

Habib DERBALI

**La caractérisation de l'amidotransférase ARNt-dépendante
(AdT) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biochimie
pour l'obtention du grade de Maître ès Science (M.Sc.)

Département de Biochimie et de Microbiologie
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL

2008

Résumé

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) jouent un rôle essentiel dans la synthèse des protéines. Ces enzymes lient un acide aminé particulier sur un ARNt correspondant. Cependant, il y a deux types d'aaRS : des aaRS discriminantes (aaRS-D) et des aaRS non discriminantes (aaRS-ND). Chez certaines bactéries, une aaRS-ND charge deux types d'ARNts.

L'AspRS-ND et l'AdT de *P. aeruginosa* ont été surproduites et purifiées. L'AspRS-ND a servi pour la synthèse d'Asp-ARNt^{Asn}, un des substrats de l'AdT; une valeur de $0.93 \mu\text{M}$ a été obtenue pour la K_m de l'AdT pour ce substrat et une k_{cat} de 0.8 s^{-1} . Ensuite, nous avons montré que l'aspartycine et la glutamycine, deux analogues des substrats Asp-ARNt^{Asn} et Glu-ARNt^{Gln}, sont des inhibiteurs compétitifs de l'AdT par rapport à l'Asp-ARNt^{Asn} avec des K_{ic} de 125 et $50 \mu\text{M}$, respectivement. Enfin, une sulfone analogue d'un intermédiaire de la réaction de transamidation est un inhibiteur compétitif de l'AdT avec une K_{ic} de $65 \mu\text{M}$.

Avant Propos

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur **Jacques Lapointe** pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au sein de son laboratoire. Je voudrais également le remercier pour avoir dirigé ce travail et pour avoir pris le temps de corriger ce mémoire. Je le remercie pour sa disponibilité, son écoute et ses nombreux conseils. J'ai apprécié ses remarques constructives ainsi que son enthousiasme qui ont constitué un précieux soutien tout au long de ma maîtrise

Mes remerciements vont également aux Professeurs **Paul H. Roy, Robert Chênevert et Manon Couture** pour avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire.

J'exprime aussi mes plus sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire : au Dr. **Pierre-Marie Akochy et Sébastien Blais** pour ses conseils et son aide pendant la période de ma maîtrise. Je remercie **Jonathan Huot, Charlotte Habbeger-Polomat, Olivier Fisette, Dominique Bernard** de ses soutien et conseils. Mes remerciements vont aussi aux étudiants de département de biochimie et microbiologie et les personnels.

Je me dois remercier l'organisme subventionnaire **CREFSIP** qui a rendu possible ces années de recherche par le soutien financière.

Merçi à mes parents, mes frères, mes sœurs, mes cousins et mes amis de m'avoir encouragé et soutenu dès le jeune âge.

Enfin, à toutes les personnes qui m'ont permis d'en arriver là, à toutes celles qui m'ont écoutée, soutenue et remonté le moral, merçi.

Table des matières

Résumé	II
Avant propos	III
Table des matières	IV
Liste des tableaux	X
Liste des figures	XI
Liste des abréviations	XIV
1 Introduction	1
1.1 La biosynthèse des protéines	1
1.2 Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS)	2
1.3 Structure de l'ARN de transfert	5
1.4 L'aminocyclation des ARNt	7
1.4.1 La voie directe	7
1.4.2 La voie indirecte	8
1.4.2.1 La synthèse de Gln-ARNt ^{Gln}	10
1.4.2.2 La synthèse d'Asn-ARNt ^{Asn}	11
1.4.2.3 La synthèse de Cys-ARNt ^{Cys}	12
1.5 Les amidotransferases ARNt-dépendantes (AdT)	13

1.5.1 L'AdT hétérodimérique	14
1.5.2 L'AdT hétérotrimérique	16
1.5.3 Les réactions catalysées par l'AdT hétérotrimérique	18
1.5.3.1 La réaction glutaminase	18
1.5.3.2 La réaction ATPase	18
1.5.3.3 La réaction transamidase	18
1.6 Les éléments d'identités de l'ARNt ^{Gln} et l'ARNt ^{Asn}	19
1.7 Les types d'inhibition.	20
1.7.1 Inhibition compétitive	21
1.6.2 Inhibition non-compétitive	21
1.7.3 Inhibition incompétitive	21
1.7.4 Inhibition irréversible	22
1.6.5 Inhibition par excès de substrat	22
1.8 Les inhibiteurs de l'AdT	22
1.8.1 Les analogues de l'ATP	22
1.8.2 Un analogue de la glutamine	24
1.7.3 Les analogues de l'aa-ARNt	24
2 Motivations et objectif	26
2.1 Motivations	26

2.2 Objectif	26
3 Méthodologie	27
3.1 Stratégie de surexpression de l'AdT de <i>P. aeruginosa</i> chez <i>E. coli</i> ..27	
3.1.1 Isolation du plasmide pUCPSK/ <i>gatBCA</i>	27
3.1.2 Migration des acides nucléiques sur gel d'agarose	27
3.1.3 Transformation des cellules compétentes de <i>E. coli</i> par le plasmide pUCPSK/ <i>gatBCA</i>	27
3.1.4 Clonage et surexpression de <i>gatCAB</i> de <i>P. aeruginosa</i> chez <i>E. coli</i>	28
3.2 Stratégie de surexpression de l'ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i> chez <i>E. coli</i>	29
3.2.1 Clonage du gène de l'ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i>	29
3.2.2 Surexpression de l'ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i> chez <i>E. coli</i>	30
3.3 Préparation de l'ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i> surexprimé chez <i>E.</i> <i>coli</i>	30
3.3.1 Purification de l'ARNt total	30
3.3.2 Activation des ARNt	31
3.3.3 Mesure de la concentration de l'ARNt	32
3.3.4 La conservation des ARNt	32
3.4 Purification des protéines	32

3.4.1	Culture cellulaire	32
3.4.2	Lyse cellulaire	32
3.4.3	Purification des protéines surproduites, par chromatographie sur une colonne de Ni-NTA	33
3.4.4	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)	34
3.4.5	Purification par filtration sur gel d'une colonne "Superdex 200" à l'aide d'un appareil FPLC d'une fraction de protéines purifiées par chromatographie d'affinité	34
3.4.6	La concentration et la conservation des protéines	35
3.5	Préparation de l'Asp-ARNt ^{Asn}	35
3.6	Transamidation de l'Asp-ARNt ^{Asn}	35
3.7	Mesure de l'inhibition de l'AdT par des analogues d'aa-ARNt	36
4	Résultats et discussions	37
4.1	Purification de l'ARNt total enrichi en ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i> surproduit chez <i>E. coli</i>	37
4.2	Purification de l'AspRS-ND de <i>P. aeruginosa</i>	38
4.3	L'aminocacylation de l'ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i>	40
4.4	La demi-vie de l'Asp-ARNt ^{Asn}	41

4.5	Surproduction de l'AdT de <i>P. aeruginosa</i>	42
4.6	Purification de l'AdT de <i>P. aeruginosa</i>	42
4.7	Caractérisation de l'AdT de <i>P. aeruginosa</i>	44
4.7.1	Test d'activité de l'AdT	44
4.7.2	Influence de l'AspRS-ND sur la stabilité de l'Asp-ARNt ^{Asn}	46
4.7.3	Les constantes cinétiques de l'AdT	48
4.7.3.1	Mesure de la K_m pour l'Asp-ARNt	49
4.7.3.2	Mesure de la V_m pour l'Asp-ARNt	49
4.7.3.3	Mesure de la k_{cat}	49
4.8	Les inhibiteurs de l'AdT	51
4.8.1	La glutamycine	53
4.8.2	L'aspartycine	54
4.8.3	La sulfone (PAN-Met)	55
5	Discussion générale et conclusions	56
5.1	La surexpression de l'ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i> chez <i>E. coli</i> , et sa purification	56
5.2	La détermination de la demi-vie de l'Asp-ARNt ^{Asn} et de l'Asn-ARNt ^{Asn}	57
5.3	La purification de l'AspRS-ND et de l'AdT de <i>P. aeruginosa</i>	57

