

ERIC MADORE

**ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE LE tRNA^{GLU} ET LA
GLUTAMYL-TRNA SYNTHÉTASE CHEZ *ESCHERICHIA COLI* :
RÔLES DES BASES MODIFIÉES, STRUCTURE DES FORMES
INACTIVE ET DIMÉRIQUE DU tRNA^{GLU} ET IDENTIFICATION
DES SITES DE CONTACTS**

Thèse

Présentée

À la Faculté des études supérieures

De l'Université Laval

Pour l'obtention

Du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

**Département de biochimie
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC**

AOUT 1999



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-43089-8

Canada



Ce 30 jour du mois de Juin 1999, les personnes soussignées, en leur qualité de membres du jury de la thèse de ERIC MADORE, ont assisté à la soutenance de cette thèse.

NOMS

UNIVERSITÉ

SIGNATURE

JACQUES LAPOINTE

LAVAL

PAUL H. ROY

LAVAL

SHENG-XIANG LIN

LAVAL

LÉA BRAKIER-GINGRAS

MONTREAL

Résumé court

En surproduisant le tRNA^{Glu} d'*E. coli*, nous avons réussi à obtenir des tRNA^{Glu} modifiés différemment. Nous avons observé que le groupement thiol du mnm⁵s²U34 a un rôle structural et un rôle en tant qu'élément d'identité : l'absence de ce groupement cause une perte de la spécificité d'un facteur 520. Nous avons établi la structure des formes inactive et dimérique du tRNA^{Glu} d'*E. coli* à l'aide de sondes chimiques : le premier a une structure en forme d'épingle à cheveux avec deux boucles internes. Le second serait formé de deux de ces épingles à cheveux via les deux boucles centrales. Suite au pontage avec un tRNA^{Glu} oxydé au periodate, nous avons identifié, sur la GluRS, 3 sites de fixation majeurs de l'extrémité 3' du tRNA^{Glu}_{ox}. La présence de ces sites pourrait s'expliquer par le déploiement de l'extrémité GCCA^{3'} de la tige acceptrice sur l'enzyme.

Résumé long

En surproduisant le tRNA^{Glu} d'*E. coli*, nous avons réussi à obtenir des tRNA^{Glu} modifiés différemment. Ces tRNA^{Glu} ont pu être purifiés en utilisant une colonne de type C18 modifiée. Ces tRNA^{Glu} ont permis l'étude du rôle des bases Ψ 13, m²A37 et mnm⁵s²U34. Nous n'avons pu identifier un rôle pour Ψ 13. La fonction de m²A37 serait structurale. Nous avons observé que les groupements méthyl-aminométhyl et thiol de la base mnm⁵s²U34 ont un rôle structural. De plus, ce second jouerait un rôle en tant qu'élément d'identité : l'absence de ce groupement cause une perte de la spécificité d'un facteur 520.

L'étude structurale des formes inactive et dimérique du tRNA^{Glu} d'*E. coli* a été effectuée à l'aide de sondes chimiques. Le conformère inactif a une structure en forme d'épingle à cheveux avec deux boucles internes. Les deux extrémités de cette épingle sont formées d'une part de la tige acceptrice et d'autre part de la tige et boucle anticodon. Le dimère serait composé de deux de ces épingles à cheveux. La liaison entre les deux monomères se ferait via les deux boucles centrales.

Nous avons observé, suite au pontage entre l'extrémité 3' d'un tRNA^{Glu} oxydé au periodate et la GluRS de *E. coli*, la formation de deux complexes de poids moléculaires différents correspondant à des rapports tRNA : GluRS de [1 : 1] et de [2 : 1]. Nous avons identifié, sur la GluRS 5 sites de fixation (3 majeurs et 2 mineurs) de l'extrémité 3' du tRNA^{Glu}_{ox}. Les trois sites majeurs se retrouvent dans la cavité liant la tige acceptrice du tRNA. La formation de ces trois sites s'expliquerait par le déploiement de l'extrémité de la tige acceptrice sur l'enzyme. Un de ces sites correspondrait à l'arrivée du tRNA, avec l'extrémité de sa tige acceptrice entièrement empilée en hélice A. Un autre correspondrait à une extrémité acceptrice repliée tel que retrouvé dans le complexe tRNA^{Gln}:GlnRS d'*E. coli*. Le dernier constituerait un intermédiaire entre les précédentes.

A mes parents

Table des matières

Résumé court	II
Résumé long	III
Avant-propos	IV
Table des matières.....	V
Liste des figures	XI
Liste des tableaux.....	XIV
Liste des abréviations.....	XV
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 La biosynthèse des protéines.....	2
1.1.1 Le cycle des RNA de transfert	3
1.2 Les aminoacyl-tRNA synthétases	6
1.2.1 Classification	8
1.2.2 Mécanisme d' aminoacylation	15
1.2.3 La glutamyl-tRNA synthétase.....	19
1.2.3.1 Généralités	19
1.2.3.2 Structure de la GluRS de <i>Thermus thermophilus</i>	20
1.2.3.3 Mécanisme d' aminoacylation.	23
1.3 Les tRNAs.....	25
1.3.1 Structure des tRNAs	28

1.3.1.1	Bases modifiées	29
1.3.2	Le tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i>	34
1.3.2.1	Structure primaire, secondaire et tertiaire du tRNA ^{Glu}	34
1.3.3.2	Interaction entre la GluRS et le tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i>	41
1.4	Objectifs et méthodologie.....	42
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		44
2.1	Préparation du matériel	45
2.1.1	Préparation des cellules.....	45
2.1.1.1	Souches utilisées	45
2.1.1.2	Milieux de culture.....	46
2.1.2	Purification du tRNA total.....	46
2.1.3	Préparation d'une colonne C18 modifiée (MODS)	47
2.1.4	Purification du tRNA ^{Glu} par chromatographie sur MODS.....	47
2.1.5	Évaluation de la qualité de tRNA par mesure d'activité.....	48
2.1.6	Évaluation de la qualité du tRNA sur gel de polyacrylamide.....	49
2.1.7	Évaluation rapide de la qualité du tRNA sur gel de polyacrylamide	49
2.1.8	Marquage direct du tRNA en 5' (par échange).....	50
2.1.9	Marquage du tRNA en 5' par déphosphorylation et rephosphorylation	50
2.1.10	Purification des tRNA sur gel d'acrylamide	51
2.1.11	Identification du contenu en bases modifiées	51
2.1.12	Obtention du tRNA ^{Glu} natif, dénaturé et dimérique.....	53
2.1.13	Purification de la GluRS	53
2.1.14	Mesure de l'activité de la GluRS	54

2.1.15	Purification partielle de la tRNA-nucléotidyl-transférase (TNT)	55
2.1.16	Mesure de l'activité tRNA-nucléotidyl-transférase	55
2.2	Étude cinétique et structurale du tRNA ^{Glu}	56
2.2.1	Mesure des paramètres cinétiques	56
2.2.2	Digestion alcaline du tRNA (échelle)	58
2.2.3	Digestion à la RNase T1 (échelle de G).....	58
2.2.4	Sondage au plomb.....	58
2.2.5	Sondage au diméthyl sulfate (DMS).....	59
2.2.6	Sondage au diéthyl pyrocarbonate (DEPC)	60
2.2.7	Sondage à l'éthyl nitro urée (ENU)	61
2.2.8	Visualisation sur gel de polyacrylamide	61
2.3	Pontage du tRNA ^{Glu} sur la GluRS d' <i>E. coli</i>	62
2.3.1	Marquage en 3' du tRNA ^{Glu} par la TNT	62
2.3.2	Oxydation du tRNA	62
2.3.3	Réaction de pontage.....	63
2.3.4	Caractérisation des complexes.....	63
2.3.4.1	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	63
2.3.4.2	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition native.....	64
2.3.4.3	Spectrométrie de masse.....	64
2.3.5	Purification de chaque complexe sur gel de polyacrylamide	65
2.3.6	Digestion du tRNA et de la GluRS	65
2.3.7	Purification des peptides marqués par chromatographie sur couche mince en 2 dimensions	66

2.3.8	Identification des peptides marqués.....	66
2.4	Logiciels.....	66
CHAPITRE 3 : RÔLE DES BASES MODIFIÉES DU tRNA^{GLU} DE E. COLI.....		68
3.1	Surexpression du tRNA ^{Glu}	69
3.2	Une souche surproductrice de tRNA ^{Glu} contient plusieurs formes différentes de ce tRNA.....	72
3.3	Détermination du contenu en bases modifiées.....	77
3.4	Les paramètres cinétiques de la GluRS pour ses différents substrats sont affectés par les modifications présentes sur le tRNA.....	82
3.5	Le sondage au plomb et à l'ENU révèle des différences structurales entre les modimères de tRNA ^{Glu}	85
3.6	Le sondage au DMS révèle la similitude de la structure secondaire des différents modimères de tRNA ^{Glu}	91
3.7	Rôle des bases modifiées dans le repliement correct du tRNA ^{Glu}	96
3.7.1	Modimère 1.....	96
3.7.2	Modimère 5.....	97
3.7.3	Modimère 4.....	97
3.7.4	Modimère 3.....	98
CHAPITRE 4 : STRUCTURE DES FORMES INACTIVE ET DIMÉRIQUE DU tRNA^{GLU} DE E. COLI.....		99
4.1	Sondage chimique des cytosines accessibles des formes inactive et dimérique du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i>	100

4.2	Sondage chimique des adénosines accessibles des formes native, inactive et dimérique du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i>	100
4.3	Structure de la forme inactive du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i>	106
4.4	Structure possible du dimère.....	110
CHAPITRE 5 : PONTAGE ENTRE L'EXTRÉMITÉ 3' DU tRNA^{GLU} ET LA GLURS...		
.....		114
5.1	Formation de complexes covalents entre la GluRS et le tRNA ^{Glu} oxydé au periodate.....	115
5.2	Les complexes formés entre la GluRS et le tRNA ^{Glu} oxydé sont très spécifiques.	123
5.3	Identification des résidus de la GluRS liés à l'extrémité 3' du tRNA ^{Glu}	126
5.4	Essai de pontage avec de l'arginine	133
5.5	Position relative des résidus liés au tRNA ^{Glu} oxydé dans la structure tridimensionnelle de la GluRS de <i>Thermus thermophilus</i>	133
5.6	Modèles pouvant expliquer la présence de sites majeurs de pontage entre la GluRS et l'extrémité 3' du tRNA ^{Glu} du complexe 1:1.	142
5.6.1	Première hypothèse : il y a plusieurs sites spécifiques sur la GluRS.....	142
5.6.2	Seconde hypothèse : il existe des parties mobiles sur la synthétase qui peuvent se déplacer et atteindre l'extrémité 3' de la tige acceptrice.....	143
5.6.3	Troisième hypothèse : l'extrémité 3' du tRNA est mobile.	146
5.7	Analyse détaillée de l'hypothèse no 3.....	150
CHAPITRE 6 : CONCLUSION.....		152
6.1	Rôle des bases modifiées du tRNA ^{Glu} de <i>E. coli</i>	153

6.1.1	Préparation du matériel.....	153
6.1.2	Ordre des modifications post-traductionnelles du tRNA ^{Glu}	153
6.1.3	Rôle du Ψ13.....	154
6.1.4	Rôle du m ² A37.....	155
6.1.5	Rôle du groupement méthyl-aminométhyl de la base mnm ⁵ s ² U34	155
6.1.6	Rôle du groupement thiol de la base mnm ⁵ s ² U34	156
6.1.6	Perspectives	157
6.2	Structure des formes inactive et dimérique du tRNA ^{Glu}	158
6.2.1	Perspectives	160
6.3	Changement conformationnels de l'extrémité 3' du tRNA ^{Glu} lors de son interaction avec la GluRS	160
6.3.1	Perspectives	161
CHAPITRE 7 : BIBLIOGRAPHIE		163

Liste des figures

Figure 1 : La biosynthèse des protéines. 4

Figure 2 : Rossmann Fold. 11

Figure 3 : Domaines de liaison de l'ATP des aminoacyl-tRNA synthétases de classe 2. 13

Figure 4 : Mécanisme d'aminacylation du tRNA^{Gln} par la GlnRS d'*E. coli* 17

Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la GluRS de *Thermus thermophilus* 21

Figure 6 : Structure des tRNAs. A) structure secondaire B) structure tertiaire 26

Figure 7 : Localisation et identification des principales modifications chez les tRNA de
E. coli 32

Figure 8 : Structure secondaire et modèle de la structure tertiaire probable du tRNA^{Glu} 35

Figure 9 : Les bases modifiées du tRNA^{Glu} d'*E. coli* et leurs précurseurs. 37

Figure 10 : Purification par HPLC sur colonne MODS de tRNA provenant de diverses
sources. 73

Figure 11 : Purification du modimère-1, par chromatographie sur colonne MODS, à partir
du tRNA total d'*E. coli* DH5 α /pKR15 cultivé en milieu minimal. 75

Figure 12 : Détermination du contenu en bases modifiées des modimères 2 et 5 par
chromatographie sur couche mince à deux dimensions. 79

Figure 13 : Sondage à l'ENU de différents modimères du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. 87

Figure 14 : Sondage au plomb de différents modimères du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. 89

Figure 15 : Sondage au DMS de différents modimères du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. 92

Figure 16. Différence dans la susceptibilité au plomb et à l'ENU entre les cinq modivariants

de tRNA ^{Glu} par rapport au modivariant 2.	94
Figure 17 : Sondage au DMS et au DEPC des formes native et inactive du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i>	102
Figure 18 : Sondage au DMS et au DEPC de la forme dimérique du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i>	104
Figure 19 : (a) Structure tertiaire du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i> telle que proposée par S. Sekine et al. (1996) (b) Structure secondaire de la forme inactive du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i> dérivé des résultats obtenu par sondage au DMS et au DEPC (Fig. 16).....	107
Figure 20 : Structure possible du dimère de la forme inactive du tRNA ^{Glu}	112
Figure 21 : La réaction de pontage entre l'extrémité 3' du tRNA ^{Glu} oxydé au periodate et des résidus lysine de la GluRS.....	117
Figure 22 : Formation de complexes entre le tRNA ^{Glu} oxydé au periodate et la GluRS d' <i>E. coli</i> visualisé sur gel de polyacrylamide 10% en condition dénaturante.....	119
Figure 23 : Détermination de la masse moléculaire des deux complexes tRNA ^{Glu} _{ox} -GluRS par électrophorèse en condition native (A) et par spectrométrie de masse (B).	121
Figure 24 : : Formation de complexes tRNA-GluRS par pontage avec du tRNA oxydé contenant ou non de tRNA ^{Glu} _{ox}	124
Figure 25 : Carte tryptique de la GluRS d' <i>E. coli</i> et de la GluRS marquée par des C-C-[³² P]A provenant des complexes 1 et 2.....	128
Figure 26 : Positions des peptides marqués dans la séquence des résidues de la GluRS d' <i>E. coli</i>	131
Figure 27 : Alignement des séquences des résidues des GluRS d' <i>E. coli</i> et de <i>T.</i> <i>thermophilus</i> et de la GlnRS d' <i>E. coli</i> dans les régions des sites majeurs de pontage. ...	134
Figure 28 : Localisation sur la GluRS de <i>T. thermophilus</i> des sites de pontages	

correspondant à ⁹⁷Lys et ³⁷²Lys chez la GluRS d'*E. coli*..... 136

Figure 29 : Le tRNA₂^{Gln} d'*E. coli* dans le site actif de la GluRS de *T. thermophilus* comme modèle pour les complexe tRNA^{Glu}-GluRS chez *E. coli*..... 139

Figure 30 : Vue latérale d'une partie du modèle du complexe de la GluRS avec le tRNA^{Glu} montrant que ¹¹⁷Lys ne peut pas rejoindre l'extrémité 3' du tRNA..... 144

Figure 31 : Trois étapes dans le déroulement de l'extrémité de la tige acceptrice du tRNA^{Glu} sur la GluRS. 148

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des aminoacyl-tRNA synthétases.....	10
Tableau 2. Action des diverses sondes utilisées synthétases	57
Tableau 3 : Quantité de tRNA ^{Glu} produit par la souche surproductrice DH5 α /pKR15 dans diverses conditions ainsi que le Km pour la GluRS pour ce tRNA.....	71
Tableau 4 : Nucléotides modifiés présents dans chacun des modimères du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i> tel que déterminé par chromatographie sur couche mince en deux dimensions.....	81
Tableau 5 : Contenu en bases dans les modimères 2 et 5 ainsi que pour le tRNA commercial, déterminé par HPLC	81
Tableau 6 : Paramètres cinétiques de la GluRS pour ses différents substrats en présence de différents modimères du tRNA ^{Glu} d' <i>E. coli</i>	84
Tableau 7 : Séquence des peptides de la GluRS d' <i>E. coli</i> pontés à l'extrémité 3' du tRNA ^{Glu} oxydé au periodate.....	130

Liste des abréviations

Ψ	Pseudouridine
aa-AMP	Aminoacyl-adénylate
aaRS	Aminoacyl-tRNA synthétase
aa-tRNA	Aminoacyl-tRNA
AMP	Adénosine monophosphate
ApppN	produit de la réaction entre l' aminoacyl-adénylate et un NDP
AppppN	produit de la réaction entre l' aminoacyl-adénylate et un NTP
ATP	Adénosine triphosphate
BAP	'Bacterial alkaline phosphatase'
BSA	'Bovine serum albumine'
C18	Chaîne de 18 carbones saturés
cal	Calorie
CPM	Coup par minute
Da	Dalton
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DMS	Diméthyl sulfate
DNA	Acide désoxyribonucléique
DO_{xxx}	Densité optique à xxx nm
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Éthylène diamine tétraacétique acide
EF-Tu	Facteur d'élongation Tu

ENU	Éthyl nitroso urée (N-nitroso-N-ethylurea)
<i>gltX</i>	Gène codant pour la GluRS chez <i>E. coli</i>
HEPES	(N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[butanesulfonique acide])
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
k_{cat}	Constante de catalyse
Kd	Constante de dissociation
K_M	Constante de Michaelis
LB	'Luria Broth'
M	Molaire
m^2A	2-méthyladénine
mnm	Méthyl aminométhyl
mnm^5s^2U (S)	5-Méthyl aminométhyl 2-thio Uridine
modivariant	tRNA de même séquence primaire modifié différemment
MODS	'modified octadecyl sulfate'
mRNA	ARN messenger
NTP	Nucléotide triphosphate
ODS	Octadécyl sulfate
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PMSF	'Phenylmethylsulfonyl fluoride'
PP_i	Pyrophosphate inorganique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNase	Nucléase spécifique à l'ARN

RPC-5	'Reversed phase chromatography'
s2U	2-thio uridine
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du sodium dodécylsulfate
T (dans l'ARN)	ribothymidine
TBE	Tris-borate-EDTA
TBE #X	Solution de réserve de Tris-borate-EDTA # fois concentré
TLC	'Thin layer chromatography'
TNT	tRNA-nucléotidyl-transférase
Tris	Tris[hydroxyméthyl]aminométhane
tRNA	Acide ribonucléique de transfert
tRNA^{Glu}_{OX}	Acide ribonucléique de transfert oxydé spécifique au glutamate
tRNA^{aa}	Acide ribonucléique de transfert spécifique à l'acide aminé 'aa'
V_{max}	Vitesse maximale
XxxRS	aaRS spécifique à l'acide aminé 'Xxx'

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

Chapitre 1

Introduction

1.1 La biosynthèse des protéines

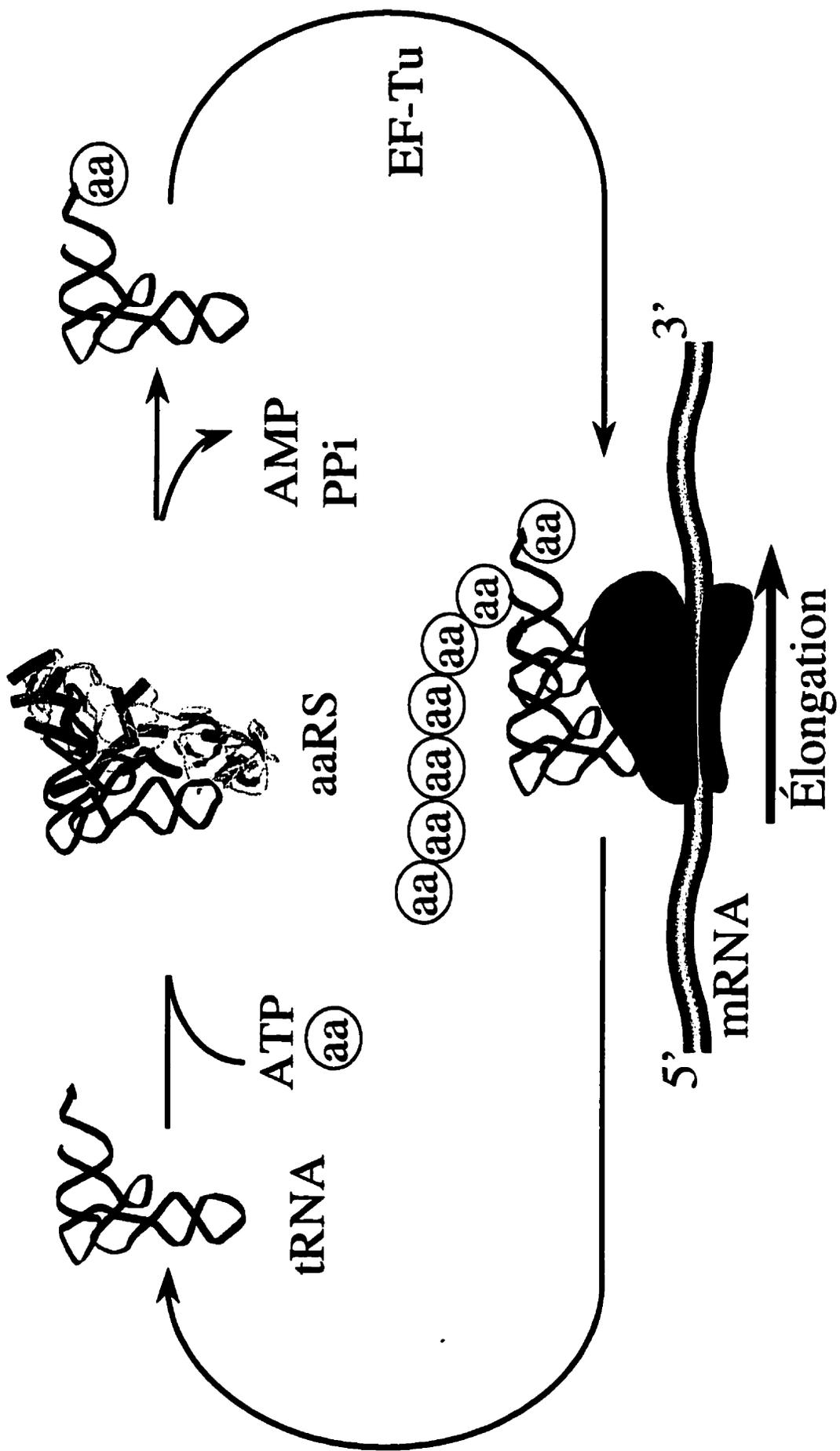
Fabriquer des protéines à partir de l'information codée du DNA, telle est la biosynthèse protéique. La transcription et la traduction sont les mécanismes principaux de cette transformation. La transcription est la reproduction, ou copie, des bases d'un fragment de DNA en un RNA messenger (mRNA), alors que la traduction consiste à décrypter l'information de ces mRNA, à l'aide de clefs, les RNA de transfert (tRNA), pour en faire des protéines.

Il est d'une importance capitale que la synthèse des protéines s'effectue sans erreur. Le bon fonctionnement de cette mécanique délicate dépend de trois réactions majeures : (1) La formation d'un RNA parfaitement complémentaire au DNA lors de la transcription de ce DNA par la RNA polymérase; (2) Un appariement précis des codons du RNA messenger et de l'anticodon des RNAs de transfert lors de la traduction sur le ribosome; (3) L'attachement des acides aminés sur les RNAs de transfert via leur aminoacyl-tRNA synthétases (aaRS) spécifique. Comme c'est à cette dernière étape que se fait le pont entre le monde des acides nucléique et celui des protéines, il est justifié de dire que c'est l'interaction entre les aaRS et les tRNA qui définit le code génétique.

1.1.1 Le cycle des RNA de transfert

Au cours de la biosynthèse des protéines, les tRNAs parcourent un cycle (Fig. 1). Le tRNA libre est aminoacylé par l'aminoacyl-tRNA synthétase qui lui correspond. Ce tRNA aminoacylé est ensuite pris en charge par le facteur de transcription EF-Tu (Elongation Factor Tu). Ce complexe est acheminé jusqu'au site d'entrée A/T d'un ribosome. Le facteur EF-Tu est largué et le tRNA est amené au site A. Si l'anticodon du nouvel arrivant s'ajuste au codon du RNA messenger présent à ce site, le ou les acide(s) aminé(s) présent(s) sur le tRNA au site P du ribosome seront joints à l'acide aminé de ce tRNA. Le tRNA passera ensuite au site P où il pourra faire don de sa chaîne d'acides aminés au prochain tRNA correctement appariée au site A. Le tRNA est alors éjecté du ribosome et redevient libre.

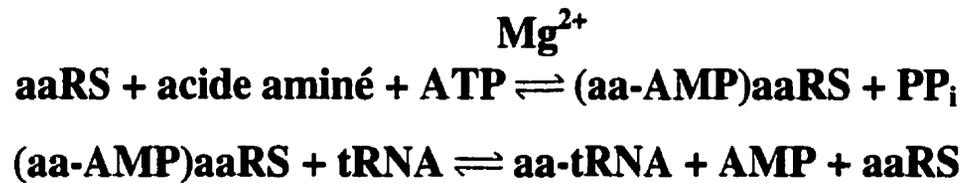
Figure 1 : La biosynthèse des protéines.



1.2 Les aminoacyl-tRNA synthétases

Dans la cellule, il existe habituellement une vingtaine d'espèces d' aminoacyl-tRNA synthétases (aaRS), soit une pour chacune des 20 espèces d'acides aminés présents dans les protéines. Il y a cependant quelques exceptions (pour une revue voir Meinnel *et al.*, 1995). Nous observons des cas où il y a deux aaRS pour un même acide aminé. C'est le cas des LysRS (Lévêque *et al.*, 1990) chez *E. coli* et des ThrRS (Putzer *et al.*, 1992) et TyrRS (Glaser *et al.*, 1991; Henkin *et al.*, 1992) chez *Bacillus subtilis*. À l'intérieur des mitochondries de levures se trouvent aussi deux ThrRS. Ce phénomène résulte du fait que les codons CUN codant normalement pour l'acide aminé leucine, code ici pour l'acide aminé thréonine. Il y a une première ThrRS pour aminoacyler les tRNA^{Thr} portant un anticodon UAG et une seconde pour ceux ayant l'anticodon UGU (Jukes *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1979; Martin *et al.*, 1978; Tzagoloff *et al.*, 1990). Chez *B. subtilis*, les cyanobactéries, les mitochondries et les chloroplastes, la GlnRS est absente; chez ces organismes, le tRNA^{Gln} est aminoacylé avec du glutamate par la GluRS (Lapointe *et al.*, 1986; Schön *et al.*, 1988). Ce glutamate est ensuite transformé en glutamine par une réaction de transamidation (Wilcox et Nirenberg, 1968). Il n'existe pas d'aaRS spécifique pour la sélénocystéine. Chez *E. coli*, le tRNA^{Sec} est aminoacylé par la SerRS (Leinfelder *et al.*, 1988). La sérine est ensuite transformée en sélénocystéine par deux enzymes (Forchhammer *et al.*, 1989; Leinfelder *et al.*, 1989)

Le rôle principal des aaRS est de catalyser l' aminoacylation des tRNAs avec leur acide aminé respectif. Pour la plupart des synthétases, la réaction se déroule de la façon suivante (Freist, 1989):



La première réaction consiste en l'activation de l'acide aminé à l'aide d'ATP pour former un aminoacyl-adénylate. Ce phénomène ne requiert pas le tRNA sauf pour la glutamyl-tRNA synthétase, la glutaminyl-tRNA synthétase et l'arginyl-tRNA synthétase (Söll et Schimmel, 1974). La seconde réaction est celle du transfert de l'acide aminé sur le ribose à l'extrémité 3' du tRNA.

En plus de leur rôle dans l'amination des tRNAs, les aminoacyl-tRNA synthétases (sauf l'ArgRS, la GlnRS, la TrpRS, la TyrRS et la ValRS de certains organismes) (Plateau et Blanquet, 1992) catalysent la synthèse d'alarmones: ApppN et AppppN (un produit de la réaction entre l' aminoacyl-adénylate et un NDP ou un NTP). Ces alarmones seraient impliquées au niveau de la réponse cellulaire à différentes conditions de stress, comme le choc thermique et les conditions oxydatives (Varshavsky, 1983; Zamecnik, 1983; Farr *et al.*, 1989). La biosynthèse de la paroi bactérienne, la biosynthèse des aminoacyl-phosphatidylglycérol (Gould *et al.*, 1968), de glycyllipopolysaccharide (Neihardt *et al.*, 1975), l'amination de l'extrémité N-terminale de certaines protéines (Deutch *et al.*, 1978) et la biosynthèse de la chlorophylle (Schön *et al.* 1986) utilisent les aminoacyl-tRNA comme donneurs d'acides aminés. Certaines aminoacyl-tRNA synthétases sont également impliquées dans le transport

des acides aminés (Moore *et al.*, 1977) et dans l'épissage des introns (Akins *et al.*, 1987). Enfin, la glutamyl-tRNA synthétase (GluRS) participe à la régulation de l'assimilation de l'azote (Lapointe *et al.*, 1975), et forme un complexe avec l'adénylo-succinate lyase, une enzyme engagée dans la biosynthèse des purines (Gendron *et al.*, 1992).

1.2.1 Classification

Les aminoacyl-tRNA synthétases sont catégorisées en deux séries appelées respectivement Classe 1 et Classe 2 (table 1). Cette classification est devenue nécessaire suite à l'observation de petites séquences d'acides aminés conservés chez certaines aaRS. En effet, nous remarquons que la moitié des synthétases possèdent les séquences HIGH (Webster *et al.*, 1984) et KMSKS (Hountondji *et al.*, 1986). Les enzymes possédant ces séquences consensus appartiennent à la classe 1, les autres à la classe 2. Les enzymes de classe 2 sont également caractérisées par des motifs. Ces motifs sont : gΦXXΦXPPΦΦ (motif 1), (F ou Y ou H)RX(E ou D)X₄₋₁₂(R ou H)XXXFXXX(D ou E) (motif 2) et λXΦgΦgΦgΦeRΦΦΦΦΦ (motif 3) (Φ : un acide aminé hydrophobique; λ : petit acide aminé; X : acide aminé quelconque) (Eriani *et al.*, 1990).

De plus, nous observons des particularités propres à chacune des deux classes. Les aaRS de classe 1 semblent généralement aminoacyler leur tRNA en 2' OH alors que celles de classe 2 préfèrent le 3'OH. La PhéRS (classe 2) est l'exception à cette règle, elle aminoacyle en 2'OH (Fersht, 1979). Des dix aaRS de classe 1, neuf sont des monomères, l'autre un dimère. Pour la classe 2, la plupart des aaRS sont des dimères (α_2) ou des tétramères ($\alpha_2\beta_2$ ou

α). Des études cristallographiques indiquent que les aaRS de classe 1 lient l'ATP ainsi que l'extrémité de la tige acceptrice du tRNA à l'aide d'un domaine constitué de 5 barreaux β parallèles appelé «Rossman Fold» (Fig. 2) (Rossman *et al.*, 1974). Ce domaine est similaire à celui des déshydrogénases (Risler *et al.*, 1981; Zelwer *et al.*, 1982). Chez les aaRS de classe 2, le domaine de liaison de l'ATP est composé d'un feuillet β antiparallèle (Fig. 3).

La manière d'aborder le tRNA serait différente selon qu'il s'agisse d'une aaRS de classe 1 ou de classe 2 (Moras, 1992). Il semble que les aaRS de classe 1 reconnaissent leur tRNA par le sillon mineur (Rould *et al.*, 1989). Pour les aaRS de classe 2, la reconnaissance s'effectuerait par le sillon majeur (Ruff *et al.*, 1991).

La technique de diffraction des rayons-X a permis de comprendre la structure de plusieurs aminoacyl-tRNA synthétases (Table 1). Parmi celles de classe I, on retrouve la GlnRS d'*E. coli* en complexe avec le tRNA^{Gln} (Rould *et al.* 1989), la TyrRS (Brick *et al.*, 1989) et la TrpRS (Doublie *et al.*, 1995) de *Bacillus stearothermophilus*, la MetRS d'*E. coli* (Brunie *et al.*, 1990) et la GluRS de *Thermus thermophilus* (Nureki *et al.*, 1995). Parmi celles de classe II, nous retrouvons la PhéRS (Mosyak *et al.*, 1995), la SerRS (Biou *et al.*, 1994) associée à son tRNA ainsi que la GlyRS (Logan *et al.*, 1995) de *Thermus thermophilus*, la LysRS (Onesti *et al.*, 1995), l'HisRS (Arnez *et al.*, 1995) d'*E. coli* et l'AspRS (Ruff *et al.*, 1991) de *Saccharomyces cerevisiae* en complexe avec son tRNA.

Table 1: Classification des aminoacyl-tRNA synthétases

Acide Aminé	Structure	Site d'acylation	Édition?	Structure élucidée?	Séquence signature
<u>Classe I</u>					
Cys	α	-	Non	Non	HIGH et KMSKS
*Met	α_2 (α)	2',3'	Oui	Oui	HIGH et KMSKS
Val	α	2'	Oui	Non	HIGH et KMSKS
Ile	α	2',3'	Oui	Non	HIGH et KMSKS
Leu	α	2'	?	Non	HIGH et KMSKS
Arg	α	2',3'	?	Non	HIGH et KMSKS
Glu	α	2'	?	Oui	HIGH et KMSKS
Gln	α	2'	?	Oui	HIGH et KMSKS
Tyr	α	2'	Non	Oui	HIGH et KMSKS
Trp	α	2',3'	?	Oui	HIGH et KMSKS
<u>Classe II</u>					
*Ala	α_4 (α)	3'	Oui	Non	Motif 2,3
*Gly	$\alpha_2\beta_2$ (α)	3'	?	Oui	Motif 3
Ser	α_2	2',3'	?	Oui	Motif 1,2,3
Thr	α_2	3'	?	Non	Motif 1,2,3
Pro	α_2	2',3'	?	Non	Motif 1,2,3
His	α_2	3'	?	Oui	Motif 1,2,3
Asp	α_2	3'	?	Oui	Motif 1,2,3
Asn	α_2	3'	?	Non	Motif 1,2,3
**Lys	α_2	3'	?	Oui	Motif 1,2,3
*Phé	$\alpha_2\beta_2$ (α)	2'	Oui	Oui	Motif 2,3

Adapté à partir de Carter 1993

* Structure quaternaire différentes chez plusieurs organismes

** Classe I chez les Archaea (Ibba *et al.*, 1997)

Figure 2 : Rossman Fold. Les flèches représentent les barreaux β et les cylindres les hélices α .

Inspiré de la représentation de Moras (1992).

