297.
- Hjalt, T.A. et Wagner, E.G. (1995) Bulged-out nucleotides protect an antisense RNA from RNase III cleavage. *Nucleic Acids Res*, **23**, 571-579.
- Hon, W.C., McKay, G.A., Thompson, P.R., Sweet, R.M., Yang, D.S., Wright, G.D. et Berghuis, A.M. (1997) Structure of an enzyme required for aminoglycoside

- antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. *Cell*, **89**, 887-895.
- Hou, Y.-M. et Schimmel, P. (1988) A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature*, **333**, 140-145.
- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Benito, Y., Geissmann, T., Namane, A., Lina, G., Etienne, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Jacquier, A., Vandenesch, F. et Romby, P. (2005) Staphylococcus aureus RNAPIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO J*, **24**, 824-835.

- I**bba, M. et Soll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, **69**, 617-650.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A. et Cook, P.R. (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*, **293**, 1139-1142.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A. et Cook, P.R. (2004) The case for nuclear translation. *J Cell Sci*, **117**, 5713-5720.
- Isel, C., Ehresmann, C., Keith, G., Ehresmann, B. et Marquet, R. (1995) Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer). *J Mol Biol*, **247**, 236-250.

- J**aeger, S., Barends, S., Giegé, R., Eriani, G. et Martin, F. (2005) Expression of metazoan replication-dependent histone genes. *Biochimie*, **in press**.
- Jenner, L., Romby, P., Rees, B., Schulze-Briese, C., Springer, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Moras, D., Yusupova, G. et Yusupov, M. (2005) Translational operator of mRNA on the ribosome: how repressor proteins exclude ribosome binding. *Science*, **308**, 120-123.
- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Padova, F.D., Lin, S.-C., Gram, H. et Han, J. (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*, **120**, 623-634.
- Johansson, J. et Cossart, P. (2003) RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol*, **11**, 280-285.
- Joshi, R.L., Chapeville, F. et Haenni, A.L. (1985) Conformational requirements of tobacco mosaic virus RNA for aminoacylation and adenylation. *Nucleic Acids Res*, **13**, 347-354.
- Joshi, R.L., Joshi, S., Chapeville, F. et Haenni, A.L. (1983) tRNA-like structures of plant viral RNAs: conformational requirements for adenylation and aminoacylation. *EMBO J*, **2**, 1123-1127.

- K**aminska, M., Denziak, M., Kerjan, P., Barciszewski, J. et Mirande, M. (2000) A recurrent general RNA binding domain appended to plant methionyl-tRNA synthetase acts as a cis-acting cofactor for aminoacylation. *EMBO J*, **19**, 6908-6917.
- Kaminska, M., Shalak, V. et Mirande, M. (2001) The appended C-domain of human methionyl-tRNA synthetase has a tRNA-sequestering function. *Biochemistry*, **40**, 14309-14316.

- Kern, D., Lorber, B., Boulanger, Y. et Giegé, R. (1985) A peculiar property of aspartyl-tRNA synthetase from baker's yeast: chemical modification of the protein by the enzymatically synthesized aminoacyl adenylate. *Biochemistry*, **24**, 1321-1332.
- Kim, S.H., Sussman, J.L., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Wang, A.H., Seeman, N.C. et Rich, A. (1974) The general structure of transfer RNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 4970-4974.
- Ko, Y.-G., Park, H. et Kim, S. (2002) Novel regulatory interactions and activities of mammalian tRNA synthetases. *Proteomics*, **2**, 1304-1310.
- Ko, Y.G., Kang, Y.S., Kim, E.K., Park, S.G. et Kim, S. (2000) Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *J Cell Biol*, **149**, 567-574.
- Kolb, F.A., Engdahl, H.M., Slagter-Jäger, J.G., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Westhof, E., Wagner, E.G. et Romby, P. (2000a) Progression of a loop-loop complex to a four-way junction is crucial for the activity of a regulatory antisense RNA. *EMBO J*, **19**, 5905-5915.
- Kolb, F.A., Malmgren, C., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Wagner, E.G. et Romby, P. (2000b) An unusual structure formed by antisense-target RNA binding involves an extended kissing complex with a four-way junction and a side-by-side helical alignment. *RNA*, **6**, 311-324.
- Kolb, F.A., Westhof, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Wagner, E.G. et Romby, P. (2001a) Four-way junctions in antisense RNA-mRNA complexes involved in plasmid replication control: a common theme? *J Mol Biol*, **309**, 605-614.
- Kolb, F.A., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Wagner, E.G. et Romby, P. (2001b) Bulged residues promote the progression of a loop-loop interaction to a stable and inhibitory antisense-target RNA complex. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3145-3153.
- Kraft, A., Lutz, C., Lingenhel, A., Gröbner, P. et Piendl, W. (1999) Control of ribosomal protein L1 synthesis in mesophilic and thermophilic archaea. *Genetics*, **152**, 1363-1372.
- Krol, A. (2002) Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. *Biochimie*, **84**, 765-774.