5.4 Les constantes cinétiques de l'AdT	58
5.5 Les constantes d'inhibitions de l'AdT par certains analogues d'aa- ARnt	59
6 Perspectives	60
7 Références	61

Liste des tableaux

Tableau 1 : Code génétique	1
Tableau 2 : Répartition des aaRS de classe I et classe II selon la présence ou l'absence de trois motifs (Eriani et al., 1990)	2
Tableau 3 : Les aaRS de classes I et II	4
Tableau 4 : Classification des bactéries selon la présence ou l'absence de GlnRS, AsnRS ou de l'AdT dans leurs génomes	13
Tableau 5 : Activation et/ou inhibition de l'AdT de <i>S. pyogenes</i> par des analogues de l'ATP	22
Tableau 6 : Comparaison des constantes cinétiques de l'AdT de <i>H. pylori</i> et de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	57
Tableau 7 : Les constantes d'inhibition K_{ic} des analogues d'Asp-ARNt ^{Asn} pour l'AdT de <i>H. pylori</i> et l'AdT de <i>P. aeruginosa</i>	58

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes étapes de l'origine de la vie aux trois règnes du vivant	3
Figure 2 : Structure des ARNts cytoplasmiques qui participent à la synthèse des protéines	6
Figure 3 : Différents circuits pour les aminoacyl-ARNt chez les eubactéries	9
Figure 4 : La biosynthèse de Gln-ARNt ^{Gln} par la voie indirecte	11
Figure 5 : La biosynthèse de l'Asn-ARNt ^{Asn} par la voie indirecte	12
Figure 6 : La biosynthèse de la Cys-ARNt ^{Cys} par la voie indirecte	12
Figure 7 : Structure cristallisée de l'AdT hétérodimérique de <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> en liaison avec l'ARNt ^{Gln}	15
Figure 8 : Structure cristallisée de l'AdT hétérotrimérique de <i>Staphylococcus aureus</i> en liaison avec le Gln, Mg ⁺⁺ et un analogue de l'ATP (ADP- AlF ₄).....	17
Figure 9 : Les différentes réactions catalysées par les sous-unités de l'AdT hétérotrimérique	18
Figure 10 : Structures secondaires de l'ARNt ^{Gln} et de l'ARNt ^{Asn} des bactéries, et leurs éléments d'identités pour l'AdT (carrés rouges)	20
Figure 11 : Structure de l'ATP-γS	23

Figure 12 : Structure de l'acide γ -Glu boronique	23
Figure 13 : Structure de la glutamycine (A), l'aspartycine (B), le Glu-ARNt (C) et l'Asp-ARNt (D)	24
Figure 14 : Le plasmide pUCPSK/ <i>gatBCA</i>	28
Figure 15 : Structure d'une colonne de Ni-NTA	32
Figure 16 : Électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dénaturant de diverses fractions d'ARNt	36
Figure 17 : Électrophorèse (SDS-PAGE 10%) de fractions d'AspRS-ND purifiées	38
Figure 18 : Test d'aminoylation de l'ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i> par l'AspRS-ND.....	39
Figure 19 : Mesure de la désacylation de l'Asp-ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 au cour du temps	41
Figure 20 : Électrophorèse (SDS-PAGE 10%) de fractions de l'AdT de <i>P. aeruginosa</i> purifiées chez <i>E. coli</i> (BL21)	42
Figure 21 : Test d'activité de l'AdT	44
Figure 22 : Quantification du taux d'asparagine formé par l'AdT	46
Figure 23 : Influence de l'AspRS-ND sur la stabilité de l'Asp-ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	46
Figure 24 : La demi-vie de l'Asn-ARNt ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i>	47
Figure 25 : Mesures de l'activité de l'AdT en présence de différentes concentrations de	

l'Asp-ARNt^{Asn}49

Figure 26 : Mesure de la K_m de l'AdT de *P. aeruginosa* pour l'Asp-ARNt^{Asn}, et de la V_m
de la réaction de transamidation49

Figure 28 : Détermination de la K_{ic} de glutamycine pour l'AdT52

Figure 29 : Détermination de la K_{ic} de l'aspartycine pour l'AdT53

Figure 30 : Structure de la sulfone (PAN-Met)54

Figure 31 : Détermination de la K_i du sulfone pour l'AdT54

Liste des abréviations

µg :	microgramme (10^{-6} gramme)
µL :	microlitre (10^{-6} litre)
aa :	acide aminé
aa-ARNt :	ARNt chargé par son acide aminé
aaRS :	aminoacyl-ARNt synthétase
ADN :	acide désoxyribonucléique
AdT	amidotransférase dépendante de l'ARNt
AMP :	adénosine monophosphate
Amp :	ampicilline
AMP-PCP:	adenosine 5'-[β , γ -methylene]triphosphate
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ARNt :	acide ribonucléique de transfert
Asn :	asparagine
AsnRS :	asparaginyl-ARNt synthétase
Asp :	aspartate
AspRS :	aspartyl-ARNt synthétase
AspRS-ND:	aspartyl-ARNt synthétase non discriminante
ATP :	adénosine triphosphate

ATP γ -AmNS: adenosine 5'-triphosphate P^3 -(5'-sulfo-1-naphthyl)amide

ATP- γ S : adenosine 5'-[γ -thio]triphosphate

BzATP: 2'- (or 3'-) *O*-(4-benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate

Cb : carbénicilline

DTT : dithiothréitol

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : éthylène diamine tétraacétate

[E] : concentration totale d'enzyme

EF-Tu : facteur d'élongation Tu

FSBA : 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyladenosine

Gln : glutamine

Glu : glutamate

GlnRS : glutaminyl-ARNt synthétase

GluRS : glutamyl-ARNt synthétase

GluRS-ND : glutamyl-ARNt synthétase non discriminante

Hepes : acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'[2-éthanesulfonique]

His: histidine

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

Kb: Kilopaire de bases

k_{cat} : constante catalytique

KDa : kilodalton (gramme/mole)

K_i : constante d'inhibition

K_{ic} : constante d'inhibition compétitive

K_m : constante Michaelis-Menten

L : litre

LB : Luria Bertani

min : minute

mL : millilitre (10^{-3} litre)

mM : millimolaire (10^{-3} mole/litre)

nM : nanomolaire (10^{-9} mole/litre)

Ni-NTA : nickel-nitrilotriacétate

°C : degré Celsius

ORF : cadre de lecture ouvert

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide

P- γ -Glu-tRNA^{Gln}: Glu-tRNA^{Gln} with a phosphate group at the γ -carboxyl of the
glutamyl moiety

Pb : paire de bases

PPi : pyrophosphate

RF : Rossman fold

SDS : sodium dodécyl sulfate

Sec : seconde

Ser : serine

TBE : Tampon Tris-Borate-EDTA

TE : Tampon Tris-EDTA

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

TNP-ATP: 2'- (or 3'-) *O*-(trinitrophenyl)adenosine 5¢-triphosphate

UV : ultraviolet

V_m : vitesse maximale

1 Introduction

1.1 La biosynthèse des protéines

La biosynthèse des protéines est un processus essentiel pour la survie et la multiplication de la cellule. Elle se réalise en plusieurs étapes qui permettent la traduction fidèle de l'information génétique en protéines. La fidélité de la traduction repose sur le déchiffrement correct du code génétique (codon (ARNm)/anticodon (ARNt)) (tableau 1). Elle est la conversion d'un langage nucléique composé d'une succession de triplets de bases (codon) au niveau de l'ARNm en un langage protéique. Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) et les ARN de transfert (ARNt) occupent une place cruciale dans ce processus. La spécificité d'amination pour de nombreux procaryotes et eucaryotes a été étudiée. La fixation de chaque acide aminé sur son ARNt correspondant est effectuée par une famille de vingt aaRS. En général, il existe pour chaque acide aminé et ses ARNt correspondants une aaRS homologue et particulière (Crick et *al.*, 1958). La spécificité de la réaction d'amination est déterminante et essentielle au fonctionnement de la biosynthèse des protéines pour assurer la fidélité de la traduction du patrimoine génétique.