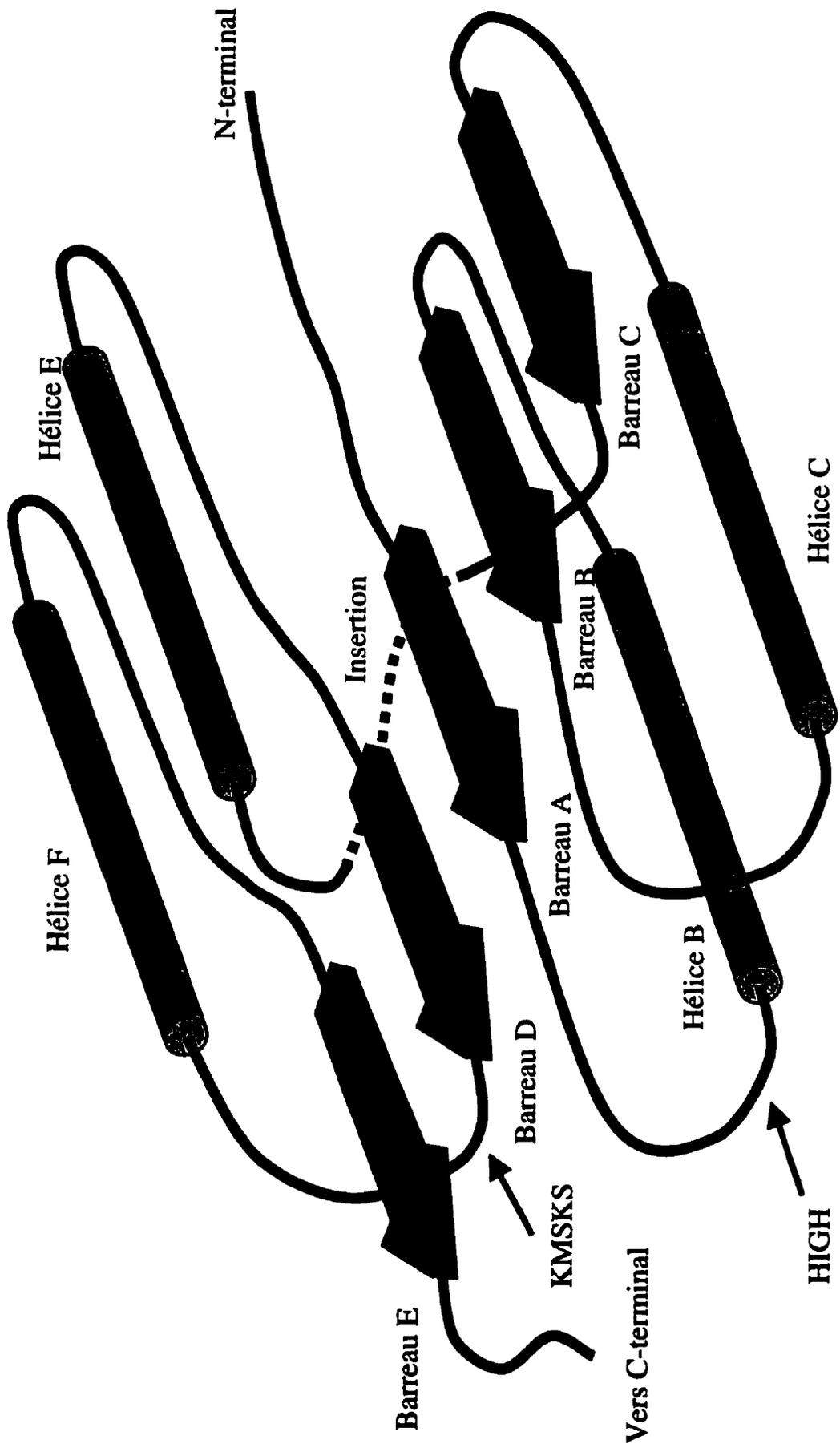
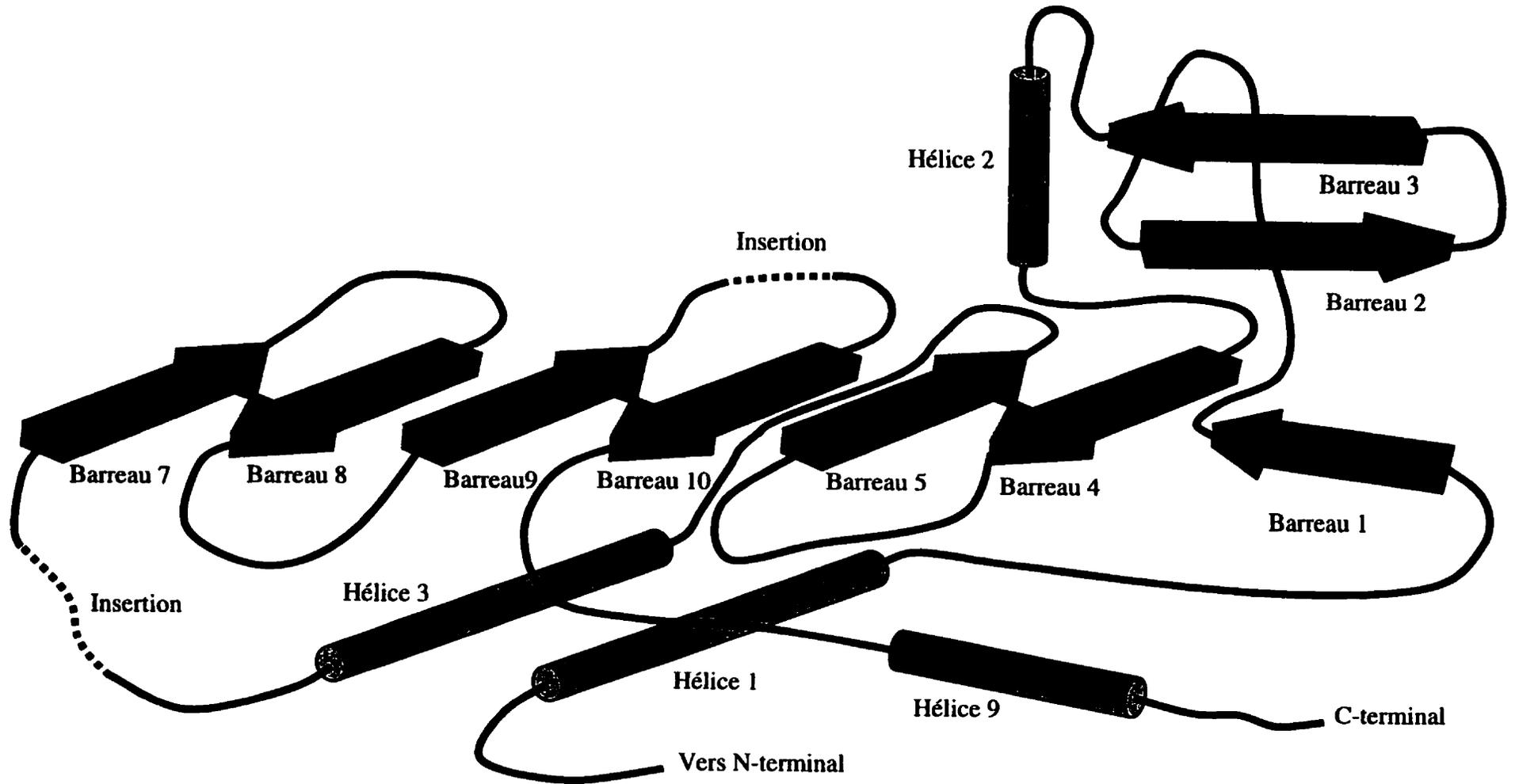


Figure 3. Domaines de liaison de l'ATP des aminoacyl-tRNA synthétases de classe 2. Les flèches représentent des barreaux β et les cylindres des hélices α . Inspiré de la représentation de Moras (1992).



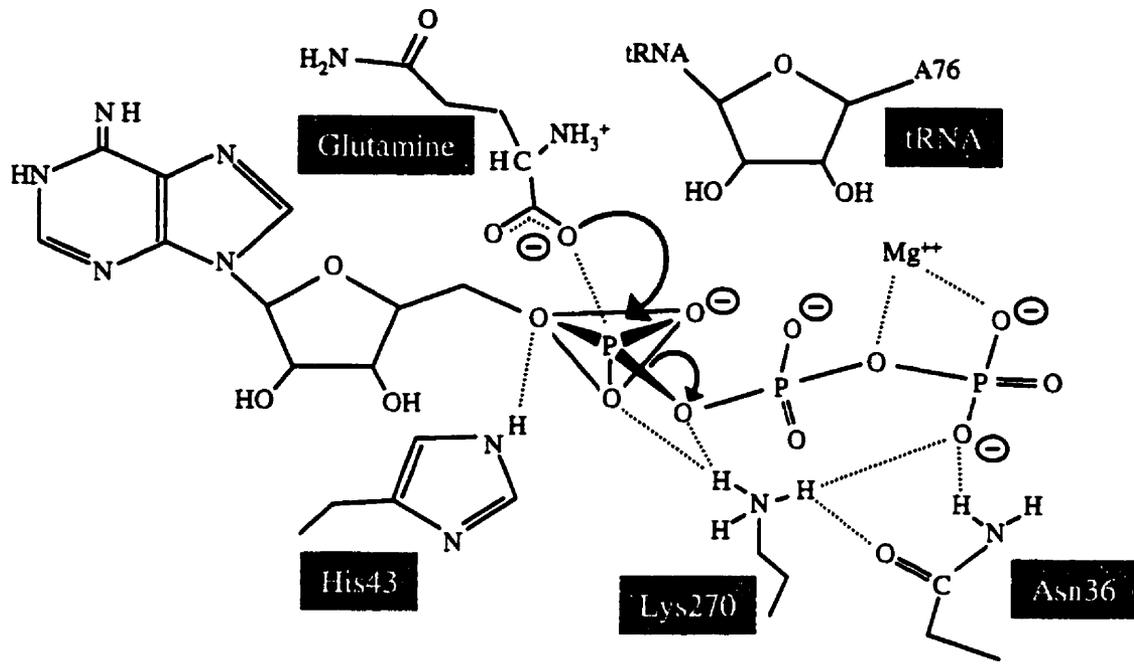
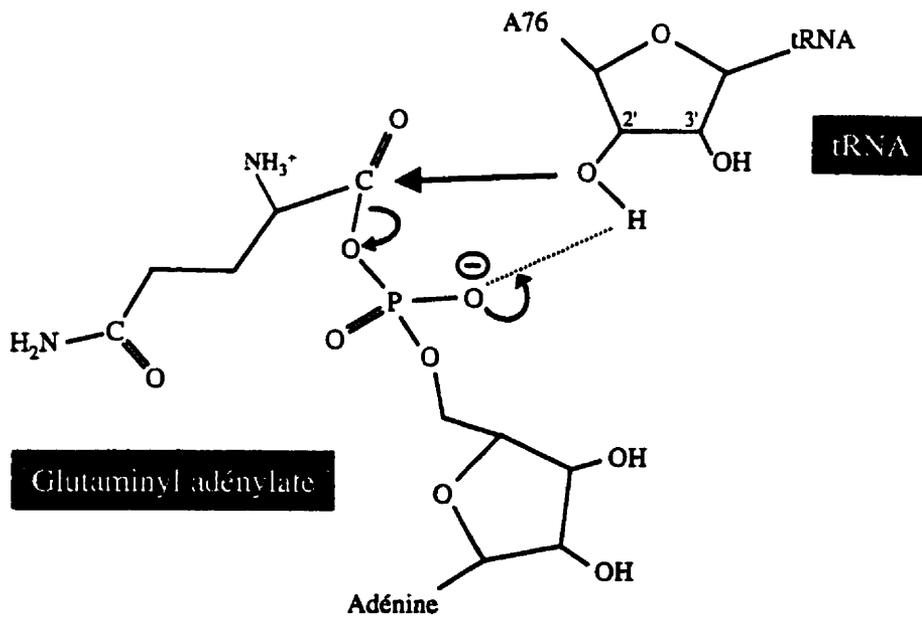
1.2.2 Mécanisme d'aminacylation

La mise à jour de la structure de la GlnRS d'*E. coli* (Rould *et al.* 1989; Perona *et al.*, 1993) en présence de différents substrats et de la TyrRS de *Bacillus stearothermophilus* (Brick *et al.*, 1989) ont permis d'imaginer un mécanisme pour la réaction d'aminacylation (Fig. 4).

Dans la première réaction (Fig. 4a), un oxygène du groupement carbonyle de la glutamine attaque l' α -phosphate de l'ATP. Il en résulte un état de transition dans lequel on observe un phosphate pentacovalent, d'où émane une molécule de pyrophosphate formé des phosphates β et γ de l'ATP (Perona *et al.*, 1993). Le rôle de l'enzyme dans cette réaction est de positionner correctement les substrats et de stabiliser l'état de transition. L'enzyme n'est pas directement impliquée dans la réaction; lorsque les substrats sont en place, la réaction s'initie d'elle-même. Les résidus Lys270 (du KLSK) et His43 (du HIGH) stabilisent l'état de transition. L'Asn36 sert à assujettir correctement la chaîne latérale de la lysine 270. Des études de cinétiques enzymatiques chez des mutants de la TyrRS de *B. stearothermophilus* ont démontré que les résidus équivalent: Lys233, His48 et Thr40, étaient impliqués dans la stabilisation de l'état de transition (Wells et Fersht, 1985; Leatherbarrow *et al.*, 1985; Fersht *et al.*, 1988). Le magnésium jouerait aussi son rôle dans cette réaction: positionner correctement les phosphates β et γ et faciliter la réaction en aspirant les électrons (Perona *et al.*, 1993). Le tRNA, même si sa présence est essentielle pour la complétion de cette réaction chez la GlnRS, ne semble pas directement impliqué.

Dans la seconde réaction (Fig. 4b), l'oxygène en 2' du ribose en 3' du tRNA attaque le carbone du groupement carbonyle de l'adénylate. Pendant l'état de transition, le carbone est pentacovalent et porte une charge négative, entraînant le bris du lien avec l'oxygène du groupement phosphate de l'AMP et le départ de cet AMP (Perona *et al.*, 1993). Le rôle de l'enzyme serait, comme précédemment, de positionner correctement les substrats.

Figure 4. Mécanisme d'aminacylation du tRNA^{Gln} par la GlnRS d'*E. coli* (Perona *et al.*, 1993). (A) Activation de l'acide aminé, (B) Transfert de l'acide aminé sur le tRNA.

A**B**

1.2.3 La Glutamyl-tRNA synthétase

1.2.3.1 Généralités

Chez *E. coli*, la glutamyl-tRNA synthétase est codée par le gène *gluX*. Ce gène se trouve à 52 minutes sur le chromosome d'*E. coli* (Lapointe et Delcuve, 1975). L'enzyme est un monomère de 471 acides aminés et possède une masse de 53.8 kDa (Breton *et al.*, 1986). Chez certaines autres eubactéries, *Rhizobium meliloti* (Laberge *et al.* 1989a,b), *Bacillus subtilis* (Breton *et al.*, 1990), *Bacillus stearothermophilus* (Breton *et al.*, 1990) et *Thermus thermophilus* (Nureki *et al.* 1992), la taille de la protéine est assez semblable (entre 53.9 et 56.2 kDa). Par alignement de séquences, on observe que la partie N-terminale de ces enzymes se ressemble beaucoup. Par contre, leur extrémité C-terminale est différente.

Chez les organismes supérieurs, la GluRS s'observe généralement sous forme de complexe multi-enzymatique associée avec d'autres aminoacyl-tRNA synthétases (Freist *et al.*, 1997 pour une revue). Chez les eubactéries, la GluRS ne forme pas de complexe avec d'autres aaRS. Cependant cette dernière, chez *Bacillus subtilis*, peut s'associer avec l'adénylosuccinate AMP lyase (Gendron *et al.*, 1992). Cette protéine protège la GluRS contre l'inactivation thermique et augmente son affinité pour l'ATP et le glutamate (Proulx *et al.*, 1983).

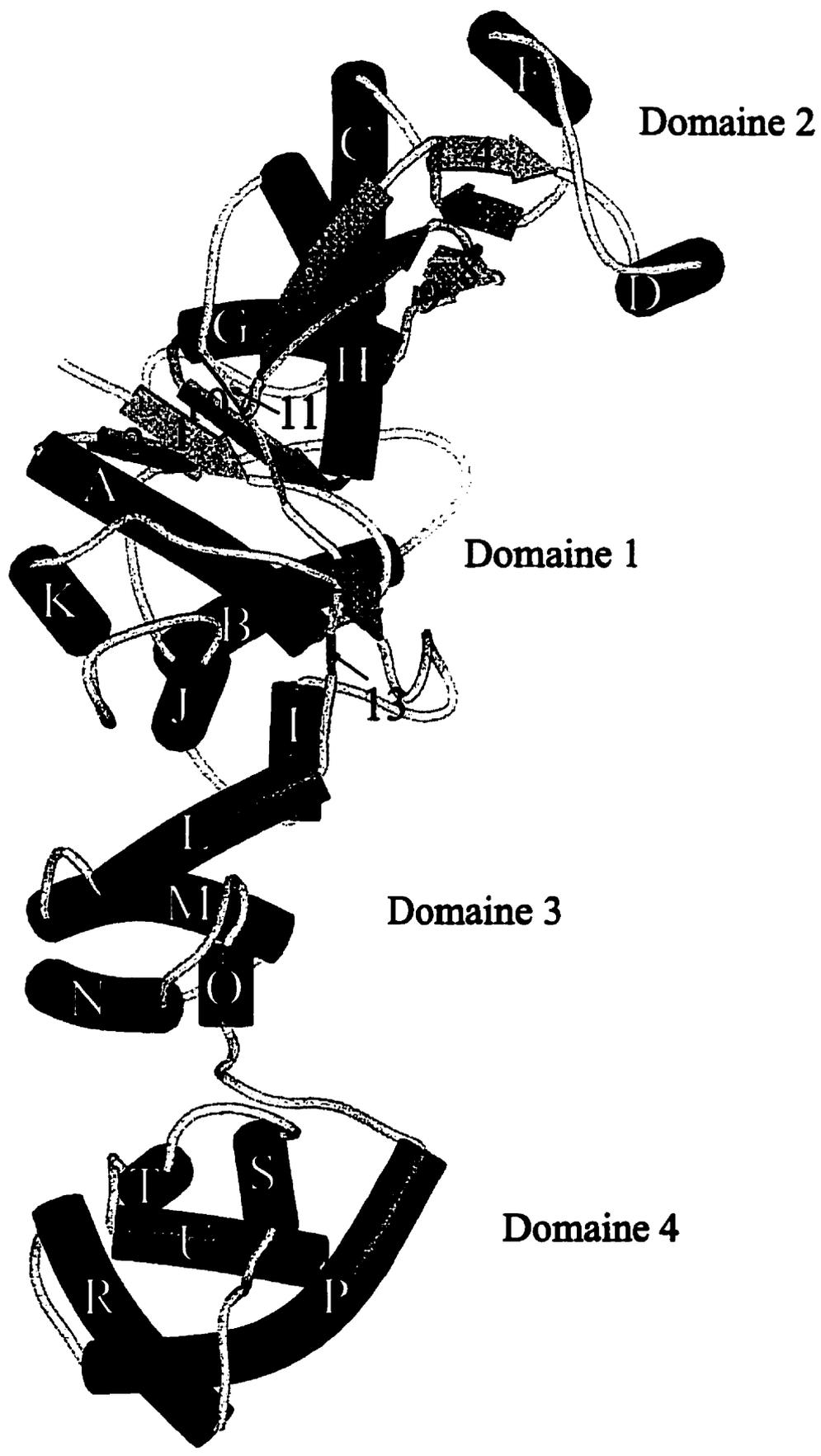
1.2.3.2 Structure de la GluRS de *Thermus thermophilus*

La structure de la GluRS de *Thermus thermophilus* a été élucidée par diffraction des rayons X (Nureki *et al.*, 1995). Cette protéine possède 4 domaines structuraux : les domaines 1 et 2 forment la partie N-terminale alors que 3 et 4 forment la partie C-terminale (Fig. 5).

Le domaine 1 est composé des hélices α A, B, C, G, H, I, J, K et L et des barreaux β 1, 2, 10, 11, 12 et 13. C'est dans ce domaine qu'on retrouve les deux séquences signatures: le motif HIGH (HVGT chez *Thermus thermophilus*) placé au début de l'hélice A et le motif KLSK (KISK chez *Thermus thermophilus*) se trouvant entre le barreau 12 et l'hélice I. C'est aussi dans ce domaine qu'on observe le 'Rossman fold'; celui-ci est formé des hélices A, B, G et H et des barreaux 1, 2, 10 et 11. C'est dans ce domaine que se lie l'ATP, le glutamate et l'extrémité acceptrice du tRNA. Notons qu'il existe une grande similarité structurale entre ce domaine et le domaine 1 des autres synthétases de classe 1, plus particulièrement avec la GlnRS d'*E. coli*.

Le domaine 2 est composé des hélices α D et F, d'une l'hélice 3_{10} (entre D et F) et d'un feuillet β antiparallèle, composé des barreaux 4, 5, 6, 7, 8 et 9. Lorsqu'on compare ce domaine avec celui correspondant des autres synthétases de classe 1, nous remarquons que seul celui de la GlnRS d'*E. coli* lui est apparenté (Rould *et al.*, 1989; Nureki *et al.*, 1995). On observe qu'ils sont presque identiques, à deux exceptions près: l'hélice 3_{10} est remplacée par un barreau β et

Figure 5. Structure tridimensionnelle de la GluRS de *Thermus thermophilus* (Inspirée de Nureki *et al.*, 1995).



les barreaux β 6 et 7 sont éliminés. Chez la GluRS d'*E. coli*, ce domaine lie un atome de zinc (Liu *et al.*, 1995) essentiel à l'activité de l'enzyme (Liu *et al.*, 1993). Ce domaine serait impliqué au niveau de la reconnaissance de la tige acceptrice des tRNA^{Glu} et tRNA^{Gln}.

Les domaines 3 et 4 sont composés d'hélices α : les hélices M, N et O pour le domaine 3 et P, U, R, S et T pour le domaine 4. Ces derniers sont dissemblables aux domaines 3 et 4 de la GlnRS d'*E. coli*. En effet, ceux-ci sont constitués exclusivement de barreaux β . Ces domaines oeuvrent à la liaison et la reconnaissance de la boucle anticodon des tRNAs.

1.2.3.3 Mécanisme d'aminocyclation.

Chez la GluRS, la GlnRS et l'ArgRS, le tRNA est essentiel pour la première étape de la réaction; soit l'activation de l'acide aminé. Cela a été vérifié par mesure des paramètres cinétiques de la GluRS pour le glutamate. Ravel *et al.* (1965) ont démontré que le Km de la GluRS d'*E. coli* passe de 6.4×10^{-4} à 0.4 M lorsque le tRNA est absent. Une étude plus récente a exposé l'absence de liaison du glutamate lorsque le tRNA est absent (Lapointe et Soll, 1972b). Il a été démontré que le tRNA et l'ATP pouvaient lier l'enzyme libre mais que ces deux substrats devaient être présents pour que la liaison du glutamate soit possible (Kern et Lapointe 1981).

Qu'est-ce qui prouve que cette réaction se fait bien en deux étapes et non pas en une seule? Selon Kern et Lapointe (1980 a,b,c), l'ATP est clivé avant que le glutamate soit transféré sur le tRNA. L'échange ATP \leftrightarrow pyrophosphate n'est en rien impliqué dans ce

transfert. De plus, en mélangeant de la GluRS, du Glu-tRNA^{Glu} et de l'AMP, ils ont pu isoler l'aminoacyl-adénylate. Le fait qu'on ait pu isoler l'intermédiaire entre les deux réactions est un argument très solide à l'appui de l'hypothèse des deux étapes.

Les paramètres cinétiques de la GluRS d'*E. coli* pour ces différents substrats sont bien connus. Son 'turnover number' à pH 7.2 se situe entre 1.8 s^{-1} et 3.6 s^{-1} (Kern et Lapointe 1979; Sylvers *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1992). À pH 8.6, son 'turnover number' monte à 4 s^{-1} . Le Km de la GluRS pour l'ATP se situe entre $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ et $4.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Ravel *et al.*, 1965; Lapointe et Soll, 1972a; Lapointe et Soll 1972c). Le Km de la GluRS pour le glutamate se situe entre $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ et $1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Ravel *et al.*, 1965; Lapointe et Soll, 1972a; Lapointe et Soll 1972c; Powers et Ginsburg, 1978). Le Km de la GluRS pour le tRNA est entre $7 \times 10^{-8} \text{ M}$ et $4.6 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Lapointe et Soll, 1972a; Lapointe et Soll 1972c; Lapointe et Soll, 1972b; Kern et Lapointe, 1979). La constante de dissociation (K_d) du tRNA^{Glu}, dans 100mM NaCl à pH 7.0, est de $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Willick et Kay, 1976).

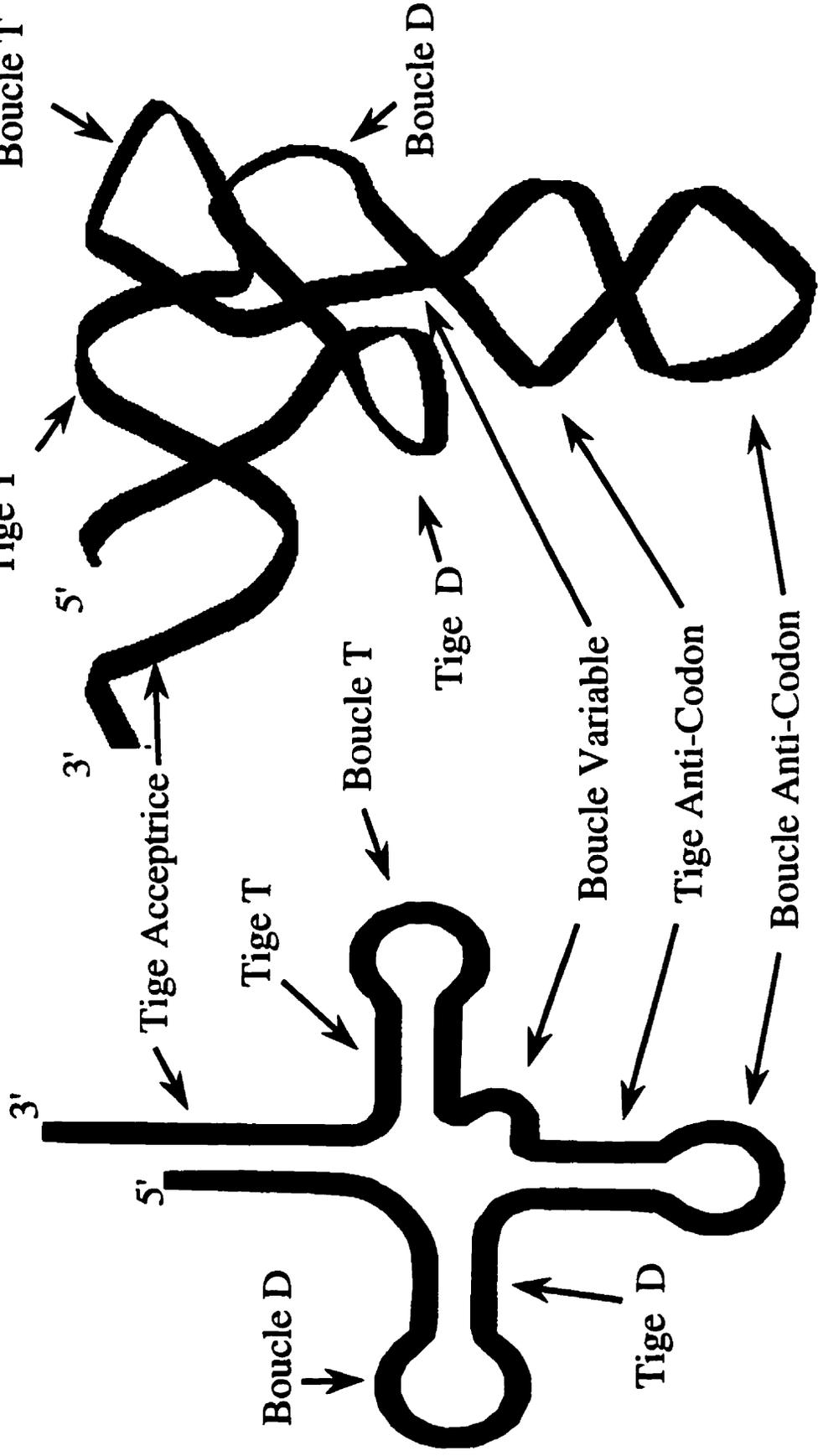
1.3 Les tRNAs

Le principal rôle des tRNAs (Acide RiboNucléiques de transfert) est de servir de lien entre les acides nucléiques et les protéines. Les tRNAs qui sont eux-mêmes des acides nucléiques, possèdent un anticodon complémentaire aux codons présents sur les mRNAs. Ils possèdent aussi, lorsqu'aminocylés, un acide aminé. Si l'anticodon d'un aminocyl-tRNA est complémentaire au codon du mRNA porté par le ribosome, cet acide aminé pourra être transféré à une protéine en élongation. Comme nous l'avons déjà vu précédemment, les aminocyl-tRNAs peuvent être impliqués comme donneur d'acides aminés dans plusieurs réactions. De plus, certaines espèces mineures de tRNAs sont des supresseurs et ont aussi un rôle régulateur (Bienz *et al.*, 1981).

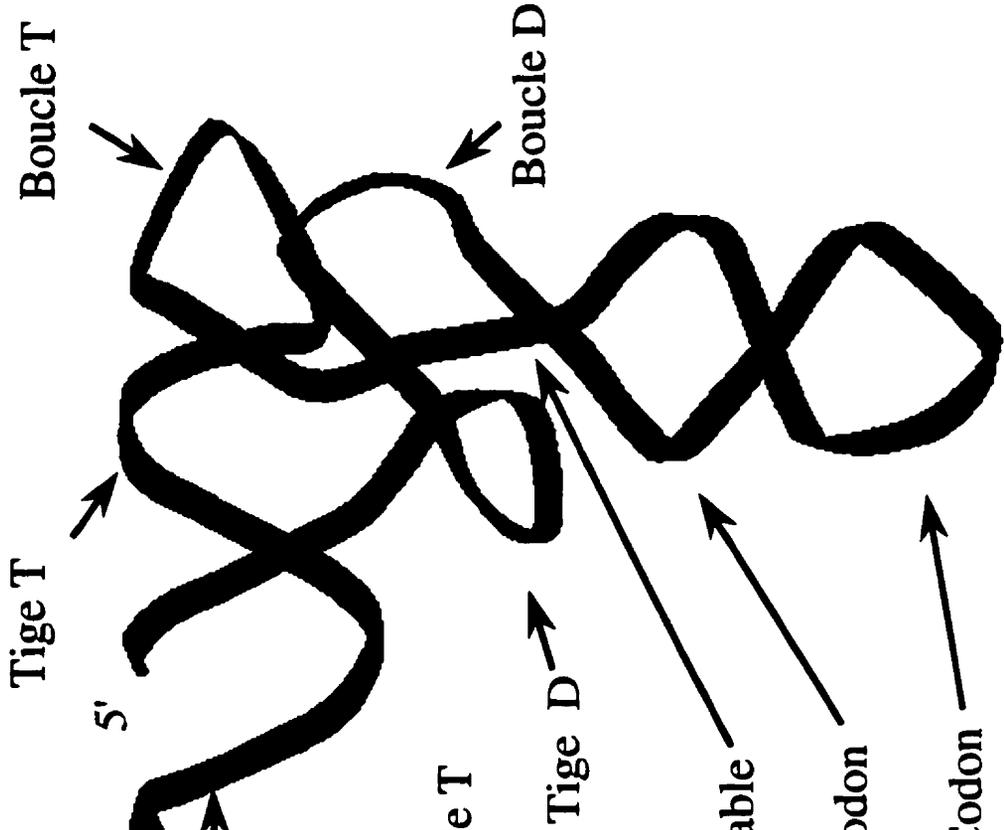
Il existe deux classes de tRNA. La reconnaissance de ces deux classes est basée sur la longueur de la région variable. Ceux qui possèdent plus de 10 nucléotides dans cette boucle sont considérés comme faisant partie de la classe 2, les autres sont de classe 1. Chez *E. coli*, seuls les tRNAs leucine, sérine et tyrosine font partie de la classe 2.

Figure 6: Structure des tRNAs. A) structure secondaire B) structure tertiaire

A



B



1.3.1 Structure des tRNAs

Nous connaissons la séquence en nucléotides d'un millier de tRNAs (Sprinzl *et al.*, 1998). La plupart de ces tRNAs possèdent une structure secondaire en forme de trèfle (Fig. 6). Les tRNAs possèdent quatre boucles et quatre tiges. Ces boucles sont appelées : boucle D, boucle T (ou TΨC), boucle anticodon et région variable. Les quatre tiges sont : tige D, tige T, tige anticodon et tige acceptrice. Les tRNAs ont une longueur variant généralement entre 70 et 90 nucléotides. C'est surtout dans la région variable que sont ajoutés les nucléotides. Comme son nom l'indique, c'est dans la boucle anticodon que se trouve l'anticodon. Tous les tRNAs possèdent une séquence se terminant en CCA à l'extrémité 3' de leur tige acceptrice. C'est sur le ribose de l'adénosine, en position 2'OH ou 3'OH (selon l'aaRS), que sera attaché l'acide aminé (Eriani *et al.*, 1990; Hecht *et al.*, 1979). Le nucléotide précédant immédiatement le CCA est appelé base discriminatrice parce qu'elle sert d'élément de reconnaissance pour la plupart des aaRS (Crothers *et al.*, 1972).

Par cristallographie, on a pu déterminer la structure tridimensionnelle, au niveau atomique, de quatre tRNA : les tRNA^{Asp} (Rich *et al.*, 1976; Moras *et al.*, 1980; Westhof *et al.*, 1985) et tRNA^{Phe} (Ladner *et al.*, 1975; Kim *et al.*, 1973) de *S. cerevisiae*, le tRNA^{Met} de *E. coli* (Woo *et al.*, 1980) et le tRNA^{Gln} d'*E. coli* en complexe avec la GlnRS (Rould *et al.* 1989). Ces tRNA adoptent une forme en L où la tige acceptrice et la boucle anticodon se trouvent chacune à une extrémité. Les boucles T et D se retrouvent au coin du L. La tige acceptrice et la tige T sont empilées pour former une double hélice longue de 12 paires de bases. Au bout de cette hélice se trouvent les 4 nucléotides NCCA. La conformation de ces 4 nucléotides

dépendrait de la nature de la base discriminatrice (N). Des études par RMN sur des microhélices (Ramos et Varani, 1997; Puglisi *et al.*, 1994; Metzger *et al.*, 1997) indiquent que si la base discriminatrice est une purine, ces 4 nucléotides seront préférentiellement empilés sur la tige acceptrice. Par contre, si cette base est une pyrimidine, ces 4 nucléotides seront disposés plus aléatoirement. Des expériences de circularisation de tRNA avec la RNA ligase corroborent ces résultats : seul les tRNA ayant une pyrimidine comme base discriminatrice peuvent être recircularisés (Hou *et al.*, 1998). Comme pour la tige acceptrice, la tige D et la tige anticodon forment une seule double hélice de 10 paires de bases. Les trois bases de l'anticodon sont empilées l'une sur l'autre du même côté de la boucle anticodon, de manière à pouvoir former un triplet de paires de bases avec les codons du RNA messenger. La boucle T est en relation étroite avec la boucle D. Les nucléotides C54 et Ψ55 de la boucle T forment des paires avec les nucléotides G19 et G18 de la boucle D. La tige D, les nucléotides 8 et 9 avec le concours de plusieurs triplets de bases et la région variable dans les tRNA de classe 1 s'associent pour former une région appelée hélice D augmentée.

1.3.1.1 Bases modifiées

Les tRNA se distinguent des autres RNA en ce qu'ils possèdent plusieurs bases modifiées. Tous les organismes ayant fait l'objet d'études possèdent des tRNAs aux bases modifiées (Björk, 1986). Chez *E. coli* on retrouve une trentaine de type de modifications (Björk *et al.*, 1987)(Fig. 7). Ces bases sont des dérivés de l'adénine, de la cytidine, de la guanine ou de l'uridine. Ces modifications consistent en grande partie en une simple

méthylation. Nous pouvons observer des transformations plus sévères chez des bases dites hypermodifiées.

Il existerait trois fonctions plausibles pour les bases modifiées. Ces bases pourraient jouer un rôle structural, ou régulateur, ou servir d'élément d'identité pour les aaRS.

Nous croyons que la majorité des bases modifiées ont un rôle structural. Elles effectueraient les micro-ajustements nécessaires à l'obtention d'un tRNA 'optimal'. Certaines bases modifiées forment des liens hydrogènes inusités. C'est le cas pour m_1A58 - m_5U54 de la boucle T du tRNA^{Phe} (Kim *et al.*, 1979) qui forment un lien de type Hoogsteen. Un autre exemple est celui de la base en position 37 (voisin de l'anticodon du côté 3'); son rôle serait de positionner correctement l'anticodon lors de son association avec le RNA messenger (pour une revue, voir Lapointe et Giégé, 1991).

Certaines bases modifiées pourraient jouer le rôle de déterminant (élément nécessaire pour la reconnaissance du tRNA par l'aaRS complémentaire) ou d'antidéterminant (élément nécessaire pour la non-reconnaissance du tRNA par les aaRS non-complémentaires). La base modifiée en position 34 du tRNA_{2^{lle}} d'*E. coli* est un bon exemple de déterminant et d'anti-déterminant. À cette position, on retrouve une lysidine (un dérivé de la base C). Lorsque cette base n'est pas modifiée, on remarque que ce tRNA n'est plus reconnu par l'IleRS mais plutôt par la MetRS (Muramatsu *et al.*, 1988); ce qui fait de cette base un déterminant pour l'IleRS et un anti-déterminant pour la MetRS. De plus cette base, comme plusieurs autres en position 34

(Wobble) chez d'autres tRNA, joue un rôle important dans la reconnaissance des codons et dans l'établissement du code génétique (Normanly et Abelson., 1989).

Une hypothèse intéressante veut que certaines modifications aient un rôle régulateur (Persson, 1993). Ce serait le cas, par exemple, des bases présentes dans la tige et la boucle anticodon du tRNA^{His} chez *S. typhimurium*. Lorsque ces bases sont absentes, il en résulte une dépression de l'opéron histidine (Roth *et al.*, 1966).

Chez *E. coli*, plus de 45 enzymes sont impliquées dans la synthèse des bases modifiées (Björk *et al.*, 1987). La synthèse de ces bases à l'exception de l'inosine (I) et de la queuosine (Q), se fait sur le tRNA après que ce dernier ait été transcrit (Hankins et Farkas, 1970; Elliott et Trewyn, 1984). La formation de chacune de ces bases modifiées requiert une ou plusieurs enzymes selon le besoin. De plus si une même base se retrouve à plusieurs endroits sur le tRNA, elle pourra requérir les services d'enzymes différentes pour chacune de ces positions, c'est le cas de la base Ψ chez *E. coli* (Singer *et al.*, 1972; Green *et al.*, 1982). Nous savons que certaines enzymes comme la Q-insertase (Carbon *et al.*, 1983) reconnaissent des séquences alors que d'autres comme la tRNA(Gm34)méthyltransférase (Drogmans *et al.*, 1986) regardent plutôt l'environnement.

Figure 7 : Location et identification des principales modifications chez les tRNAs de *E. coli*
(Sprinzl *et al.*, 1998; Grosjean *et al.*, 1995)

Nous connaissons peu le mécanisme de régulation de ces enzymes. Nous savons que les gènes codant pour ces enzymes sont exprimés à bas niveau (Björk *et al.*, 1987). Le niveau d'expression de quelques-unes de ces enzymes semble augmenter avec une hausse de la vitesse de croissance. C'est le cas de la tRNA(m⁵U54)-méthyltransférase alors que chez les tRNA(m¹G37)méthyltransférase, tRNA(mnm⁵s²U34)méthyltransférase et tRNA(38,39,40) synthétase, la quantité d'enzyme semble constante (Ny et Björk, 1980a+b; Arena *et al.*, 1978).