- L**ai, E.C. (2005) miRNAs: whys and wherefores of miRNA-mediated regulation. *Curr Biol*, **15**, R458-R460.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L. et Gorospe, M. (2004) Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J*, **23**, 3092-3102.
- LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D. et Uhlenbeck, O.C. (2001) Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science*, **294**, 165-168.
- Lease, R.A. et Belfort, M. (2000) Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Mol Microbiol*, **38**, 667-672.
- Lee, S.W., Cho, B.H., Park, S.G. et Kim, S. (2004) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J Cell Sci*, **117**, 3725-3734.
- Li, B., Vilardell, J. et Warner, J.R. (1996) An RNA structure involved in feedback regulation of splicing and of translation is critical for biological fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1596-1600.

- Liou, L.-Y., Herrmann, C.H. et Rice, A.P. (2004) HIV-1 infection and regulation of Tat function in macrophages. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 1767-1775.
- Lorber, B., Kern, D., Mejdoub, H., Boulanger, Y., Reinbolt, J. et Giege, R. (1987) The microheterogeneity of the crystallizable yeast cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase. *Eur J Biochem*, **165**, 409-417.
- Lorber, B., Mejdoub, H., Reinbolt, J., Boulanger, Y. et Giegé, R. (1988) Properties of N-terminal truncated yeast aspartyl-tRNA synthetase and structural characteristics of the cleaved domain. *Eur J Biochem*, **174**, 155-161.
- Lyon, G.J. et Novick, R.P. (2004) Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*, **25**, 1389-1403.

- M**arquet, R., Isel, C., Ehresmann, C. et Ehresmann, B. (1995) tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie*, **77**, 113-124.
- Martienssen, R.A., Zaratiegui, M. et Goto, D.B. (2005) RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Trends Genet*, **21**, 450-456.
- Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J. et Florentz, C. (1999) Aminoacyl-tRNA synthetases: a new image for a classical family. *Biochimie*, **81**, 683-700.
- Mathy, N., Pellegrini, O., Serganov, A., Patel, D.J., Ehresmann, C. et Portier, C. (2004) Specific recognition of rpsO mRNA and 16S rRNA by *Escherichia coli* ribosomal protein S15 relies on both mimicry and site differentiation. *Mol Microbiol*, **52**, 661-675.
- Matsuda, D. et Dreher, T.W. (2004) The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer. *Virology*, **321**, 36-46.
- Matsuda, D., Yoshinari, S. et Dreher, T.W. (2004) eEF1A binding to aminoacylated viral RNA represses minus strand synthesis by TYMV RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, **321**, 47-56.
- Mattheakis, L., Vu, L., Sor, F. et Nomura, M. (1989) Retroregulation of the synthesis of ribosomal proteins L14 and L24 by feedback repressor S8 in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 448-452.
- Mattheakis, L.C. et Nomura, M. (1988) Feedback regulation of the spc operon in *Escherichia coli*: translational coupling and mRNA processing. *J Bacteriol*, **170**, 4484-4492.
- Maurin, A.-C., Jousse, C., Averous, J., Parry, L., Bruhat, A., Cherasse, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Harding, H.P., Ron, D. et Fafournoux, P. (2005) The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab*, **1**, 273-277.
- Meisner, N.-C., Hackermüller, J., Uhl, V., Aszódi, A., Jaritz, M. et Auer, M. (2004) mRNA openers and closers: modulating AU-rich element-controlled mRNA stability by a molecular switch in mRNA secondary structure. *Chembiochem*, **5**, 1432-1447.
- Mejdoub, H., Kern, D., Giegé, R., Ebel, J.P., Boulanger, Y. et Reinbolt, J. (1987) Covalent aspartylation of aspartyl-tRNA synthetase from bakers' yeast by its cognate aspartyl adenylate: identification of the labeled residues. *Biochemistry*, **26**, 2054-2059.
- Merianos, H.J., Wang, J. et Moore, P.B. (2004) The structure of a ribosomal protein S8/spc operon mRNA complex. *RNA*, **10**, 954-964.