Tableau 1 : Code génétique

	U	C	A	G
U	UUU phe (F)	UCU ser (S)	UAU tyr (Y)	UGU cys (C)
	UUC	UCC	UAC	UGC
	UUA leu (L)	UCA	UAA STOP	UGA STOP
	UUG	UCG	UAG STOP	UGG trp (W)
C	CUU leu (L)	CCU pro (P)	CAU his (H)	CGU arg (R)
	CUC	CCC	CAC	CGC
	CUA	CCA	CAA gln (Q)	CGA
	CUG	CCG	CAG	CGG
A	AUU ile (I)	ACU thr (T)	AAU asn (N)	AGU ser (S)
	AUC	ACC	AAC	AGC
	AUA	ACA	AAA lys (K)	GA arg (R)
	AUG met (M)	ACG	AAG	AGG
G	GUU val (V)	GCU ala (A)	GAU asp (D)	GGU gly (G)
	GUC	GCC	GAC	GGG
	GUA	GCA	GAA glu (E)	GGA
	GUG	GCG	GAG	GGG

1.2 Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS)

Les aaRS sont des enzymes modulaires de tailles et de structures oligomérique très hétérogènes, qui assurent leurs fonctions d'aminocyclation grâce à deux types de sites catalytiques structurellement très différents. L'ensemble des données au niveau des séquences des structures et de la biochimie a permis de distinguer deux classes de 10 membres chacune, et six sous-classes (Tableau 3) (Cusack et al., 1990; Eriani et al., 1990; Arnez et Moras, 1997). Les aaRS de Classe I possèdent toutes un repliement de Rossmann fold (RF) et deux motifs peptidiques conservés dont les localisations dans la structure du Rossmann fold sont toujours identiques. Les aaRS de Classes 2 possèdent toutes un centre catalytique organisé autour d'un feuillet β -antiparallèle contenant trois motifs constants (Tableau 2) (Eriani et al., 1990).

Tableau 2 : Répartition des aaRS de classe I et classe II selon la présence ou l'absence de trois motifs (Eriani et al., 1990)

Class II synthetases		Class I synthetases	
Motif 3 only	Motifs 1, 2, 3	HIGH + KMSKS	
Gly ($\alpha 2\beta 2$)	3' OH		
Ala ($\alpha 4$)	3' OH		
	Pro ($\alpha 2$) 3' OH		
	Ser ($\alpha 2$) 3' OH		no RF
	Thr ($\alpha 2$) 3' OH		
	Asp ($\alpha 2$) ??		
	Asn ($\alpha 2$) 3' OH		
		Glu (α) 2' OH	
		Gln (α) ?	RF
	His ($\alpha 2$) 3' OH		
	Lys ($\alpha 2$) 3' OH		
		Arg (α) 2' OH	
		Val (α) 2' OH	
		Ile (α) 2' OH	
		Leu (α) 2' OH	
		Met ($\alpha 2$) 2' OH	RF
	Phe ($\alpha 2\beta 2$) 2' OH	Tyr ($\alpha 2$) ??	RF
		Trp ($\alpha 2$) ?	

L'étonnante similarité retrouvée dans la biochimie de tous les êtres vivants, a largement suggéré l'existence d'un ancêtre commun aux trois règnes de la vie (Bactéries, Archaea et eucaryotes), LUCA («Last Universal common Ancestor»), nommé également progénote pour entité génétique (Woese et al., 1990). Woese propose, que LUCA soit une

communauté complexe et hétérogène de progénètes simples capables d'évoluer rapidement (Woese 1998). LUCA est la population dans son ensemble qui aurait été le réservoir de tous les gènes conservés actuellement. Elle s'est développée progressivement grâce au transfert des gènes (Figure 1). Cette communauté se serait divisée pour former les trois règnes du vivant (Eucaryote, Bactéries et Archaea).

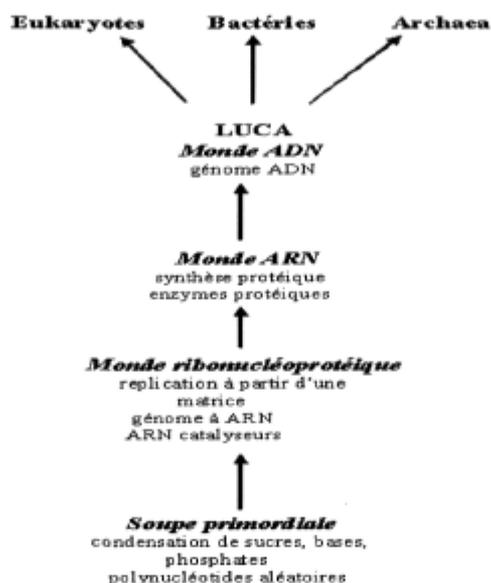


Figure 1 : Les différentes étapes de l'origine de la vie aux trois règnes du vivant (Maizel et al., 1994).

Dans le monde des ARN, les ribozymes catalysant l'aminocyclation auraient évolué par étapes successives : la fixation des acides aminés, puis l'ajout de peptides leur aurait conférés de meilleures propriétés (réactivité, reconnaissance du substrat et stabilité) (Lee et al., 2000; Saito et al., 2001) avant de laisser la place aux protéines (aaRS) plus aptes à répondre à la nécessité d'une spécificité accrue de reconnaissance du substrat. Certaines espèces bactériennes, dont plusieurs pathogènes, et l'ensemble des archaebactéries sont privées d'une ou de plusieurs aminoacyl-ARNt synthétases. L'ARNt orphelin est alors aminoacylé par une voie indirecte. Les voies indirectes de formation d'aa-ARNt sont dans l'ensemble méconnues et certaines restent inexplorées. Elles constituent vraisemblablement un vestige de la synthèse protéique primitive. Par conséquent leur étude permet d'approcher les mécanismes ancestraux de formation d'aa-ARNt et de comprendre comment sont apparues les aminoacyl-ARNt synthétases modernes.

Tableau 3 : Les aaRS de classes I et II. Les aminoacyl-ARNt synthétases sont groupées en deux classes (I et II) et 6 sous-classes en fonction de leur structure. Chaque classe comprend 10 synthétases. (<http://perso.orange.fr/Aminoacyl-tRNA.Synth/Tab%20des%20synthetases.html>)

Acide aminé	Classe et sous-classe	Codon/anticodon
Alanine (A)	IIc	GCA/UGC GCC/GGC GCG/CGC GCU/ AGC
Cystéine (C)	Ia	UGC/GCA UGU/ACA
Acide aspartique (D)	IIb	GAC/GUC GAU/AUC
Acide glutamique (E)	Ib	GAA/UUC GAG/CUC
Phénylalanine (F)	IIc	UUC/GAA UUU/AAA
Glycine (G)	IIa	GGA/UCC GGC/GCC GGG/CCC GGU/ACC
Histidine (H)	IIa	CAC/GUG CAU/AUG
Isoleucine (I)	Ia	AUA/UAU AUC/GAU AUU/AAU
Lysine (K)	Ia, IIb	AAA/UUU AAG/CUU
Leucine (L)	Ia	UUA/UAA UUG/CAA CUA/UAG CUC/GAG CUG/CAG CUU/AAG
Méthionine (M)	Ia	AUG/CAU
Asparagine (N)	IIb	AAC/GUU AAU/AUU
Proline (P)	IIa	CCA/UGG CCC/GGG CCG/CGG CCU/AGG
Glutamine (Q)	Ib	CAA/UUG CAG/CUG
Arginine (R)	Ia	AGA/UCU AGG/CCU CGA/UCG CGC/GCG CGG/CCG CGU/ACG
Sérine (S)	IIa	AGC/GCU AGU/ACU UCA/UGA UCC/GGA UCG/CGA UCU/AGA
Thréonine (T)	IIa	ACA/UGU ACC/GGU ACG/CGU ACU/AGU
Valine (V)	Ia	GUA/UAC GUC/GAC GUG/CAC GUU/AAC
Tryptophane (W)	Ic	UGG/CCA
Tyrosine (Y)	Ic	UAC/GUA UAU/AUA