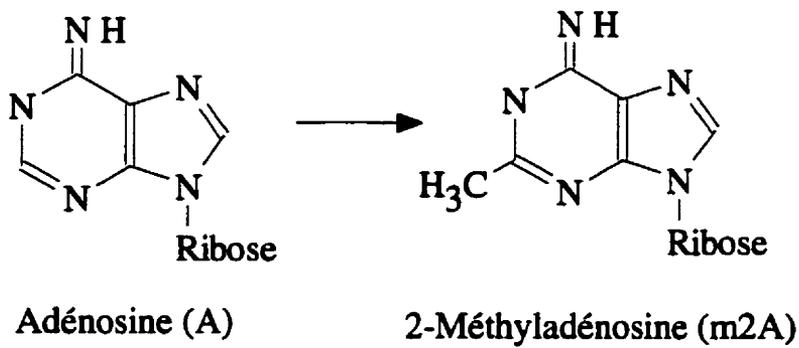
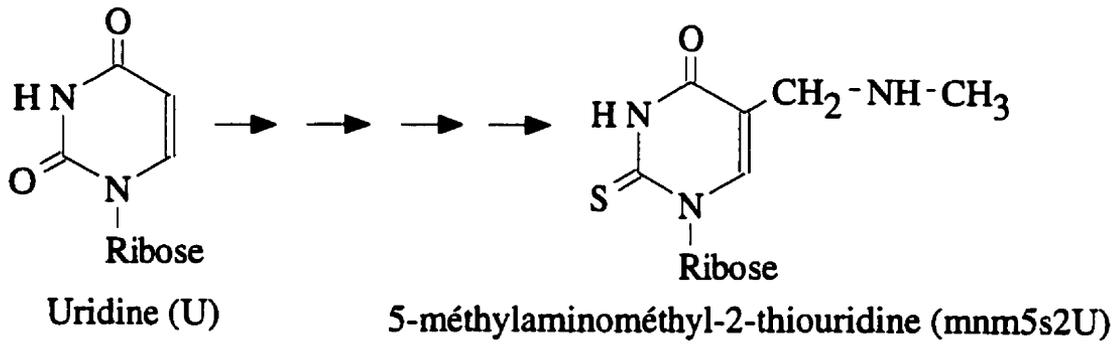
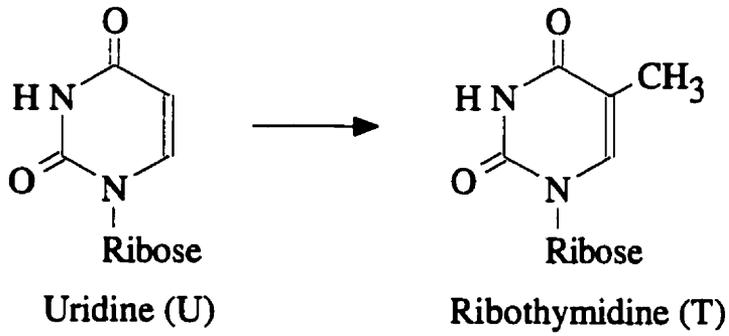
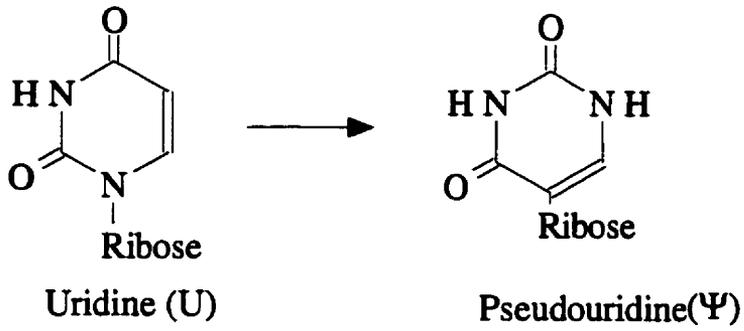
1.3.2 Le tRNA^{Glu} d'*E. coli*

1.3.2.1 Structure primaire, secondaire et tertiaire du tRNA^{Glu}

À l'origine, on croyait qu'il existait deux espèces différentes de tRNA^{Glu} chez *E. coli*: tRNA₁^{Glu} et tRNA₂^{Glu} (Nishimura, 1971). Des études plus récentes ont révélé que l'une de ces deux formes (tRNA₁^{Glu}) ne constituait en fait qu'une version dénaturée du tRNA^{Glu} natif (tRNA₂^{Glu}) d'*E. coli* (Tremblay et Lapointe, 1986). Il existe dans le génome d'*E. coli* K12, quatre gènes identiques codant pour ce tRNA. Ces gènes font partie intégrante d'opérons codant pour d'autres RNA stables tels les RNA ribosomaux 16S, 23S et 5S (Morgan *et al.*, 1977, Komine *et al.*, 1990).

Figure 8. Structure secondaire et modèle de la structure tertiaire probable du tRNA^{Glu} (Sekine *et al.*, 1996)

Figure 9: Les bases modifiées du tRNA^{Glu} d'*E. coli* et leurs précurseurs.



Le tRNA^{Glu} avec ses 76 nucléotides est l'un des plus petits tRNA d'*E. coli*. Dû à son haut pourcentage de G+C, son point de fusion est d'environ 90°C (Lapointe, 1972). Ce tRNA possède une particularité intéressante: il ne contient que cinq bases modifiées (Fig. 8). Ces bases modifiées sont une pseudouridine (Ψ) en position 13, une 5-méthylaminométhyl 2-thiouridine (S) en position 34, une 2-méthyladénine (m²A) en position 37, une ribothymidine (T) en position 54 et une autre pseudouridine en position 55 (voir figure 9). Seule la base S requiert plus d'une enzyme pour sa synthèse. De fait, sa synthèse nécessiterait la présence de cinq enzymes (Bjork *et al.*, 1987; Rogers *et al.*, 1995).

Aucune structure de tRNA^{Glu} n'a été élucidée par diffraction aux rayons X ni par RMN. Par contre, d'autres approches (mutagenèse, cinétiques, sondage chimique et enzymatique...) nous ont renseigné sur la structure tertiaire de ce tRNA. Nous savons que la présence de magnésium est essentielle pour obtenir un tRNA^{Glu} actif et correctement replié (Eisinger et Gross, 1975; Bina-Stein, 1974). Des expériences de sondage chimique au bisulfite (Singhal, 1971) nous indiquent que les cytidines présentes dans l'anticodon, les boucles variable et D et dans le CCA^{3'} étaient attaquées, donc accessibles au solvant. Le sondage avec la cysteine-méthyl-ester (Wataya *et al.*, 1976) démontre que les region variable et D sont exposées au solvant alors que les tiges anticodons et T sont protégées. Des expérimentations de sondage enzymatique à l'aide des RNases T1 et S1 suggèrent que les boucles T, D et anticodon sont accessibles ainsi que la tige D et le CCA^{3'} (Wrede *et al.*, 1979). Par mutagenèse dirigée et par comparaison avec les structures existantes, un modèle de la structure tertiaire du tRNA^{Glu} d'*E. coli* a pu être établi (Sekine *et al.*, 1996)(Fig. 8b). On remarque dans ce modèle

la présence de quatre triplets de bases : A21-A14-U8, Ψ13-G22-A46, C12-G23-C9 et C25-G10-A45.

Nous savons que le tRNA^{Glu} d'*E. coli* peut adopter trois structures secondaires différentes : native, inactive (ou dénaturée) et dimérique. La première est la structure en feuille de trèfle qu'adoptent normalement les tRNAs. La seconde, appelée forme inactive, est obtenue lorsqu'on place le tRNA natif en absence de magnésium et en présence d'un chélateur des cations divalents comme l'EDTA (Eisinger et Gross, 1975; Bina-Stein, 1974). La GluRS n'aminoacyle pas ce conformère. Par la comparaison des spectres U.V. des formes native et dénaturée, nous savons que la forme dénaturée possède moins de bases empilées (Eisinger et Gross, 1975). Le conformère dénaturé peut s'associer au tRNA^{Phe} aussi efficacement que le tRNA natif (Eisinger et Gross, 1975), suggérant l'intégrité de sa boucle anticodon (le dimère tRNA^{Glu}-tRNA^{Phe} se formerait via l'anticodon). Enfin, d'après des mesures de vitesses de relaxation, ce conformère ne posséderait que trois hélices (Bina-Stein *et al.*, 1976). Celles-ci seraient les hélices anticodon, acceptrice et possiblement T. La troisième forme est le dimère de tRNA^{Glu}. Cette forme est obtenue en plaçant la forme dénaturée du tRNA^{Glu} en présence de magnésium à basse température (Eisinger et Gross, 1975). Nous ignorons tout de ce conformère sauf que la barrière énergétique à franchir pour passer de la forme dénaturée au dimère n'est que de 14 kcal M⁻¹ (Eisinger et Gross, 1975).

1.3.3.2 Interaction entre la GluRS et le tRNA^{Glu} d'*E. coli*

Les interactions entre le tRNA^{Glu} et la GluRS ont été investiguées de différentes façons. Par dichroïsme circulaire (Willick et Kay, 1976) et par ultraviolet (Thomas *et al.*, 1981), il a été observé que la boucle anticodon du tRNA^{Glu}, plus particulièrement la base 34, était en contact avec la GluRS. Des expériences de protection du tRNA par la GluRS contre l'éthyl-nitroso-urée montrent quels nucléotides sont en contact avec la GluRS (Sekine *et al.*, 1996). Les nucléotides les mieux protégés sont : U11, C12, Ψ13 et G69. Les autres nucléotides protégés sont C5, C6, U7, C9, A14, G15, A16, A24, C25, A26, m²A37, C38, G39, G67, G68 et G70 (Sekine *et al.*, 1996). Ces résultats indiquent que les principaux contacts avec la GluRS se font par la tige D. Des expériences de pontage avec un tRNA oxydé en 3' montrent que le tRNA^{Glu} peut former 2 complexes de différents poids moléculaires avec la GluRS suggérant que celui-ci est capable de se lier à au moins deux endroits différents (Brisson, 1992).

Des études de cinétique enzymatique ont démontré que des 5 nucléotides modifiés du tRNA^{Glu}, seule la base mnm⁵s²U peut être considérée comme un élément d'identité (Kern et Lapointe, 1979; Sylvers *et al.*, 1993; Sekine *et al.*, 1996). En effet, lorsque cette base est chimiquement altérée ou substituée, il en résulte une augmentation du Km de 40 à 300 fois. D'autres éléments ont cependant été découverts : la paire de bases U11-A24 et le triplet Ψ13-G22-H46 de l'hélice D étendue et G1-C72, U2-C71, U34, U35, C36, A37 et l'absence du nucléotide 47 sont considérés respectivement comme des éléments majeurs et secondaires (Sekine *et al.*, 1996). Fait à noter, contrairement à plusieurs autres tRNA, la base discriminatrice (G73) n'est pas un élément d'identité (Sherman *et al.*, 1992).

1.4 Objectifs et méthodologie.

Mes objectifs sont d'identifier les sites de pontages de l'extrémité acceptrice du tRNA^{Glu} sur la GluRS, de déterminer le rôle des bases modifiées du tRNA^{Glu} au niveau structural et dans l'interaction avec la GluRS et finalement d'obtenir la structure des formes inactive et dimérique du tRNA^{Glu}. L'atteinte de ces objectifs permettra d'approfondir nos connaissances sur les interactions entre le tRNA^{Glu} et la GluRS d'*E. coli*

Le pontage entre le tRNA^{Glu} et la GluRS se fait à l'aide d'un tRNA^{Glu} dont le ribose en 3'OH a été oxydé au periodate. Ce tRNA ainsi traité peut se fixer de façon covalente au site actif de la GluRS. Les complexes obtenus sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant. L'identification des sites de contact se fait en digérant partiellement la GluRS, en purifiant les peptides lié au tRNA par chromatographie sur couche mince en deux dimensions et en les séquençant.

Pour déterminer le rôle des bases modifiées, nous devons d'abord obtenir des tRNAs avec une ou plusieurs base(s) modifiée(s) en moins. Pour y parvenir, nous avons utilisé une souche surproductrice de tRNA^{Glu}. Lors d'une surproduction massive, les enzymes de modification n'ont pas le temps de modifier entièrement le tRNA^{Glu} et il en résulte une population hétérogène de tRNA^{Glu} plus ou moins modifié. Ces différents tRNAs sont ensuite purifiés par chromatographie sur une colonne de C18 modifié. Le contenu en bases modifiées est identifié par chromatographie sur couche mince en deux dimensions. L'effet des bases

modifiées sur l'interaction avec la GluRS est évalué en mesurant les paramètres cinétiques (K_m et k_{cat}) de la GluRS pour ces différents substrats en présence de tRNA plus ou moins modifié. L'effet des bases modifiées sur la structure du tRNA est évalué par sondage chimique avec le plomb, l'éthyl-nitro-urée (ENU) et le diméthyl sulfate (DMS). Le plomb et l'ENU nous permettent de sonder les phosphates exposés au solvant. Le DMS nous permet d'identifier les cytosines qui ne sont pas impliquées dans une paire de bases.

La détermination de la structure des formes inactive et dimérique du tRNA^{Glu} est faite à l'aide de sondage chimique au diéthylpyrocarbonate (le DEPC attaque les adénosine qui ne sont pas empilées) et au DMS. Avant d'être soumis à l'action des sondes, le tRNA^{Glu} est converti sous sa forme inactive (en lui enlevant son magnésium) ou dimérique (en redonnant du magnésium à la forme inactive à 4°C). Les données ainsi obtenues, comparées à celles obtenues pour la forme native, permettront d'établir la structure de ces deux formes.

Les protocoles de toutes ces expériences sont décrits dans le chapitre suivante intitulé 'Matériels et méthodes'. Les résultats des études sur le rôle des bases modifiées du tRNA^{Glu}, la structure des formes dénaturée et dimérique et des expériences de pontages sont montrés, respectivement, aux chapitres 3, 4 et 5.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

2.1 Préparation du matériel

2.1.1 Préparation des cellules

2.1.1.1 Souches utilisées

La souche *Escherichia coli* DH5 α contenant le plasmide pKR15 surproduit le tRNA^{Glu} d'*E. coli*. Ce plasmide exprime le gène codant pour le tRNA^{Glu} de façon constitutive à partir du promoteur d'une protéine membranaire. Le plasmide code également pour un gène de résistance à l'ampicilline. Ce plasmide est un don des Drs. Kelley Rogers et Dieter Söll.

La souche *E. coli* K12 Δ H1 Δ Trp contenant le plasmide pRS3 (Perona *et al.*, 1988) surproduit le tRNA^{Gln} d'*E. coli*. La surproduction du tRNA^{Gln} est induite par un choc thermique à 42°C. Le plasmide code aussi pour un gène de résistance à l'ampicilline.

La souche *E. coli* UT481 contenant le plasmide pEC7 surproduit la tRNA-nucléotidyl transférase (TNT) d'*E. coli* (Cudny et Deutscher, 1986). Le plasmide surproduit constitutivement la TNT et code aussi pour un gène de résistance à l'ampicilline. Ce plasmide nous a été donné par le Dr. Murray P. Deutscher.

La souche *E. coli* DH5 α contenant le plasmide pLQ7612 surproduit la GluRS d'*E. coli* (Brisson *et al.*, 1989). Le plasmide surproduisant la GluRS sauvage est induit par un choc thermique à 42°C. Le plasmide confère une résistance à l'ampicilline.

2.1.1.2 Milieux de culture

Deux milieux de cultures sont utilisés : un milieu riche (LB, défini par Luria et Bertani) et un minimal (voir Lech et Brent, 1997). Le milieu riche contient 10 g de bacto tryptone, 5 g d'extrait de levure et 5 g de NaCl par litre d'eau. Le milieu minimal contient 33 mM de KH_2PO_4 , 60 mM de K_2HPO_4 , 7.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM $\text{Na}_3\text{Citrate}$, 0.8 mM MgCl_2 , 11 mM dextrose et 15 μM de thiamine.

2.1.2 Purification du tRNA total

Le tRNA total est purifié selon une méthode dérivée de celle de von Ehrenstein (1967). Le tRNA total est extrait à partir de cellules DH5 α (pKR15) croissant dans 20L de milieu minimal. Les cellules sont centrifugées lorsque la densité optique à 600nm atteint 0.8. Les cellules (50 g) sont resuspendues dans 100 ml de Tris-HCl 20mM pH 7.2. Nous ajoutons 100 ml de phénol (tamponné à pH 7.2 avec du Tris-HCl 20mM) et la suspension est soumise à une faible agitation pendant 2 heures à 4 °C . Le mélange est ensuite centrifugé pendant une heure à 6000 x g. Les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont précipités avec 2 volumes d'éthanol et 0.1 volume d'acétate de potassium 20% à pH 6. Le culot est resolubilisé dans du NaCl 1M et centrifugé 40 minutes à 8000 x g. Le RNA présent dans le surnageant résultant est précipité à l'éthanol comme précédemment. Le précipité est dissout dans 0.5M Tris-HCl pH 8.5 et agité 30 minutes à 37°C. Quatre volumes d'eau sont ajoutés et le tout est injecté sur une colonne d'échangeurs d'anions de type Mono Q (Pharmacia). La colonne est lavée avec du NaCl 200mM dans un tampon Tris-HCl 50mM pH 7.2, jusqu'à ce que la densité

optique à 260nm à la sortie de la colonne soit négligeable. Le tRNA total est ensuite élué avec du NaCl 1M dans un tampon Tris-HCl 50mM pH 7.2.

2.1.3 Préparation d'une colonne C18 modifiée (MODS)

La résine est préparée d'après la méthode de Bischoff et McLaughlin (Bischoff et McLaughlin, 1985; McLaughlin et Bischoff, 1987): 80 g de C18 ODS-Hypersyl (Shandon) sont suspendus dans 500 ml de dichlorométhane. À cela, on ajoute 12 g de chlorure de méthyltrioctylammonium (Sigma) et on agite pendant 3 heures. Sous la hotte chimique, on laisse ensuite évaporer le dichlorométhane. La poudre blanche obtenue est resuspendue dans un tampon : acétate d'ammonium 0.5M pH 4.5, MgCl₂ 0.01 M. La résine a été disposé dans une colonne de type HPLC de 21.2 mm x 250 mm.

2.1.4 Purification du tRNA^{Glu} par chromatographie sur MODS

Avant la chromatographie sur colonne, le tRNA doit être renaturé (voir section 1.12). Pour la chromatographie, on utilise deux tampons : A) l'acétate d'ammonium 0.5 M pH 4.5, MgCl₂ 0.01 M et B) l'acétate d'ammonium 5.0 M pH 6.0, MgCl₂ 0.01 M. Nous pouvons injecter jusqu'à 1000 unités de DO₂₆₀ de tRNA total (dissout dans le tampon A) à un débit de 4 ml par minute. On applique ensuite un gradient de A:100%, B:0% jusqu'à A:40%, B:60%. Le débit de la phase mobile est de 4 ml/min et la durée de la procédure varie de 6 à 12 heures. On mesure la densité optique (à 260 nm, ou plus si l'absorbance est trop forte) du liquide à la sortie de la colonne et on recueille les fractions.

2.1.5 Évaluation de la qualité de tRNA par mesure d'activité

La capacité de charge du tRNA^{Glu} est évaluée en mesurant la quantité totale de tRNA aminoacylé par la GluRS (Lapointe *et al.*, 1985). La solution d'aminacylation est composée de 50 mM de NaHEPES pH 7.2, 16 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 100 µM [¹⁴C]glutamate à ~50 CPM/pmole, 1 µg de GluRS et une quantité connue de tRNA (~40 µg) dans un volume total de 100 µl. Le mélange est incubé à 37°C, des aliquotes de 20 µl sont retirées aux 20 minutes et déposées sur des petits carrés (2 cm x 2 cm) de papier Whatman. Après 30 secondes, ces papiers sont plongés dans de l'acide trichloroacétique 5% à 4°C, et successivement lavés deux fois 15 minutes dans l'acide trichloroacétique 5 % et deux fois 5 minutes dans l'éthanol 99%. Les morceaux de papier sont séchés, placés dans une fiole contenant du liquide à scintillation (Ready Organic de Beckman) et la radioactivité évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation (1217 Rackbeta de LKB). Un graphique de la radioactivité en fonction du temps devrait nous montrer des plateaux. Si le plateau n'est pas atteint, nous devons incuber le mélange plus longtemps. L'activité spécifique du glutamate en CPM/pmole étant connue, il sera possible de déterminer dans chaque échantillon la quantité de tRNA capable d'accepter le glutamate.

2.1.6 Évaluation de la qualité du tRNA sur gel de polyacrylamide

La pureté du tRNA peut être évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en utilisant le système Mini-protéan de Bio-Rad. On utilise un gel à 15% d'acrylamide (acrylamide : bisacrylamide [29 : 1]), 50%(m/v) d'urée dans du tampon TBE (Tris-borate 89 mM à pH 8.3, EDTA 2 mM). Le tampon d'électrode est aussi du tampon TBE. L'échantillon contenant le tRNA (~0.1 unité de DO₂₆₀) est dilué 1:1 dans un tampon contenant 20% de saccharose, 0.25 % de xylène cyanol et du TBE 2X. La durée de l'électrophorèse est de deux heures à 175 V. Le gel est coloré 5 minutes dans une solution de bleu de méthylène 0.1% et d'acide acétique 10%. Il est décoloré dans de l'eau jusqu'à ce que les bandes soient bien visibles.

2.1.7 Évaluation rapide de la qualité du tRNA sur gel de polyacrylamide

La purification fine des tRNA n'est pas nécessaire à leur analyse sur gels. Nous pouvons à cette fin utiliser un peu de pâte de cellule provenant d'environ un millilitre de culture. Cette pâte est mélangée avec 100 µl de Tris-HCl 20mM pH 7.2 et 100 µl de phénol tamponné avec ce dernier. Après homogénéisation par agitation, la pâte est conservée dans la glace pendant 20 minutes et réagitée à toutes les 5 minutes. L'échantillon est ensuite centrifugé 5 minutes à environ 8000 x g à la température ambiante, et l'ARN de la phase aqueuse est précipité par ajout de 2 volumes d'éthanol à -20°C et de 0.1 volume d'acétate de potassium 20% à pH 6. Après centrifugation, le culot est dilué avec 11 µl d'eau. 1µl et 10µl de cette

solution sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 15% tel que décrit dans la section 1.6.

2.1.8 Marquage direct du tRNA en 5' (par échange)

Les acides nucléiques, tel les tRNA, peuvent se marquer directement (sans déphosphorylation préalable) en 5'. On incube de 0.5 µg à 5 µg de tRNA en présence de 50 mM d'imidazole pH 6.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.05 mM ADP, 100 à 250 µCi [γ ³²P]ATP (3000 Ci/mmmole) et 10 unité de T4 polynucléotide kinase (Pharmacia) dans un volume total de 25 µl pendant 1 heure à 37°C (Silberklang *et al.*, 1979b).

2.1.9 Marquage du tRNA en 5' par déphosphorylation et rephosphorylation

Cette procédure de marquage est inspirée du protocole de Keith *et al.*, (1983). Le tRNA peut être déphosphorylé avant d'être marqué. Cette déphosphorylation se fait à partir de 8 µg (320 pmole) de tRNA dans un volume de 50 µl contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 0.02 % SDS, 7% formamide. Ce mélange est réchauffé 2 minutes à 80°C et refroidi rapidement sur glace. On ajoute 1 unité de BAP ('Bacterial alkaline phosphatase')(Amersham) et on incube 15 minutes à 37°C. On ajoute encore 1 unité de BAP et on incube 15 minutes à 37°C. La réaction est interrompue par une extraction au phénol suivie par deux extractions à l'éther. À la phase aqueuse on ajoute 5 µl d'acétate de sodium 3M pH 6.0 et 140 µl d'éthanol afin de précipiter les tRNAs. Le précipité est ensuite solubilisé dans 8 µl d'eau. La réaction de marquage s'effectue dans un volume final de 20µl contenant environ 320 pmole d'ARN déphosphorylé,

80 mM Tris-HCl pH 8.1, 8 mM MgCl₂, 4 mM DTT, 0.1 mM spermidine, 40 µCi [γ ³²P]ATP (3000 Ci/mme) et ~ 40 unité de T4 polynucléotide kinase (Pharmacia) pendant 30 minutes à 37°C.

2.1.10 Purification des tRNAs sur gel d'acrylamide

La purification des tRNAs marqués est possible sur un grand gel (30 à 40 cm de long) de polyacrylamide 15% (acrylamide : bisacrylamide [29 : 1]) contenant 50%(m/v) d'urée dans du tampon TBE (Tris-borate 89 mM à pH 8.3, EDTA 2 mM). Le tampon d'électrode est également du tampon TBE. L'échantillon contenant le tRNA marqué est dilué 1:1 dans un tampon (tampon d'échantillon) contenant 20% de saccharose, 0.25% xylène cyanol et du TBE 2X. L'électrophorèse se fait à 2100 V et est interrompue lorsque le bleu a parcouru les 2/3 du gel. La bande désirée est détectée par autoradiographie et découpée. Le fragment de gel est placé dans une solution contenant 0.5 M d'acétate d'ammonium à pH 8, 10 mM d'acétate de magnésium, 0.1 mM d'EDTA et 0.1% SDS et ce pendant 16 heures à 4°C. On ajoute alors 0.1 volume d'acétate de sodium 3M pH 6.0 et 2.5 volumes d'éthanol afin d'obtenir le tRNA marqué sous forme d'un précipité.

2.1.11 Identification du contenu en bases modifiées

L'identification des bases modifiées (selon Silberklang *et al.*, 1979) se fait en deux étapes : le marquage de chacun des nucléotides et leur séparation sur 2D-TLC. 0.5 µg tRNA

sont digérés par 0.05 unité de RNase T2 dans un tampon acétate d'ammonium 10 mM pH 4.5 dans un volume total de 10 µl pendant 5 heures à 37°C. Après lyophilisation, les nucléotides 3'-phosphate résultants sont marqués en 5'. Les nucléotides sont dissouts dans 10 µl de : 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM DTT, 0.1 µg BSA, 10% glycérol, 250 µM [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (100 Ci/mmmole) et deux unités de T4 polynucléotide kinase. La réaction s'effectue à 37°C pendant 30 minutes. L'excès d'ATP radioactif est éliminé par l'addition de 2 mM de glucose et de 0.008 unité d'hexokinase. Après 10 minutes à 37°C, 2.5 nmole d'ATP sont ajoutées . Cette étape est répétée une nouvelle fois et après 10 autres minutes, la réaction est interrompue par refroidissement sur glace. Les protéines du mélange sont extraites avec 1 volume de chloroforme : alcool isoamylique [24:1]. La phase organique est ensuite re-extraite 2 fois avec 10 µl d'eau. Les phases aqueuses sont ensuite réunies et extraites 6 fois avec de l'éther diéthylique. L'éther résiduel est ensuite éliminé par incubation à 37°C pendant 15 minutes. Le tout est ensuite lyophilisé et re-dissout dans 20 µl d'eau. Afin d'éliminer le phosphate en 3' des nucléotides, la moitié de cette solution est incubée en présence de 2 µg de nucléase P1 dans 75 mM d'acétate d'ammonium pH 5.3 dans un volume final de 15 µl pendant 3 heures à 37°C. L'échantillon est maintenant prêt à être analysé par chromatographie sur couche mince à deux dimensions. 1 µl est déposé au coin (2.5 cm du bord) d'une plaque de cellulose 20 cm X 20 cm (#5577 de Merck). La première dimension est une chromatographie ascendante dans de l'acide isobutyrique : 25% NH_4OH : H_2O [50:1.1:28.9]. La seconde est une chromatographie ascendante dans HCl : isopropanol : H_2O [15:70:15]. La position des nucléotides radioactifs est ensuite révélée par autoradiographie. En comparant la position des taches radioactives obtenues avec celles des bases modifiées connues (Keith, 1995) on pourra identifier le contenu en bases modifiées de notre échantillon.

2.1.12 Obtention des tRNA^{Glu} natif, inactif et dimérique

La préparation des tRNA^{Glu} natif, inactif et dimérique se fait selon Eisinger et Gross (1975). Le tRNA^{Glu} natif est obtenu en chauffant une solution de tRNA à 60°C en présence de 10 mM de MgCl₂ et en laissant redescendre lentement la température (20 minutes à la température de la pièce). Le tRNA^{Glu} inactif (ou dénaturé) est obtenu en chauffant une solution de tRNA à 60°C en absence de magnésium et en présence de 1 mM d'EDTA et en laissant redescendre lentement la température. Le dimère est obtenu en ajoutant 10 mM de MgCl₂ à une solution froide (4°C) de tRNA inactif.

2.1.13 Purification de la GluRS

La purification de la GluRS s'effectue selon une méthode dérivée de Lin *et al.*, (1992) et ce à partir de 1 litre de culture en milieu riche d'E. coli DH5 α /pLQ7612. Les cellules sont soniquées 10 fois pendant 1 minute dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 10% glycérol, 0.1 mM EDTA, 2 mM PMSF et 3 mM DTT. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12000 x g pendant 45 minutes. Les acides nucléiques sont éliminés par partition dans un système à deux phases aqueuses polyéthylène glycol-dextran : l'extrait brut est mélangé à une solution (20 ml final) contenant 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 10% glycérol, 7% polyéthylène glycol 8000, 1.5% dextran T500, 0.05 mM EDTA, 1 mM PMSF et 1.5 mM DTT.

Le tout est agité pendant une heure et centrifugé 15 minutes à 12000 x g. La phase supérieure, contenant la GluRS, est diluée quatre fois avec un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.2 mM DTT, 10% glycérol et 0.1 mM PMSF et injectée sur une colonne MonoQ HR10/10. Nous appliquons un gradient de 0 à 0.6 M NaCl (dans le même tampon). Les fractions contenant la GluRS sont identifiées par mesure d'activité (1.14) et par SDS-PAGE, et sont rassemblées. Le tampon est remplacé par du Tris-HCl 25 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, glycérol 10% et DTT 0.2 mM à l'aide de Centricon 30 (Amicon). La GluRS est ensuite injectée sur une colonne 'Blue Sepharose CL6B' (Pharmacia). La colonne est lavée avec du Tris-HCl 25 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, glycérol 10% et DTT 0.2 mM et la GluRS est éluée en utilisant le même tampon avec du NaCl 1 M. Les fractions contenant la GluRS sont rassemblées et la GluRS est conservée dans un tampon contenant 20 mM NaHEPES pH 7.2, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT et 65% glycérol après concentration à l'aide de Centricon 30 (le glycérol est ajouté après).

2.1.14 Mesure de l'activité de la GluRS

La mesure du [¹⁴C]glutamate-tRNA^{Glu} permet l'évaluation de l'activité GluRS. (Lapointe *et al.*, 1985) Le milieu d'aminacylation contient 50 mM NaHEPES pH 7.2, 16 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 100 μM [¹⁴C]glutamate à ~50 CPM/pmole, 3.6 mg/ml de tRNA total et environ 0.1 μg/ml GluRS pour un volume final de 120 μL. L'enzyme est diluée dans une solution contenant 50 mM NaHEPES pH 7.2, 1 mg/ml de BSA, 1 mM DTT et 10% glycérol. La réaction se déroule à 37°C. À partir du moment où l'enzyme est ajouté au milieu, des aliquotes (20 μL) sont prélevées à chaque minute pendant 5 minutes. Ces aliquotes sont

déposées sur papier Whatman et sont traitées comme dans la section 2.1.5. Sur un graphique de la radioactivité en fonction du temps, nous devrions obtenir une droite dont la pente est directement proportionnelle à l'activité enzymatique.

2.1.15 Purification partielle de la tRNA-nucléotidyl-transférase

La purification de la tRNA-nucléotidyl-transférase (TNT) s'effectue selon le protocole de Cudny et Deutscher (1986). L'objectif n'est pas d'obtenir une TNT pure mais plutôt une fraction enrichie sans RNases. Les cellules surproductrice (UT481/pEC7) sont lysées par sonication puis centrifugées à 6000 x g pendant 15 minutes. La phase aqueuse est injectée sur une colonne de type Mono Q. Un gradient de 20 mM Tris-HCl pH 7.6 à 200 mM KH₂PO₄ pH 4.5 est utilisé (en présence de 0.1 mM PMSF, 0.1 mM DTT et 10% glycérol). L'activité TNT (voir 2.1.16) est évaluée pour chacune des fractions. La présence de RNase est vérifiée en incubant les fractions positives en présence du tRNA pendant 3 heures à 37°C. L'intégrité du tRNA est ensuite évaluée sur gel d'acrylamide en condition dénaturante.

2.1.16 Mesure de l'activité tRNA-nucléotidyl-transférase

L'activité est mesurée par l'incorporation de [³²P]ATP à l'extrémité 3' de tRNA. Le mélange contient 50 mM Tris-Cl pH 8, 2.5 mM pyrophosphate de sodium, 5 mM DTT, 10 µCi [^α-³²P]ATP, 5 mg/ml tRNA total de levure, 10 mM MgCl₂. Ensuite, 2 µl d'extrait enzymatique, provenant des fractions recueillies précédemment sont ajoutés à 20 µl de mélange réactionnel. Après une incubation de 15 minutes à 37°C, cette solution est déposée

sur un papier Whatman préalablement saturé avec une solution 50 mM ATP. Les papiers Whatman sont traités comme dans la section 2.1.5. Les échantillons contenant le plus de radioactivité correspondent aux fractions contenant la TNT.

2.2 Étude cinétique et structurale du tRNA^{Glu}

2.2.1 Mesure des paramètres cinétiques

Les conditions d'aminocyclation sont essentiellement les mêmes que celle décrite dans la section 1.14, à l'exception de la concentration du substrat pour lequel on veut mesurer les K_M et V_{max} . Les K_M et V_{max} sont déterminés graphiquement par les méthodes de Lineweaver-Burk et d'Eadie-Hofstee.

Pour le tRNA, le mélange réactionnel contient 50 mM NaHEPES pH 7.2, 16 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 100 μM [¹⁴C]glutamate (ayant la plus haute radioactivité spécifique possible), 0.1 $\mu g/ml$ de GluRS et des concentrations en tRNA allant de 0.05 μM à 6 μM .

Pour le glutamate, le mélange contient 50 mM NaHEPES pH 7.2, 16 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 0.1 $\mu g/ml$ de GluRS, du tRNA en concentration 10 fois supérieure au K_M et du glutamate à des concentrations de 20 μM à 400 μM .

Pour l'ATP, le mélange contient 50 mM NaHEPES pH 7.2, 16 mM $MgCl_2$, 100 μM glutamate, 0.1 $\mu g/ml$ de GluRS, du tRNA en concentration 10 fois supérieure au K_M et de l'ATP à des concentrations de 20 μM à 400 μM .

2.2.2 Digestion alcaline du tRNA (pour l'obtention d'une échelle lors de l'électrophorèse sur gel)

La digestion alcaline d'un tRNA marqué au ^{32}P à une extrémité nous donnera une échelle nous permettant d'évaluer la taille des fragments obtenus sur gel. Cette digestion est obtenue en chauffant à 90°C pendant 10 minutes une solution contenant 1 μl de tRNA marqué et 8 μl de NaHCO_3 50 mM pH 8.9. On y ajoute 8 μl de tampon d'échantillon (section 1.10), on la laisse encore 1 minute à 90°C puis on la refroidit sur glace.

2.2.3 Digestion à la RNase T1 (échelle de G)

Une échelle de G peut nous donner des repères facilement identifiables. Le milieu de digestion contient 1 μg de tRNA marqué au ^{32}P en 5', 7 M d'urée, 25 mM de Na-citrate pH 4.5 et 1 mM d'EDTA dans 9 μl . Le mélange est réchauffé à 50°C pendant 5 minutes puis 0.01 unité (0,5 μl) de RNase T1 est ajoutée. Le tout est incubé 10 minutes à 50°C , plongé dans la glace et 8 μl de tampon d'échantillon (section 2.1.10) y sont ajoutés.

2.2.4 Sondage au plomb

La digestion au plomb s'effectue selon Krzyzosiak *et al.*, (1988), dans un milieu contenant 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ tRNA marqué au ^{32}P en 5', 0.09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de tRNA non-marqué, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 et diverses concentrations (0, 0.55, 1.1, 2.2 et 9

mM) d'acétate de plomb. La réaction dure 10 minutes à la température de la pièce. La réaction est arrêtée par l'ajout de tampon d'échantillon (section 2.1.10) contenant en plus 20 mM d'EDTA. Le tout est réchauffé 2 minutes à 65°C puis refroidi sur glace.

2.2.5 Sondage au diméthyl sulfate (DMS)

Le sondage au diméthyl sulfate se fait selon la méthode de Romby et al (1987) et est utile à l'identification des cytosines ne formant pas de paires de bases (Peattie et Gilbert, 1980). Le milieu réactionnel contient 5 µg/ml de tRNA marqué, 45 µg/ml de tRNA non-marqué, 50 mM cacodylate de sodium pH 7.2, 10 mM MgCl₂ et 0.5%(v/v) DMS pour un volume final de 200 µl. La conformation des molécules de tRNA devra être homogène (natif, dénaturé ou dimère) avant l'ajout du DMS. Pour le témoin négatif, le DMS est remplacé par de l'eau. La réaction dure 10 minutes à 37°C et est interrompue par l'ajout de 5µg de tRNA total, 100 µl d'acétate de sodium 1 M à pH 6.0 et 900 µl d'éthanol à -20°C. On laisse précipiter le tRNA et on dissout le culot avec 100 µl d'acétate de sodium 0.3M à pH 6.0 et 300 µl d'éthanol. Le tRNA est précipité et le culot lavé deux fois avec de l'éthanol 80%. Il est ensuite dissout dans 10 µl d'hydrazine 10% et refroidi 5 minutes à 0°C. On ajoute 5 µg de tRNA total, 100 µl d'acétate de sodium 0.3 M à pH 6.0 et 300 µl d'éthanol. On laisse précipiter le tRNA et on ajoute au culot 100 µl d'acétate de sodium 0.3M à pH 6.0 et 300 µl d'éthanol. On laisse précipiter le tRNA et on lave ensuite le culot deux fois avec de l'éthanol 80%. Le culot est ensuite dissout dans 10 µl d'aniline 9% et incubé 10 minutes à 60°C dans l'obscurité. La solution d'aniline est préparée à partir de 950 µl d'eau, 100 µl d'aniline et 60 µl d'acide acétique glaciale (si la solution n'est pas homogène, on peut y ajouter un peu plus d'acide

acétique). La réaction est arrêtée par l'ajout de 100 μl d'acétate de sodium 0.3M à pH 6.0 et 300 μl d'éthanol. On laisse précipiter le tRNA et on lave ensuite le culot deux fois avec de l'éthanol 80%. Le précipité est ensuite solubilisé dans 5 μl d'eau et 5 μl de tampon d'échantillon (section 1.10).