- Messenguy, F., Colin, D. et Have, J.P.t. (1980) Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur J Biochem*, **108**, 439-447.
- Moll, I., Afonyushkin, T., Vytvytska, O., Kaberdin, V.R. et Bläsi, U. (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA*, **9**, 1308-1314.
- Morales, A.J., Swairjo, M.A. et Schimmel, P. (1999) Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J*, **18**, 3475-3483.
- Moras, D., Comarmond, M.B., Fischer, J., Weiss, R., Thierry, J.C., Ebel, J.P. et Giegé, R. (1980) Crystal structure of yeast tRNA^{Asp}. *Nature*, **288**, 669-674.
- Morfeltdt, E., Taylor, D., Gabain, A.v. et Arvidson, S. (1995) Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J*, **14**, 4569-4577.
- Mucha, P. (2002) Aminoacyl-tRNA synthetases and aminoacylation of tRNA in the nucleus. *Acta Biochim Pol*, **49**, 1-10.

- N**akamura, Y. et Ito, K. (2003) Making sense of mimic in translation termination. *Trends Biochem Sci*, **28**, 99-105.
- Nakanishi, K. et Nureki, O. (2005) Recent progress of structural biology of tRNA processing and modification. *Mol Cells*, **19**, 157-166.
- Nameki, N., Asahara, H., Shimizu, M., Okada, N. et Himeno, H. (1995) Identity elements of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA(His). *Nucleic Acids Res*, **23**, 389-394.
- Nameki, N., Tamura, K., Himeno, H., Asahara, H., Hasegawa, T. et Shimizu, M. (1992) *Escherichia coli* tRNA(Asp) recognition mechanism differing from that of the yeast system. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 856-862.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. et Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
- Noeske, J., Richter, C., Grundl, M.A., Nasiri, H.R., Schwalbe, H. et Wöhnert, J. (2005) An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1372-1377.
- Nudler, E. et Mironov, A.S. (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci*, **29**, 11-17.
- Nureki, O., Vassylyev, D.G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T.L., Schimmel, P. et Yokoyama, S. (1998) Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science*, **280**, 578-582.
- Nurizzo, D., Shewry, S.C., Perlin, M.H., Brown, S.A., Dholakia, J.N., Fuchs, R.L., Deva, T., Baker, E.N. et Smith, C.A. (2003) The crystal structure of aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance. *J Mol Biol*, **327**, 491-506.