1.3 Structure de l'ARN de transfert :

L'ARN de transfert (ARNt) est constitué de quatre domaines (domaine accepteur, domaine D, domaine de l'anticodon, domaine T et la région variable). Ils se replient sur eux mêmes, formant des appariements intramoléculaires pour former une structure secondaire de quatre tiges ou bras, appelé "feuille de trèfle" (Figure 2.A). Les quatre tiges se replient en trois dimensions pour former une structure tridimensionnelle en forme de "L" (Figure 2.B). Celle-ci résulte de l'empilement coaxial deux à deux des tiges : le bras T sur le bras accepteur et le bras anticodon sur le bras D. Cette structure en forme de "L" est stabilisée par des interactions entre la boucle T et la boucle D, qui fait intervenir des nucléotides modifiés, que l'on retrouve conservé dans la plupart des ARNt. La tige qui porte les extrémités 5' et 3' s'appelle le bras accepteur, car c'est lui qui porte l'acide aminé.

1.4 L'aminocyclation des ARNt

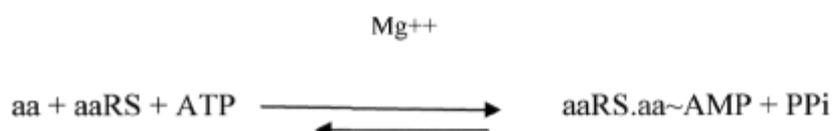
Le chargement de l'ARNt par son acide aminé correspondant doit se faire avec une haute précision pour assurer l'intégrité structurale et fonctionnelle des protéines synthétisées. La spécificité de l'aaRS pour son substrat ribonucléique incombe particulièrement aux régions : de l'anticodon, la base discriminante 73 et le bras accepteur. Ces 2 derniers semblent avoir une importance particulière. L'anticodon est important pour 17 des 20 synthétases. L'acide aminé activé est transféré sur l'extrémité accéptrice 3'OH ou 2'OH du ribose du dernier nucléotide de l'ARNt par les aaRS II et les aaRS I respectivement (Tableau 3) (Hecht et Chinault, 1976).

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des deux partenaires (aaRS et ARNt) de la réaction d'aminocyclation ont été étudiées intensivement depuis leur découverte dans les années cinquante. Les complexes ARNt/aaRS du système glutamine d'*E. coli* (enzyme de classe 1) (Rould et al., 1998; Perona et al., 1993) et aspartate de levure (enzyme de classe 2) (Ruff et al., 1991; Cavarelli et al., 1993) ont été les premiers dont la structure cristallographique a été résolue, et sont ainsi devenus des modèles quant à la reconnaissance de l'ARNt selon la classe d'enzyme.

L'aminocyclation de certains ARNt chez plusieurs procaryotes se fait par deux voies : la voie directe et la voie indirecte

1.4.1 La voie directe

La réaction d'aminocyclation chez tous les organismes (procaryotes et eucaryotes) consiste à charger l'ARNt avec l'acide aminé correspondant à son anticodon, selon le code génétique (Tableau 1). Cette réaction est catalysée par l'aaRS spécifique à l'acide aminé (Schimmel et Söll 1979). Elle se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, l'aaRS active l'acide aminé qui lui est spécifique en aminoacyl-adénylate (aa-AMP), en présence de Mg^{++} et d'ATP.



Ensuite, l'acide aminé activé est transféré sur l'extrémité acceptrice 3' ou 2' de l'ARNt (Hecht et Chinault, 1976)



Certains aaRS ont besoin de la fixation de l'ARNt pour activer leur acide aminé. Il s'agit des ArgRS, GluRS, GlnRS et LysRS de classe I (tableau 3), pour lesquels l'ARNt joue un rôle d'activateur de la synthétase pour la formation de l'aminoacyl-adenylate (Mitra et Mehler, 1967; Kern et Lapointe, 1980; Sekine *et al.*, 2003). Chaque aaRS aminoacyle un ARNt par un acide aminé particulier parmi les vingt acides aminés. Ces enzymes utilisent des mécanismes qui assurent une haute spécificité catalytique dans la réaction de l'aminoacylation des ARNt.

1.4.2 La voie indirecte

L'incorporation de l'acide aminé dans la chaîne polypeptidique ne dépend pas de la nature de l'acide aminé fixé sur l'ARNt, mais du type d'interaction entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt chargé (Chapeville *et al.*, 1962). Par conséquent, il y a des aaRS qui aminoacylent plus qu'un ARNt. Les ARNt incorrectement chargés ne participent pas à la biosynthèse des protéines, puisqu'ils ne sont pas reconnus par le facteur d'élongation EF-Tu (Figure 3) (Blanquet *et al.* 2003)

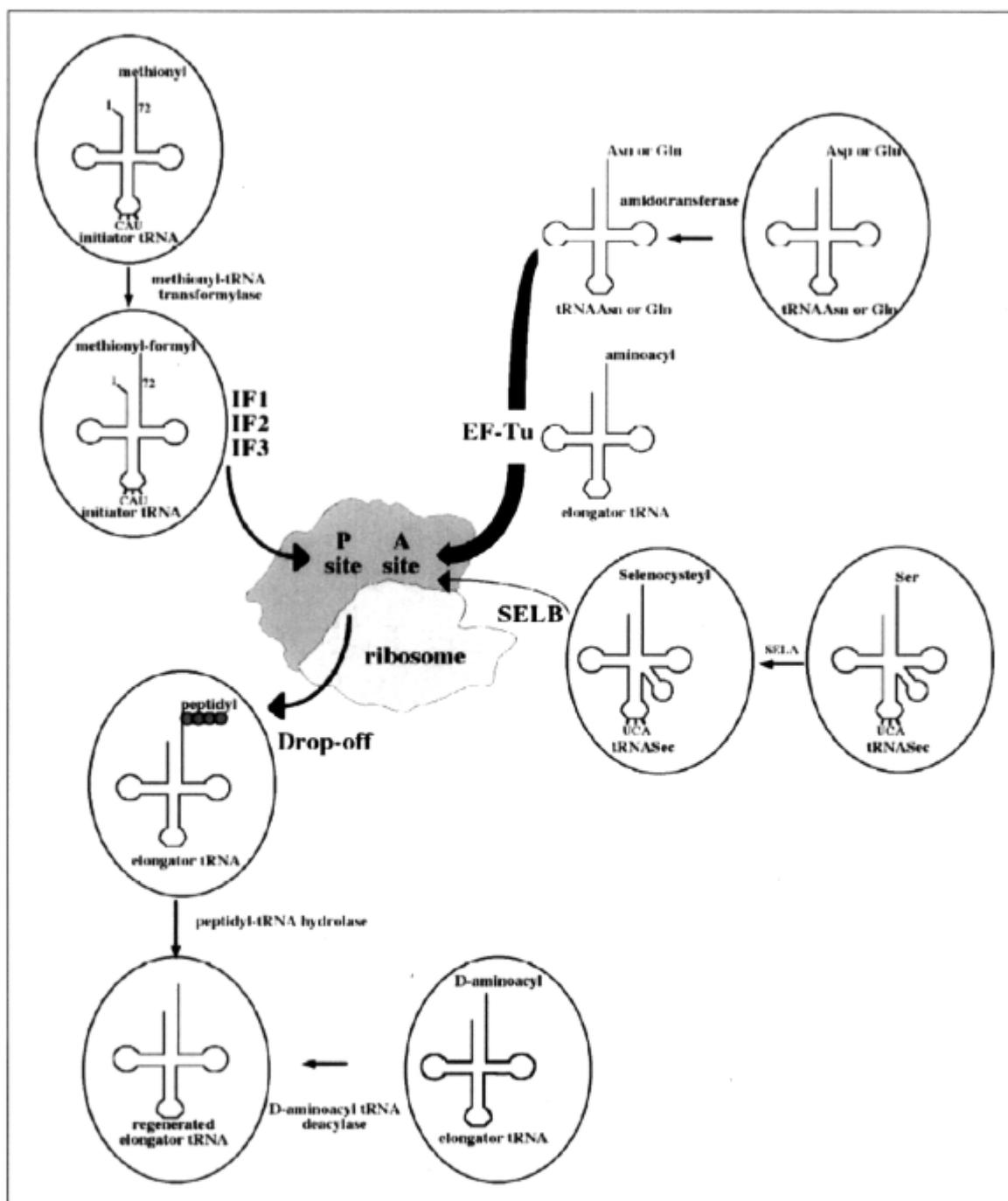


Figure 3 : Différents circuits pour les aminoacyl-ARNt chez les eubactéries. Les ARNt représentés sur un fond gris ne sont pas reconnus par EF-Tu.