2.2.6 Sondage au diéthyl pyrocarbonate (DEPC)

Le sondage au diéthyl pyrocarbonate s'effectue selon Romby et al (1987) et sert à identifier les adénines non impliquées dans les structure secondaire ou tertiaire (Peattie et Gilbert, 1980). Le milieu réactionnel contient 5 $\mu\text{g/ml}$ de tRNA marqué, 45 $\mu\text{g/ml}$ de tRNA froid, 50 mM cacodylate de sodium pH 7.2, 10 mM MgCl_2 et 5%(v/v) DEPC dans un volume final de 200 μl . Le tRNA devra être dans un seul conformère (natif, dénaturé ou dimère) avant l'ajout du DEPC. Pour le témoin négatif, le DEPC est remplacé par de l'eau. La réaction dure 10 minutes à 37°C et est arrêtée par l'ajout de 5 μg de tRNA total, 100 μl d'acétate de sodium 1M à pH 6.0 et 900 μl d'éthanol. On laisse précipiter le tRNA et on dissout le culot avec 100 μl d'acétate de sodium 0.3M à pH 6.0. Après re-précipitation du tRNA avec 300 μl d'éthanol, le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol 80%. Il est ensuite dissout dans 10 μl d'aniline 9% et laissé à incuber 10 minutes à 60°C dans l'obscurité. L'aniline est préparée à partir de 950 μl d'eau, 100 μl d'aniline et 60 μl d'acide acétique glacial (si la solution n'est pas homogène, on peut ajouter un peu plus d'acide acétique). La réaction est interrompue par l'ajout de 100 μl d'acétate de sodium 0.3 M à pH 6.0 et 300 μl d'éthanol. On précipite le tRNA et on lave le culot deux fois avec de l'éthanol 80%. Le précipité est solubilisé dans 5 μl d'eau et 5 μl de tampon d'échantillon (section 1.10).

2.2.7 Sondage à l'éthyl nitro urée (ENU)

La digestion à l'éthyl nitroso urée (Vlassov *et al.*, 1981; Romby *et al.*, 1985) s'effectue dans un milieu contenant 40 µg/ml de tRNA marqué, 25 µg/ml de tRNA non-marqué, 150 mM cacodylate de sodium pH 8, 10 mM MgCl₂, 0.3 mM EDTA et 10% (v/v) de solution d'ENU dans un volume final de 25 µl. La solution d'ENU est préparée en saturant de l'éthanol 99% avec de l'ENU. Pour le contrôle négatif, la solution d'ENU est remplacée par de l'éthanol 99%. La réaction dure 3 heures à la température de la pièce et est interrompue par l'ajout de 11 µg de tRNA total, 5 µl d'acétate de sodium 2 M à pH 6.0 et 100 µl d'éthanol. Le tRNA est précipité et le culot dissout dans 20 µl d'acétate de sodium 0.3 M pH 6.0/EDTA 20 mM. Le tRNA est précipité par l'ajout de 100 µl d'éthanol et le culot est dissout dans 10 µl de Tris-HCl 100 mM à pH 9.0 et incubé 5 minutes à 50°C. On ajoute ensuite 7 µl d'acétate de sodium 3 M à pH 6.0 et 60 µl d'éthanol. On laisse précipiter le tRNA et on lave ensuite le culot deux fois avec de l'éthanol 80%. Le précipité est solubilisé dans 5 µl d'eau et 5 µl de tampon d'échantillon (section 2.1.10).

2.2.8 Visualisation des produits des réactions de sondage par électrophorèse

Les échantillons provenant des différents sondages, de l'échelle alcaline et de la digestion à la RNase T1 sont déposés sur un grand gel (minimum 40 cm) de 12% de polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide [29 : 1] contenant 50%(m/v) d'urée dans du tampon Tris-borate 89 mM à pH 8.3, EDTA 2 mM). On doit s'assurer que les échantillons provenant d'une même série d'expériences aient des comptes semblables (en CPM mesuré par

sa radiation Cerenkov). On doit également s'assurer que l'intensité de la radioactivité des échelles alcalines et T1 soit du même ordre de grandeur que celles des échantillons étudiés. La migration se fait à 2000 V jusqu'à ce que le bleu ait atteint le tiers du gel. Les bandes sur le gel sont révélées par autoradiographie.

2.3 Pontage du tRNA^{Glu} sur la GluRS d'*E. coli*

2.3.1 Marquage en 3' du tRNA^{Glu} par la TNT

Le marquage en 3' du tRNA se fait par réaction d'échange avec de l' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Le milieu réactionnel contient 50 mM Tris-Cl pH 8.9, 2.5 mM pyrophosphate de sodium, 5 mM DTT, 250 μCi $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (600Ci/mmol), 10 mg/ml tRNA^{Glu} pur, 10 mM MgCl_2 et 5% (v/v) d'extrait de TNT dans un volume final de 250 μl . La réaction dure 30 minutes à 37°C et est interrompue par une extraction au phénol (250 μl). La phase aqueuse contenant le tRNA marqué est précipitée avec 0.1 volume d'acétate de potassium 20% pH 6.0 et 2 volumes d'éthanol. Le culot est lavé avec de l'éthanol 80 % et est dissout dans 200 μl d'eau.

2.3.2 Oxydation du tRNA

L'oxydation au periodate est directement inspiré du protocole de Fayat et al. (1979). Le milieu d'oxydation contient du tRNA^{Glu} marqué en 3' à 2 mg/ml, 7.5 mM de NaIO_4 fraîchement préparé, 100 mM d'acétate de sodium à pH 5.0 et 10 mM de MgCl_2 dans un volume final de 1 ml. L'oxydation s'effectue à l'obscurité, à 4°C pendant 30 minutes. La

réaction est interrompue par l'ajout de 111 μl de glycérol. Le tampon est remplacé par du Tris-HCl 100 mM pH 8.9 (~100 μl) par plusieurs étapes de concentration de l'échantillon original par Centricon-10 (Amicon) et de dilution avec ce tampon. L'oxydation au periodate ne modifie que le ribose en 3' du tRNA^{Glu} d'*E. coli* (Kern et Lapointe, 1980).

2.3.3 Réaction de pontage

La réaction de pontage s'effectue à partir de 2 mg de [5'-³²P]tRNA^{Glu} oxydé et de 2 mg de GluRS pure dans un volume de 500 μl contenant 20 mM d'imidazole pH 8.0, 10 mM de MgCl₂, 25% de glycérol et 10 mM de NaCNBH₃ (fraichement préparé)   37°C pendant 1 heure.

2.3.4 Caractérisation des complexes

2.3.4.1  lectrophor se sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

La formation des complexes peut être visualisée sur gel par SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Une aliquote de 10 μl de la solution de GluRS pontée au [5'-³²P]tRNA^{Glu} oxydé est déposée sur un gel 10 % polyacrylamide. La migration s'effectue en 1 heure à 150 volts. Le gel est coloré au bleu de Coomassie (0.2 % dans une solution 40 % méthanol, 10 % acide acétique) et décoloré avec une solution eau : méthanol : acide acétique [5:4:1].

2.3.4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition native

Le poids moléculaire de chacun des complexes peut être évalué sur gel de polyacrylamide en condition native (Mueller *et al.*, 1995). Les complexes et 5 marqueurs de poids moléculaires ont été analysés sur 6 gels contenant de 4 % à 12 % de polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide [29 : 1] dans 250 mM glycine pH 8.3, 25 mM Tris-HCl). Les marqueurs sont: la β -lactoglobulin (18.4 kDa), la pepsine (34.7 kDa), l'albumine d'oeuf (45 kDa), la 'bovine serum albumin' (66 kDa), son dimère (132 kDa) et la catalase (232 kDa). La variation de la mobilité en fonction de la concentration en polyacrylamide est proportionnelle à la taille de la molécule : plus la molécule est grosse, plus la variation de la mobilité est grande.

2.3.4.3 Spectrométrie de masse

Le poids moléculaire des différents complexes a aussi été mesuré par spectrométrie de masse ESI ('electrospray ionization'). Le spectre a été lu sur un spectromètre de masse 'Micromass Quattro II triple-stage quadrupole' (Micromass, UK) par les Drs. Gilles Lajoie et Jian Chen au 'Biological Mass Spectrometry Laboratory' de l'Université de Waterloo à Waterloo, Ontario, Canada.

2.3.5 Purification de chaque complexe sur gel de polyacrylamide

Les complexes sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en présence de SDS. Les dimensions du gel sont de 20 cm x 20 cm x 3 mm et il est composé de 10% polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide [29 : 1]), 0.1 % SDS, 250 mM glycine pH 8.3, 25 mM Tris-HCl (Laemmli, 1970). Les bandes correspondant à chacun des complexes sont découpées, broyées, et placées dans des sacs à dialyse (Spectra/Por, Fisher #08-667E) contenant 25 mM Tris, 250 mM glycine pH 8.3 et 0.1% SDS. Ce montage est déposé dans un bac contenant le même tampon et soumis à une électrophorèse de 2 heures à 100 volts et à 4° C. Le contenu des sacs est filtré sur un verre fritté. Le volume de la solution est réduit à 50 µl par filtration sur Centricon-30 (Amicon), et la concentration de SDS est réduite à 0.01% par dilutions et filtrations successives dans ce même Centricon.

2.3.6 Digestion du tRNA et de la GluRS

Le tRNA présent dans les complexes est digéré par 100 unités de RNase T1 (Boehringer Mannheim) pendant 3 heures à 37°C. Comme cette nucléase coupe en aval des purines et que le tRNA^{Glu} a un G comme base discriminatrice, cette digestion ne laissera que le CCA^{3'} accroché sur l'enzyme. Le tampon est ensuite remplacé par du bicarbonate d'ammonium 100 mM pH 8.0 à l'aide de Centricon-30. La GluRS est ensuite digérée avec de la trypsine (T-013H de Sigma) à un ratio de 1:20 m/m pendant 24 heures à 37°C. Un échantillon (50 µg) de GluRS pure digéré de la même façon servira de témoin lors des prochaines étapes.

2.3.7 Purification des peptides marqués par chromatographie sur couche mince en 2 dimensions

Environ 15 μ moles de peptides sont déposées au centre et en bas d'une plaque de cellulose 20 cm X 20 cm (No 6064 de Kodak). La première migration est une chromatographie ascendante dans une solution éthanol : chloroforme : 28% ammoniacale : eau [5:2:1:1]. La seconde migration est une électrophorèse dans de l'acétate d'ammonium 100 mM à pH 8. Elle est effectuée avec un appareil Savant TLE20. Les peptides sont colorés avec une solution contenant 0.2% ninhydrine et 2% triméthyl pyridine, ou révélés par autoradiographie. Les taches radioactives sont découpées et les peptides sont extraits une première fois avec de l'eau et une seconde fois avec une solution d'acétonitrile 50%(v/v) dans l'eau. Le volume des échantillons est réduit par lyophilisation.

2.3.8 Identification des peptides marqués

La séquence des différents peptides a été déterminée par dégradation d'Edman (Edman, 1970), par Dr Sylvie Bourassa du Service de séquence de peptides de l'est du Québec (CHUL).

2.4 Logiciels

Un ordinateur Silicon Graphics Indigo 2 a servi aux études de modélisation moléculaire effectuées à l'aide du logiciel InsightII de 'Biosym Technologies'. Les

programmes RasMol de Roger Sayle (Glaxo Wellcome Research and Development) et WebLab ViewerLite Version 3.10 de Molecular Simulations Inc ont été utilisés pour la visualisation des molécules. L'analyse de séquence a été faite en utilisant le 'Wisconsin Package Version 9.0' (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, USA) (Devereux *et al.*, 1984). La prédiction des structures secondaires a été faite en utilisant le programme mfold version 3.0 de Michael Zuker, Washington University, School of Medicine (Walter *et al.*, 1994) (<http://www.ibc.wustl.edu/~zucker/rna/form1.cgi>).

Chapitre 3

Rôle des bases modifiées du tRNA^{Glu} de *E. coli*

3.1 Surexpression du tRNA^{Glu}

Avant de pouvoir étudier différentes formes sous-modifiées de tRNA^{Glu}, il nous fallait trouver un moyen d'obtenir ces dites formes. Pour y parvenir, nous avons surproduit le tRNA^{Glu} d'*Escherichia coli* avec un plasmide contenant le gène de ce tRNA chez une souche d'*E. coli* DH5 α . Afin de déterminer les conditions optimales de surproduction, nous avons cultivé ces cellules dans un milieu riche et mesuré la quantité de tRNA^{Glu} présente en phase exponentielle, en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire (tableau 3). La proportion en tRNA^{Glu} a été évaluée par microdensitométrie (mesure de l'intensité de la coloration au bleu de méthylène du tRNA^{Glu} par rapport au tRNA total sur gel de polyacrylamide) et par l'activité acceptrice. Nous avons observé qu'en phase exponentielle et qu'en fin de phase exponentielle, environ 30% du tRNA des cellules est du tRNA^{Glu}, ce qui correspond à ~10 fois la quantité de tRNA^{Glu} retrouvé normalement chez ce type de cellule. Nous remarquons qu'en phase stationnaire, cette proportion augmente à 60 - 70 %, ce qui correspond à une production de 50 à 60 fois supérieure au taux habituel. Il existe une différence sensible entre les valeurs obtenues par microdensitométrie et par mesure d'activité acceptrice. Cette anomalie peut s'expliquer de trois façons : 1) il est possible que d'autres tRNA occupent la même position que le tRNA^{Glu}. 2) Nous pouvons supposer l'existence d'une forme de tRNA^{Glu} ne migrant pas à la même position. 3) Il existerait peut-être des tRNA^{Glu} peu ou pas actifs, indétectable par la mesure de l'activité acceptrice.

Le début de la phase stationnaire étant le moment le plus propice à l'obtention de grandes quantités de tRNA^{Glu}, nous avons évalué la qualité de ce tRNA par la mesure du Km

de la GluRS pour le tRNA. Nous avons obtenu un K_m supérieur à $10 \mu M$, ce qui est largement au-dessus du $0.12 \mu M$ observé par Lapointe et Söll (1972b). Cette donnée indique que notre tRNA, même s'il semble actif, est imparfait. Il est fort probable que cette imperfection provienne d'une absence partielle (ou total) de modification. Il est facile de concevoir que les enzymes de modification aient de la difficulté à modifier l'énorme quantité de tRNA^{Glu} générée. Afin d'attester ce phénomène, nous avons surproduit le tRNA^{Glu} dans des conditions de ralentissement des mécanismes cellulaires *i.e.* dans un milieu minimal. Nous avons ainsi obtenu des cellules avec 69% de tRNA^{Glu} actif ayant un K_m de $0.35 \mu M$. Cela suggère que dans ces conditions le taux de surproduction serait peu affecté par le taux de croissance de la cellule. De plus, il semble que dans un milieu minimal les enzymes de modification bénéficient de plus de temps pour modifier le tRNA.

TABLEAU 3 : Quantité de tRNA^{Glu} produit par la souche surproductrice DH5 α /pKR15 dans diverses conditions ainsi que le Km pour la GluRS pour ce tRNA.

	Phase de croissance et DO _{590nm}	% tRNA ^{Glu} μ densitomètre	% tRNA ^{Glu} act. acceptrice	Taux de sur-production*	Km
Riche (LB)	Exponentielle 0.4	36	31	10	-
Riche (LB)	Fin exponentielle 0.8	35	24	7	-
Riche (LB)	Début stationnaire 1.5	62	73	64	>10 μ M
Minimal	Fin exponentielle 0.8	-	69	52	0.35 μ M

Une souche non-surproductrice contient environ 4 % (Tremblay et Lapointe, 1986) de tRNA^{Glu} et le Km de la GluRS pour ce tRNA est de 0.12 μ M.

*En partant du fait que :

$$FAG = \frac{G^c + G^p}{T^c + G^p}$$

et que $T^c = \sim 25 G^c$

G ^c	tRNA ^{Glu} produit des gènes chromosomiques
T ^c	Ensemble des tRNAs produits des gènes chromosomiques
G ^p	tRNA ^{Glu} produit des gènes plasmidiques
FAG	Fraction des tRNAs accepteurs du glutamate

$$\text{Taux de surproduction} = \frac{G^p}{G^c} = \frac{(25FAG - 1)}{1 - FAG}$$

3.2 Une souche surproductrice de tRNA^{Glu} contient plusieurs formes différentes de ce tRNA.

Maintenant que nous disposons d'une source de tRNA^{Glu} plus ou moins modifié, il nous faut trouver un moyen de le purifier. Nous savions que le tRNA^{Glu} avait déjà été purifié à l'aide d'une colonne de type RPC-5 (Tremblay et Lapointe, 1986). Cette résine est constituée de microscopique particules de plastique (plaskon) recouvertes d'adogen (trioctylammonium). Bischoff et McLaughlin (Bischoff et McLaughlin, 1985; McLaughlin et Bischoff, 1987) ont considérablement amélioré ce système en remplaçant le plaskon pour des billes de 5 µm recouverte de C18. À l'aide de ce renseignement, nous avons fabriqué une colonne de 22 mm X 250 mm que nous appellerons MODS (pour 'modified octadecyl sulfate'). Nous l'avons utilisée afin de caractériser le tRNA total de cellules cultivées dans les milieux riche ou minimal. L'activité acceptrice pour le glutamate de chaque fraction été mesurée. Nous avons constaté dans tout les cas la présence de tRNA^{Glu} (modivariant-1 à modivariant-5, Fig. 10) dans 5 pics majeurs. Nous appelons 'modivariant' les différentes formes plus ou moins modifiées d'une même espèce de tRNA. En milieu riche, l'espèce dominante est le modivariant-3, alors qu'en milieu minimal le modivariant-2 est le plus important. Chacun de ces modivariants a été purifié par deux ou trois passages successifs sur la colonne MODS (Fig. 11). Nous obtenons de 0.5 à 10 mg de chaque espèce à partir de 24 litres de culture. L'activité acceptrice varie de 90% (~1550 pmole/A_{260nm}) pour les modivariant-2 et -4, à 60% pour les modivariant-1 et -5 et à moins de 15% pour le modivariant-3.

Figure 10 : Purification par HPLC sur colonne MODS de tRNA provenant de diverses sources. A) tRNA total d'*E. coli* MRE600 (~20 mg), B) tRNA total d'*E. coli* DH5 α /pKR15 cultivé dans un milieu riche (~ 20 mg), C) tRNA total d'*E. coli* DH5 α /pKR15 cultivé dans un milieu minimal (~20 mg), D) tRNA^{Glu} pure de source commerciale (~0.2 mg). La chromatographie s'effectue à un débit de 4 ml par minutes pendant 6 heures. Le gradient consiste au départ en 100% solution A et à la fin en 40% Solution A et 60 % Solution B. La longueur d'onde de détection est de 280 nm.

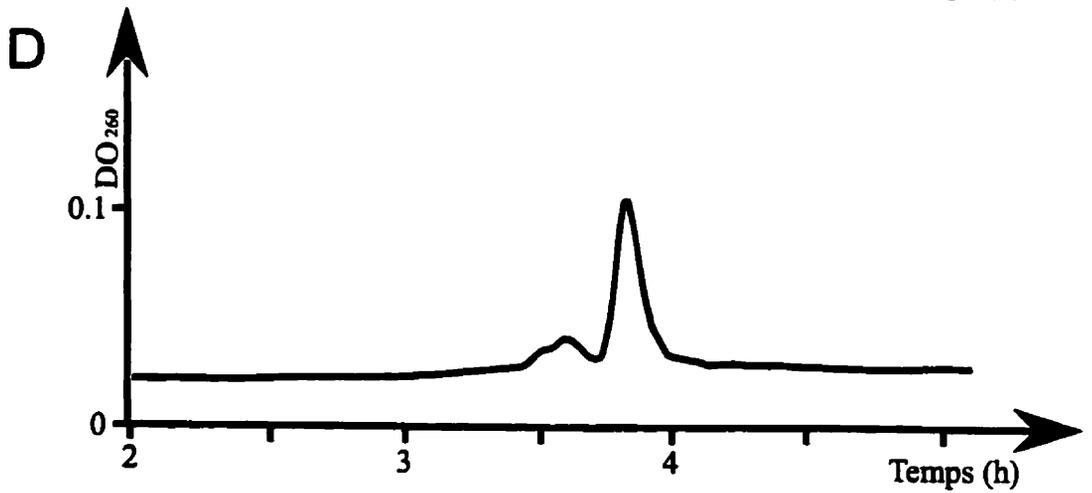
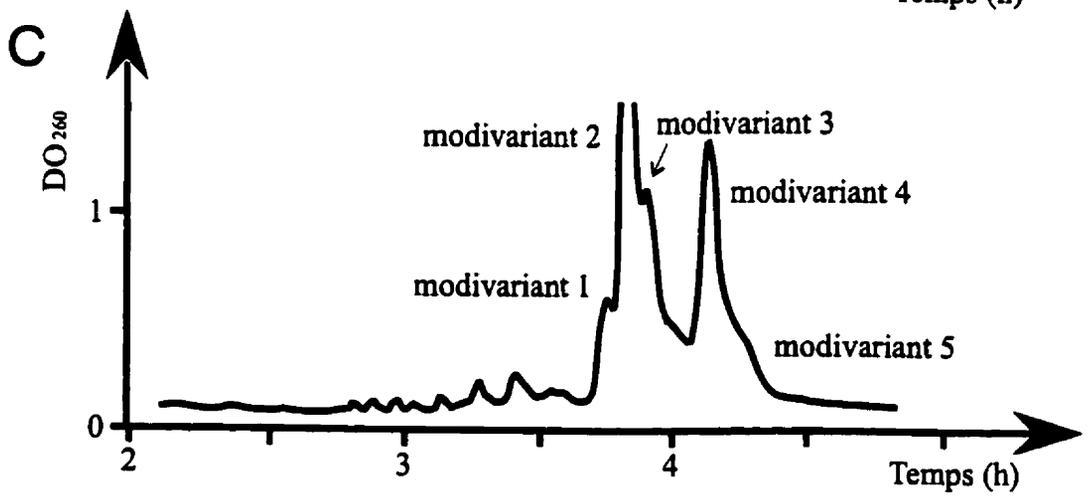
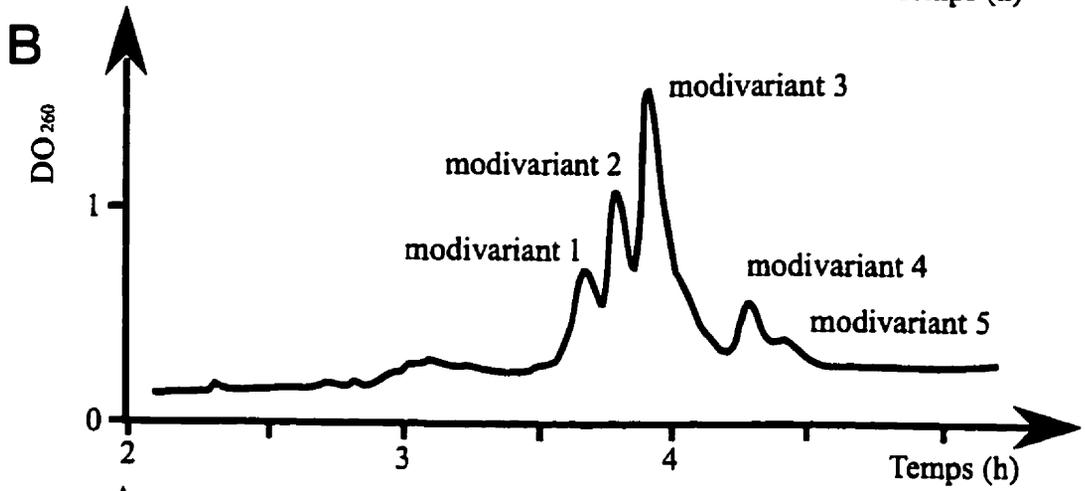
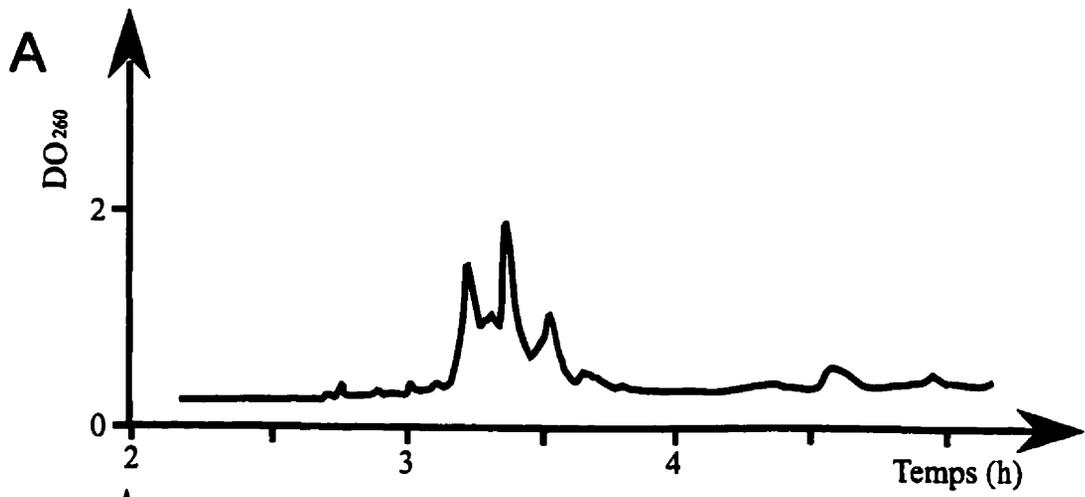
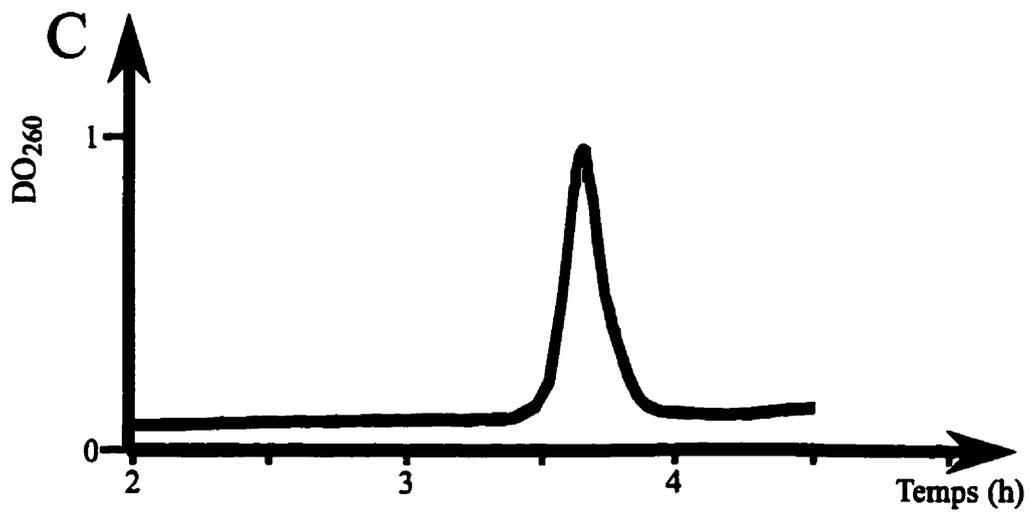
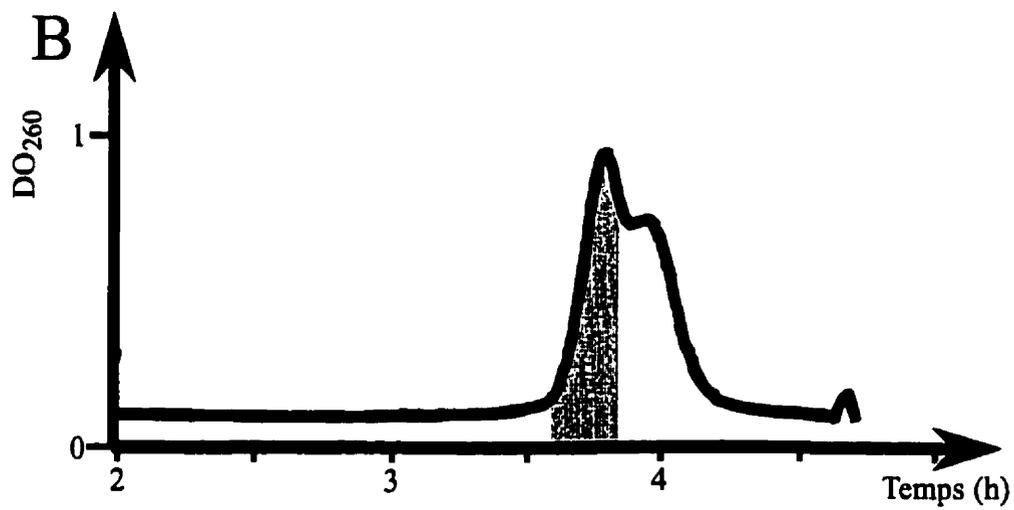
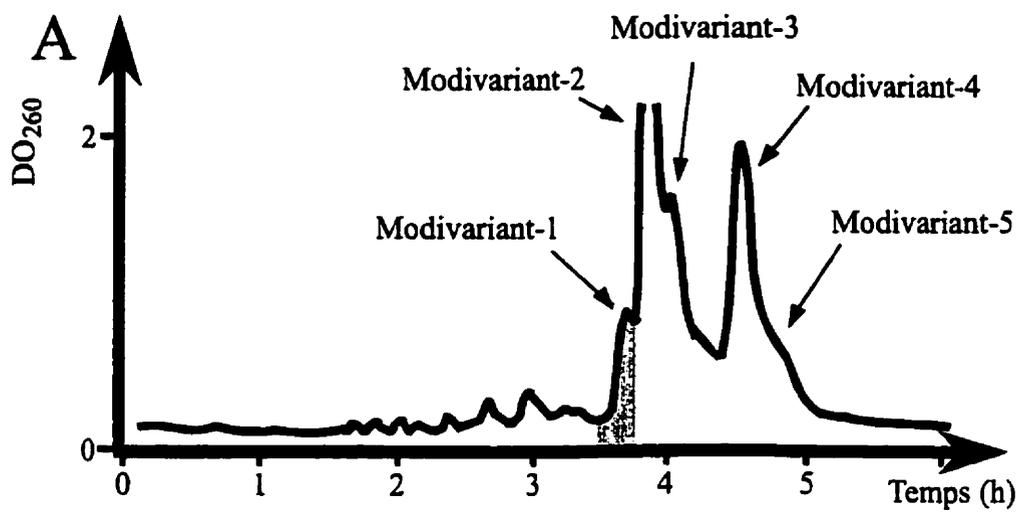


Figure 11 : Purification du modivariant-1, par chromatographie sur colonne MODS, à partir du tRNA total d'*E. coli* DH5 α /pKR15 cultivé en milieu minimal. La chromatographie s'effectue à un débit de 4 ml par minute pendant 6 heures. Le gradient consiste au départ en 100% solution A et à la fin en 40% Solution A et 60 % Solution B. La longueur d'onde de détection est de 260 nm. A) tRNA total, B) 2^e passage du pic 1 C) 3^e passage du pic 1.



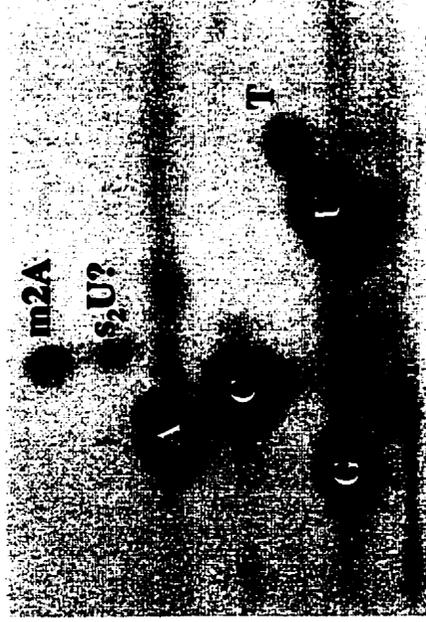
3.3 Détermination du contenu en bases modifiées

Nous avons déterminé le contenu en bases modifiées de chaque tRNA par chromatographie sur couche mince en deux dimensions (tous les modivariants) et par HPLC (modivariants 2 et 5). S. Sekine du laboratoire du Dr Yokoyama a effectué les analyses sur HPLC. Le tRNA^{Glu} d'*E. coli* contient normalement 4 bases modifiées différentes. La comparaison avec le tRNA commercial (tableau 5) révèle que le modivariant-2 correspond à l'espèce totalement modifiée. Sur la figure 12, on peut distinguer chacun des 4 nucléotides modifiés du modivariant-2. Leur intensité nous laisse à penser qu'il y a beaucoup plus de T (ribothymidine) que des trois autres. Cette irrégularité apparente est causé par la non-uniformité du marquage des nucléotides par la T4 polynucléotide kinase. Il nous faut donc tenir compte de ce fait lors de la quantification de ces bases (tableau 4). On observe la présence de s²U (thio-2 uridine) chez les modivariants 4 et 5. Le modivariant 5 contient un s²U tel que démontré par les résultats de HPLC. Pour identifier à quelle tache de la plaque chromatographique ce nucléotide correspondait, nous avons recherché une tache présente sur la plaque 5 mais absente de la plaque 2 (Fig. 12). Une bonne candidate (et la seule...) est celle à quelques millimètres sous la tache correspondant au m²A. Nous avons donc assigné cette position au s²U. Cette tache apparaissant aussi sur la plaque du modivariant 4, nous en avons conclu que cette espèce contenait aussi un s²U. Il est à noter que les modivariants possédant un s²U ne possèdent pas de mnm⁵s²U, ce qui est normal puisque le s²U est un intermédiaire dans la fabrication du mnm⁵s²U.

Chacun de nos modivariants est différent. Le modivariant 1 est hyper-modifié : il possède une base modifiée (Ψ) supplémentaire. Il est malaisé de dire où se trouve cette base supplémentaire. Il est possible qu'elle soit placée en position 65. C'est la seule position commune lorsqu'on compare la position des U du tRNA^{Glu} et celles où on trouve des pseudouridine dans les autres tRNA d'*E. coli* (Sprinzl *et al.*, 1998; Grosjean *et al.*, 1995). Les modivariants 3, 4 et 5 sont des espèces sous-modifiées du tRNA^{Glu}. Il leur manque une ou plusieurs bases modifiées: mnm⁵s²U et/ou m²A et/ou Ψ . Dans le cas du modivariant 4 on ne retrouve qu'une seule pseudouridine. Laquelle des deux est absente? Il est fort probable que cela soit Ψ 13. Le taux d'enzyme de modification pour Ψ 13 chez d'*E. coli* doit être très nettement inférieur à celui de Ψ 55; tous les tRNA d'*E. coli* possèdent une Ψ 55.

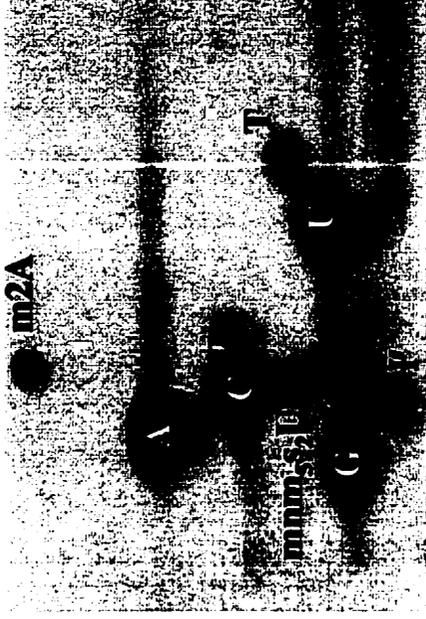
Figure 12 : Détermination du contenu en bases modifiées des modivariants 2 et 5 par chromatographie sur couche mince à deux dimensions. La première dimension est une chromatographie ascendante dans l'acide isobutyrique : 25% NH_4OH : H_2O [50:1.1:28.9]. La seconde est une chromatographie ascendante dans HCl : isopropanol : H_2O [15:70:15]. Les nucléotides marqués sont révélés par autoradiographie. Les taches non-identifiées correspondent au bruit de fond (dinucléotides, nucléotide di-phosphate, etc.)

A



Modivariant 5

B



Modivariant 2

Tableau 4 : Nucléotides modifiés présents dans chacun des modivariants du tRNA^{Glu} d'*E. coli* tel que déterminé par chromatographie sur couche mince en deux dimensions.

Espèces	m ² A	mnm ⁵ s ² U	T	Ψ
1	1	1	1	3
2*	1	1	1	2
3	0	0	1	2
4	0	1 s ² U	1	1
5	1	1 s ² U	1	2

*Espèce totalement modifiée.

Tableau 5 : Contenu en bases dans les modivariants 2 et 5 ainsi que pour le tRNA commercial, déterminé par HPLC

Bases	tRNA ^{Glu} commercial	Pic 2	Pic 5
A	13	13	13
C	27	27	27
U	9	9	9
G	22	22	22
Ψ	2	2	2
T	1	1	1
m ² A	1	1	1
mnm ⁵ s ² U	1	1	-
s ² U	-	-	1

3.4 Les paramètres cinétiques de la GluRS pour ses différents substrats sont affectés par les modifications présentes sur le tRNA.