- O sman, T.A.M. et Buck, K.W. (2003) Identification of a region of the tobacco mosaic virus 126- and 183-kilodalton replication proteins which binds specifically to the viral 3'-terminal tRNA-like structure. *J Virol*, **77**, 8669-8675.
- P erret, V., Florentz, C., Dreher, T. et Giegé, R. (1989) Structural analogies between the 3' tRNA-like structure of brome mosaic virus RNA and yeast tRNA^{Tyr} revealed by protection studies with yeast tyrosyl-tRNA synthetase. *Eur J Biochem*, **185**, 331-339.
- Perret, V., Garcia, A., Grosjean, H., Ebel, J.P., Florentz, C. et Giegé, R. (1990) Relaxation of a transfer RNA specificity by removal of modified nucleotides. *Nature*, **344**, 787-789.
- Perret, V., Garcia, A., Puglisi, J., Grosjean, H., Ebel, J.P., Florentz, C. et Giegé, R. (1990a) Conformation in solution of yeast tRNA(Asp) transcripts deprived of modified nucleotides. *Biochimie*, **72**, 735-743.
- Petrushenko, Z.M., Budkevich, T.V., Shalak, V.F., Negrutskii, B.S. et El'skaya, A.V. (2002) Novel complexes of mammalian translation elongation factor eEF1A.GDP with uncharged tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. Implications for tRNA channeling. *Eur J Biochem*, **269**, 4811-4818.
- Philippe, C., Eyermann, F., Bénard, L., Portier, C., Ehresmann, B. et Ehresmann, C. (1993) Ribosomal protein S15 from *Escherichia coli* modulates its own translation by trapping the ribosome on the mRNA initiation loading site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4394-4398.
- Piron, M., Beguiristain, N., Nadal, A., Martínez-Salas, E. et Gómez, J. (2005) Characterizing the function and structural organization of the 5' tRNA-like motif within the hepatitis C virus quasispecies. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1487-1502.
- Popenko, V.I., Cherny, N.E., Beresten, S.F., Ivanova, J.L., Filonenko, V.V. et Kisselev, L.L. (1993) Immunoelectron microscopic location of tryptophanyl-tRNA synthetase in mammalian, prokaryotic and archaebacterial cells. *Eur J Cell Biol*, **62**, 248-258.
- Popenko, V.I., Ivanova, J.L., Cherny, N.E., Filonenko, V.V., Beresten, S.F., Wolfson, A.D. et Kisselev, L.L. (1994) Compartmentalization of certain components of the protein synthesis apparatus in mammalian cells. *Eur J Cell Biol*, **65**, 60-69.
- Przykorska, A. (1995) Influence of modified nucleosides on tRNA structure as probed by two plant nucleases. *Biochimie*, **77**, 109-112.
- Pütz, J., Florentz, C., Benseler, F. et Giegé, R. (1994) A single methyl group prevents the mischarging of a tRNA. *Nat Struct Biol*, **1**, 580-582.
- Pütz, J., Puglisi, J.D., Florentz, C. et Giegé, R. (1991) Identity elements for specific aminoacylation of yeast tRNA(Asp) by cognate aspartyl-tRNA synthetase. *Science*, **252**, 1696-1699.
- Q uigley, G.J. et Rich, A. (1976) Structural domains of transfer RNA molecules. *Science*, **194**, 796-806.

- R**aibaud, S., Vachette, P., Guillier, M., Allemand, F., Chiaruttini, C. et Dardel, F. (2003) How bacterial ribosomal protein L20 assembles with 23 S ribosomal RNA and its own messenger RNA. *J Biol Chem*, **278**, 36522-36530.
- Ramos, A., Hollingworth, D. et Pastore, A. (2003) G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA. *RNA*, **9**, 1198-1207.
- Rana, T.M. et Jeang, K.T. (1999) Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys*, **365**, 175-185.
- Reed, V.S. et Yang, D.C. (1994) Characterization of a novel N-terminal peptide in human aspartyl-tRNA synthetase. Roles in the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem*, **269**, 32937-32941.
- Rho, S.B., Kim, M.J., Lee, J.S., Seol, W., Motegi, H., Kim, S. et Shiba, K. (1999) Genetic dissection of protein-protein interactions in multi-tRNA synthetase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4488-4493.
- Rietveld, K., Poelgeest, R.V., Pleij, C.W., Boom, J.H.V. et Bosch, L. (1982) The tRNA-like structure at the 3' terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. Differences and similarities with canonical tRNA. *Nucleic Acids Res*, **10**, 1929-1946.
- Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F. et Klug, A. (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature*, **250**, 546-551.
- Roy, H., Becker, H.D., Reinbolt, J. et Kern, D. (2003) When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9837-9842.
- Rozhdestvensky, T.S., Kopylov, A.M., Brosius, J. et Hüttenhofer, A. (2001) Neuronal BC1 RNA structure: evolutionary conversion of a tRNA(Ala) domain into an extended stem-loop structure. *RNA*, **7**, 722-730.
- Rudinger, J., Florentz, C., Dreher, T. et Giegé, R. (1992) Efficient mischarging of a viral tRNA-like structure and aminoacylation of a minihelix containing a pseudoknot: histidinylation of turnip yellow mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1865-1870.
- Rudinger, J., Florentz, C. et Giegé, R. (1994) Histidylation by yeast HisRS of tRNA or tRNA-like structure relies on residues -1 and 73 but is dependent on the RNA context. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5031-5037.
- Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J.C. et Moras, D. (1991) Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science*, **252**, 1682-1689.
- S**aguy, M., Gillet, R., Metzinger, L. et Felden, B. (2005) tmRNA and associated ligands: a puzzling relationship. *Biochimie*, **in press**.
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A.C., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Ehresmann, C., Ehresmann, B. et Moras, D. (1999) The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell*, **97**, 371-381.
- Sankaranarayanan, R. and Moras, D. (2001) The fidelity of the translation of the genetic code. *Acta Biochim Pol*, **48**, 323-335.