Il y a plusieurs types d'ARNt qui sont aminoacylés par une voie indirecte : l'ARNt^{Gln}, l'ARNt^{Asn} et l'ARNt^{Cys}.

1.4.2.1 La synthèse de Gln-ARNt^{Gln}

Contrairement à la situation observée chez les eucaryotes et quelques bactéries, qui ont une GlnRS et une GluRS discriminantes (Dubois et al., 2005), une voie indirecte de formation de Gln-ARNt^{Gln} a été remarquée la première fois chez le *Bacillus subtilis* à la fin des années soixante (Wilcox et al., 1969). Cette bactérie n'a pas la capacité de synthétiser le Gln-ARNt^{Gln} par la voie directe. La séquençage du génome de *B. subtilis* en 1997 confirma l'absence du gène *glnS* qui code pour la GlnRS (Kunst et al., 1997). La biosynthèse du Gln-ARNt^{Gln} s'effectue par la voie indirecte, à l'aide des deux enzymes suivantes : une GluRS non discriminante (GluRS-ND) qui produit le Glu-ARNt^{Glu} et le Glu-ARNt^{Gln}, et l'AdT (Figure 4). La GlnRS est aussi absente chez plusieurs archaea, où la synthèse de Gln-ARNt^{Gln} se fait par une GluRS-ND et une GatDE. Chez les bactéries qui n'ont pas de GlnRS, la synthèse de Gln-ARNt^{Gln} se fait généralement par une GluRS-ND et une GatCAB, comme chez *B. subtilis* et *Lactobacillus bulgaricus* (Lapointe et al., 1986; Schön et al., 1988). Certaines bactéries, comme *Helicobacter pylori* et *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ont deux GluRSs qui ont des activités complémentaires (Skouloubris et al., 2003; Salazar et al., 2003) : une GluRS1 discriminante qui génère seulement le Glu-ARNt^{Glu}, et une GluRS2 qui génère seulement le Glu-ARNt^{Gln}, qui est transamidé par une GatCAB.

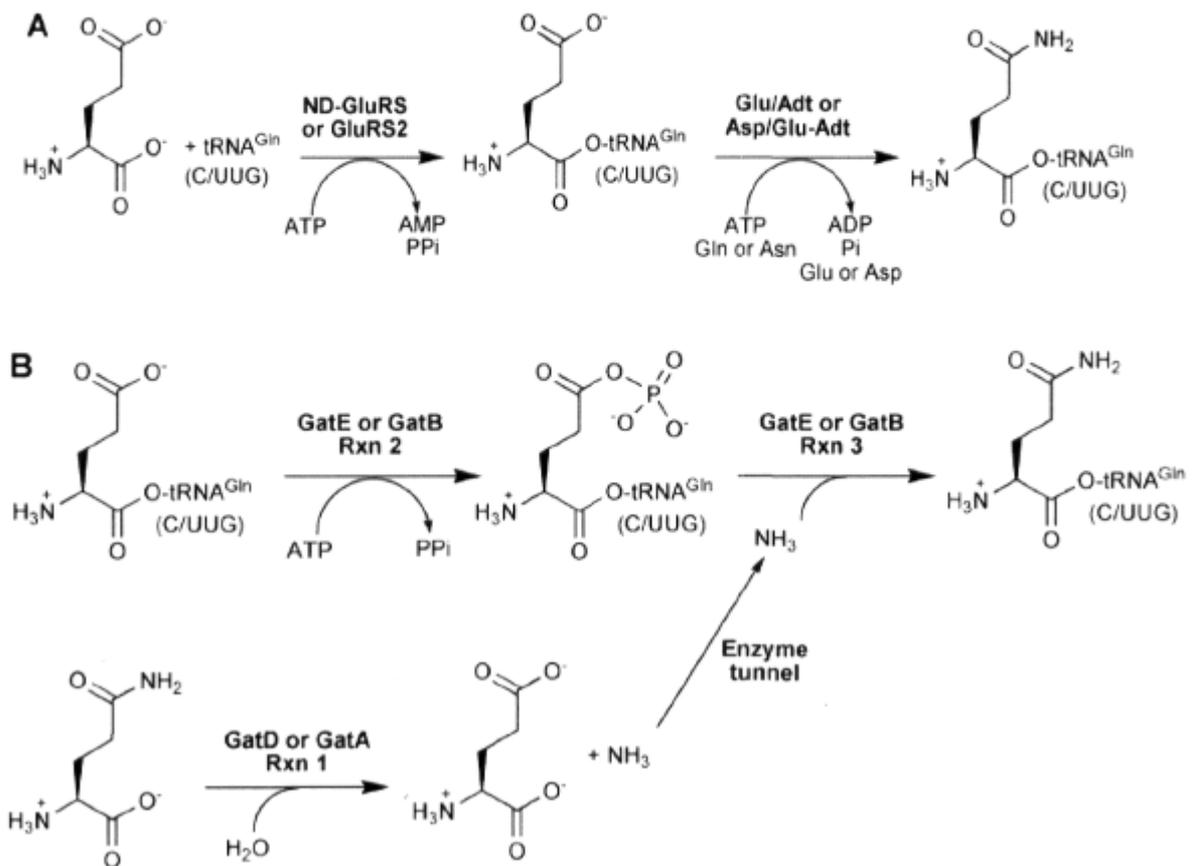


Figure 4 : La biosynthèse de $\text{Gln-ARNt}^{\text{Gln}}$ par la voie indirecte

A) Le $\text{Glu-ARNt}^{\text{Gln}}$ est d'abord produit par la GluRS-ND ou la GluRS2 . Par la suite, la Glu-AdT (GatDE) ou l' Asp/Glu-AdT (GatCAB) le transamide en $\text{Gln-ARNt}^{\text{Gln}}$ (pour les organismes privés de *glnS*)

B) La Glu-AdT et Asp/Glu-AdT catalysent les trois mêmes réactions (glutaminase, ATPase et transamidase) pour générer le $\text{Gln-ARNt}^{\text{Gln}}$ (Cathopoulos et al., 2007)

1.4.2.2 La synthèse d' $\text{Asn-ARNt}^{\text{Asn}}$

La biosynthèse de l' $\text{Asn-ARNt}^{\text{Asn}}$ par la voie indirecte existe chez les bactéries. Chez les organismes manquant une AsnRS dans leur cytoplasme (*H. pylori*, *P. aeruginosa*...), l'aminoacylation de l' ARNt^{Asn} se fait en deux étapes. Premièrement, l' $\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}$ se forme en moyen d'une AspRS non discriminante (AspRS-ND). Deuxièmement, une transamidation de l' $\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}$ par la GatCAB (Asp/Glu-AdT) a lieu et forme l' $\text{Asn-ARNt}^{\text{Asn}}$

ARNt^{Asn} (Figure 5). L'AspRS-ND aminoacyle deux types d'ARNt (ARNt^{Asp} et ARNt^{Asn}).