Les paramètres cinétiques (K_M , k_{cat} , K_M/k_{cat}) de la GluRS ont été déterminés pour chacun des substrats (ATP, glutamate et tRNA) en présence des différents modivariants de tRNA^{Glu} (tableau 6). Les valeurs de K_M et k_{cat} pour le tRNA du modivariant-2 (le principal modivariant retrouvé chez *E. coli*) sont comparables aux valeurs publiées : 0.13 μM vs 0.12 μM (Lapointe et Söll, 1972b), 280 min^{-1} vs 108 min^{-1} (Kern et Lapointe, 1979) ou 216 min^{-1} (Sylvers *et al.*, 1993). Le K_M de la GluRS pour le glutamate est de 56 μM vs 86 μM (Lapointe et Söll, 1972b) et celui pour l'ATP est de 80 μM vs 250 μM (Lapointe et Söll, 1972b). Cette différence peut s'expliquer de la façon suivante : la mesure du K_M s'est fait avec du tRNA purifié et non pas avec du tRNA total. Les autres tRNAs interfèrent peut-être avec la liaison de l'ATP.

Il existe certaines différences entre les paramètres cinétiques de la GluRS pour le modivariant 2 du tRNA^{Glu} comparativement aux autres modivariants. On observe une baisse de 520 fois de la spécificité (k_{cat}/K_M) pour le modivariant 3. Cette baisse est attribuable à une hausse du K_M d'un facteur 100. L'absence de la modification thio-2 en position 34 est responsable de la chute observée (celà ne peut être attribuable à l'absence de m²A37 puisque son absence dans le modivariant 4 ne change presque rien). Les très faibles variations de spécificité pour les autres modivariants nous indiquent que les autres modifications ne sont pas vraiment impliquées dans la reconnaissance du tRNA par la GluRS.

Les paramètres cinétiques de la GluRS pour l'ATP du modivariant 2 diffèrent de ceux des modivariants 3 et 4. En effet, le K_M de ces derniers est augmenté d'un facteur 3 à 4.5. Cette variation résulterait de l'absence de m^2A qui causerait cette variation. Il est encore trop tôt pour statuer sur les mécanismes responsables de ce phénomène.

Les paramètres cinétiques de la GluRS pour le glutamate de l'espèce totalement modifiée diffèrent des autres. En effet, les modivariants 4 et 5 ont un K_M plus élevé. Cette élévation pourrait être due à l'absence du groupement méthylaminométhyl.

Tableau 6 : Paramètres cinétiques de la GluRS pour ses différents substrats en présence de différents modivariants du tRNA^{Glu} d'*E. coli.*

	Modivariant-1	Modivariant-2	Modivariant-3	Modivariant-4	Modivariant-5
m ² A	1	1	0	0	1
mnm ⁵ s ² U	1	1	0	0	0
s ² U	0	0	0	1	1
T	1	1	1	1	1
Ψ	3	2	2	1	2
K_{cat} (s⁻¹)	6.5	8.5	1.5	6.2	9.6
tRNA					
K_m (μM)	0.060	0.13	12	0.072	0.12
Perte relative**	0.60	1.0	520	0.76	0.82
ATP					
K_m (mM)	0.11	0.08	0.35	0.21	0.07
Perte relative**	1.8	1.0	25	3.6	0.77
Glutamate					
K_m (mM)	0.096	0.056	0.034	0.23	0.48
Perte relative**	2.2	1.0	3.4	5.6	7.6

** Perte relative de spécificité calculé par rapport au modivariant 2

$$\text{Perte relative} = \frac{(K_M / k_{cat}) \text{ du modivariant considéré}}{(K_M / k_{cat}) \text{ du modivariant 2}}$$

3.5 Le sondage au plomb et à l'ENU révèle des différences structurales entre les modivariants de tRNA^{Glu}.

La structure des différents modivariants a été investiguée par sondage au plomb et à l'éthyl-nitro-urée. Ces deux composés attaquent les phosphates accessibles et brisent la chaîne nucléotidique. En observant les figures 13 et 14, on remarque qu'il y a peu de différences entre les patrons de bandes obtenus avec une même sonde. La différences des patrons de coupures obtenus avec les sondes au plomb et à l'ENU proviennent du fait qu'elles sont de tailles et de charges différentes.

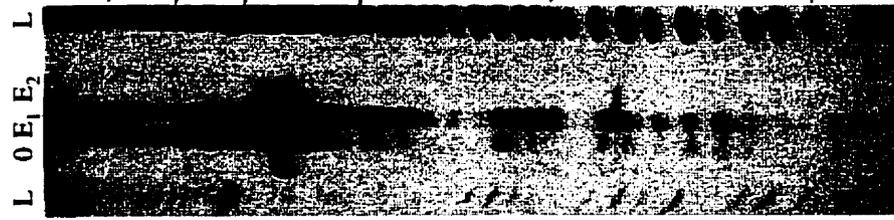
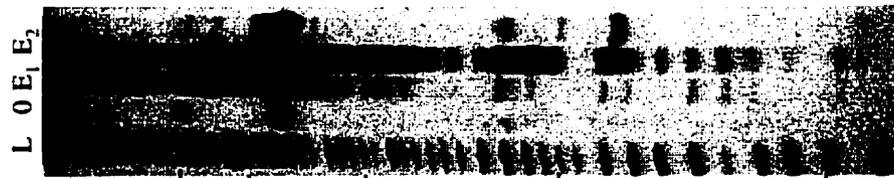
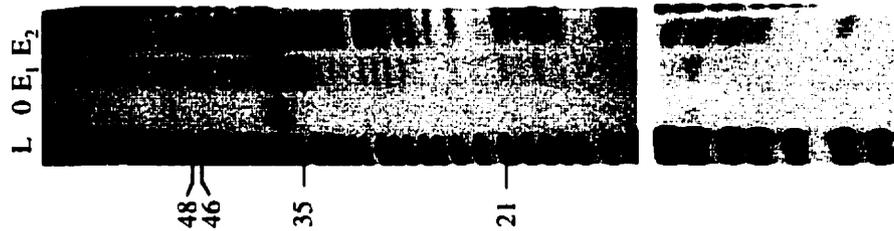
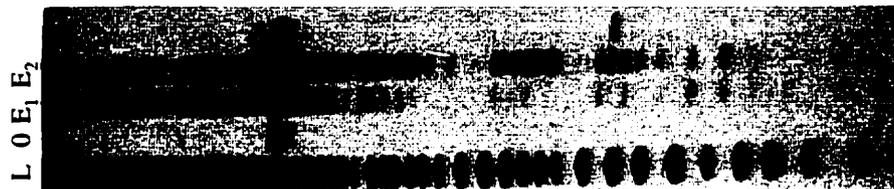
Avec le sondage à l'ENU (Fig. 13), nous observons quelques petites différences dans la région de l'anticodon. Il semble que la position 35 soit plus accessible chez les modivariant 1, 3 et 5 que chez l'espèce totalement modifiée. Cependant, cette position semble moins accessible chez le modivariant 4. On observe dans le modivariant 1 que le bras D (position 23 à 25) semble moins exposé que chez les autres modivariants. Les positions A21, A46 et C48 du modivariant 3 sont également d'un accès difficile.

Nous obtenons avec le sondage au plomb (Fig. 14), pour l'espèce totalement modifiée un patron de bandes comprenant quatre bandes fortes (positions 35, 36, 57 et ~60) et quatre bandes faibles (position 12, 13, 37 et 49). Ce patron diffère d'avec ceux des 4 autres modivariants. Le point saillant est l'apparition d'une bande forte en position 59 du modivariant 3. De faibles variations de la force du signal s'observent aux positions 35, 36 et 37. Pour

l'espèce totalement modifiée, les bandes 35 et 36 sont d'intensité comparable alors que 37 est plus faible. Pour les modivariants 1 et 5, la bande 36 est plus intense que la 35. Chez le modivariant 4, c'est la bande 35 qui est plus forte que la 36. La position 37 est moins accessible chez les modivariants 3 et 4. La position 49 est plus accessible chez ceux-ci que chez le modivariant 1. Dans le modivariant 3, les positions 12, 13 et 20:2 sont plus vulnérables.

Les observations précédentes nous apprennent que les cinq modivariants possèdent des structures semblables mais non pas identiques. Cela supporte la théorie à savoir que les bases modifiées induisent des modifications de configuration mineures afin d'optimiser l'ensemble de la structure.

Figure 13, Sondage à l'ENU de différents modivariants du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. La digestion s'effectue à pH 7.2 pendant 10 minutes. Les fragments générés sont séparés sur gel de polyacrylamide 12% et visualisés par autoradiographie. L = échelle alcaline, O = pas d'ENU, E₁ = ENU à 25°C, E₂ = ENU à 50°C.



Boucle V
Boucle AC
Boucle T
Boucle D

5

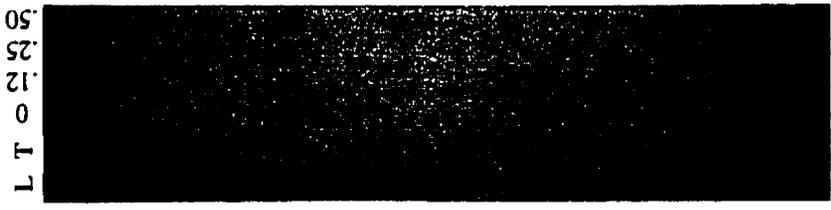
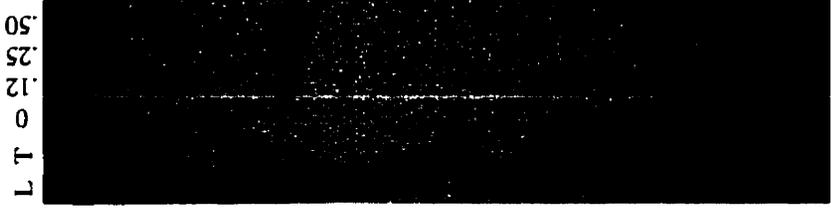
4

3

2

1

Figure 14, Sondage au plomb de différents modivariants du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. La digestion s'effectue pendant 5 minutes à 25°C et à pH 7.2. Les fragments générés sont séparés sur gel de polyacrylamide 12% et visualisés par autoradiographie. L = échelle alcaline , T = RNase T1, 0,12,25 et 50 = concentration de 0, .12, .25 et .50 mM Pb²⁺.



Boucle V
 Boucle AC
 Boucle T
 Boucle D
 Boucle V
 70
 69
 68
 67
 57
 52
 53
 50
 51
 43
 40
 39
 29
 23
 22
 19
 18
 15
 10

L T 0 .12 .25 .50

5

4

3

2

1

3.6 Le sondage au DMS révèle la similitude de la structure secondaire des différents modivariants de tRNA^{Glu}.

Les cytosines du tRNA^{Glu} d'*E. coli* ne formant pas de paire de base Watson-Crick peuvent être attaquées par le DMS. Celui-ci réagit avec le N³ accessible du nucléotide (Peattie et Gilbert, 1980). Ces nucléotides altérés seront ensuite clivés. Nous avons exposé au DMS chacun de nos modivariants et n'avons noté aucune différence significative entre les patrons de bandes ainsi obtenus (Fig. 15). À 25°C, ils possèdent la même susceptibilité aux positions 20, 20:1, 20:2, 34, 36 et 38. Cela correspond bien à la théorie : tous ces nucléotides se retrouvent dans des boucles. La fragilité de la base mnm⁵s²U34 est due au fait que cette base est attaquée lors du traitement avec l'hydrazine; les bases modifiées sont souvent sensibles à l'hydrazine (Peattie et Gilbert, 1980). Nous avons placé nos modivariants dans des conditions plus stringentes pour vérifier leurs réactions respectives. En absence de Mg²⁺, à 25°C : ils conservent tous les bandes 36 et 38, perdent 20, 20:1 et 20:2 et gagnent 25 et ~62. Le phénomène se répète à 50°C, à la différence qu'ils acquièrent deux bandes supplémentaires, en position 9 et 12. On peut donc affirmer que les modivariants possèdent la même structure secondaire. De plus, tous les modivariants réagissent de la même façon dans des conditions dénaturantes. Cela indiquerait que les bases modifiées ne seraient pas impliquées dans la formation de la forme inactive (ou dénaturée) du tRNA^{Glu} d'*E. coli*.

Figure 15 : Sondage au DMS de différents modivariants du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. La digestion s'effectue à pH 7.2 pendant 10 minutes. Les fragments générés sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide 12% et visualisés par autoradiographie. L = échelle alcaline, O = pas de DMS, N = avec Mg²⁺ à 25°C, S = sans Mg²⁺ à 25°C, D = sans Mg²⁺ à 50°C. La différence observable entre l'échelle et la taille des fragments obtenus par digestion au DMS est dûe au fait que le traitement au DMS modifie légèrement la mobilité du tRNA.

L L O N S D



1

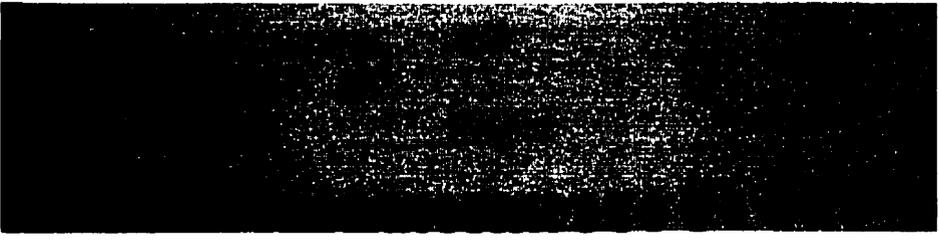
O N S D L



2

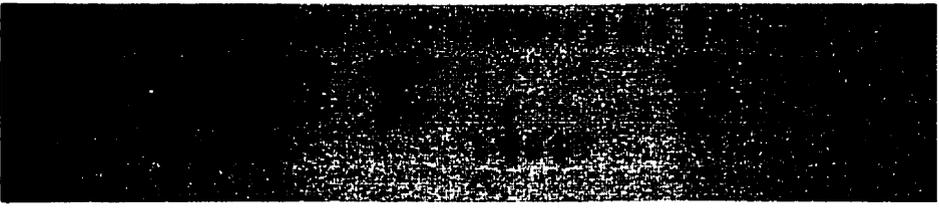
61-64
 48
 38
 36
 32
 25
 20:2
 20:1
 20
 12
 9

L O N S D



3

O N S D L



4

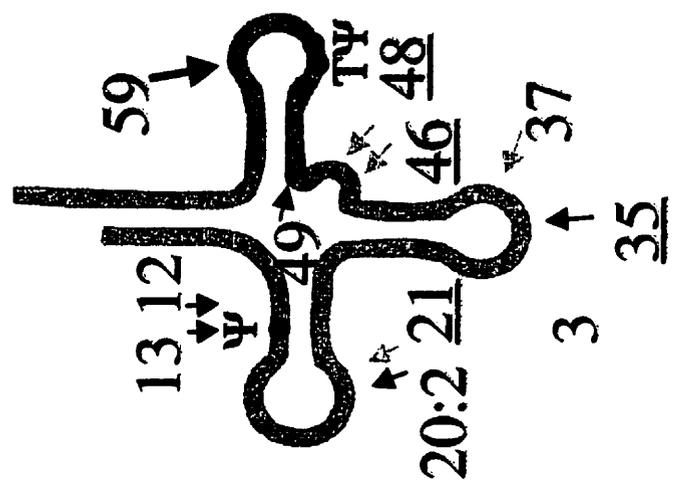
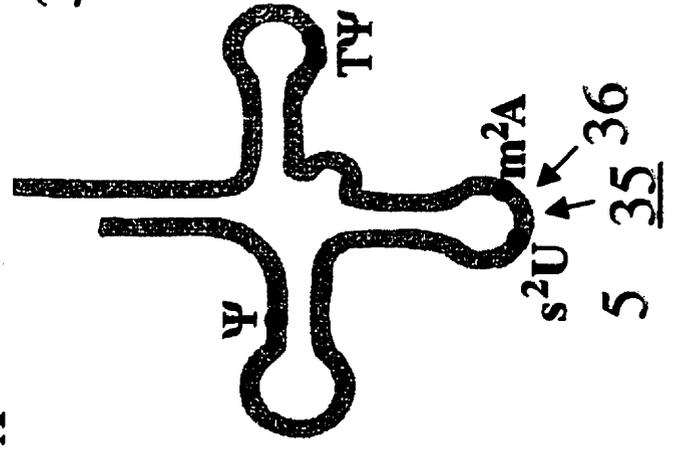
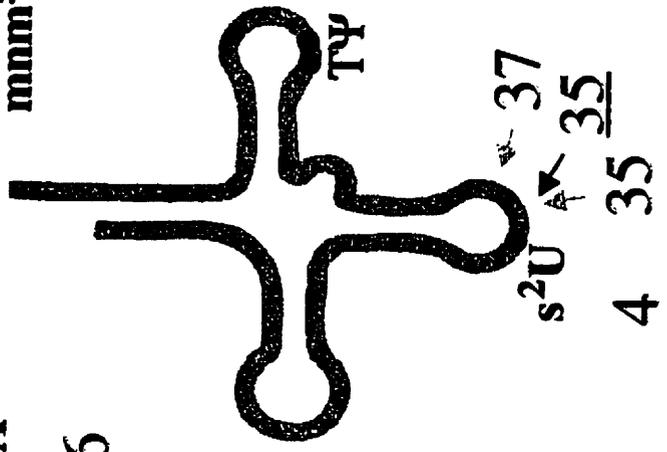
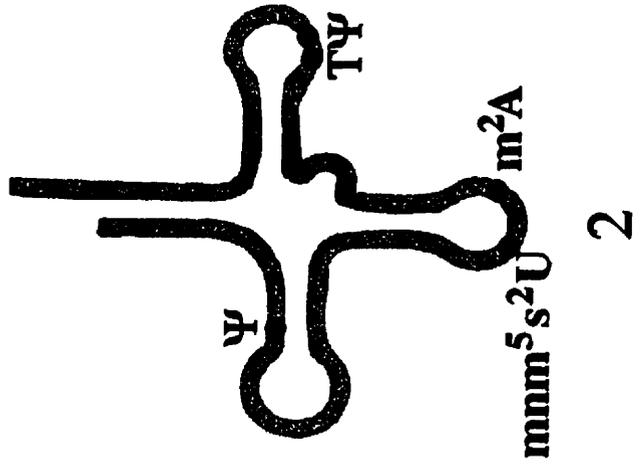
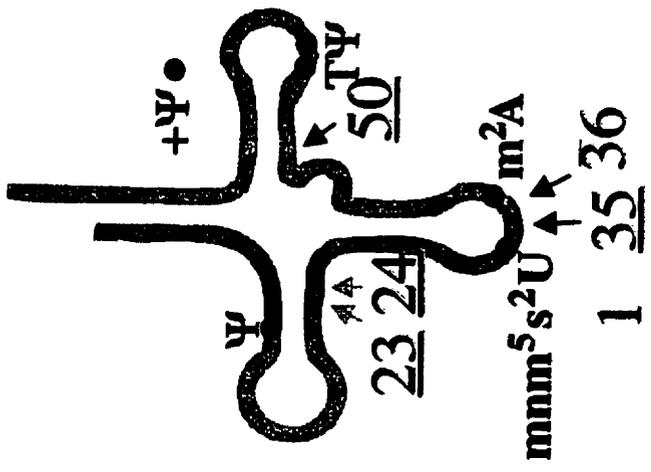
O N S D



5

Boucle V
 Boucle AC
 Boucle D

Figure 16. Différence dans la susceptibilité au plomb et à l'ENU entre les cinq modivariants de tRNA^{Glu} par rapport au modivariant 2. Une augmentation de susceptibilité est montrée par une flèche noire et une diminution de susceptibilité est indiquée par une flèche grise. La taille des flèches est proportionnelle à la différence observée. Les chiffres soulignés correspondent aux positions attaquées par l'ENU et les autres à celle attaquées par le plomb.



3.7 Rôle des bases modifiées dans le repliement correct du tRNA^{Glu}.

Les sondages au plomb, à l'ENU et au DMS n'ont pas révélé de grandes différences structurales entre les différents modivariants (Fig. 16). Cependant, en utilisant les différences mineures observées, nous pouvons tenter d'identifier l'effet de l'absence (ou de la présence) de certaines bases modifiées chez chacun des modivariants, du plus vers le moins modifiés.

3.7.1 Modivariant 1

Ce modivariant contient une pseudouridine de plus que le tRNA^{Glu} sauvage. Comme nous l'avons signalé précédemment, il est fort possible que cette base se trouve en position 65. Cette base supplémentaire est responsable de perturbations dans la boucle anticodon (tel qu'observé par sondage au plomb et à l'ENU aux positions 35 et 36), dans la tige D (position 23 et 24 à l'ENU) et dans la boucle T (position 50 révélé par sondage à l'ENU). Cette dernière perturbation renforce l'hypothèse de la position 65 pour la base supplémentaire: les nucléotides A49 et U65 forment une paire de base. Il est par contre malaisé d'expliquer la perturbation observée dans la boucle anticodon. On peut supposer que la déstabilisation de la paire A49-U65 a perturbé l'empilement des bases. Nous savons qu'à peu près toutes les bases d'un tRNA sont empilées (Rich *et al.*, 1976; Moras *et al.*, 1980; Westhof *et al.*, 1985; Ladner *et al.*, 1975; Kim *et al.*, 1973). Il est donc plausible que cette perturbation ait pu se propager jusqu'à la boucle anticodon, amenant le nucléotide 36 (ou un de ses voisins) à se déplacer un

peu pour s'adapter aux nouvelles conditions. Cette même perturbation aurait pu déranger un peu les bases se trouvant dans la tige D.

3.7.2 Modivariant 5

La seule différence notable entre ce modivariant et l'espèce totalement modifiée est constituée de l'absence du groupement méthyl-aminométhyl (mnm) sur la base $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U34}$. Les sondages au plomb et à l'ENU ont montré une petite perturbation dans la boucle anticodon. Selon Yokoyama et Nishimura (1995) le groupement mnm pourrait être impliqué dans la stabilisation de la structure de la boucle anticodon. Notre observation appuie cette hypothèse.

3.7.3 Modivariant 4

Le modivariant 4, contrairement au 5, ne possède pas les bases $\text{m}^2\text{A37}$ et $\Psi13$. L'absence de ces bases (ou d'une de ces bases) a causé des modifications de la conformation de la boucle anticodon du modivariant 4 (position 35 et 37 avec le plomb, 35 avec l'ENU). Cette perturbation suggère que le groupement méthyle du m^2A est impliqué dans la stabilisation de la boucle anticodon. Il est peu probable que cette perturbation ait été occasionnée par l'absence de $\Psi13$, comme observé pour $\Psi65$ dans le modivariant 1. Si c'était le cas, nous observerions des changements ailleurs dans le tRNA (tige D, boucle D...) ce qui n'est pas le cas. De tout cela nous pouvons affirmer que la base modifiée $\text{m}^2\text{A37}$ assume un

rôle structural dans la formation de la boucle anticodon. Cependant, les méthodes utilisées ne nous ont pas permis d'observer un quelconque changement structural apporté par une modification en position 13.

3.7.4 Modivariant 3

Ce modivariant se caractérise par l'absence du groupement thio-2 sur la base s^2U34 et la présence des 2 pseudouridines. L'absence du groupement s^2 provoque beaucoup de changements à la structure du tRNA^{Glu}. La structure des quatre boucles est affectée (positions 21, 35, 46 et 48 tel que révélé par traitement à l'ENU; 20: 2, 37 et 59 révélé par le plomb) ainsi que les tige D (position 12 et 13, par le plomb) et T (position 49 par le plomb). Nous constatons la similitude avec ce qui est observé pour le modivariant 1 où une altération est propagée à tout le tRNA via l'empilement des bases. Ici la source se retrouverait dans la boucle anticodon. Une telle propagation, de l'anticodon vers l'ensemble du tRNA, a déjà été observée chez le tRNA^{Phé} de levure. Une absence de modification dans la boucle anticodon amenait un changement dans les boucles T et D (Krzyzosiak *et al.*, 1988). Dans notre cas, la généralisation et l'amplitude de la perturbation (surtout en position 59) nous indique que le groupement thio-2 de la base mnm^5s^2U34 jouerait un rôle majeur dans le maintien de la structure du tRNA^{Glu} d'*E. coli*.

Chapitre 4

Structure des formes inactive et
dimérique du tRNA^{Glu} de *E.*
coli

4.1 Sondage chimique des cytosines accessibles des formes native, inactive et dimérique du tRNA^{Glu} d'*E. coli*.

Nous avons observé précédemment que le traitement au DMS, dans des conditions natives à 25°C, générait des bandes aux positions 20, 20:1, 20:2, 36 et 38 (fig. 17, DMS ligne N₂₅). Nous avons aussi observé qu'en des conditions dénaturantes, à 25°C ou à 50°C, le patron de bandes se modifiait. En absence de Mg²⁺, à 25°C, les bandes 36 et 38 sont conservées, celles aux positions 20, 20:1 et 20:2 sont perdues et deux bandes nouvelles aux positions 25 et -62 apparaissent (Fig. 17, DMS ligne I₂₅). Même scénario à 50°C, à l'exception de l'apparition de deux bandes supplémentaires en position 9 et 12 (Fig. 17, DMS ligne I₅₀). La bande en position 62 est très large et pourrait correspondre à la coupure des nucléotides 61 à 64. Pour le dimère (Fig. 18), les cytosines 25, 36, 38 et 61 à 64 sont attaquées.

4.2 Sondage chimique des adénosines accessibles des formes native, inactive et dimérique du tRNA^{Glu} d'*E. coli*.

Les adénines qui ne sont pas empilées ou impliquées dans la structure tertiaire du tRNA^{Glu} peuvent être identifiées à l'aide du diéthyl pyrocarbonate. Le DEPC ira attaquer le groupement N⁷ de ces nucléotides (Peattie et Gilbert, 1980). En condition native, l'adénine 46 et le mnm⁵s²U34 sont clivés (Fig. 17, DEPC ligne N₂₅). La coupure à la position 34 est un artefact du même genre que celui observé avec le DMS (hydrazinolyse). D'après la structure

cristallographique des tRNA^{Gln} et tRNA^{Phe}, nous nous attendions à ce qu'il y ait un clivage en position A16. À l'intérieur de ces structures, cette position n'est pas empilée ni en interaction avec une autre base. Le fait que ce nucléotide soit protégé indique que la situation est différente chez le tRNA^{Glu} d'*E. coli*. En des conditions dénaturantes (à 25°C et à 50°C), de nouvelles bandes apparaissent aux positions 24, 37, 49, 58 et 59, indiquant que ces nucléotides sont libérés (Fig 17, DEPC ligne I₂₅ et I₅₀). Pour le dimère, seules les adénines 37 (à peine), 58 et 59 réagissent (Fig. 18).

Figure 17 : Sondage au DMS et au DEPC des formes native et inactive du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. La digestion s'effectue à pH 7.2 pendant 10 minutes. Les fragments générés sont séparés sur gel de polyacrylamide 12% et visualisés par autoradiographie. L = échelle alcaline, T1 = échelle Rnase T1, O₂₅ = pas de DMS ni de DEPC, N₂₅ = tRNA actif à 25°C, I₂₅ = tRNA inactif à 25°C, I₅₀ = tRNA inactif à 50°C. La différence observable entre l'échelle et la taille des fragments obtenus par digestion au DMS ou au DEPC est due au fait que le traitement modifie légèrement la mobilité du tRNA.

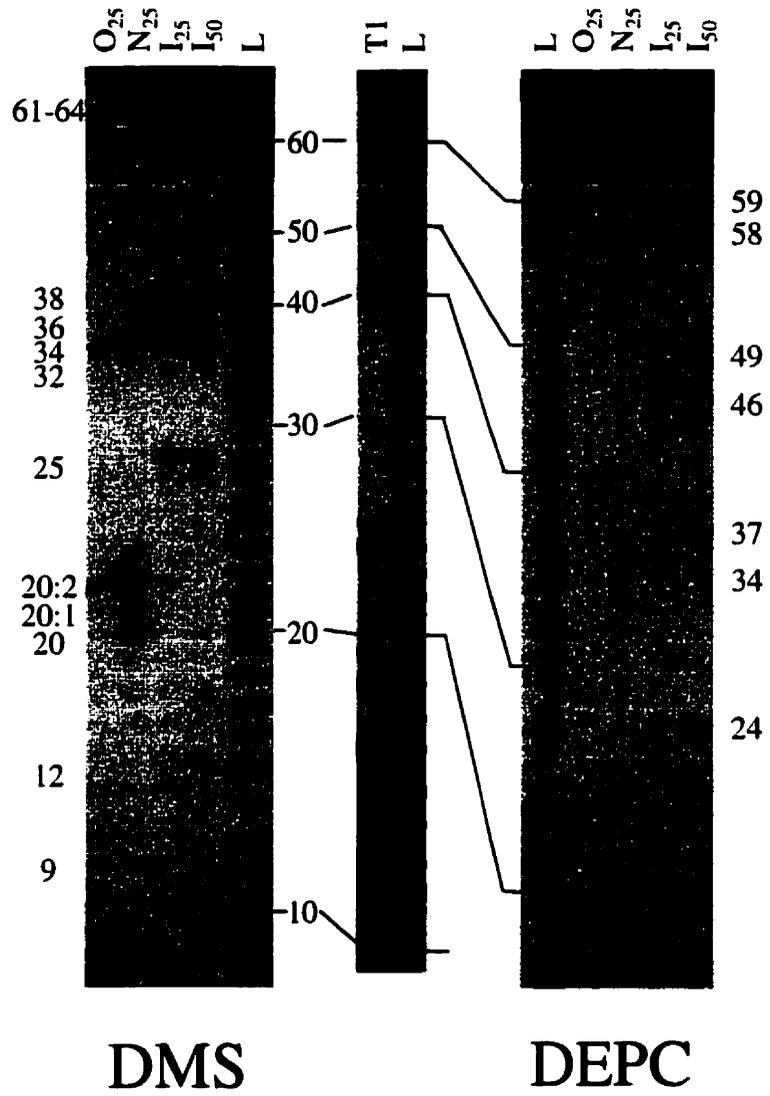


Figure 18 : Sondage au DMS et au DEPC de la forme dimérique du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. La digestion s'effectue à 0°C, à pH 7.2 pendant 15 minutes. Les fragments générés sont séparés sur gel de polyacrylamide 12% et visualisés par autoradiographie. L = échelle alcaline, O = pas de DMS ni de DEPC, + = avec DMS ou DEPC. La différence observable entre l'échelle et la taille des fragments obtenus par digestion au DMS ou au DEPC est due au fait que le traitement modifie légèrement la mobilité du tRNA.

L
DMS -
DMS +
DEPC -
DEPC +



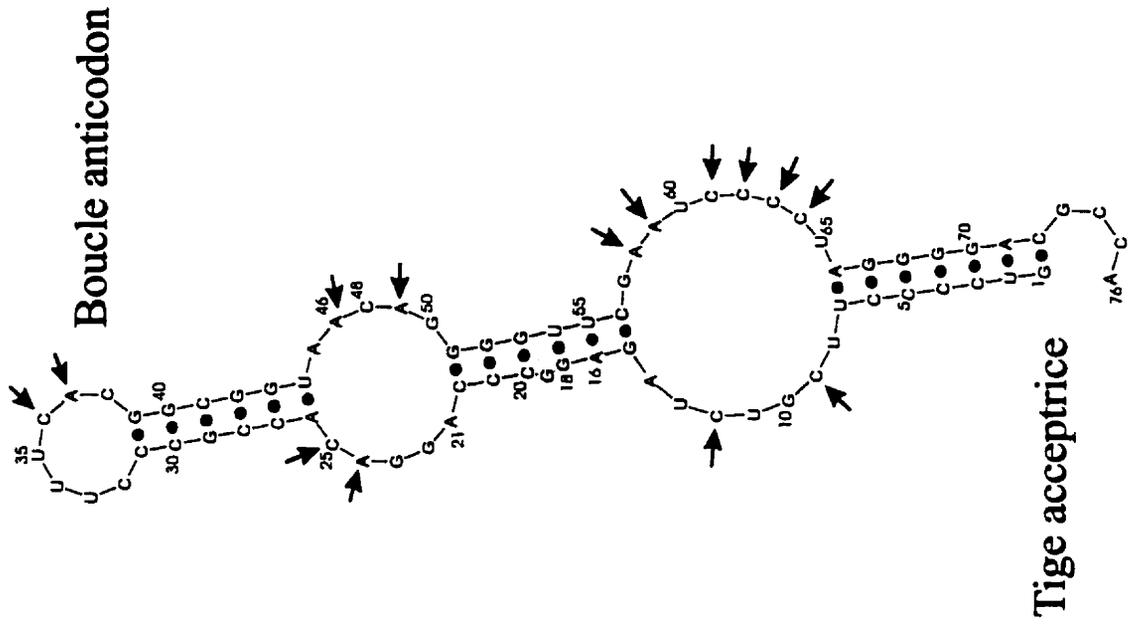
61-64
58-59

38
36
34
25

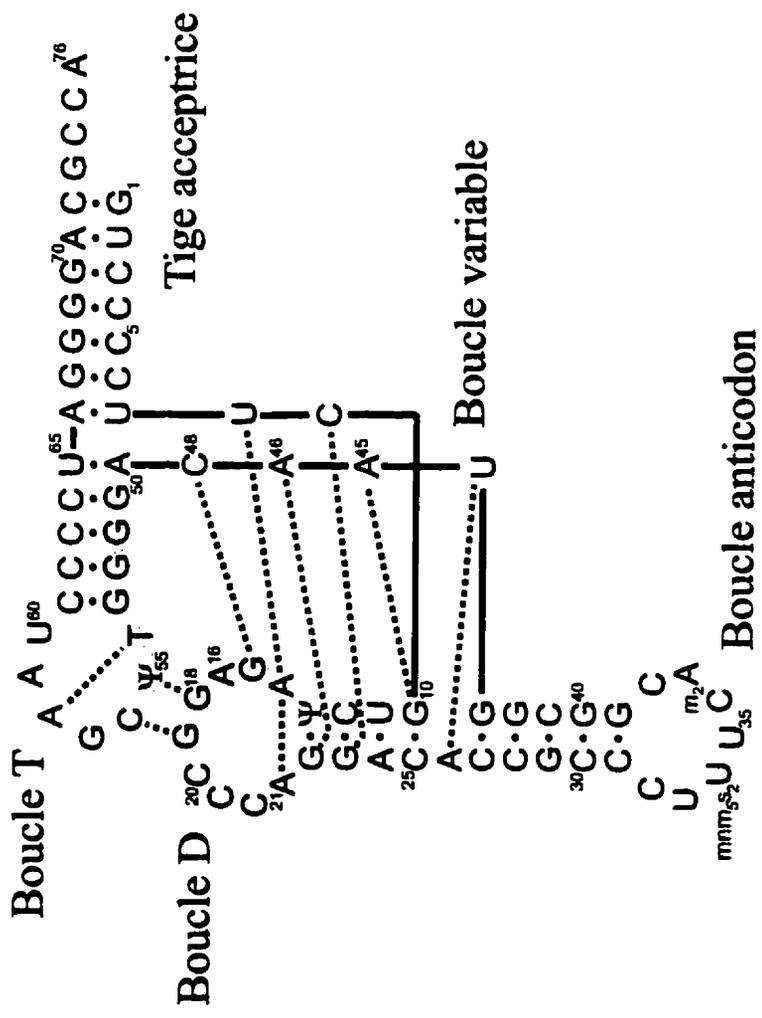
4.3 Structure de la forme inactive du tRNA^{Glu} d'*E. coli*

En tenant compte du fait que les cytosines 9, 12, 25, 36, 38, 61, 62, 63, 64 et adénines 24, 37, 46, 49, 58, 59 sont accessibles, donc à l'extérieur d'une paire de bases Watson-Crick, et que les cytosines 20, 20:1 et 20:2 ne le sont pas, nous avons tenté d'identifier la structure secondaire de la forme inactive du tRNA^{Glu} d'*E. coli*. Pour ce faire, nous avons utilisé un programme de prédiction de structure secondaire d'ARN (mfold, Walter *et al.*, 1994) en incluant les contraintes citées précédemment. Nous avons obtenu une structure avec un ΔG théorique de -27.4 kcal/mol à 37°C (qui est très près de celui calculé pour le tRNA^{Glu} natif qui est de -28.7 kcal/mol). Il faut préciser que ces ΔG s ne tiennent pas compte des interactions tertiaires ni de la présence de Mg²⁺. La structure obtenue ressemble à une épingle à cheveux avec deux boucles internes (Fig. 19b). Cette structure peut expliquer toutes les coupures obtenues avec le DEPC et le DMS. De plus, cette structure ne possède que trois tiges, ce qui est en accord avec les observations obtenues par cinétique de relaxation (Bina-Stein *et al.*, 1976). Le fait que les bandes C20, C20:1 et C20:2 disparaissent complètement en condition dénaturante (fig 17, DMS ligne I₂₅ et I₅₀) indique que la forme en feuille de trèfle n'existe pas dans ces conditions et qu'elle doit être nettement moins stable que la forme en épingle à cheveux. La susceptibilité de la base m²A37 en absence de Mg²⁺ indique que le magnésium doit avoir un rôle dans le repliement adéquat de la boucle anticodon. Cependant, une boucle anticodon sans magnésium ne doit pas être très altérée puisque celle-ci est encore capable de former un dimère anticodon-anticodon avec le tRNA^{Phé} (Eisinger et Gross, 1975).