- Santos, M.A., Cheesman, C., Costa, V., Moradas-Ferreira, P. and Tuite, M.F. (1999) Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in *Candida* spp. *Mol Microbiol*, **31**, 937-947.
- Sauerwald, A., Zhu, W., Major, T.A., Roy, H., Palioura, S., Jahn, D., Whitman, W.B., Yates, J.R., Ibbá, M. et Söll, D. (2005) RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science*, **307**, 1969-1972.
- Sauter, C., Basquin, J. et Suck, D. (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4091-4098.
- Sauter, C., Lorber, B., Cavarelli, J., Moras, D. et Giegé, R. (2000) The free yeast aspartyl-tRNA synthetase differs from the tRNA(Asp)-complexed enzyme by structural changes in the catalytic site, hinge region, and anticodon-binding domain. *J Mol Biol*, **299**, 1313-1324.
- Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J.L., Ehresmann, B., Ehresmann, C. et Moine, H. (2001) The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J*, **20**, 4803-4813.
- Schimmel, P. et Wang, C.C. (1999) Getting tRNA synthetases into the nucleus. *Trends Biochem Sci*, **24**, 127-128.
- Schlax, P.J. et Worhunsky, D.J. (2003) Translational repression mechanisms in prokaryotes. *Mol Microbiol*, **48**, 1157-1169.
- Schlax, P.J., Xavier, K.A., Gluck, T.C. et Draper, D.E. (2001) Translational repression of the *Escherichia coli* alpha operon mRNA: importance of an mRNA conformational switch and a ternary entrapment complex. *J Biol Chem*, **276**, 38494-38501.
- Schlünzen, F., Pyetan, E., Fucini, P., Yonath, A. et Harms, J.M. (2004) Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: the structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Mol Microbiol*, **54**, 1287-1294.
- Schmitt, E., Moulinier, L., Fujiwara, S., Imanaka, T., Thierry, J.C. et Moras, D. (1998) Crystal structure of aspartyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD: archaeon specificity and catalytic mechanism of adenylate formation. *EMBO J*, **17**, 5227-5237.
- Serganov, A., Ennifar, E., Portier, C., Ehresmann, B. et Ehresmann, C. (2002) Do mRNA and rRNA binding sites of *E. coli* ribosomal protein S15 share common structural determinants? *J Mol Biol*, **320**, 963-978.
- Serganov, A., Polonskaia, A., Ehresmann, B., Ehresmann, C. et Patel, D.J. (2003) Ribosomal protein S15 represses its own translation via adaptation of an rRNA-like fold within its mRNA. *EMBO J*, **22**, 1898-1908.
- Serganov, A., Yuan, Y.-R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R. et Patel, D.J. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem Biol*, **11**, 1729-1741.
- Sha, Y., Lindahl, L. et Zengel, J.M. (1995a) RNA determinants required for L4-mediated attenuation control of the S10 r-protein operon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **245**, 486-498.
- Sha, Y., Lindahl, L. et Zengel, J.M. (1995b) Role of NusA in L4-mediated attenuation control of the S10 r-protein operon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **245**, 474-485.
- Shaheen, H.H. et Hopper, A.K. (2005) From the Cover: Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11290-11295.