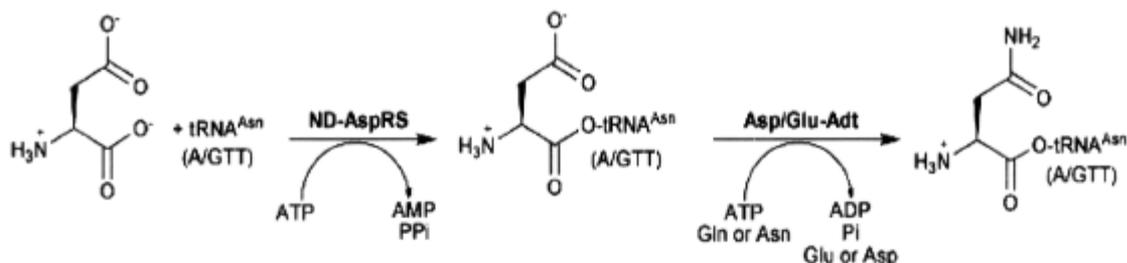


Figure 5 : La biosynthèse de l'Asn-ARNt^{Asn} par la voie indirecte (Cathopoulis et *al.*, 2007)

Certains bactéries comme le *Thermus thermophilus* a deux types d'AspRS, une AspRS discriminante (AspRS-D) et une AspRS-ND (AspRS2) (Stanzel et *al.*, 1994). L'AspRS-D aminoacyle seulement l'ARNt^{Asp} par l'aspartate et l'AspRS2 aminoacyle deux type d'ARNt par l'aspartate, tels que l'ARNt^{Asp} et l'ARNt^{Asn} (Schon et *al.*, 1988).

1.4.2.3 La synthèse de Cys-ARNt^{Cys}

Plusieurs organismes possèdent un gène *cysS* et synthétisent le Cys-ARNt^{Cys} par la voie directe (Woese C. et *al.*, 2000). Cependant, le gène codant la CysRS étant absent chez quelques archaea, l'aminocyclation du Cys-ARNt^{Cys} se fait par la voie indirecte (Figure 6). Chez *M. jannaschii*, l'enzyme O-phosphorylseryl-ARNt synthétase (SepRS) forme le Sep-ARNt^{Cys} tandis que l'enzyme Sep-tRNA :Cys-tRNA synthétase (SepCysS) convertit le Sep-ARNt^{Cys} en Cys-ARNt^{Cys} (Sauerwald et *al.*, 2005).

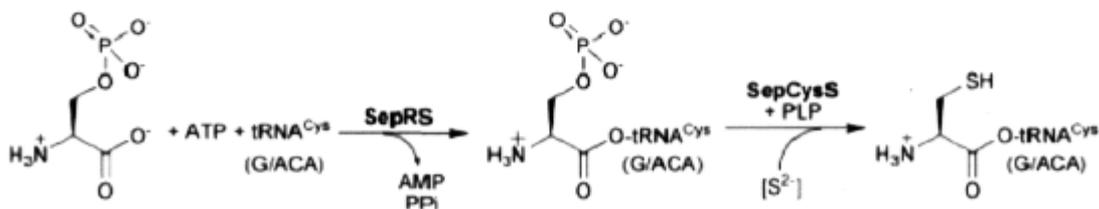


Figure 6 : La biosynthèse de la Cys-ARNt^{Cys} par la voie indirecte (Cathopoulis et *al.*, 2007)

1.5 Les amidotransférases ARNt-dépendantes (AdT)

Les études biochimiques et génomiques de plusieurs procaryotes révèlent l'existence d'un chemin indirect dans l'aminoylation de l'ARNt^{Asn} et l'ARNt^{Gln} (Tableau 4) (Gagnon et al. 1996; Raczniaik et al. 2001; Salazar et al. 2001). L'aminoylation de ces ARNts se fait par deux enzymes. La formation du Gln-ARNt^{Gln} se fait par la GluRS-ND et l'AdT, et la formation de l'Asn-ARNt^{Asn} se fait par l'AspRS-ND et l'AdT. Il existe deux types d'AdT : l'AdT hétérodimérique et l'AdT hétérotrimérique. Ces deux enzymes sont différentes au niveau structural et fonctionnel.

Tableau 4 : Classification des bactéries selon la présence ou l'absence de GlnRS, AsnRS ou de l'AdT dans leurs génomes (tiré du Tableau 5.1 de Bernard, 2006)

Pas d'AdT (γ -protéobactéries hautes)	AdT, AsnRS, pas de GlnRS (Firmicutes (Gram+ à bas G+C), Spirochètes, Cyanobactéries)	
<i>E. coli</i> <i>H. pylori</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Porphyromonas gingivavalis</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Shewanella oneidensis</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia pestis</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> ^a <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Synechocystis sp.</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Treponema pallidum</i> <i>Treponema denticola</i>
AdT, GlnRS, pas d'AsnRS β et γ -protéobactéries basses	AdT, pas de GlnRS, pas d'AsnRS (α , δ et ϵ -protéobactéries, Gram + à haut G+C)	
<i>Bordetella pertussis</i> <i>Francisella tularensis</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Nitrosomonas europaea</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>P. putida</i> <i>P. syringae</i> <i>Burkholderia mallei</i>	<i>Aquifex aeolicus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Rickettsia prowazekii</i> <i>Thermotoga maritima</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Clorobium tepidum</i>	<i>Prochlorococcus marinus</i> <i>Brucella suis</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> <i>Methylococcoides capsulatus</i>
		AdT, GlnRS, AsnRS δ -protéobactérie)
		<i>Deinococcus radiodurans</i> ^a <i>Geobacter sulfurreducens</i> <i>Thermus thermophilus</i> ^e

1.5.1 L'AdT hétérodimérique

L'AdT hétérodimérique fut découverte chez les archaea et n'a été observée ni chez les bactéries ni chez les eucaryotes (White *et al.*, 1972 et Gupta *et al.*, 1985). Le gène codant pour la GlnRS étant absent chez ces organismes, l'aminoylation de l'ARNt^{Gln} se fait par deux enzymes : la GluRS-ND et l'AdT. Premièrement, l'aminoylation de l'ARNt^{Gln} se fait par la GluRS-ND et forme le Glu-ARNt^{Gln}. Deuxièmement, une transamidation du Glu-ARNt^{Gln} par l'AdT forme le Gln-ARNt^{Gln}.

L'AdT hétérodimérique est spécifique pour la transamidation du Glu-ARNt^{Gln}. Cette conversion est accomplie en trois étapes (Figure 3): du NH₃ est d'abord formé par hydrolyse du Gln/Asn; une phosphorylation du Glu-ARNt^{Gln} en formant γ -phosphoryl-Glu-ARNt^{Gln} s'effectue ensuite; enfin, le NH₃ est délivré au γ -carbonyl pour former le Gln-ARNt^{Gln}. Cette Glu-AdT est constituée de deux sous-unités (GatD et GatE) codées par l'opéron *gatDE*. La structure cristallisée de GatDE :ARNt^{Gln} de *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Figure 7) montre que le GatDE est un $\alpha_2\beta_2$ hétérodimérique (Oshikane *et al.*, 2006) formé par :

- a) La sous-unités GatD est homologue à une asparaginase A. Elle contient le site d'activité glutaminase, formé par quatre acides aminés conservés : Thr101, Thr177, Asp178 et Lys254. Ces acides aminés forment une triade catalytique (Thr-Lys-Asp) semblable à celle des L-asparaginase.
- b) La sous-unité GatE lie l'ARNt et contient les sites d'activité kinase et transamidase. Les sous-unités GatD et GatE sont traversées par un canal de 40Å de longueur où se fait l'acheminement de l'ammonium de GatD vers GatE.