Figure 19 : (a) Structure tertiaire du tRNA^{Glu} d'*E. coli* telle que proposée par S. Sekine et al. (1996) (b) Structure secondaire de la forme inactive du tRNA^{Glu} d'*E. coli* dérivé des résultats obtenu par sondage au DMS et au DEPC (Fig. 17)



B



A

Les éléments rigides dans notre modèle de la structure secondaire de la forme inactive sont constitués de trois courtes hélices. Que ces hélices soient plus courtes que dans la forme native suggère que la structure tertiaire de la forme inactive est plus compacte. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la mobilité électrophorétique de la forme inactive, à 0°C, est de 10% supérieure à celle du tRNA^{Glu} actif (Eisinger et Gross, 1975). De plus, nous savons que la forme inactive est éluée avant la forme active lorsqu'elles sont appliquées sur une colonne de type RPC-5 (Tremblay et Lapointe, 1986). Les régions en hélice sont plus courtes dans la forme inactive et se lieraient donc moins fortement à la matrice chargée positivement, par analogie au DNA double brins qui se lie plus fortement à hydroxylapatite que le DNA simple brin (Martinson, 1973; Kawasaki *et al.*, 1986; Broadhurst, 1997).

Suite à leur étude par RMN de la forme inactive du tRNA^{Glu} d'*E. coli*, Bina-Stein *et al.* (Bina-Stein *et al.*, 1976) en sont venus à la conclusion que la transition de la forme active vers la forme inactive était accompagnée d'un changement dans la structure tertiaire. Ce changement impliquerait la perte de la structure tertiaire, la formation de nouveaux liens et probablement la perte de la tige D. Pour ce phénomène, Eisinger et Gross (1975) ont mesuré une énergie d'activation de 64 kcal M⁻¹, correspondant à l'énergie accumulée par l'empilement de 20 paires de bases. Dans notre modèle basé sur les résultats de sondage au DMS et a DEPC, le bris des tiges T et D contribuerait pour la moitié de cette énergie (10 paires de bases). L'autre moitié proviendrait de la perte de la structure tertiaire. Chez le tRNA^{Phe} de levure on retrouve une dizaine de paires de bases impliquées dans la structure tertiaire. Notre modèle

s'accorde donc mieux aux mesures d'énergie d'activation que celui qui n'implique que la perte de la tige D et de la structure tertiaire.

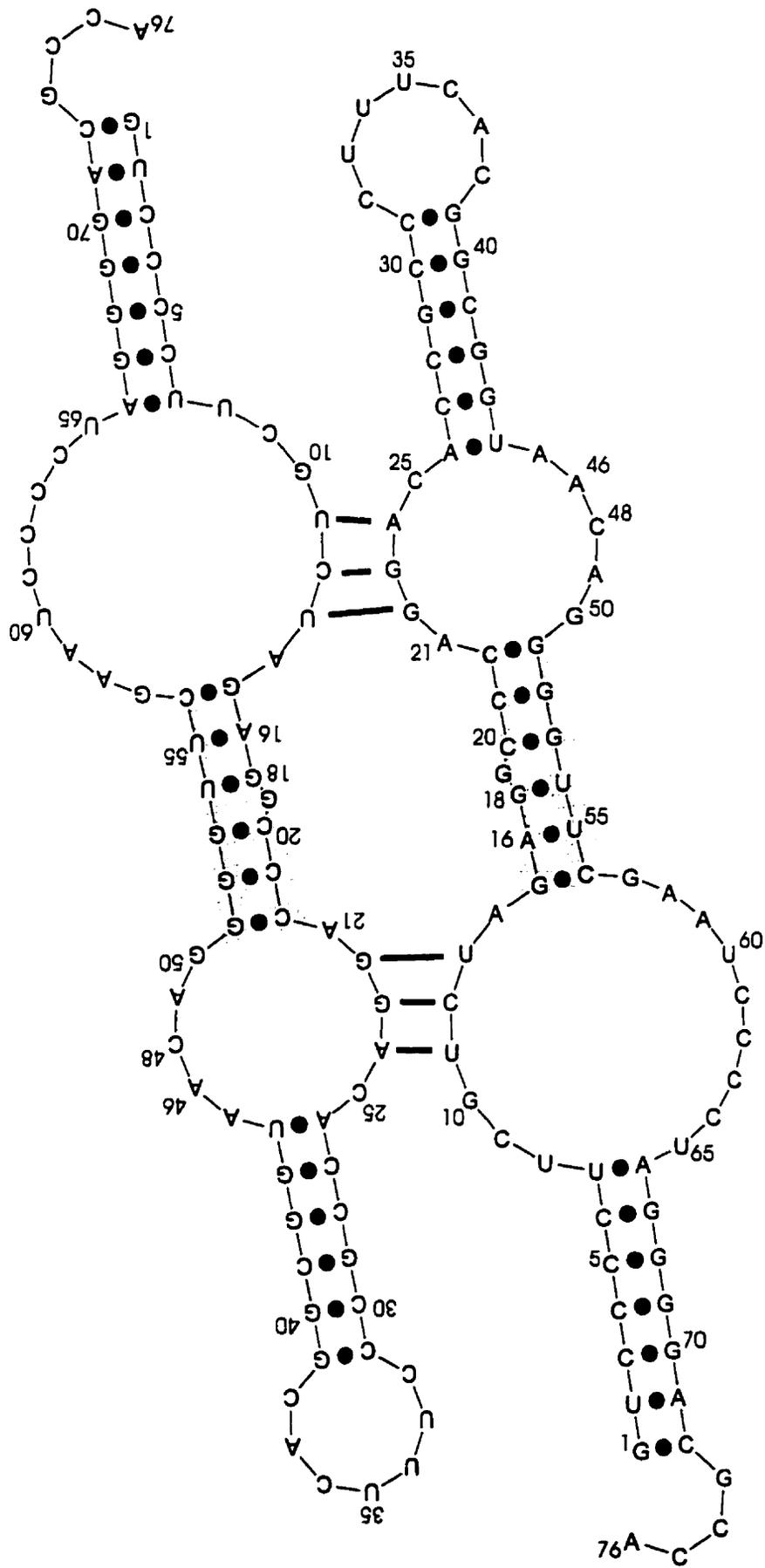
Eisinger et Gross (1975) ont observé que la transition de la forme active vers la forme inactive s'accompagnait d'une hyperchromicité de 1% à 2%. En sachant que le déploiement complet du tRNA^{Glu} cause une hyperchromicité de 25% (Lapointe et Söll, 1972a), nous estimons que la forme inactive possède de 3 à 6 nucléotides empilés de moins. En tenant compte du fait que le tRNA^{Glu} natif doit comporter environ 4 nucléotides non-empilés (comme dans le tRNA^{Phe} de levure, excluant le CCA^{3'}), il devrait y avoir entre 7 et 10 nucléotides non-empilés à l'intérieur de la forme inactive. Dans notre modèle, nous en avons identifié 6, soit : A24, A46, A49, A58 et A59, qui sont accessibles au DEPC et G19 (qui doit être exclu de l'hélice centrale).

4.4 Structure possible du dimère

Les deux monomères formant le dimère de tRNA^{Glu} ont un patron de digestion ressemblant beaucoup à celui de la forme inactive. La seule différence consiste en ce que le nucléotide A24 est protégé. On peut expliquer cette protection supplémentaire de deux façons: D'une part, elle peut provenir d'interactions tertiaires présentes à 4°C et absente à 25°C. D'autre part, cette protection peut être la conséquence directe de la formation du dimère.

Nous savons que la barrière énergétique de la formation du dimère à partir de la forme inactive n'est que de -14 kcal M^{-1} (Eisinger et Gross, 1975). Nous devons donc nous attendre à peu de changements dans la structure tertiaire de la forme inactive: ces changements doivent consister en un bris d'environ 4 paires de bases brisées, probablement dans la structure tertiaire. Le dimère est probablement formé suite à la formation de paires de bases entre les nucléotides accessibles des boucles. Il est possible de faire un tel dimère en plaçant deux 'épingles à cheveux' l'une à côté de l'autre, tête à queue, et en formant les paires de bases G22-U'13, G23-C'12, A24-U'11 et réciproquement G'22-U13, G'23-C12, A'24-U11 (Fig. 20). Le faible nombre de paires de bases unissant les deux monomères expliquerait que le dimère se dissocie à 25°C (Eisinger et Gross, 1975).

Figure 20 : Structure possible du dimère de la forme inactive du tRNA^{Glu}.



Chapitre 5

Pontage entre l'extrémité 3' du
tRNA^{Glu} et la GluRS

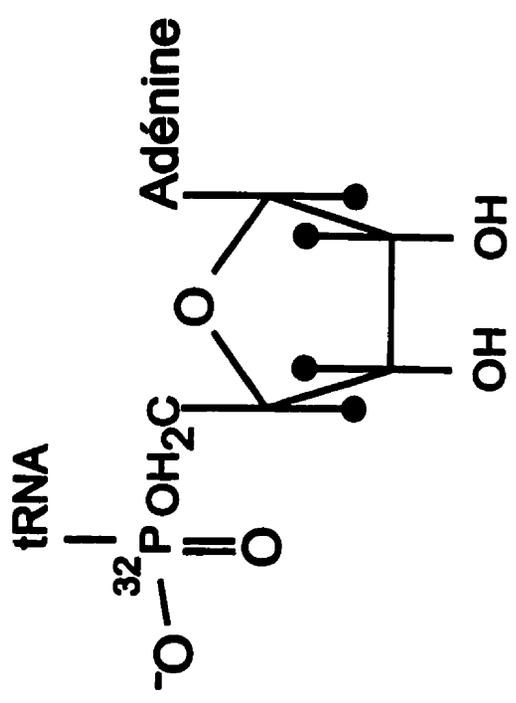
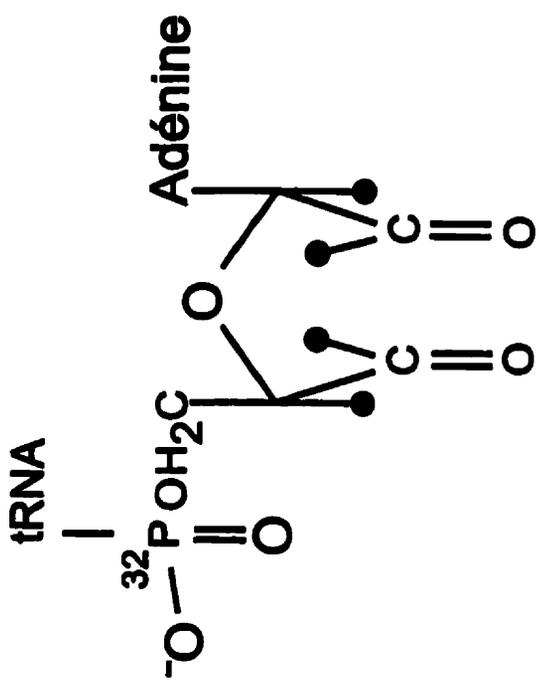
5.1 Formation de complexes covalents entre la GluRS et le tRNA^{Glu} oxydé au periodate.

La formation d'un complexe covalent entre la GluRS d'*E. coli* et son tRNA se déroule en trois étapes. Premièrement, le ribose à l'extrémité 3' du tRNA est oxydé au periodate. Cette oxydation transforme un diol (formé des OH en 2' et 3') en dialdéhyde. Ce dialdéhyde formera subséquemment une base de Schiff avec un groupement amine présent sur la GluRS (Fig. 21). Pour stabiliser le complexe, le lien C=N est réduit à l'aide de cyanoborohydrate de sodium (NaCNBH₃).

L'analyse des complexes ainsi obtenus a d'abord été effectuée par SDS-PAGE (Fig. 22). Sur le gel, on note la présence de deux bandes de poids moléculaires plus élevés que celui de la GluRS. Ces deux bandes correspondent probablement à des complexes ayant des rapports tRNA : aaRS différents. Afin d'établir ces rapports, nous avons déterminé la masse moléculaire de ces deux complexes par électrophorèse sur gel natif de diverses concentrations (la masse moléculaire de complexe acide nucléique – protéine ne peut être évaluée sur gel de polyacrylamide SDS) et par spectrométrie de masse (Fig. 23). Par gels natifs, nous avons obtenu pour le complexe 1 une masse moléculaire de 73 kDa, et de 94 kDa pour le complexe 2. Par spectrométrie de masse, en ne considérant que les deux pics les plus importants, ces masses seraient de 79.95 kDa et 104.5 kDa. Les autres pics proviennent probablement de la fragmentation de l'ARN (voir revue de Fitzgerald et Smith, 1995). En considérant la masse moléculaire de la GluRS (53.8 kDa) et de celle du tRNA (25.5 kDa), il est facile de déduire le

rapport GluRS : tRNA de ces deux complexes. Le complexe 1 contient un tRNA et une GluRS (masse théorique de 79.3 kDa) et le complexe 2 contient 2 tRNA et une GluRS (masse théorique de 104.8 kDa).

Figure 21 : La réaction de pontage entre l'extrémité 3' du tRNA^{Glu} oxydé au periodate et des résidus lysine de la GluRS.



\swarrow
GluRS
 (résidu lysine)

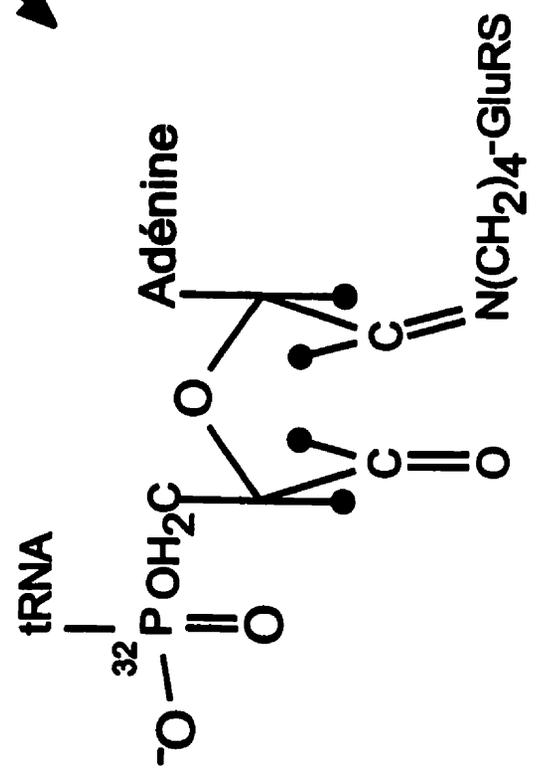


Figure 22 : Formation de complexes entre le tRNA^{Glu} oxydé au periodate et la GluRS d'*E. coli* visualisée sur gel de polyacrylamide 10% en condition dénaturante. Dans le puit 1 se trouve un mélange de complexes formés par le pontage du tRNA^{Glu} sur la GluRS. Dans le puit 2 se trouve la GluRS seule.

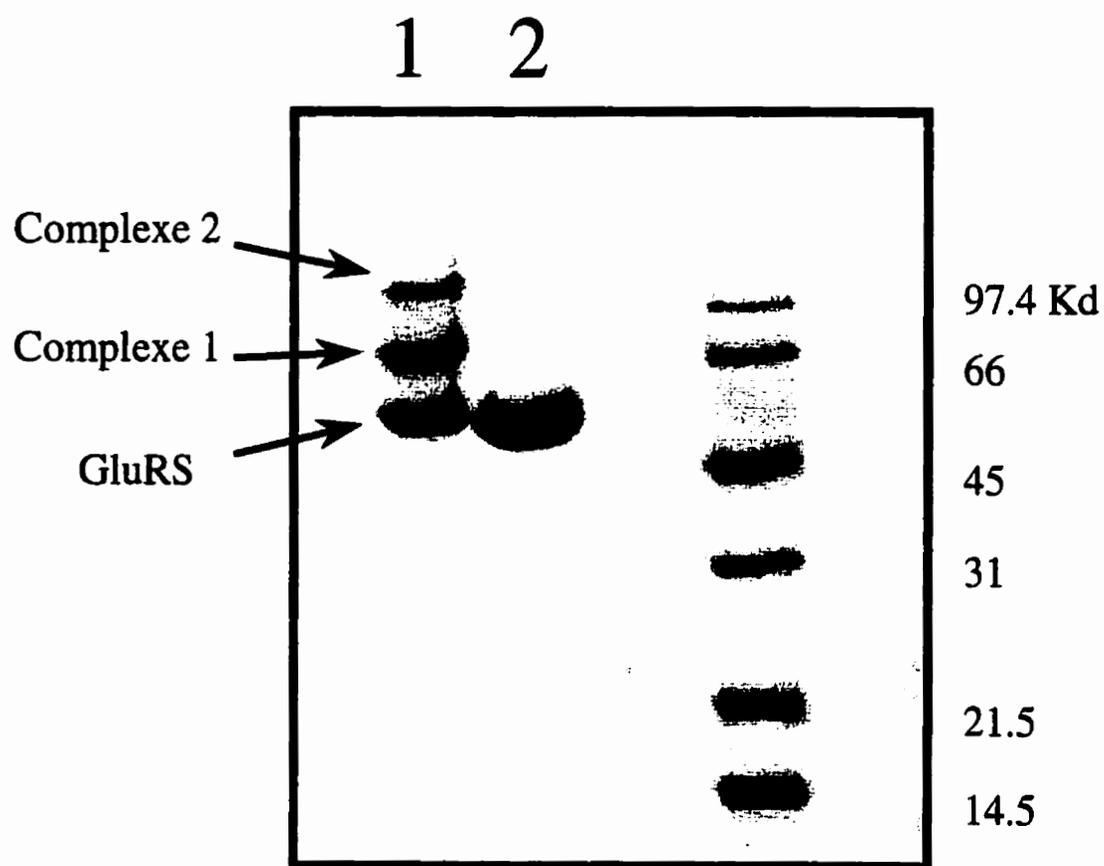
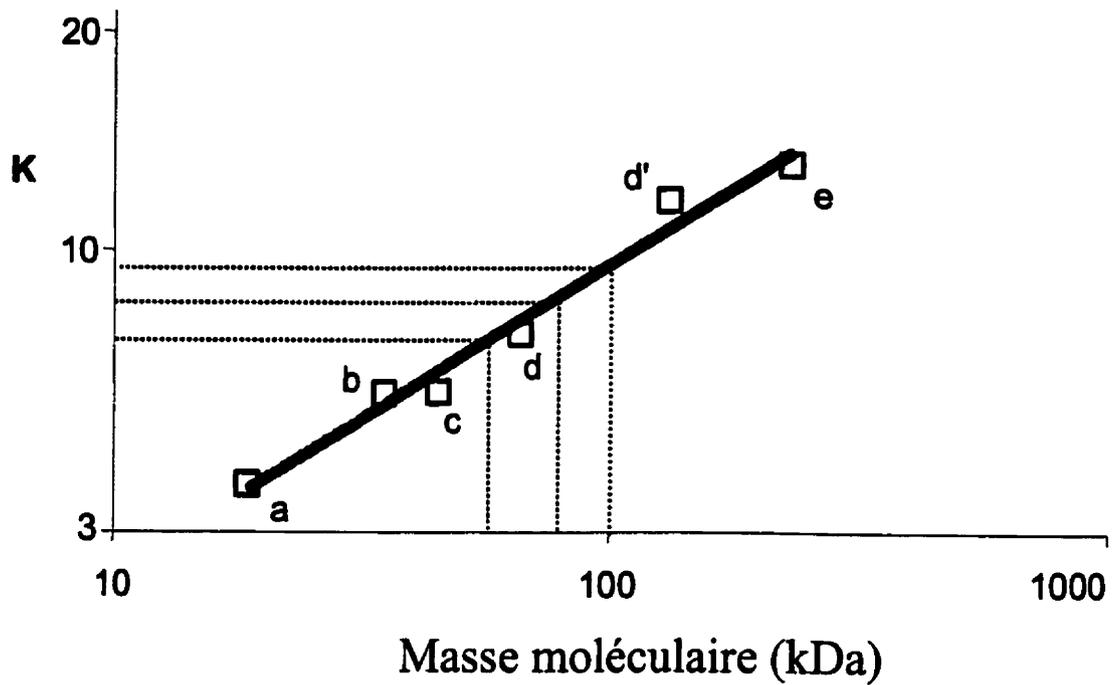
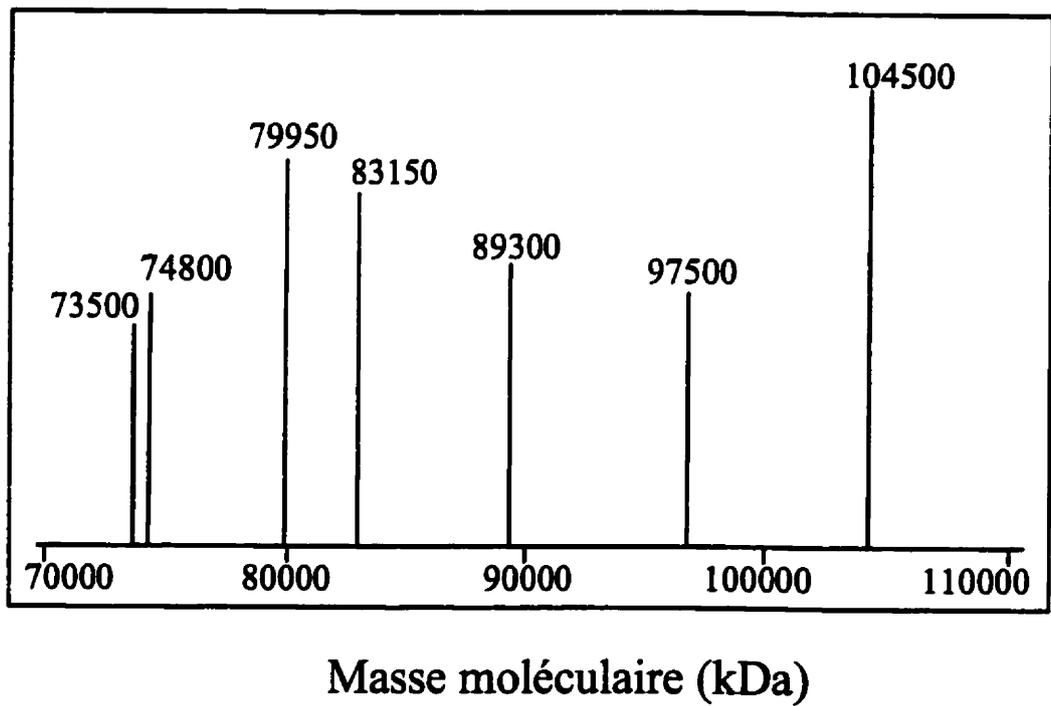


Figure 23: Détermination de la masse moléculaire des deux complexes tRNA^{Glu}_{ox}-GluRS par électrophorèse en condition native (A) et par spectrométrie de masse (B). (A) Les complexes et 5 marqueurs de poids moléculaires ont été analysés sur 6 gels contenant de 4 à 12 pour-cent de polyacrylamide. Les marqueurs sont: a) β -lactoglobulin (18.4 kDa), b) pepsine (34.7 kDa), c) 'egg albumin' (45 kDa), d) 'bovine serum albumin' (66 kDa), d') son dimère (132 kDa) et e) catalase (232 kDa). K est – la pente de la mobilité $\{100(\log(R_f \times 100))\}$ en fonction du pourcentage d'acrylamide (Mueller *et al.*, 1995). La valeur de K pour la GluRS est de 7.31, pour les complexes, ces valeurs sont de 8.35 et 9.25. Les masses moléculaires calculées par interpolation sont de 54 kDa, 73 kDa et 94 kDa. (B) Spectre de masse ESI fait a partir d'un mélange des deux complexes. Les 2 principaux pics (79950 et 104500) correspondent à des rapports tRNA :GluRS de 1 :1 et de 2 :1. Les autres pics proviennent de la dégradation de l'ARN

A) Variation de mobilité sur gels natifs



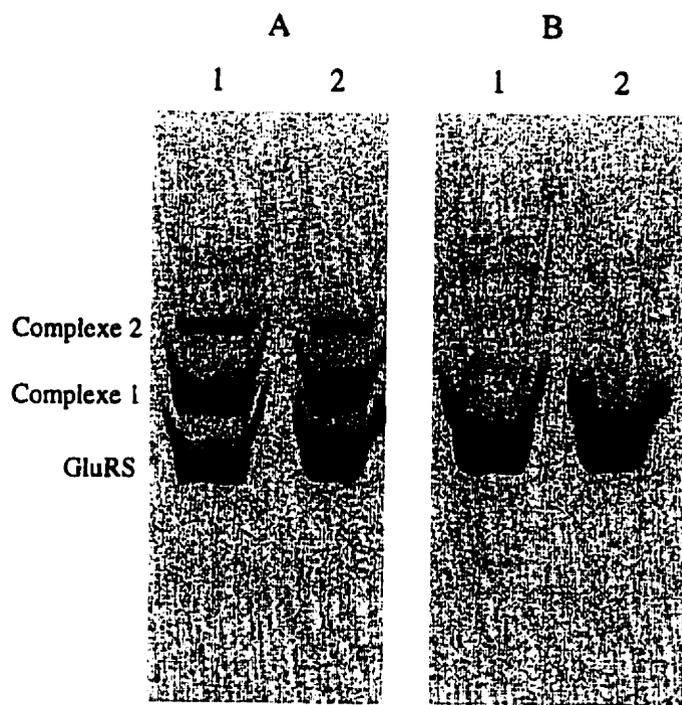
B) Spectre de masse



5.2 Les complexes formés entre la GluRS et le tRNA^{Glu} oxydé sont très spécifiques.

Afin de vérifier la spécificité de ces complexes, nous avons tenté de former des complexes avec les autres tRNAs (et plus particulièrement le tRNA^{Gln}). Pour y parvenir, nous avons utilisé du tRNA total d'une souche d'*E. coli* surproduisant le tRNA₂^{Gln} (*E. coli* K12 Δ H1 Δ Trp/pRS3). Le tRNA^{Glu} présent dans ce tRNA total a été aminoacylé avec du glutamate par la GluRS. Un tRNA ainsi aminoacylé ne pourra pas être oxydé par le periodate : le 3'OH du ribose n'étant plus là, l'oxydation ne peut pas s'effectuer. Les autres tRNA ont ensuite été oxydés et mis en présence de GluRS. Aucun complexe n'a été formé (Fig. 24). Cela indique que seul le tRNA^{Glu} est capable de former un complexe covalent avec la GluRS. La spécificité de ces complexes suggère que le tRNA^{Glu} n'accoste pas la GluRS au hasard mais plutôt à des sites d'ancrages précis.

Figure 24 : Formation de complexes tRNA-GluRS par pontage avec du tRNA oxydé contenant ou non de tRNA^{Glu}_{ox}. Sur le gel B, le tRNA avait été aminoacylé avec du glutamate par la GluRS avant la réaction de pontage (ce qui empêche son oxydation) . Dans les puits #1 de chacun des gels, nous avons utilisé du tRNA^{Glu} pur alors que dans les puits #2 nous avons utilisé du tRNA total enrichi en tRNA₂^{Gln}. Complexe 1 et complexe 2 sont respectivement les complexes GluRS-tRNA^{Glu}_{ox} de rapport 1:1 et 1:2.



La formation de deux complexes covalents entre un tRNA oxydé au periodate et son aminoacyl-tRNA synthétase a été observé entre l'ArgRS d'*E. coli* et le tRNA^{Arg} (Cheng *et al.*, 1991) ainsi qu'entre la GlnRS d'*E. coli* et le tRNA₂^{Gln} (Madore, Gagnon et Lapointe, résultats non-publiés). Par contre, ils n'ont pas été observés avec les MetRS, PhéRS, TyrRS et AlaRS (Fayat *et al.*, 1979; Renaud *et al.*, 1982; Hountondji *et al.*, 1985; Hountondji *et al.*, 1986; Hountondji *et al.*, 1987; Hill et Schimmel, 1989; Sanni *et al.*, 1991). Ces résultats suggèrent que seuls les aminoacyl-tRNA synthétases requérant le tRNA pour l'activation de l'acide aminé peuvent lier le tRNA à deux sites distincts.

5.3 Identification des résidus de la GluRS liés à l'extrémité 3' du tRNA^{Glu}.

Afin de pouvoir localiser les acides aminés liés au tRNA, nous avons marqué le tRNA^{Glu} en 3', avec du ³²P, à l'aide de la TNT. Le tRNA a été oxydé et les complexes covalents GluRS-tRNA^{Glu} ont été formés. Chacun des complexes a été purifié par SDS-PAGE et digéré par la RNase T1. Cette digestion ne laisse que l'extrémité CC-[³²P]-A^{3'} liée à l'enzyme. L'enzyme est digérée avec de la trypsine et les peptides ainsi générés sont analysés par chromatographie sur couche mince en deux dimensions. La figure 25 nous montre la carte tryptique de la GluRS (plaque A) ainsi que la position des peptides marqués dans les complexes 1 et 2 (plaque B et C). On remarque que les peptides marqués se trouvent à des positions où l'on n'observe normalement aucun peptide chez la GluRS, le CCA attaché aux peptides ayant modifié leur migration. Nous avons extrait des plaques chromatographiques B

et C chacun des peptides marqués. Sur une plaque témoin (ne contenant que la GluRS) leur positions équivalentes ont aussi été extraites. Chaque échantillon a été séquencé par dégradation d'Edman (tableau 7). Nous n'avons retrouvé aucun peptide sur la plaque témoin, aux positions relatives aux taches radioactives des deux autres plaques. Cela signifie que les peptides extraits des plaques B et C sont uniquement des peptides modifiés (CC-[³²P]A-peptides). Le fait qu'un très grand nombre de peptides ait été obtenu sur la plaque A, et que les fragments en amont et en aval de ceux obtenus ne soient pas visibles, indique que la digestion à la trypsine est complète. En effet, si la digestion avait été partielle, nous aurions observé des signaux correspondant aux peptides en amont et en aval de ²⁰⁰GEDHI...(par exemple). On aurait observé ¹⁷⁵TDGSP... si la digestion à la position ¹⁹⁹R avait été partielle ou bien ²¹⁰QINIL si ²¹⁵K avait été le site de pontage et que la digestion en position ²⁰⁹R avait été incomplète. Nous pouvons classer les sites de pontage en deux catégories selon la quantité de peptides marqués (Tableau 7) : les sites majeurs et les sites mineurs. Les sites majeurs sont ⁴¹IEDTD..., ¹¹⁰EEQMA... et ²⁰⁰GEDHI... , les mineurs sont ³⁶³YFYED... et ⁸²YNAVI... . En comparant la séquence des peptides obtenus (Tableau 7) avec la séquence de la GluRS (Fig. 26), nous pouvons déterminer où se trouve l'acide aminé ponté. Habituellement il s'agit de la première lysine de chacun des peptides. Le fait attesté que la trypsine coupe après les lysines et arginines simplifie l'équation : il ne peut y avoir qu'une lysine par peptide. Il n'y a pas de lysine dans les peptides IEDTD... et GEDHI. Nous supposons donc que le tRNA s'est ponté sur une arginine (voir section 5.4).

Figure 25: Carte tryptique de la GluRS d'*E. coli* et de la GluRS marquée par des C-C-[³²P]A provenant des complexes 1 et 2. Le gros point noir représente l'origine. La première migration (a) est une chromatographie ascendante dans un mélange éthanol : chloroforme : 28% ammoniacque : eau [5:2:1:1]. La seconde migration (b) est une électrophorèse dans l'acétate d'ammonium 100 mM, à pH 8. (A) Peptides provenant de la digestion de 15 µmoles de GluRS pure, colorés à la ninhydrine. (B) autoradiogramme des peptides marqués provenant de la digestion du complexe 1. (C) autoradiogramme des peptides marqués provenant de la digestion du complexe 2.

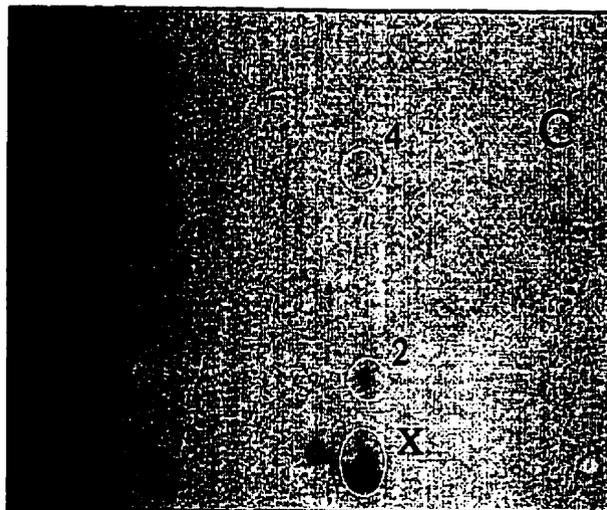
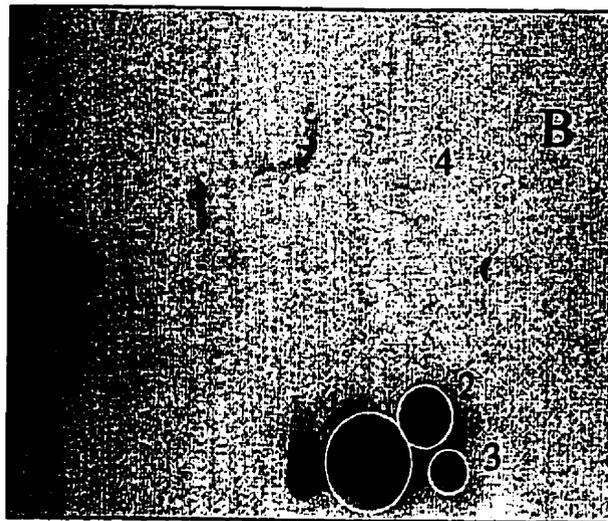
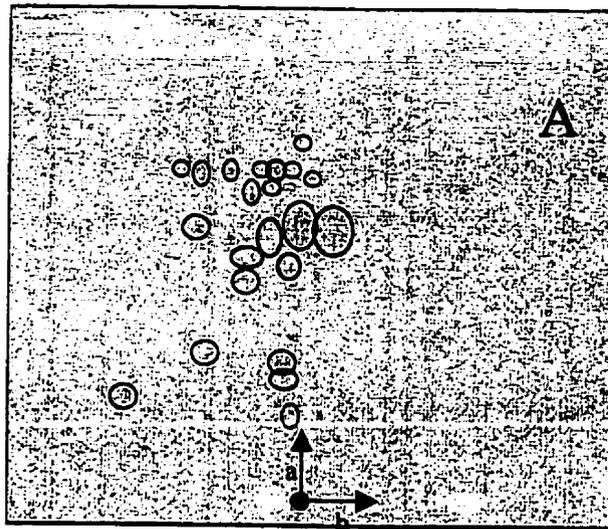


Tableau 7 : Séquence des peptides de la GluRS d'*E. coli* pontés à l'extrémité 3' du tRNA^{Glu} oxydé au periodate.

Source	Tache	Peptide ponté*Quantité relative**
Plaque A, GluRS pure		aucun nil
Plaque B, Complexe 1	2	⁴¹ IEDTDLER ⁴⁸ 0.75
	3	¹¹⁰ EEQMAK ¹¹⁵ 1.0
	1	²⁰⁰ GEDHI ^{INNTPR} ²⁰⁹ 0.41
	4	³⁶³ YFYED ^{FAEFDADAAK} ³⁷⁷ < 0.1
Plaque C, Complexe 2	2	⁴¹ IEDTDLER ⁴⁸ 0.64
	X	?? ??
	4	⁸² YNAV ^{IDQMLEEGTAYK} ⁹⁷ < 0.1
	4	³⁶³ YFYED ^{FAEFDADAAK} ³⁷⁷ < 0.1

* Aucun autre peptide n'a été détecté.

** Quantité d'acide aminé mesuré au quatrième cycle de la dégradation d'Edman comparativement à la tache #3 où 69 pmoles de PTH-méthionine ont été trouvées. La différence entre la quantité relative mesurée par cette méthode et celle déduite par la taille des taches (Fig. 25) peut provenir de peptides impossible à séquencer (trop courts, bloqués en position N-terminale...) comme pour la tache X.

Figure 26 : Positions des peptides marqués dans la séquence des résidus de la GluRS d'*E. coli*.

Les zones grises correspondent aux sites majeurs de pontage.

1 MKIKTRFAPS PTGYLHVGGG RTALYSWLFA RNHGGEFVLR **I**EDTDLERST
51 PEAI EAIMDG MNWLSLEWDE GPYYQTKRFD **RYNA**VIDQML EEGTAYKCYC
101 SKERLEALRE **EQMA**KGEKPR YDGRCRHSHE HHADDEPCVV RFANPQEGSV
151 VFDDQIRGPI EFSNQELDDL IIRRTDGSPT YNFCVVVDDW DMEITHVIR**G**
201 **EDH**INNTPRQ INILKALKAP VPVYAHVSMI NGDDGKKLSK RHGAVSVMQY
251 RDDGYLPEAL LNYLVRLGWS HGDQEIFTRE EMIKYFTLNA VSKSASAFNT
301 DKLLWLNHHY INALPPEYVA THLQWHIEQE NIDTRNGPQL ADLVKLLGER
351 CKTLKEMAQS **CRYFY**EDFAE FDADAAKKHL RPVARQPLEV VRDKLAAITD
401 WTAENVHHAI QATADELEV G MGKVGMP LRV AVTGAGQSPA LDVTVHAIGK
451 TRSIERINKA LDFIAERENQ Q

5.4 Essai de pontage avec de l'arginine

Afin de vérifier la capacité d'un tRNA oxydé au periodate à se lier à une arginine, nous avons incubé 500 μ M de tRNA oxydé, 500 mM d'arginine et 100 mM de NaCNBH₃ pendant 15 minutes à 25°C. Le tRNA a ensuite été précipité plusieurs fois pour éliminer l'arginine libre. Il a ensuite été resolubilisé dans de l'eau, déposé sur une plaque de cellulose et coloré à la ninhydrine. La coloration a révélé la présence d'arginine. La même expérience a été faite avec un tRNA non-oxydé et aucune coloration n'est apparue. Cette expérience a aussi été faite avec de la glycine et aucun pontage n'a été observé.

5.5 Position relative des résidus liés au tRNA^{Glu} oxydé dans la structure tridimensionnelle de la GluRS de *Thermus thermophilus*.