- Sherman, J.M., Rogers, M.J. et Söll, D. (1992) Competition of aminoacyl-tRNA synthetases for tRNA ensures the accuracy of aminoacylation. *Nucleic Acids Res*, **20**, 2847-2852.
- Sierra-Gallay, I.L.d.l., Pellegrini, O. et Condon, C. (2005) Structural basis for substrate binding, cleavage and allostery in the tRNA maturase RNase Z. *Nature*, **433**, 657-661.
- Silanes, I.L.d., Zhan, M., Lal, A., Yang, X. et Gorospe, M. (2004) Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2987-2992.
- Siomi, H., Ishizuka, A. et Siomi, M.C. (2004) RNA interference: a new mechanism by which FMRP acts in the normal brain? What can *Drosophila* teach us? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, **10**, 68-74.
- Sivakumaran, K., Hema, M. et Kao, C.C. (2003) Bromo mosaic virus RNA syntheses in vitro and in barley protoplasts. *J Virol*, **77**, 5703-5711.
- Slagter-Jäger, J.G. et Wagner, E.G.H. (2003) Loop swapping in an antisense RNA/target RNA pair changes directionality of helix progression. *J Biol Chem*, **278**, 35558-35563.
- Smit, M.H.d., Gulyaev, A.P., Hilge, M., Bink, H.H.J., Barends, S., Kraal, B. et Pleij, C.W.A. (2002) Structural variation and functional importance of a D-loop-T-loop interaction in valine-accepting tRNA-like structures of plant viral RNAs. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4232-4240.
- Sprague, K.U. (1995) Transcription of Eukaryotic tRNA Genes. In Söll, D. et RajBhandary, U.L. (eds.), *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. Am. Soc. Microbiol. Press, Washington DC.
- Sprinzel, M. et Vassilenko, K.S. (2005) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **33**, D139-D140.
- Srinivasan, G., James, C.M. et Krzycki, J.A. (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science*, **296**, 1459-1462.
- Stelzl, U. et Nierhaus, K.H. (2001) A short fragment of 23S rRNA containing the binding sites for two ribosomal proteins, L24 and L4, is a key element for rRNA folding during early assembly. *RNA*, **7**, 598-609.
- Stelzl, U., Zengel, J.M., Tovbina, M., Walker, M., Nierhaus, K.H., Lindahl, L. et Patel, D.J. (2003) RNA-structural mimicry in *Escherichia coli* ribosomal protein L4-dependent regulation of the S10 operon. *J Biol Chem*, **278**, 28237-28245.
- Storz, G., Opdyke, J.A. et Zhang, A. (2004) Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 140-144.
- Sung, D. et Kang, H. (2003) Prokaryotic and eukaryotic translational machineries respond differently to the frameshifting RNA signal from plant or animal virus. *Virus Res*, **92**, 165-170.
- Swairjo, M.A., Morales, A.J., Wang, C.C., Ortiz, A.R. et Schimmel, P. (2000) Crystal structure of trbp111: a structure-specific tRNA-binding protein. *EMBO J*, **19**, 6287-6298.

Takano, A., Endo, T. et Yoshihisa, T. (2005) tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science*, **309**, 140-142.

Tang, C.K. et Draper, D.E. (1989) Unusual mRNA pseudoknot structure is recognized by a protein translational repressor. *Cell*, **57**, 531-536.