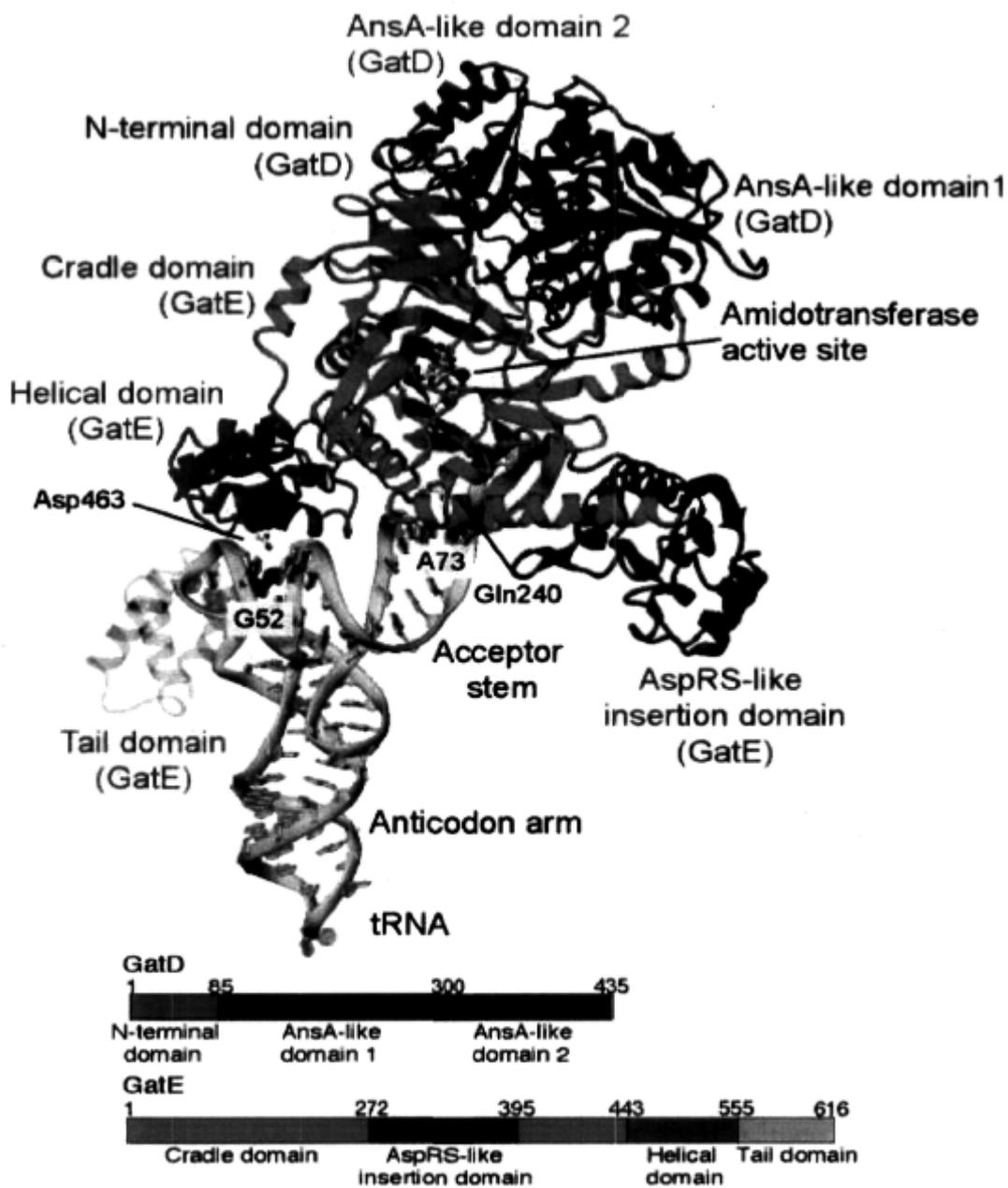


Figure 7: Structure cristallisée de l'AdT hétérodimérique de *Methanothermobacter thermautotrophicus* en liaison avec l'ARNt^{Gln} (Oshikane et al., 2006)

1.5.2 L'AdT hétérotrimérique

L'AdT hétérotrimérique est constituée de trois sous-unités codées par l'opéron *gatCAB*. Les gènes *gatA*, *gatB* et *gatC* sont aussi groupés en un seul opéron chez *B. subtilis*, mais sont dispersés sur le chromosome chez *Deinococcus radiodurans* (Curnow et al., 1998). L'AdT transamide le Glu-ARNt^{Gln} en Gln-ARNt^{Gln} et l'Asp-ARNt^{Asn} en Asn-ARNt^{Asn}. L'Asp/Glu-AdT existe chez des bactéries, des organelles et des archaea. L'Asp-ARNt^{Asn} est converti par l'AdT en Asn-ARNt^{Asn} en présence d'un donneur d'azote (Gln, Asn ou NH₃). La structure cristallisée de l'AdT de *Staphylococcus aureus* (Figure 8) (Nakamura et al., 2006) montre que :

- GatA est homologue à certains amidases et contient le site d'activité glutaminase. L'hydrolyse de la glutamine se fait par un mécanisme différent de celui de GatD, et procède via la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme : γ -carbonyl(Glu) avec le résidu Ser178.
- GatB contient le site d'activité kinase et transamidase. Elle ressemble au GatE, mais elle ne contient pas le domaine AspRS-like.
- GatB et GatA sont connectés par un tunnel hydrophile de 30Å de longueur. Le transport du cation ammonium (NH₄⁺) dans le tunnel se fait par une série de protonations et déprotonations de GatA jusqu'au site d'activité transamidase de GatB.
- GatC est une petite protéine (nombre d'acide aminés inférieur à 100) qui entoure et solidifie l'interface de liaison entre GatA et GatB. Elle joue un rôle de stabilisation ou d'assemblage des deux autres sous-unités.

Chez les organismes dépourvus d'une AsnRS comme le *H. pylori*, l'Asp-ARNt^{Asn} est généré par une AspRS-ND (Feng et al., 2005 et Giegé et al., 2005). La biosynthèse de l'Asn-ARNt^{Asn} par la voie indirecte ressemble à celle de la formation de Gln-ARNt^{Gln} (Figure 4).

Cette voie est commune chez les bactéries. La transamidation se fait par l'Asp/Glu-AdT (GatCAB), mais l'Asp-ARNt^{Asn} n'est pas un substrat pour la GatDE (Curnow et al., 1998; Min et al., 2002). Chez certains organismes dépourvus d'un gène qui code pour un asparagine synthétase, la voie indirecte est la seule voie pour la synthèse de l'asparagine (Giegé et al., 2005).