Pour connaître la position des 5 peptides marqués, les trois majeurs et les deux mineurs, nous nous sommes servis de la structure tridimensionnelle de la GluRS de *Thermus thermophilus* (Nureki *et al.*, 1995). Celle-ci ressemble beaucoup à la GluRS d'*E. coli*; leurs séquences sont identiques à 37%. Chez *E. coli*, les résidus liés au tRNA dans les trois sites majeurs sont ⁴⁸Arg, ²⁰⁹Arg et ¹¹⁵Lys, correspondant à ⁴⁷Arg, ²¹⁵Ile et ¹¹⁷Lys chez *T. thermophilus* (Fig. 27 et Fig. 28). Comme la ¹¹⁵Lys de la GluRS d'*E. coli* se trouve dans une petite insertion absente chez *T. thermophilus*, nous avons utilisé à sa place ¹¹⁷Lys qui se trouve juste avant cette insertion. Les deux sites mineurs sont ⁹⁷Lys et ³⁷²Lys correspondant à ¹⁰⁴Arg et ³⁸⁵Arg chez la GluRS de *T. thermophilus*.

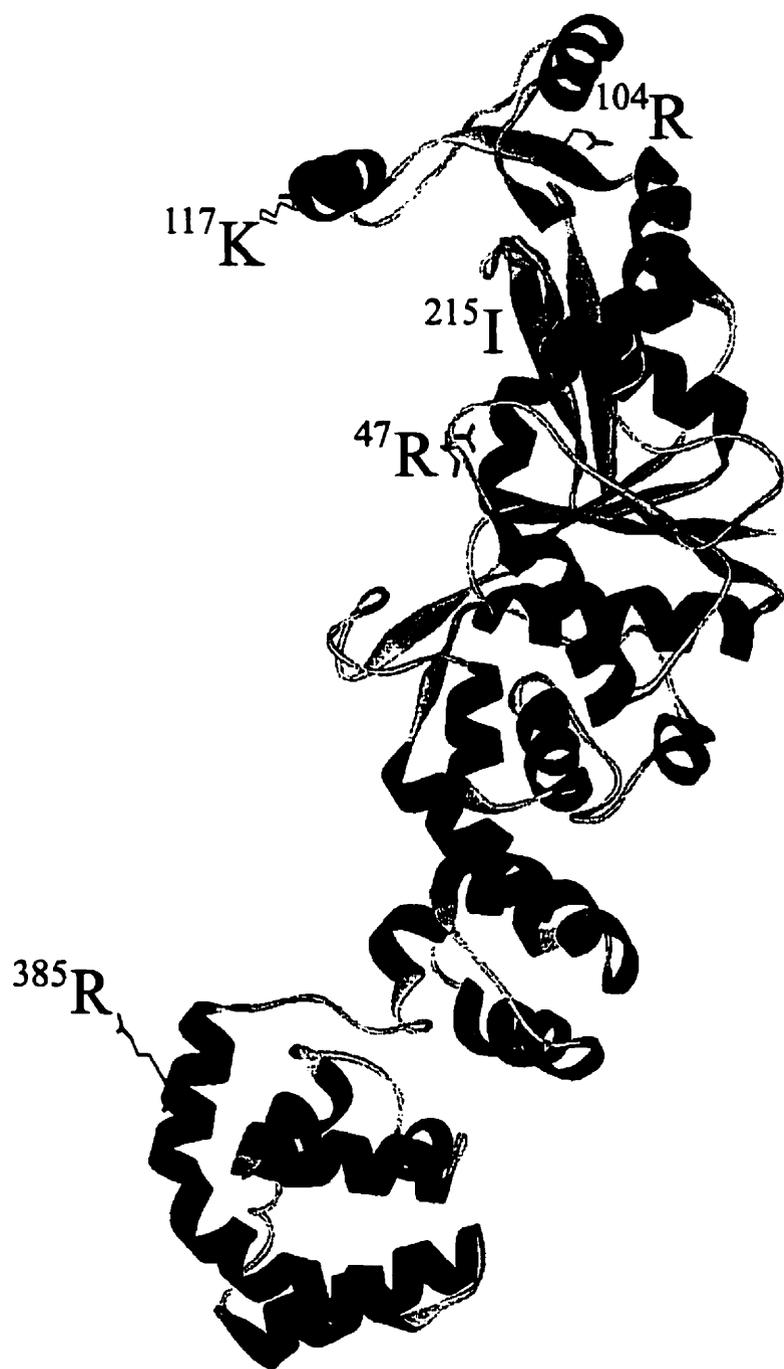
Figure 27 : Alignement des séquences des résidus des GluRS d'*E. coli* et de *T. thermophilus* et de la GlnRS d'*E. coli* dans les régions des sites majeurs de pontage. Les hélices α et les feuillets β de la GluRS de *T. thermophilus* (Nureki *et al.*, 1995) sont identifiés.

		αA		β2		αB	
		—————→				—————→	
Glueco	27	WLFARNHGGE	FVLRIEDTDL	ER	STPEAIEA	IMDGMNWL	SL 66
Glutth	26	YAWARRNGGR	FIVRIEDTDR	AR	YVPGAEER	ILAALKWL	GL 65
Glneco	51	FGIAQDYKGQ	CNLRFDDTNP	VK	EDIEYVES	IKNDVEWL	GF 90

		αD		αE		αF	
		
Glueco	99	YCSKERLEAL	REEQMAKGEK	PR	YDGRCRHS	HE...HH	ADD 135
Glutth	106	FETPEELEQI	RK.....EK	GG	YDGRARNI	PP...EE	AEE 136
Glneco	123	ELTPEQIREY	RGTLTQPGKN	SP	YDRSVEE	NLALFEK	MRA 162

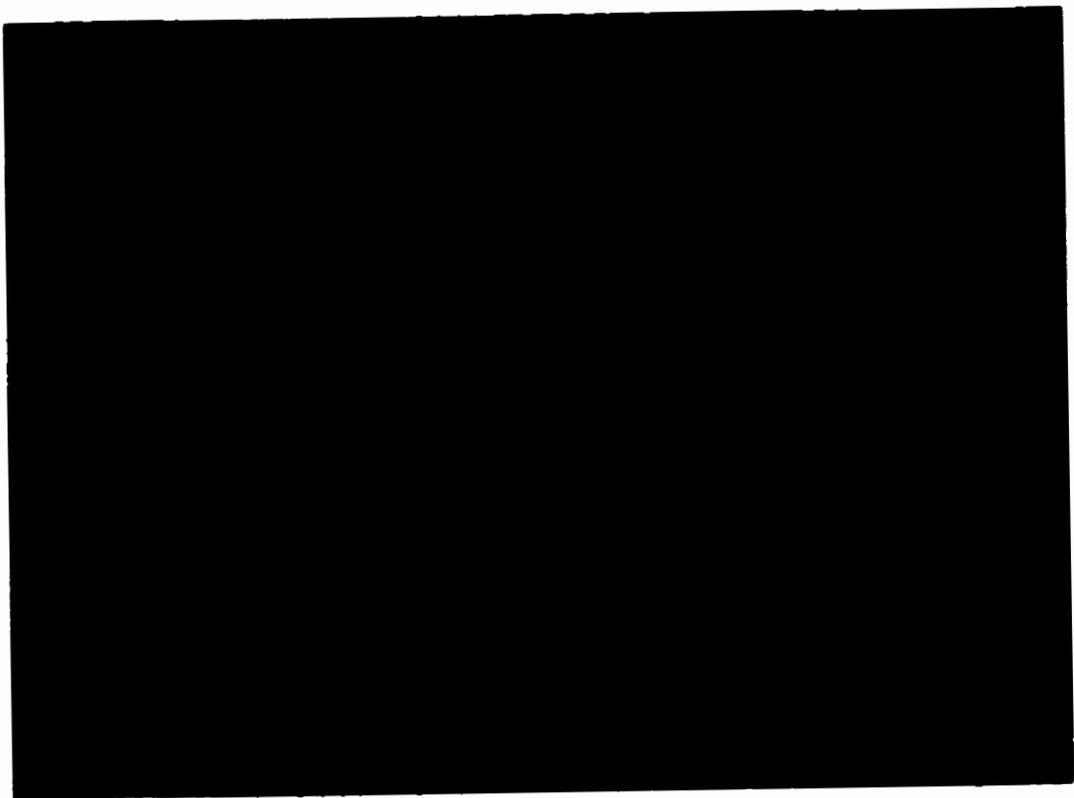
		αG		β10		αH		β11
		—————→				—————→		
Glueco	190	WDMEITHVIR	GEDHINNTPR	QI	NILKALKA	PV.PV	YAHVS 228	
Glutth	196	HLMGVTDVIR	AEEWLVTPI	HV	LLYRAFGW	EA.PR	FYHMP 234	
Glneco	220	ALEGITHSLC	TLEFQDNRR	YD	WVLDNITI	PVHPRQ	YEF 259	

Figure 28 : Localisation sur la GluRS de *T. thermophilus* des sites de pontages. Les résidus identifiés sont ceux de *T. thermophilus*. Les trois sites majeurs, ⁴⁷Arg, ²¹⁵Ile et ¹¹⁷Lys chez *T. thermophilus* correspondent à ⁴⁸Arg, ²⁰⁹Arg et ¹¹⁵Lys chez la GluRS d'*E. coli*, et les deux sites mineurs ¹⁰⁴Arg et ³⁸⁵Arg correspondent à ⁹⁷Lys et ³⁷²Lys chez la GluRS d'*E. coli*.



La position du tRNA a été déterminée en se servant comme modèle de la structure tridimensionnelle du complexe GlnRS•tRNA₂^{Gln} d'*E. coli* (Rould *et al.*, 1989). Nous avons superposé les parties N-terminales de la GluRS de *T. Thermophilus* et de la GlnRS d'*E. coli* en utilisant le programme Homology d'InsightII. Comme Nureki *et al.* (1995) l'avaient observé, la partie N-terminal de ces synthétases se superposent très bien. De cette superposition, nous avons éliminé la GlnRS en conservant le tRNA. Le tRNA₂^{Gln} d'*E. coli* s'est retrouvé dans le site actif de la GluRS de *T. thermophilus*. Le tRNA₂^{Gln} s'imbrique très bien dans le site actif de la GluRS avec seulement quelques accrochages dans le bras D (Fig. 29). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Tateno *et al.* (1995) lors de la modélisation du tRNA^{Glu} de *T. thermophilus*, et avec le fait que les principaux éléments d'identité du tRNA^{Glu} se retrouvent dans le bras D étendu (Sekine *et al.*, 1996).

Figure 29 : Le tRNA^{Gln}₂ d'*E. coli* dans le site actif de la GluRS de *T. thermophilus* comme modèle pour les complexe tRNA^{Glu}-GluRS chez *E. coli*. En rose, le nucléotide A76. En jaune, les trois acides aminés majeurs pontés au tRNA^{Glu}_{ox}. Les trois acides aminés, de haut en bas, sont ¹¹⁷Lys, ²¹⁵Ile et ⁴⁷Arg.



A



B

La position relative des trois acides aminés majeurs formant un lien covalent avec le tRNA^{Glu}_{OX} est illustrée dans la figure 29. On y montre aussi le tRNA tel qu'associé dans le complexe tRNA^{Gln}₂-GlnRS. Sur cette figure, on constate que le résidu ⁴⁷Arg (de *T. thermophilus* correspondant à ⁴⁸Arg d'*E. coli*) et le ribose de A76 (le ribose oxydé par le periodate) sont très près l'un de l'autre, ce qui a dû contribuer à faciliter la réaction de pontage. On peut même se demander pourquoi les deux autres sites majeurs existent. Pourquoi le résidu ⁴⁸Arg n'a pas accaparé tout le tRNA^{Glu}_{OX} ? Le fait que ce résidu soit une arginine plutôt qu'une lysine explique peut-être ce phénomène. Nous savons que l'arginine peut former une base de Schiff, mais moins efficacement qu'une lysine. En effet, s'il y avait eu une lysine en position 48 sur la GluRS, il est probable qu'elle aurait accaparé une grande partie des tRNA^{Glu}_{OX} et serait ainsi devenue la seule espèce majeure. Il est intéressant de noter que les deux autres sites majeurs de fixation du tRNA^{Glu}_{OX}, ²⁰⁹Arg et ¹¹⁵Lys, se trouvent aussi dans la grande crevasse du domaine N-terminal où se lie la tige acceptrice (Fig. 28). Par rapport à ⁴⁸Arg, ²⁰⁹Arg se trouve un peu plus au fond et ¹¹⁵Lys se situe de l'autre côté de cette crevasse.

Il n'a pas été possible de déterminer la position de tous les peptides marqués du complexe 2. Nous savons que le résidu ⁴⁸Arg est impliqué (Tableau 7, tache 2) mais l'autre tache majeure sur la plaque C n'a malheureusement pas pu être séquencée. On observait un très fort bruit de fond lors des trois premiers cycles de dégradation d'Edman, et tous les signaux

se sont perdus lors des cycles subséquents. Le(s) peptide(s) recherché(s) a(ont) probablement moins de 4 résidus de long et serai(en)t ainsi perdu(s) dans le bruit de fond.

Sur la GluRS de *T. thermophilus*, les résidus correspondant à ⁹⁷Lys et ³⁷⁷Lys chez *E. coli* ne se trouvent pas dans la cavité liant l'extrémité acceptrice du tRNA^{Glu}. Le premier se trouve dans le domaine de liaison de la tige acceptrice mais sur l'autre côté de l'enzyme. Le second se trouve dans le domaine de liaison de l'anticodon.

5.6 Modèles pouvant expliquer la présence de sites majeurs de pontage entre la GluRS et l'extrémité 3' du tRNA^{Glu} du complexe 1:1.

La présence de trois sites majeurs sur la GluRS liant un tRNA^{Glu}_{ox} pourrait s'expliquer de trois façons: A) il y a plusieurs sites spécifiques pour le tRNA^{Glu} sur la GluRS; B) la GluRS possède des régions mobiles qui peuvent se déplacer et atteindre l'extrémité 3' du tRNA; C) l'extrémité 3' du tRNA est mobile et peut rejoindre les trois sites de pontage. Nous allons analyser plus en détail chacune de ces possibilités.

5.6.1 Première hypothèse : il y a plusieurs sites spécifiques sur la GluRS.

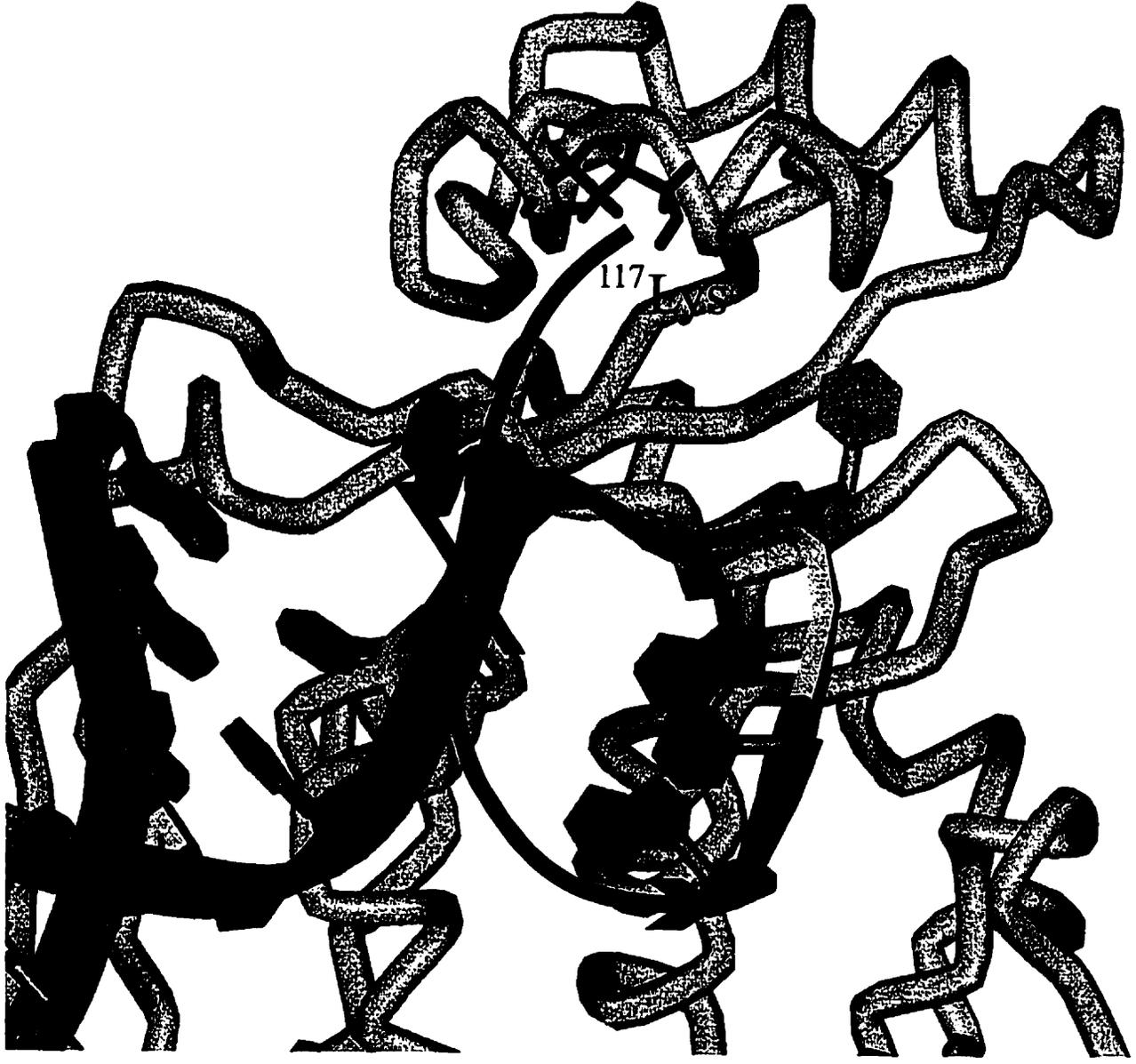
Le fait que nous observions deux complexes de poids moléculaires différents supporte l'idée qu'il doit y avoir au moins deux sites spécifiques. Nous savons qu'il y a deux sites majeurs de pontage sur le complexe 2 : ⁴⁸Arg, l'autre n'est pas encore identifié. On a constaté par modélisation moléculaire qu'en plaçant un tRNA dans le site actif pour atteindre ⁴⁸Arg, il

est impossible d'ajouter un second tRNA qui rejoindrait un des deux autres sites majeurs parce que le premier tRNA obstrue complètement les deux autres sites. Donc il existe quelque part un autre site pour lier un second tRNA. On a donc 3 sites majeurs connus, un majeur inconnu et deux mineurs. L'expérience de pontage avec les autres tRNA (fig. 24) nous a montré que la réaction de pontage était spécifique au tRNA^{Glu}. Nous serions possiblement en présence de 6 sites distincts spécifiques au tRNA^{Glu}. Comme il est improbable que cela soit le cas, nous avons rejeté cette hypothèse.

5.6.2 Seconde hypothèse : il existe des parties mobiles sur la synthétase qui peuvent se déplacer et atteindre l'extrémité 3' de la tige acceptrice

Dans cette hypothèse, nous avons placé le tRNA^{Glu} au site actif, dans la même conformation que le tRNA^{Gln}₂ dans le complexe tRNA^{Gln}₂-GlnRS (Fig. 29). Nous avons ensuite tenté de replier la GluRS de *T. thermophilus* de manière à ce que ¹¹⁷Lys et ²¹⁵Ile puissent atteindre le ribose oxydé du tRNA. Il est possible de déplacer ²¹⁵Ile juste assez pour rejoindre le ribose de A76 sans endommager le site actif. Par contre, déplacer ¹¹⁷Lys est assez risqué: la tige acceptrice y fait obstacle (Fig. 30). Pour y parvenir, il faudrait faire réarranger la protéine. Or ces reconstructions auraient pour effet de déformer considérablement le site actif. Cette hypothèse a donc été rejetée.

Figure 30 : Vue latérale d'une partie du modèle du complexe de la GluRS avec le tRNA^{Glu} montrant que ¹¹⁷Lys ne peut pas rejoindre l'extrémité 3' du tRNA.



5.6.3 Troisième hypothèse : l'extrémité 3' du tRNA est mobile.

Nous savons que les tRNAs peuvent supporter d'importants changements de conformation. Ceci est vrai pour la tige acceptrice. La conformation du tRNA^{Asp} de levure se modifie lorsqu'il se lie à l'AspRS (Rees *et al.*, 1996). Nous savons aussi qu'il existe une différence significative entre la structure des tRNA^{Phé} (Kim *et al.*, 1974; Robertus *et al.*, 1974) et tRNA^{Asp} (Moras *et al.*, 1980) de levure libre et celle du tRNA^{Gln} d'*E. coli* combiné avec sa synthétase (Rould *et al.*, 1989). Tout cela implique que l'extrémité acceptrice se transforme lorsqu'elle atteint l'enzyme. En nous inspirant de ces faits, nous avons construit un modèle où l'extrémité acceptrice du tRNA se déplie de manière à ce que le ribose oxydé (en position 76) puisse atteindre les trois sites majeurs de pontage. Cela en conservant les interactions tRNA^{Glu}-GluRS (sauf celles impliquant la tige acceptrice) car elles définissent la spécificité pour le tRNA^{Glu} (Sekine *et al.*, 1996) et que seul le tRNA^{Glu}_{ox} est capable de lier la GluRS (Fig. 23).

Notre modèle illustre le déploiement de la tige acceptrice du tRNA^{Glu} en trois étapes. La première étape est l'arrivée du tRNA sur l'enzyme, avec les bases de sa tige acceptrice entièrement empilées (le GCCA^{3'} est empilé sur l'hélice double brin et a lui-même une conformation d'hélice A). Pour le construire, nous avons superposé la structure du tRNA^{Phé} de levure (Kim *et al.*, 1974; Robertus *et al.*, 1974) à celle du tRNA^{Gln} (que nous avons ensuite éliminé) dans notre modèle tRNA^{Gln}-GluRS. Dans ce nouveau modèle (Fig. 31 A et A'), on remarque que le résidu ¹¹⁷Lys (pour la GluRS de *T. thermophilus* ou ¹¹⁵Lys pour la GluRS d'*E. coli*) est à proximité du cis-diol réactif du ribose du nucléotide A76. Il faut signaler que chez la

GluRS d'*E. coli*, il existe une petite insertion de 6 acides aminés dans cette région. Cette insertion allonge l'hélice D d'environ deux tours et rend ainsi notre modèle un peu imprécis dans cette région. Cependant, même si le site de pontage est déplacé d'un tour d'hélice, il reste quand même à la portée du ribose réactif.

Dans la dernière étape, le tRNA^{Glu} est dans la même conformation que le tRNA^{Gln} dans le complexe GlnRS•tRNA^{Gln}₂. Le ribose de A76 est en position d'accéder à ⁴⁷Arg (pour la GluRS de *T. thermophilus* ou ⁴⁸Arg pour la GluRS d'*E. coli*) (Fig. 31 C et C').

L'autre site de pontage (²¹⁵Ile pour la GluRS de *T. thermophilus*, ²⁰⁹Arg pour la GluRS d'*E. coli*) correspond à un état intermédiaire entre les étapes initiale et finale. La transition entre cette étape et l'étape finale peut être faite à l'aide de quelques rotations autour des phosphates P₇₄ et P₇₆. Plusieurs conformations possibles de l'extrémité 3' du tRNA^{Glu} permettent d'atteindre le résidu ²¹⁵Ile. Ce qui est important, ce n'est pas la conformation exacte du tRNA mais plutôt le fait que le tRNA puisse passer par ²¹⁵Ile (chez la GluRS de *T. thermophilus*; ²⁰⁹Arg chez celle d'*E. coli*) (Fig. 31 B et B'). L'extrémité acceptrice du tRNA balayerait la GluRS (l'intérieur de la cavité liant la tige acceptrice), de ¹¹⁷Lys, en passant par ²¹⁵Ile, pour terminer à ⁴⁷Arg (¹¹⁵Lys, ²⁰⁹Arg et ⁴⁸Arg pour la GluRS d'*E. coli*).

Figure 31: Trois étapes dans le déroulement de l'extrémité de la tige acceptrice du tRNA^{Glu} sur la GluRS. (A) L'extrémité de la tige acceptrice est empilée en une hélice A tel que retrouvé dans le tRNA^{Phé} de levure. (B) Étape intermédiaire dans le dépliement de l'extrémité de la tige acceptrice (C) Dans l'étape finale, l'extrémité de la tige acceptrice adopte la même conformation que celle du tRNA^{Gln} dans le complexe tRNA₂^{Gln} •GlnRS (C). En A', B' et C', structure détaillée montrant la position du nucléotide A76 et des acides aminés pontés. Le tRNA est coloré en vert, la GluRS en bleu, A76 en rose et les acides aminés pontés en jaune.

5.7 Analyse détaillée de l'hypothèse no 3.

Le déploiement de la tige acceptrice sur la GluRS peut se faire sans qu'il y ait d'interférences significatives entre ces deux macromolécules. De plus, il est possible que ce déploiement soit accompagné de changements de conformation de l'enzyme. Cependant, on peut se demander si les trois sites majeurs de pontage ne correspondraient pas à trois conformères différents du tRNA^{Glu} en solution ? Si c'était le cas, cela détruirait notre hypothèse. Or, plusieurs études structurales sur des tRNAs et sur des microhélices possédant une purine comme base discriminatrice ont démontré que l'extrémité 3' était empilée en une hélice A. Cela a été vérifié pour le tRNA^{Phe} de levure tel que révélé par diffraction des rayons X (Kim *et al.*, 1974; Robertus *et al.*, 1974), la microhélice de tRNA^{Ala} d'*E. coli* (Ramos et Varani, 1997), la microhélice de tRNA^{Met} initiateur d'*E. coli* (Puglisi *et al.*, 1994) et la microhélice de tRNA^{Leu} humaine (Metzger *et al.*, 1997) dont la structure a été déterminée par RMN. De plus, pour la microhélice de tRNA^{Leu} humaine, un seul conformère est observé. Toutes ces données suggèrent fortement que l'extrémité de la tige acceptrice du tRNA^{Glu} adopte une conformation en hélice A.

Dans notre modèle, les complexes intermédiaire et final sont détectables parce que la vitesse de formation d'une base de Schiff est inférieure à celle du déploiement d'un ARN simple brin. Celle-ci est trop rapide pour être mesurée (Cantor et Schimmel, 1980) alors que la vitesse de formation d'une base de Schiff est réduite par une haute barrière énergétique résultant de l'élimination d'une molécule d'eau (Streitwieser et Heathcock, 1985). Le fait que

le déploiement de la tige acceptrice soit plus rapide que la réaction de pontage peut expliquer pourquoi toutes les molécules de tRNA^{Glu}_{ox} ne se sont pas liées à l'étape initiale (avec ¹⁵Lys). Cela indique aussi que le segment GCCA^{3'} doit demeurer en conformation hélicoïdale un certain temps sur l'enzyme de manière à laisser à la réaction de pontage avec ¹⁵Lys le temps de s'effectuer.

De plus, le transcrit mutant du tRNA^{Glu} d'*E. coli* C72A est aminoacylé par la GluRS d'*E. coli* et ce avec un k_{cat} soixante fois plus petit qu'avec un transcrit sauvage (Sekine *et al.*, 1996). Cette mutation aurait pour effet de briser la paire de base G1-C72 et déstabiliserait l'empilement du segment simple brin GCCA^{3'}. Une extrémité acceptrice en hélice A serait donc requise pour la reconnaissance du tRNA^{Glu} par la GluRS lors de leur contact initial.

Chapitre 6

Conclusion

6.1 Rôle des bases modifiées du tRNA^{Glu} de *E. coli*

6.1.1 Préparation du matériel

En surproduisant le tRNA^{Glu} d'*E. coli*, nous avons obtenu des tRNA^{Glu} modifiés différemment (tableau 3). Le fait que les enzymes de modification n'aient pas été capables de répondre à la demande est responsable de ce phénomène. Ces différentes formes de tRNA^{Glu} ont pu être purifiées en utilisant une colonne de type C18 modifiée (Fig. 10). Cette résine s'est avérée être un outil efficace autant dans la purification des différents modivariants que du tRNA^{Glu} totalement modifié. En effet, on peut se servir de ce type de chromatographie pour obtenir un tRNA^{Glu} relativement pur et en quantité (~10 mg pour 30 L de culture). Les impuretés polluant le tRNA^{Glu} peuvent être éliminées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

6.1.2 Ordre des modifications post-traductionnelles du tRNA^{Glu}

Les différents modivariants de tRNA^{Glu} obtenus ont permis d'étudier le rôle des bases mnm⁵s²U34, m²A37 et (fort probablement) Ψ13. Nous n'avons pas obtenu de modivariant où T54 et/ou Ψ55 étaient absents. Les quelques modivariants que nous avons étudiés nous permettent d'avancer certaines hypothèses relative à l'ordre dans laquelle s'effectuent les modifications chez le tRNA^{Glu} d'*E. coli*. Comme Bjork et al. (1987) l'avaient déjà observé, la partie s² de la base mnm⁵s²U est synthétisée avant la partie mnm⁵. Nous avons observé aussi

que ni la formation de m^2A ni celle de $\Psi13$ ne requéraient la présence d'un mnm^5s^2U . En effet, dans le modivariant 5, le mnm^5s^2U est absent alors que m^2A et $\Psi13$ sont présents (Tableau 3). De plus, la présence des nucléotides modifiés m^2A et $\Psi13$ n'est pas requise pour la formation de s^2U . Le modivariant 4, possède un s^2U mais pas de m^2A ni de $\Psi13$. Il est possible que la présence de s^2U soit requise pour la formation de m^2A et que celle-ci soit nécessaire à l'ajout du groupement méthyl-aminométhyl sur le s^2U .

6.1.3 Rôle du $\Psi13$

Cette base modifiée ne semble jouer aucun rôle dans la reconnaissance du tRNA, de l'ATP et du glutamate par la GluRS (section 3.4, Tableau 5). De plus, l'absence de cette base ne modifie pas la structure du tRNA (Fig. 16). Si cette base modifiée a une quelconque fonction, nous n'avons pas pu l'identifier. Il faut noter que nous ne sommes pas assuré que la pseudouridine absente dans le modivariant 4 soit bien $\Psi13$. Il se peut que cela soit $\Psi54$. Par contre, une surproduction du tRNA^{Glu} d'un facteur 60 n'aurait augmenté la 'charge de travail' de la $\Psi55$ -synthase que d'un facteur 2 (il y a environ deux fois plus de tRNA dans la cellule). Comme très peu de tRNA ont besoin d'une pseudouridine en position 13, l'augmentation de la 'charge de travail' de la $\Psi13$ -synthase serait nettement plus significative. Cet argument nous incite à croire que si une pseudouridine est absente, cela doit être $\Psi13$.

6.1.4 Rôle du m^2A37

La base modifiée m^2A37 ne semble pas impliquée dans la reconnaissance du tRNA ou du glutamate par la GluRS. En effet, si on compare les cinétiques obtenues pour le glutamate et le tRNA, pour les modivariant 4 (sans m^2A) et 5 (avec m^2A), on n'observe que peu de différence (Tableau 5). Cependant, il semble que cette base soit impliquée, de façon peu importante, dans la reconnaissance de l'ATP. Les K_m de la GluRS pour l'ATP augmentent d'un facteur 3 à 4.5 lorsque cette base est absente. Au niveau structural, on remarque que cette base semble impliqué dans le maintien de l'intégrité de la boucle anticodon (Fig. 16). Le faible impact au niveau cinétique nous suggère que les variations observées proviendraient davantage de cette perturbation structurale plutôt que d'une reconnaissance directe. Nous savons que la liaison du tRNA amène un changement de conformation sur la GluRS. Si la boucle anticodon est déformée, ce changement ne se produit peut-être pas de la même façon, perturbant ainsi le site de liaison de l'ATP. Le rôle de cette base modifiée serait donc uniquement structural.

6.1.5 Rôle du groupement méthyl-aminométhyl de la base mnm^5s^2U34

Le méthyl-aminométhyl de la base mnm^5s^2U34 ne semble pas être impliqué dans la reconnaissance du tRNA et de l'ATP par la GluRS. En effet, lorsqu'on compare les modivariant 2 (avec méthylaminométhyl) et 5 (sans méthylaminométhyl) on ne remarque que

peu de changement (Tableau 5). Par contre, la reconnaissance du glutamate est augmentée d'un facteur 6 à 8. Au niveau structural, on remarque que cette base, comme la base m^2A , contribue au maintien de l'intégrité de la structure de la boucle anticodon (Fig. 16). Ce cas est similaire à celui de la base m^2A37 . Dans ce cas-ci, la perturbation dans l'anticodon aurait amené la formation d'un site de liaison du glutamate moins performant. La conformation de l'anticodon des modivariant 3, 4 et 5 seraient différentes. Ces conformations auraient un impact différent sur la formation du site actif de la GluRS. Nous pouvons donc affirmer que le groupement méthyl-aminométhyl de la base mnm^5s^2U34 a un rôle structural.

6.1.6 Rôle du groupement thiol de la base mnm^5s^2U34

Lorsqu'on compare les données obtenues avec les modivariants 3 et 4, on constate que le groupement thiol de la base mnm^5s^2U34 ne semble avoir aucune action dominante dans la reconnaissance du glutamate. On observe que l'absence du groupement thiol contrecarre l'absence du groupement méthyl-aminométhyl sur la reconnaissance du glutamate par la GluRS. Là où l'effet du groupement thiol est le plus visible, c'est dans la reconnaissance du tRNA; cette dernière est affectée d'un facteur 520 (Tableau 5). Il était déjà connu que la base mnm^5s^2U34 constituait un élément d'identité du tRNA^{Glu} (Kern et Lapointe, 1979; Sylvers *et al.*, 1993; Sekine *et al.*, 1996). Nous pouvons affirmer que c'est le groupement thio-2 de cette base qui est l'élément d'identité. Cette modification a un impact important sur la structure du tRNA (Fig. 16). Elle altère la structure de la boucle anticodon et cette altération est propagée à tout le tRNA via l'empilement des bases. On peut se demander si la perte majeure de spécificité pour le tRNA ne proviendrait pas de la perturbation structurale plutôt que d'une

reconnaissance directe du groupement s^2U par la GluRS ? Le fait que la reconnaissance de l'ATP et celle du glutamate ne soient pas trop affectées semble appuyer la théorie de la reconnaissance directe. Cependant on ne peut exclure la possibilité que la perturbation structurale ait pu modifier un des éléments d'identité majeurs du tRNA^{Glu}. Si la paire de bases U11-A24 ou le triplet U13-G22-H46 était affecté, il s'en suivrait certainement une importante baisse de spécificité. On peut donc dire que le groupement thiol de la base mm^5s^2U34 a un rôle structural et, fort probablement, un rôle en tant qu'élément d'identité.

6.1.6 Perspectives

Nous devons préciser que les méthodes utilisées ne nous ont pas permis de noter tous les changements qu'auraient pu amener la perte d'une base modifiée. La principale difficulté provient du fait que ces modifications sont généralement très subtiles. En plus d'avoir identifié le rôle des bases modifiées $\Psi13$, mm^5s^2U34 et m^2A37 dans la réaction d'aminacylation, nous avons ouvert la porte à plusieurs autres études. Au niveau cinétique, nous pourrions étudier l'échange ATP-pyrophosphate pour voir quelle étape (activation ou transfert) est affectée. Au niveau structural, nous avons choisi certaines méthodes de sondage mais nous aurions pu utiliser d'autres sondes, la diffraction des rayons X ou la RMN. Nous avons déjà tenté d'élucider la structure du tRNA^{Glu} par cette dernière méthode (en collaboration avec le Dr Paul F. Agris du département de Biochimie de la North Carolina State University) mais le trop haut contenu en GC a rendu l'interprétation des spectres impossible. Il aurait aussi été intéressant d'obtenir plus de modivariants pour étudier l'effet des bases T54 et $\Psi55$. L'effet de

ces bases modifiées pourrait aussi être investigé dans le cadre de la liaison avec EF-Tu ou avec le ribosome. Toutes ces expériences pourraient être faites dans un projet futur visant à approfondir nos connaissances sur le rôle des bases modifiées du tRNA^{Glu}.

6.2 Structure des formes inactive et dimérique du tRNA^{Glu}

L'étude structurale des formes inactive et dimérique du tRNA^{Glu} d'*E. coli* à l'aide de sondes chimiques s'est révélé être un succès. Nous avons proposé deux structures secondaires pouvant expliquer tous les résultats obtenus ainsi que les observations faites auparavant. On peut affirmer que les méthodes de sondage chimique sont efficaces pour déterminer la structure secondaire de petits ARN. Ces techniques nous donnent aussi des indices sur la structure tertiaire. Cependant, des méthodes plus puissantes, telles que la RMN ou la diffraction des rayons X, doivent être utilisées pour appréhender l'image complète de la structure tertiaire.

Le conformère inactif a une structure en forme d'épingle à cheveux avec deux boucles internes (Fig. 19). Les deux extrémités de cette épingle sont formées d'une part de la tige acceptrice et d'autre part de la tige et boucle anticodon. Il est intéressant de constater que cette structure a conservé les deux régions où se trouve la majorité des éléments d'identité des tRNA pour leur aaRS (pour une revue voir McClain, 1995 et Giegé *et al.*, 1998). La seconde serait formée d'un dimère de cette épingle à cheveux. La liaison entre les deux monomères se ferait via les deux boucles centrales (Fig. 20).

La forme inactive du tRNA^{Glu} a-t-elle une fonction? En observant sa structure, on comprend qu'elle ne puisse pas être aminoacylée. En effet, cet ARN ne possède pas d'hélice D étendue et nous savons que cette région est le principal site de reconnaissance chez le tRNA^{Glu} d'*E. coli* pour la GluRS. Elle possède peut-être une fonction dans un autre domaine. Comme aucune étude n'a encore été faite à ce sujet, nous ne pouvons que conjecturer. Et la dimère, a-t-il une fonction? C'est peu probable. En effet, les conditions requises à l'obtention du dimère seraient difficiles à réunir *in vivo*.