- Thisted, T. et Gerdes, K. (1992) Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene. *J Mol Biol*, **223**, 41-54.
- Thisted, T., Nielsen, A.K. et Gerdes, K. (1994) Mechanism of post-segregational killing: translation of Hok, SrnB and Pnd mRNAs of plasmids R1, F and R483 is activated by 3'-end processing. *EMBO J*, **13**, 1950-1959.
- Thisted, T., Sørensen, N.S. et Gerdes, K. (1995) Mechanism of post-segregational killing: secondary structure analysis of the entire Hok mRNA from plasmid R1 suggests a fold-back structure that prevents translation and antisense RNA binding. *J Mol Biol*, **247**, 859-873.
- Tomari, Y., Suzuki, T. et Ueda, T. (2002) tRNA recognition by CCA-adding enzyme. *Nucleic Acids Res Suppl*, 77-78.
- Torres, M., Condon, C., Balada, J.M., Squires, C. et Squires, C.L. (2001) Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *EMBO J*, **20**, 3811-3820.
- Tumbula, D.L., Becker, H.D., Chang, W.Z. et Söll, D. (2000) Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature*, **407**, 106-110.

- V**anáková, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G. et Keller, W. (2005) A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol*, **3**, e189.
- Vecerek, B., Moll, I. et Bläsi, U. (2005) Translational autocontrol of the Escherichia coli hfq RNA chaperone gene. *RNA*, **11**, 976-984.
- Vicens, Q. et Westhof, E. (2003) Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: an analysis of x-ray crystal structures. *Biopolymers*, **70**, 42-57.
- Voinnet, O. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet*, **6**, 206-220.

- W**agner, E.G., Heijne, J.v. et Nordström, K. (1987) Control of replication of plasmid R1: translation of the 7k reading frame in the RepA mRNA leader region counteracts the interaction between CopA RNA and CopT RNA. *EMBO J*, **6**, 515-522.
- Wagner, E.G.H., Altuvia, S. et Romby, P. (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet*, **46**, 361-398.
- Wagner, E.G.H. et Vogel, J. (2003) Noncoding RNAs Encoded by Bacterial Chromosomes. In Barciszewski, J. et Erdmann, V.A. (eds.), *Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine*. Landes Bioscience.
- Wang, M.-B. et Metzloff, M. (2005) RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 216-222.
- Wang, X. et Hall, T.M.T. (2001) Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat Struct Biol*, **8**, 141-145.

- White, S.A., Hoeger, M., Schweppe, J.J., Shillingford, A., Shipilov, V. et Zarutskie, J. (2004) Internal loop mutations in the ribosomal protein L30 binding site of the yeast L30 RNA transcript. *RNA*, **10**, 369-377.
- Winzen, R., Gowrishankar, G., Bollig, F., Redich, N., Resch, K. et Holtmann, H. (2004) Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR. *Mol Cell Biol*, **24**, 4835-4847.
- Wolf, Y.I., Aravind, L., Grishin, N.V. et Koonin, E.V. (1999) Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases--analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res*, **9**, 689-710.

- Y**ang, X.-L., Schimmel, P. et Ewalt, K.L. (2004) Relationship of two human tRNA synthetases used in cell signaling. *Trends Biochem Sci*, **29**, 250-256.
- Yousef, M.R., Grundy, F.J. et Henkin, T.M. (2003) tRNA requirements for glyQS antitermination: a new twist on tRNA. *RNA*, **9**, 1148-1156.
- Yousef, M.R., Grundy, F.J. et Henkin, T.M. (2005) Structural transitions induced by the interaction between tRNA(Gly) and the *Bacillus subtilis* glyQS T box leader RNA. *J Mol Biol*, **349**, 273-287.

- Z**alfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Penta, A.D., Reis, S., Oostra, B. et Bagni, C. (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, **112**, 317-327.
- Zeenko, V.V., Ryabova, L.A., Spirin, A.S., Rothnie, H.M., Hess, D., Browning, K.S. et Hohn, T. (2002) Eukaryotic elongation factor 1A interacts with the upstream pseudoknot domain in the 3' untranslated region of tobacco mosaic virus RNA. *J Virol*, **76**, 5678-5691.
- Zengel, J.M. et Lindahl, L. (1996) A hairpin structure upstream of the terminator hairpin required for ribosomal protein L4-mediated attenuation control of the S10 operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **178**, 2383-2387.
- Zhang, T., Krays, V., Huez, G. et Gueydan, C. (2002) AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem Soc Trans*, **30**, 952-958.