Le cas du tRNA^{Glu} n'est pas unique. Il existe plusieurs autres tRNA qui possèdent une forme inactive (tRNA^{Trp}, tRNA^{His}, tRNA^{Glu} de *E. coli*, tRNA^{Ser}, tRNA^{Phé}, tRNA^{Met}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Lys} de levure etc...)(Ishida et al., 1971; Adams et al., 1967; Fresco et al., 1966). La plupart de ces formes inactives sont obtenues à basse concentration en magnésium. Le logiciel de prédiction de structures secondaires développé par Walter *et al.* (1994) nous donne pour ces tRNA, une série de structures secondaires ayant peu ou pas de points commun avec la structure en feuille de trèfle. Dans la plupart des cas, la structure canonique est thermodynamiquement défavorisée par rapport aux structures alternatives (il faut noter que le logiciel ne tient pas compte des interactions tertiaires). L'idée que tous les tRNA adoptent spontanément la structure en forme de trèfle due à leur seule séquence n'est donc pas véridique. Pour le tRNA^{Glu}, et certainement pour plusieurs autres, un ligand comme le magnésium est essentiel. Pour le tRNA^{Lys} humain, la modification en position 9 est essentielle (Helm *et al.*, 1998).

6.2.1 Perspectives

La connaissance des structures des formes inactive et dimérique du tRNA^{Glu} pourrait être affinée en utilisant d'autres sondes chimiques, par RMN et/ou par diffraction des rayons X. Il serait intéressant d'étudier le rôle possible pour ces différentes formes. Finalement, l'étude de la conformation des formes inactives des autres tRNA pourrait nous donner des indications sur les mécanismes impliqués dans le repliement de l'ARN et sur la fonction du magnésium dans ce processus.

6.3 Changement conformationnels de l'extrémité 3' du tRNA^{Glu} lors de son interaction avec la GluRS

Suite au pontage entre l'extrémité 3' d'un tRNA^{Glu} oxydé au periodate et la GluRS de *E. coli*, nous avons observé la formation de deux complexes de poids moléculaires différents correspondant à des rapports tRNA : GluRS de [1 : 1] et de [2 : 1]. De plus, des études de spécificité ont démontré que seul le tRNA^{Glu} pouvait former un (des) complexe(s) avec la GluRS. Nous avons donc découvert un outil pouvant servir à l'étude de liaison de mutant de tRNA^{Glu}, ou d'autres tRNA, à la GluRS.

Nous avons identifié, sur la GluRS, 5 sites de fixation (3 majeurs et 2 mineurs) de l'extrémité 3' du tRNA^{Glu}_{ox} (Fig 26). Les trois sites majeurs se trouvent dans la cavité liant la tige acceptrice du tRNA. La formation de ces trois sites pourrait être expliquée par le déploiement de l'extrémité de la tige acceptrice sur l'enzyme. Un de ces sites correspondrait à l'arrivée du ribose 3'-terminale du tRNA dont l'extrémité de la tige acceptrice serait entièrement empilé en hélice simple brin de conformation A. Un autre correspondrait à la position de ce même ribose dans une extrémité acceptrice repliée telle que retrouvée dans le complexe tRNA^{Gln}:GlnRS d'*E. coli*. Le dernier correspondrait à un état intermédiaire entre les deux. Nous aurions donc trois images d'un petit film montrant le déploiement du GCCA^{3'} sur la GluRS. Il est possible, même probable, que la GluRS participe à ce processus par des changements de conformation.

Dans ce modèle, il est intéressant de constater que le premier contact avec la GluRS se fait avec un tRNA^{Glu} dont l'extrémité 3' est empilé. On peut se demander si ce mécanisme peut s'appliquer aux autres aaRS requérant le tRNA pour l'activation de l'acide aminé. On peut imaginer un mécanisme où le tRNA entrerait en contact avec son aaRS. La reconnaissance des éléments d'identité présents dans l'anticodon (ou ailleurs) provoquerait un changement de conformation dans l'enzyme. Ce changement amènerait la tige acceptrice à se déplier et ainsi à contribuer à la formation des conditions nécessaires à l'activation de l'acide aminé.

6.3.1 Perspectives

Afin d'approfondir cette dernière théorie, il serait intéressant d'étudier la formation de complexe(s), plus particulièrement la reconnaissance initiale, dans les systèmes Arg et Gln. Il serait aussi intéressant d'étudier en détails le mécanisme de déploiement de l'extrémité GCCA^{3'} ; qu'est-ce qui le provoque? Quel est le rôle de la GluRS dans ce phénomène? Qu'est-ce qui provoque des changements de conformation sur l'enzyme et en quoi consistent ces changements? Tout cela nous permettrait de mieux comprendre les interactions entre les aminoacyl-tRNA synthétases et leurs tRNA.

Chapitre 7

Bibliographie

1. Adams A, Lindahl T et Fresco JR (1967) Conformational differences between the biologically active and inactive forms of a transfer ribonucleic acid, *Proc Natl Acad Sci USA*, **57**:1684-1691
2. Agris PF, Söll D et Seno T (1973) Biological function of 2-thiouridine in *Escherichia coli* glutamic acid transfer ribonucleic acid, *Biochemistry*, **12**:4331-4337
3. Akins RA et Lambowitz AM (1987) A protein required for splicing group I introns in *Neurospora* mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof, *Cell*, **50**:331-345
4. Arena F, Ciliberto G, Ciampi S et Cortese R (1978) Purification of pseudouridylate synthetase I from *Salmonella typhimurium*, *Nucleic Acids Res*, **5**:4523-4536
5. Arnez JG, Harris DC, Mitschler A, Rees B, Francklyn CS et Moras D (1995) Crystal structure of histidyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* complexed with histidyl-adenylate, *EMBO J*, **14**:4143-4155
6. Bienz M, Kubli E, Kohli J, deHenau S, Huez G, Marbaix G et Grosjean H (1981) Usage of the three termination codons in a single eukaryotic cell, the *Xenopus laevis* oocyte, *Nucleic Acids Res*, **9**:3835-3850
7. Bina-Stein M, Crothers DM, Hilbers CW et Shulman RG (1976) Physical studies of denatured tRNA_{2^{Glu}} from *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **73**: 2216-2220
8. Bina-Stein M (1974) PhD thesis, Yale University
9. Biou V, Yaremchuk A, Tukalo M et Cusack S (1994) The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Ser), *Science*, **263**:1404-1410

10. Bischoff R et McLaughlin LW (1985) Isolation of specific tRNAs using an ionic-hydrophobic mixed-mode chromatographic matrix, *Anal Biochem*, **151**:526-533
11. Björk GR (1986) Transfert RNA modification in different organisms, *Chemica Scripta*, **26B**:91
12. Björk GR, Ericson JU, Gustafsson CE, Hagervall TG, Jonsson YH et Wikstrom PM (1987) Transfer RNA modification, *Annu Rev Biochem*, **56**:263-87
13. Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B et Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12, *Science*, **277**:1453-1474
14. Breton R, Sanfacon H, Papayannopoulos I, Biemann K et Lapointe J (1986) Glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* Isolation and primary structure of the *gltX* gene and homology with other aminoacyl-tRNA synthetases *J Biol Chem*, **261**:10610-10617
15. Breton R, Watson D, Yaguchi M et Lapointe J (1990) Glutamyl-tRNA synthetases of *Bacillus subtilis* 168T and of *Bacillus stearothermophilus* Cloning and sequencing of the *gltX* genes and comparison with other aminoacyl-tRNA synthetases, *J Biol Chem*, **265**:18248-18255
16. Brick P, Bhat TN et Blow DM (1989) Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 23 Å resolution Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate, *J Mol Biol*, **208**:83-98
17. Brisson A, Brun YV, Bell AW, Roy PH et Lapointe J (1989) Overproduction and domain structure of the glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*, *Biochem Cell Biol*, **67**:404-410

18. Brisson A, (1992) Thèse de doctorat, Université Laval
19. Broadhurst AV (1997) Hydroxylapatite chromatography Dans: *Current Protocols in protein Science*, Vol 1, unit 86, John Wiley and Sons, Inc
20. Brunie S, Zelwer C et Risler JL (1990) Crystallographic study at 25 Å resolution of the interaction of methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* with ATP, *J Mol Biol*, **216**:411-424
21. Cantor CR et Schimmel PR (1980) *Biophysical chemistry*, WH Freeman and Co, pp 1211-1214
22. Carbon P, Haumont E, Fournier M, de Henau S et Grosjean (1983) H Site-directed *in vitro* replacement of nucleosides in the anticodon loop of tRNA: application to the study of structural requirements for queuine insertase activity, *EMBO J*, **2**:1093-1097
23. Carre DS, Thomas G et Favre A (1974) Conformation and functioning of tRNAs: cross-linked tRNAs as substrate for tRNA nucleotidyl-transferase and aminoacyl synthetases, *Biochimie*, **56**:1089-1101
24. Carter CW Jr (1993) Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases, *Annu Rev Biochem*, **62**:715-748
25. Cheng X, Lin S, Shi J et Wang Y (1991) Arginyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* affinity labeling with 3'-oxidized tRNA(Arg), *Science in China*, **34**:293-305
26. Crothers DM, Seno T et Söll DG (1972) Is there a discriminator site in transfer RNA?, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**:3063-3067
27. Cudny H et Deutscher MP (1986) High-level overexpression, rapid purification, and properties of *Escherichia coli* tRNA nucleotidyltransferase, *J Biol Chem*, **261**:6450-6453

28. Deutch CE, Scarpulla RC et Soffer RL (1978) Posttranslational NH₂-terminal aminoacylation, *Curr Top Cell Regul*, **13**:1-28
29. Devereux J, Haerberli P et Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX, *Nucleic Acids Res*, **12**:387-395
30. Doublet S, Bricogne G, Gilmore C et Carter CW Jr (1995) Tryptophanyl-tRNA synthetase crystal structure reveals an unexpected homology to tyrosyl-tRNA synthetase, *Structure*, **3**:17-31
31. Droogmans L, Haumont E, de Henau S et Grosjean H (1986) Enzymatic 2'-O-methylation of the wobble nucleoside of eukaryotic tRNA^{Phe}: specificity depends on structural elements outside the anticodon loop, *EMBO J*, **5**:1105-1109
32. Edman P (1970) Sequence determination, *Mol Biol Biochem Biophys*, **8**:211-255
33. Eisinger J and Gross N, (1975) Conformers, dimers, and anticodon complexes of tRNA^{Glu2} (*Escherichia coli*), *Biochemistry*, **14**:4031-4041
34. Elliott MS et Trewyn RW (1984) Inosine biosynthesis in transfer RNA by an enzymatic insertion of hypoxanthine, *J Biol Chem*, **259**:2407-2410
35. 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
36. Farr SB, Arnosti DN, Chamberlin MJ et Ames BN (1989) An *apaH* mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**:5010-5014

37. Fayat G, Hountondji C, et Blanquet S (1979) Methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* Inactivation and labeling by periodate-treated initiator tRNA, *Eur J Biochem*, **96**:87-92
38. Fersht AR (1979) dans: *Transfert RNA: Structure, Properties, and Recognition*, Schimmel P, Söll D et Abelson JN (Eds), Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 247
39. Fersht AR, Knill-Jones JW, Bedouelle H et Winter G (1988) Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: a mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism, *Biochemistry*, **27**:1581-1587
40. Fitzgerald MC et Smith LM (1995) Mass spectrometry of nucleic acids: the promise of matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **24**:117-140
41. Forchhammer K, Leinfelder W et Böck A (1989) Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein, *Nature*, **342**:453-456
42. Freist W (1989) Mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases: a critical consideration of recent results, *Biochemistry*, **28**:6787-95
43. Freist W, Gauss DH, Söll D et Lapointe J (1997) Glutamyl-tRNA synthetase, *Biol Chem*, **378**:1313-1329
44. Fresco JR, Adams A, Ascione R, Henley D et Lindahl (1966) Tertiary structure in transfer ribonucleic acids, *Cold Spr Harb Symp Quant Biol* **31**:527

45. Gendron N, Breton R, Champagne N et Lapointe J (1992) Adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis* regulates the activity of the glutamyl-tRNA synthetase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**:5389-5392
46. Giegé R, Frugier M et Rudinger J (1998) tRNA mimics, *Curr Opin Struct Biol*, **8**: 286-293
47. Glaser P, Kunst F, Debarbouille M, Vertes A, Danchin A et Dedonder R (1991) A gene encoding a tyrosine tRNA synthetase is located near *sacS* in *Bacillus subtilis*, *DNA Seq*; **1**:251-261
48. Gould RM, Thornton MP, Liepkalns V et Lennarz WJ (1968) Participation of aminoacyl transfer ribonucleic acid in aminoacyl phosphatidylglycerol synthesis II Specificity of alanyl phosphatidylglycerol synthetase, *J Biol Chem*, **243**:3096-3104
49. Green CJ, Kammen HO et Penhoet EE (1982) Purification and properties of a mammalian tRNA pseudouridine synthase, *J Biol Chem*, **257**:3045-3052
50. Grosjean H, Sprinzl M et Steinberg S (1995) Posttranscriptionally modified nucleosides in transfer RNA: their locations and frequencies, *Biochimie*, **77**:139-141
51. Hankins WD et Farkas WR (1970) Guanylation of transfer RNA by rabbit reticulocytes, *Biochim Biophys Acta*, **213**:77-89
52. Hecht S (1979) Dans: *Transfert-RNA structure, properties and recognition*, Schimmel PR, Söll D et Abelson JN (Eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp 345-360
53. Helm M, Brule H, Degoul F, Capanec C, Leroux JP, Giegé R et Florentz C (1998) The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA *Nucleic Acids Res*, **26**:1636-1643

54. Henkin TM, Glass BL et Grundy FJ (1992) Analysis of the *Bacillus subtilis tyrS* gene: conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase genes, *J Bacteriol*, **174**:1299-1306
55. Hilbers CW et Shulman RG (1974) Assignment of the hydrogen bonded proton resonances in (*Escherichia coli*) tRNA^{Glu} by sequential melting, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**:3239-3242
56. Hill K et Schimmel P (1989) Evidence that the 3' end of a tRNA binds to a site in the adenylate synthesis domain of an aminoacyl-tRNA synthetase, *Biochemistry*, **28**,2577-2586
57. Hou YM, Lipman RS et Zarutskie JA (1998) A tRNA circularization assay: evidence for the variation of the conformation of the CCA end, *RNA*, **7**:733-738
58. Hountondji C, Blanquet S et Lederer F (1985) Methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: primary structure at the binding site for the 3'-end of tRNA^{tMet}, *Biochemistry*, **24**:1175-1180
59. Hountondji C, Dessen P et Blanquet S (1986) Sequence similarities among the family of aminoacyl-tRNA synthetases, *Biochimie*, **68**:1071-1078
60. Hountondji C, Lederer F, Dessen P et Blanquet S (1986) *Escherichia coli* tyrosyl- and methionyl-tRNA synthetases display sequence similarity at the binding site for the 3'-end of tRNA, *Biochemistry*, **25**:16-21
61. Hountondji C, Schmitter JM, Beauvallet C et Blanquet S (1987) Affinity labeling of *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase at the binding site for tRNA^{Phe}, *Biochemistry*, **26**:5433-5439

62. Ibba M, Morgan S, Curnow AW, Pridmore DR, Vothknecht UC, Gardner W, Lin W, Woese CR, Söll D (1997) A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases, *Science*, **278**:1119-1122
63. Ishida T, Snyder D et Sueoka N (1971) The interconvertibility of various bacterial transfer ribonucleic acids between an active and an inactive stable configuration, *J Biol Chem*, **57**:1684
64. Jukes TH et Osawa S (1990) The genetic code in mitochondria and chloroplasts, *Experientia*, **46**:1117-1126
65. Kawasaki T, Ikeda K, Takahashi S et Kuboki Y (1986) Further study of hydroxylapatite high performance liquid chromatography using both proteins and nucleic acids, and a new technique to improve chromatographic efficiency, *Eur J Biochem*, **155**:249-257
66. Keith G (1995) Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer chromatography, *Biochimie*, **77**:142-144
67. Keith G, Pixa G, Fix C et Dirheimer G (1983) Primary structure of three tRNAs from brewer's yeast: tRNA^{Pro2}, tRNA^{His1} and tRNA^{His2}, *Biochimie*, **65**:661-672
68. Kern D et Lapointe J (1979) Glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli* Study of the interactions with its substrates, *Biochemistry*, **18**:5809-5818
69. Kern D et Lapointe J (1979b) Glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli* Effect of alteration of the 5-(methylaminomethyl)-2-thiouridine in the anticodon of glutamic acid transfer ribonucleic acid on the catalytic mechanism, *Biochemistry*, **18**:5819-5826

70. Kern D et Lapointe J (1980a) The catalytic mechanism of glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* Evidence for a two-step aminoacylation pathway, and study of the reactivity of the intermediate complex, *Eur J Biochem*, **106**:137-150
71. Kern D et Lapointe J (1980b) Catalytic mechanism of glutamyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* Reaction pathway in the aminoacylation of tRNA^{Glu}, *Biochemistry*, **13**:3060-3068
72. Kern D et Lapointe J (1980c) The catalytic mechanism of the glutamyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* Detection of an intermediate complex in which glutamate is activated, *J Biol Chem*, **255**:1956-1961
73. Kern D et Lapointe J (1981) The catalytic mechanism of glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* A steady-state kinetic investigation, *Eur J Biochem*, **115**:29-38
74. Kern D, Potier S, Boulanger Y et Lapointe J The monomeric glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* Purification and relation between its structural and catalytic properties, *J Biol Chem*, **254**:518-524
75. Kim SH et Quigley GJ (1979) Determination of a transfer RNA structure by crystallographic method, *Methods Enzymol*, **59**:3-21
76. Kim SH, Quigley GJ, Suddath FL, McPherson A, Sneden D, Kim JJ, Weinzierl J et Rich A (1973) Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain, *Science*, **179**:285-288
77. Kim SH, Suddath FL, Quigley GJ, McPherson A, Sussman JL, Wang AHJ, Seeman NC et Rich, A (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA, *Science* **185**,435-440

78. Komine Y, Adachi T, Inokuchi H et Ozeki H (1990) Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12, *J Mol Biol*, **212**:579-598
79. Krzyzosiak WJ, Marciniec T, Wiewiorowski M, Romby P, Ebel JP et Giege R (1988) Characterization of the lead(II)-induced cleavages in tRNAs in solution and effect of the Y-base removal in yeast tRNA^{Phe}, *Biochemistry*, **27**:5771-5777
80. Laberge S, Belair M, Verreault A, Bell AW, Bordeleau LM et Lapointe J (1989a) Purification and partial amino acid sequence of a glutamyl-tRNA synthetase from *Rhizobium meliloti*, *Biochem Cell Biol*, (1989a) **67**:674-679
81. Laberge S, Gagnon Y, Bordeleau LM et Lapointe J (1989b) Cloning and sequencing of the *gltX* gene, encoding the glutamyl-tRNA synthetase of *Rhizobium meliloti* A2, *J Bacteriol*, **171**:3926-3932
82. Ladner JE, Jack A, Robertus JD, Brown RS, Rhodes D, Clark BF et Klug A (1975) Structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 25 Å resolution, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**:4414-4418
83. Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**:680-685
84. Lapointe J (1972) PhD thesis , Université de Yale
85. Lapointe J et Delcuve G (1975) Thermosensitive mutants of *Escherichia coli* K-12 altered in the catalytic Subunit and in a Regulatory factor of the glutamy-transfer ribonucleic acid synthetase, *J Bacteriol*, **122**:352-358
86. Lapointe J et Geigé R (1991), dans *Translation in Eukaryotes*, H Trachsel, ed, pp 35-69

87. Lapointe J et Söll D (1972a) Glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli* I Purification and properties, *J Biol Chem*, **247**:4966-4974
88. Lapointe J et Söll D (1972b) Glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli* II Interaction with intact glutamyl transfer ribonucleic acid, *J Biol Chem*, **247**:4975-4981
89. Lapointe J et Söll D (1972c) Glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli* 3 Influence of the 46K protein on the affinity of the 56K glutamyl transfer ribonucleic acid synthetase for its substrates, *J Biol Chem*, **247**:4982-4985
90. Lapointe J, Delcuve G et Duplain L (1975) Derepressed levels of glutamate synthase and glutamine synthetase in *Escherichia coli* mutants altered in glutamyl-transfer ribonucleic acid synthetase, *J Bacteriol*, **123**:843-850
91. Lapointe J, Duplain L et Proulx M (1986) A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNA^{Glu} and tRNA^{Gln} in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNA^{Gln1} *in vitro*, *J Bacteriol*, **165**:88-93
92. Lapointe J, Levasseur S and Kern D (1985) in *Methods in Enzymology*, Vol **113**, Academic Press inc, pp 42-49
93. Leatherbarrow RJ, Fersht AR et Winter G (1985) Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**:7840-7844
94. Lech K et Brent R (1997) dans *Current protocols in molecular biology*, Ausubel *et al*, Eds, John Wiley & Sons Inc, pp 112

95. Leinfelder W, Stadtman TC et Böck A (1989) Occurrence *in vivo* of selenocysteyl-tRNA(SERUCA) in *Escherichia coli* Effect of sel mutations, *J Biol Chem*, **264**:9720-9723
96. Leinfelder W, Zehelein E, Mandrand-Berthelot MA et Böck A (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine, *Nature*, **331**:723-725
97. Leveque F, Plateau P, Dessen P et Blanquet S (1990) Homology of *lysS* and *lysU*, the two *Escherichia coli* genes encoding distinct lysyl-tRNA synthetase species, *Nucleic Acids Res*, **18**:305-312
98. Li M et Tzagoloff A (1979) Assembly of the mitochondrial membrane system: sequences of yeast mitochondrial valine and an unusual threonine tRNA gene, *Cell*, **18**:47-53
99. Lin SX, Brisson A, Liu J, Roy PH et Lapointe J (1992) Higher specific activity of the *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase purified to homogeneity by a six-hour procedure, *Protein Expr Purif*, **3**:71-74
100. Liu J, Gagnon Y, Gauthier J, Furenlid L, L'Heureux PJ, Auger M, Nureki O, Yokoyama S et Lapointe J (1995) The zinc-binding site of *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase is located in the acceptor-binding domain Studies by extended x-ray absorption fine structure, molecular modeling, and site-directed mutagenesis, *J Biol Chem*, **270**:15162-15169
101. Liu J, Lin SX, Blochet JE, Pezolet M et Lapointe J (1993) The glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* contains one atom of zinc essential for its native conformation and its catalytic activity, *Biochemistry*, **32**:11390-11396

102. Logan DT, Mazauric MH, Kern D et Moras D (1995) Crystal structure of glycyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*, *EMBO J*, **14**:4156-4167
103. Martin NC et Rabinowitz M (1978) Mitochondrial transfer RNAs in yeast: identification of isoaccepting transfer RNAs, *Biochemistry*, **17**:1628-1634
104. Martinson HG (1973) The basis of fractionation of single-stranded nucleic acids on hydroxylapatite, *Biochemistry*, **12**:2731-2736
105. McClain WH (1995) The tRNA identity problem: past, present and future dans *tRNA structure, biosynthesis and function* D Söll and UL RajBhandary, eds ASM Press pp 335-347
106. McIntosh AR, Caron M et Dugas H (1973) A specific spin labeling of the anticodon of *E coli* tRNA-Glu, *Biochem Biophys Res Commun*, **55**:1356-1363
107. McLaughlin LW et Bischoff R (1987) Resolution of RNA using high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr*, **418**:51-72
108. Meinnel T, Mechulam Y, et Blanquet S (1995) in *tRNA , Structure, Biosynthesis and Function* eds Söll, D, and RajBhandary, UL (ASM), pp251-292
109. Metzger AU, Heckl M, Willbold D, Breitschopf K, RajBhandary UL, Rosch P et Gross HJ (1997) Structural studies on tRNA acceptor stem microhelices: exchange of the discriminator base A73 for G in human tRNA^{Leu} switches the acceptor specificity from leucine to serine possibly by decreasing the stability of the terminal G1-C72 base pair, *Nucleic Acids Res*, **25**:4551-4556
110. Moras D (1992) Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases, *Trends Biochem Sci*, **17**:159-164

111. Moras D, Comarmond MB, Fisher J, Weiss R, Thierry JC, Ebel JP et Giegé R (1980) Crystal structure of yeast tRNA^{Asp}, *Nature*, **288**:669-674
112. Morgan EA, Ikemura T et Nomura M (1977) Identification of spacer tRNA genes in individual ribosomal RNA transcription units of *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**:2710-2714
113. Mosyak L, Reshetnikova L, Goldgur Y, Delarue M et Safro MG (1995) Structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*, *Nat Struct Biol*, **2**:537-547
114. Mueller JE, Smith D, Bryk M et Belfort M (1995) Intron-encoded endonuclease I-TevI binds as a monomer to effect sequential cleavage via conformational changes in the td homing site, *EMBO*, **22**:5724-5735
115. Muramatsu T, Nishikawa K, Nemoto F, Kuchino Y, Nishimura S, Miyazawa T et Yokoyama S (1988) Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification, *Nature*, **336**:179-181
116. Neihardt FC, Parker J et McKeever WG (1975) Function and regulation of aminoacyl-tRNA synthetases in prokaryotic and eukaryotic cells, *Annu Rev Microbiol*, **29**:215-250
117. Nishimura S (1971) dans *Procedures in Nucleic Acid Research*, GL Cantoni and DR Davies eds (New York : Harper and Row), Vol 2, pp 542-564
118. Normanly J et Abelson J (1989) tRNA identity, *Annu Rev Biochem*, **58**:1029-1049
119. Nureki O, Suzuki K, Hara-Yokoyama M, Kohno T, Matsuzawa H, Ohta T, Shimizu T, Morikawa K, Miyazawa T et Yokoyama S (1992) Glutamyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* HB8 Molecular cloning of the *gltX* gene and crystallization of the overproduced protein, *Eur J Biochem*, **204**:465-472

120. Nureki O, Vassylyev DG, Katayanagi K, Shimizu T, Sekine S, Kigawa T, Miyazawa T, Yokoyama S et Morikawa, K (1995) Architectures of class-defining and specific domains of glutamyl-tRNA synthetase, *Science*, **267**:1958-1965
121. Ny T et Björk GR (1980a) Growth rate-dependent regulation of transfer ribonucleic acid (5-methyluridine) methyltransferase in *Escherichia coli* B/r, *J Bacteriol*, **141**:67-73
122. Ny T, Thomale J, Hjalmarsson K, Nass G et Björk GR (1980b) Non-coordinate regulation of enzymes involved in transfer RNA metabolism in *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta*, **607**:277-284
123. Onesti S, Miller AD et Brick P (1995) The crystal structure of the lysyl-tRNA synthetase (LysU) from *Escherichia coli*, *Structure*, **3**:163-176
124. Oxender DL, Lee M, Moore PA et Cecchini G (1977) Neutral amino acid transport systems of tissue culture cells, *J Biol Chem*, **252**:2675-2679
125. Parker J (1989) Errors and alternatives in reading the universal genetic code, *Microbiol Rev*, **53**:273-298
126. Peattie DA et Gilbert W (1980) Chemical probes for higher-order structure in RNA, *Prot Nat Acad Sci USA*, **77**: 4079-4082
127. Perona JJ, Rould MA et Steitz TA (1993) Structural basis for transfer RNA aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase, *Biochemistry*, **32**:8758-8771
128. Perona JP, Swanson R, Steitz TA et Söll D (1988) Overproduction and purification of *Escherichia coli* tRNA(2Gln) and its use in crystallization of the glutamyl-tRNA synthetase-tRNA(Gln) complex, *J Mol Biol*, **202**:121-126

129. Persson BC (1993) Modification of tRNA as a regulatory device, *Mol microbiol*, **8**:1011-1016
130. Plateau P et Blanquet S (1992) Synthesis of N_pN' ($n=3$ ou 4) *in vitro* and *in vivo*, in A G McLennan (ed), *and Other Dinucleoside Polyphosphates* CRC Press Inc, London, pp 63-79
131. Powers DM et Ginsburg A (1978) Monomeric structure of glutamyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*, *Arch Biochem Biophys*, **191**:673-679
132. Proulx M, Duplain L, Lacoste L, Yaguchi M et Lapointe J (1983) The monomeric glutamyl-tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* 168 and its regulatory factor Their purification, characterization, and the study of their interaction, *J Biol Chem*, **258**:753-759
133. Puglisi EV, Puglisi JD, Williamson JR et RajBhandary UL (1994) NMR analysis of tRNA acceptor stem microhelices: discriminator base change affects tRNA conformation at the 3' end, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**:11467-11471
134. Putzer H, Gendron N et Grunberg-Manago M (1992) Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence, *EMBO J*, **11**:3117-3127
135. Ramos A et Varani G (1997) Structure of the acceptor stem of *Escherichia coli* tRNA Ala: role of the G3U70 base pair in synthetase recognition, *Nucleic Acids Res*, **25**:2083-2090
136. Ravel JM, Wang S-F, Heinemeyer C et Shive W (1965) Glutamyl and glutaminyl ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli* W, *J Biol Chem*, **240**:432-438

137. Rees B, Cavarelli J et Moras D (1996) Conformational flexibility of tRNA: structural changes in yeast tRNA(Asp) upon binding to aspartyl-tRNA synthetase, *Biochimie*, **78**:624-631
138. Renaud M, Fasiolo F, Baltzinger M, Boulanger Y et Remy P (1982) Affinity labelling of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase with a 3'-oxidised tRNA^{Phe} Isolation and sequence of the labelled peptide, *Eur J Biochem*, **123**:267-274
139. Rich A et RajBhandary UL (1976) Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties, *Annu Rev Biochem*, **45**:805-860
140. Risler JL, Zelwer C et Brunie S (1981) Methionyl-tRNA synthetase shows the nucleotide binding fold observed in dehydrogenases, *Nature*, **292**:384-386
141. Robertus JD, Ladner JE, Finch JT, Rhodes D, Brown RS, Clark BFC et Klug A (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution, *Nature*, **250**:546-551
142. Rogers KC, Crescenzo AT et Söll D (1995) Aminoacylation of transfer RNAs with 2-thiouridine derivatives in the wobble position of the anticodon, *Biochimie*, **77**:66-74
143. Romby P, Moras D, Bergdoll M, Dumas P, Vlassov VV, Westhof E, Ebel JP et Giegé R (1985) Yeast tRNA^{Asp} tertiary structure in solution and areas of interaction of the tRNA with aspartyl-tRNA synthetase A comparative study of the yeast phenylalanine system by phosphate alkylation experiments with ethylnitrosourea, *J Mol Biol*, **184**:455-471
144. Romby P, Moras D, Dumas P, Ebel JP et Giegé R (1987) Comparison of the tertiary structure of yeast tRNA(Asp) and tRNA(Phe) in solution Chemical modification study of the bases, *J Mol Biol*, **195**:193-204

145. Rordorf BF et Kearns DR (1976) Nuclear magnetic resonance investigation of the base-pairing structure of *Escherichia coli* tRNA^{Tyr} monomer and dimer conformations, *Biochemistry*, **15**:3320-3330
146. Rossman MG, Moras D et Olsen KW (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein, *Nature*, **250**:194-199
147. Roth JR, Silbert DF, Fink GR, Voll MJ, Anton D, Hartman PE et Ames BN (1966) Transfer RNA and the control of the histidine operon, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **31**:383-392
148. Rould M, Perona J, Söll D et Steitz T (1989) Structure of *E coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP at 28 Å resolution, *Science*, **246**:1135-1142
149. Ruff, M, Krishnaswamy, S, Boeglin, M, Poterszman, A, Mitschler, A, Podjarny, A, Rees, B, Thierry, JC, and Moras, D (1991) Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp), *Science*, **252**:1682-1689
150. Sanni A, Hountondji C, Blanquet S, Ebel JP, Boulanger Y et Fasiolo F (1991) Interaction of the tRNA(Phe) acceptor end with the synthetase involves a sequence common to yeast and *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetases, *Biochemistry*, **30**:2448-2453
151. Schon A, Kannangara CG, Gough S et Söll D (1988) Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA, *Nature*, **331**:187-190

152. Schon A, Krupp G, Gough S, Berry-Lowe S, Kannangara CG et Söll D (1986) The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA, *Nature*, **322**:281-284
153. Schulman RG, Hilbers CW, Söll D et Yang SK (1974) Letter: Nuclear magnetic resonance of protein-nucleic acid interactions II The *E coli* tRNA-Glu complex with glutamyl-tRNA synthetase, *J Mol Biol*, **90**:609-611
154. Sekine S, Nureki O, Sakamoto K, Niimi T, Tateno M, Go M, Kohno T, Brisson A, Lapointe J et Yokoyama S (1996) Major identity determinants in the "augmented D helix" of tRNA(Glu) from *Escherichia coli*, *J Mol Biol*, **256**:685-700
155. Sherman JM, Rogers K, Rogers MJ et Söll D (1992) Synthetase competition and tRNA context determine the *in vivo* identify of tRNA discriminator mutants, *J Mol Biol*, **228**:1055-1062
156. Silberklang M, Gillum AM et RajBhandary UL (1979), dans: *Methods in enzymology*, vol LIX, Academic Press inc, pp 58-109
157. Silberklang M, Prochiantz A, Haenni AL et Rajbhandary UL (1977) Studies on the sequence of the 3'-terminal region of turnip-yellow-mosaic-virus RNA, *Eur J Biochem*, **72**:465-478
158. Singer CE, Smith GR, Cortese R et Ames BN (1972) Mutant tRNA His ineffective in repression and lacking two pseudouridine modifications, *Nat New Biol*, **238**:72-74
159. Singhal RP (1971) Modification of *Escherichia coli* glutamate transfer ribonucleic acid with bisulfite, *J Biol Chem*, **246**:5848-5851
160. Söll D et Schimmel PR (1974) Aminoacyl tRNA synthetase dans: *Enzymes*, Vol X, 3^e éd, PD Boyer, ed (New York,London:Academic-Press), pp 489-538

161. Sprinzl M, Horn C, Brown M, Ioudovitch A et Steinberg S (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes, *Nucleic Acids Res*, **26**:148-153
162. Streitwieser A et Heathcock C (1985) *Introduction to organic chemistry*, 3^e édition, MacMillan Publishing Co, pp 384-385
163. Suddath FL, Quigley GJ, McPherson A, Sneden D, Kim JJ, Kim SH et Rich A (1974) Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 3.0 angstroms resolution, *Nature*, **248**:20-24
164. Sylvers LA, Rogers KC, Shimizu M, Ohtsuka E et Söll D (1993) A 2-thiouridine derivative in tRNA^{Glu} is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase, *Biochemistry*, **32**:3836-3841
165. Tateno M, Nureki O, Sekine S, Kaneda K, Go M et Yokoyama S (1995) A three-dimensional structure model of the complex of glutamyl-tRNA synthetase and its cognate tRNA, *FEBS Lett*, **377**:77-81
166. Thomas G, Thiam K et Favre (1981) A tRNA thiolated pyrimidines as targets for near-ultraviolet-induced synthesis of guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli*, *Eur J Biochem*, **119**:381-387
167. Tremblay TL et Lapointe J (1986) The so-called tRNA^{Glu1} of *Escherichia coli* is a denatured form of the major isoacceptor tRNA^{Glu}, *Biochem Cell Biol*, **64**:315-321
168. Tzagoloff A, Gatti D et Gampel A (1990) Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **39**:129-158
169. Varshavsky A (1983) Diadenosine 5', 5'''-P1, P4-tetraphosphate: a pleiotropically acting alarmone?, *Cell*, **34**:711-712

170. Vlassov VV, Giege R et Ebel JP (1981) Tertiary structure of tRNAs in solution monitored by phosphodiester modification with ethylnitrosourea, *Eur J Biochem*, **119**:51-59
171. von Ehrenstein G (1967) dans: *Methods in enzymology*, vol **XII** part a, pp 588-596
172. Walter AE, Turner DH, Kim J, Lyttle MH, Muller P, Mathews DH et Zuker M, (1994) Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**:9218-9222
173. Wataya Y, Iida S, Kudo U, Ohashi Z, Nishimura S, Suga K, Takagi H, Yokoshima T et Hayatsu H (1976) Conformation of *Escherichia coli* glutamic acid tRNA II as studied by hydrogen-tritium exchange catalyzed by cysteine methyl ester, *Eur J Biochem*, **64**:27-34
174. Webster T, Tsai H, Kula M, Mackie GA et Schimmel P (1984) Specific sequence homology and three-dimensional structure of an aminoacyl transfer RNA synthetase, *Science*, **226**:1315-1317
175. Wells, TNC and Fersht AR (1985) *Nature* **316**:656-657
176. Westhof E, Dumas P et Moras D (1985) Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA, *J Mol Biol*, **184**:119-145
177. Wilcox M et Nirenberg M (1968) Transfert RNA as a cofactor coupling aminoacid synthesis with that of protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, **61**:229-236
178. Willick GE et Kay CM (1976) Circular dichroism study of the interaction of glutamyl-tRNA synthetase with tRNA^{Glu2}, *Biochemistry*, **15**:4347-4352
179. Woo NH, Roe BA et Rich A (1980) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* initiator tRNA^{fMet} *Nature*, **286**:346-351

180. Wrede P, Wurst R, Vournakis J et Rich A (1979) Conformational changes of yeast tRNA^{Phe} and *E coli* tRNA^{2Glu} as indicated by different nuclease digestion patterns, *J Biol Chem*, **254**:9608-9616
181. Yokoyama S et Nishimura S (1995) dans *tRNA , Structure, Biosynthesis and Function* eds Söll, D, and RajBhandary, UL (ASM), pp207-233
182. Zamecnik P (1983) Diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate (Ap4A): its role in cellular metabolism, *Anal Biochem*, **134**:1-10
183. Zelwer C, Risler JL et Brunie S (1982) Crystal structure of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase at 25 Å resolution, *J Mol Biol*, **155**:63-81