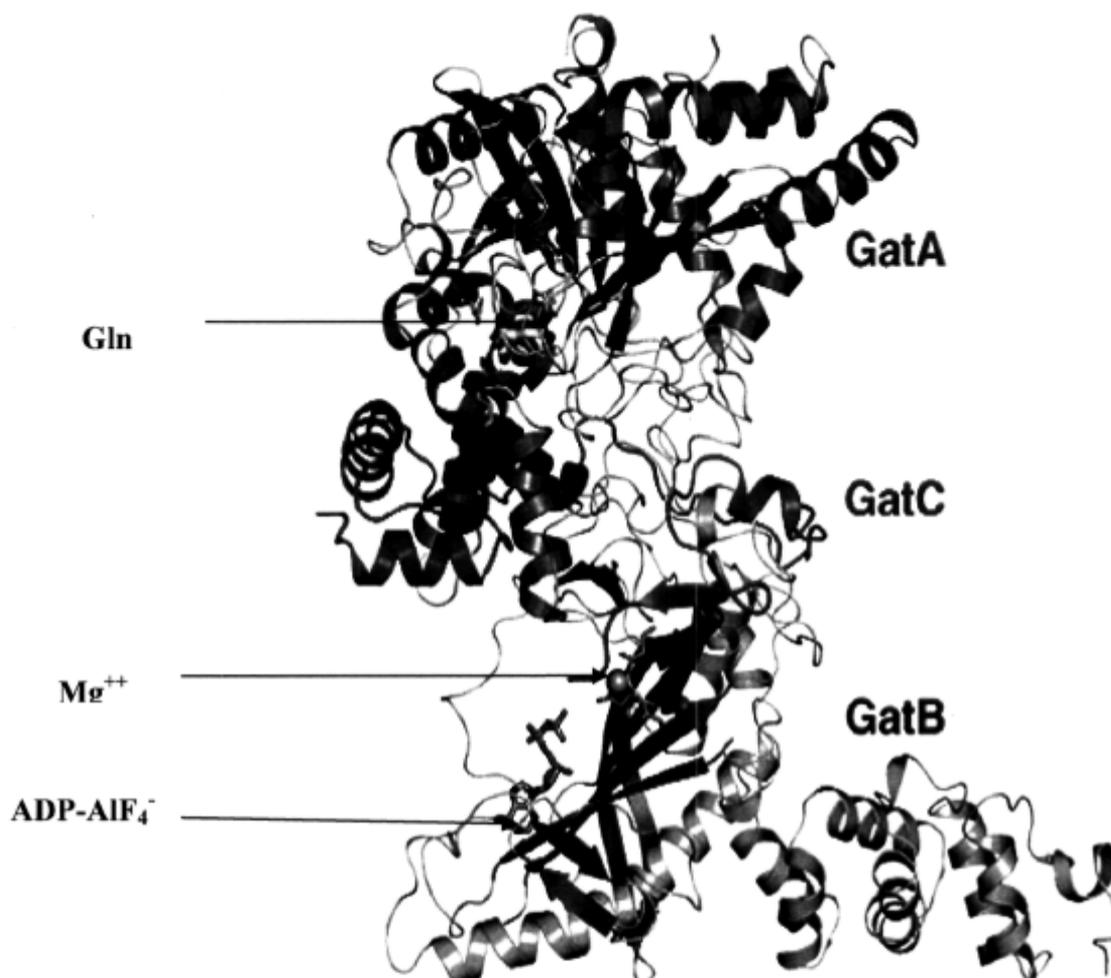


Figure 8 : Structure cristallisée de l'AdT hétérotrimérique de *Staphylococcus aureus* en liaison avec le Gln, Mg^{++} et un analogue de l'ATP (ADP-AIF₄⁻) (Nakamura et al., 2006)

1.5.3 Les réactions catalysées par l'AdT hétérotrimérique

Il y a trois types de réactions (Figure 9):

1.5.3.1 La réaction glutaminase : elle se fait par la sous-unité A (GatA). En présence de Gln/Asn comme donneur d'azote, la GatA génère le NH_3

1.5.3.2 La réaction ATPase : elle se fait par la sous-unité B (GatB). En présence de l'Asp-ARNt^{Asn} ou du Glu-ARNt^{Gln}, la GatB forme le β -phosphoryl-Asp-ARNt^{Asn} ou le γ -phosphoryl-Glu-ARNt^{Gln}.

1.5.3.3 La réaction transamidase : le complexe β -phosphoryl-Asp-ARNt^{Asn}:GatCAB ou γ -phosphoryl-Glu-ARNt^{Gln}:GatCAB en présence de NH_3 génère l'Asn-ARNt^{Asn} ou le Gln-ARNt^{Gln}.

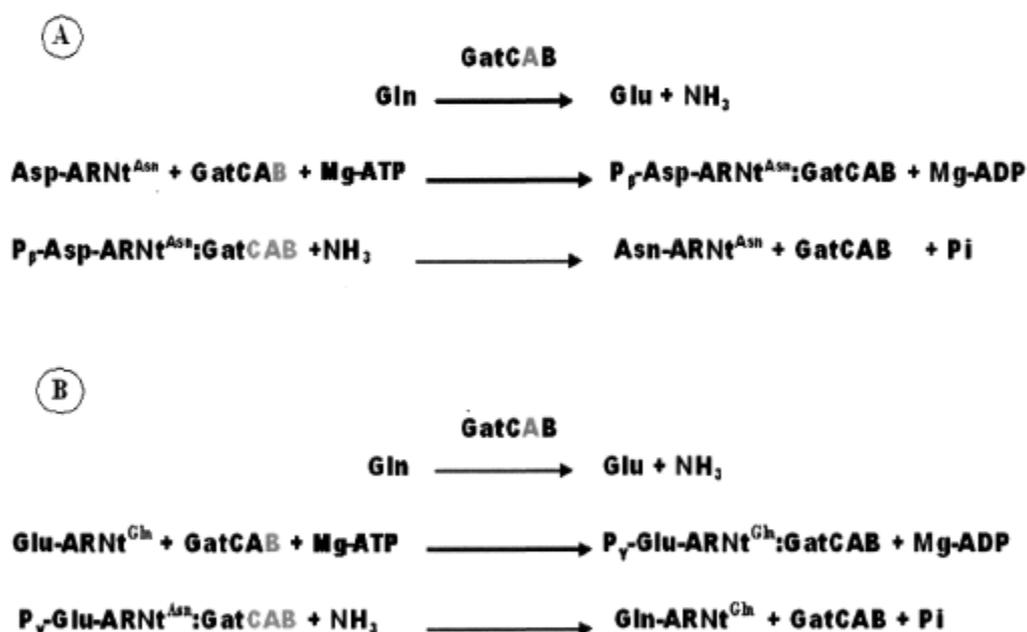


Figure 9 : Les différentes réactions catalysées par les sous-unités de l'AdT

hétérotrimérique : (A) chez l'Asp-AdT et (B) chez la Glu-AdT

(Horiuchi et *al.*, 2001)

1.6 Les éléments d'identités de l'ARNt^{Gln} et l'ARNt^{Asn} :

L'*Acidithiobacillus ferrooxidans* a deux GluRS. La GluRS1 est non discriminante et aminoacyle l'ARNt^{Glu} ainsi que l'ARNt^{Gln}. Elle reconnaît l'ARNt^{Gln} (CUG) à courte tige D. La GluRS2 aminoacyle seulement l'ARNt^{Gln} (UUG) qui a une longue tige D (Salazar et al., 2003). Pour l'AspRS-ND comme pour la GluRS-ND, la position 36 dans l'anticodon de l'ARNt^{Asp} (C36) et l'ARNt^{Asn} (U36) est un élément d'identité qui fait la différence entre l'AspRS-D et l'AspRS-ND (Charron et al., 2003).

La GatDE de *M. thermoautotrophicus* cristallisée en liaison avec l'ARNt révèle que l'AdT lie l'ARNt^{Gln} en position de l'hélice TΨC, de la boucle D, de la tige acceptrice à la position du site d'activité transamidase et indépendamment de l'anticodon. L'Asn463 et Arg503 sont deux résidus clés en contact avec la tige D. Des mutations au niveau du gène qui code pour l'ARNt^{Gln} montrent que U19 et A20 sont spécifiques pour l'activité amidotransférase et la paire de base G1-A72 de l'ARNt^{Asn} est un anti-déterminant clé.

Une mutation à la paire de base U1-A72 de l'ARNt^{Gln} est un élément déterminant pour la reconnaissance de GatCAB. L'insertion d'un U dans la boucle D empêche la liaison entre l'ARNt et l'AdT (Oshikane et al., 2006). La paire de base U1-A72 de l'ARNt^{Asn} de *Neisseria meningitidis* est essentielle pour l'activité amidotransférase de GatCAB. La paire de base G1-C72 et les bases U20A dans la boucle D de l'ARNt^{Asp} sont des éléments anti-déterminants pour la reconnaissance de GatCAB.

Les éléments d'identité d'aa-ARNt (Glu-ARNt^{Gln} et Asp-ARNt^{Asn}) pour l'AdT sont présents chez toutes les bactéries ayant l'activité Glu-AdT et/ou l'activité Asp-AdT. La paire de base U1-A72 dans la tige acceptrice et la base ΔA20 dans la boucle D sont deux éléments d'identités pour l'ARNt^{Gln} et l'ARNt^{Asn} (Figure 10) (Bailly et al., 2006).

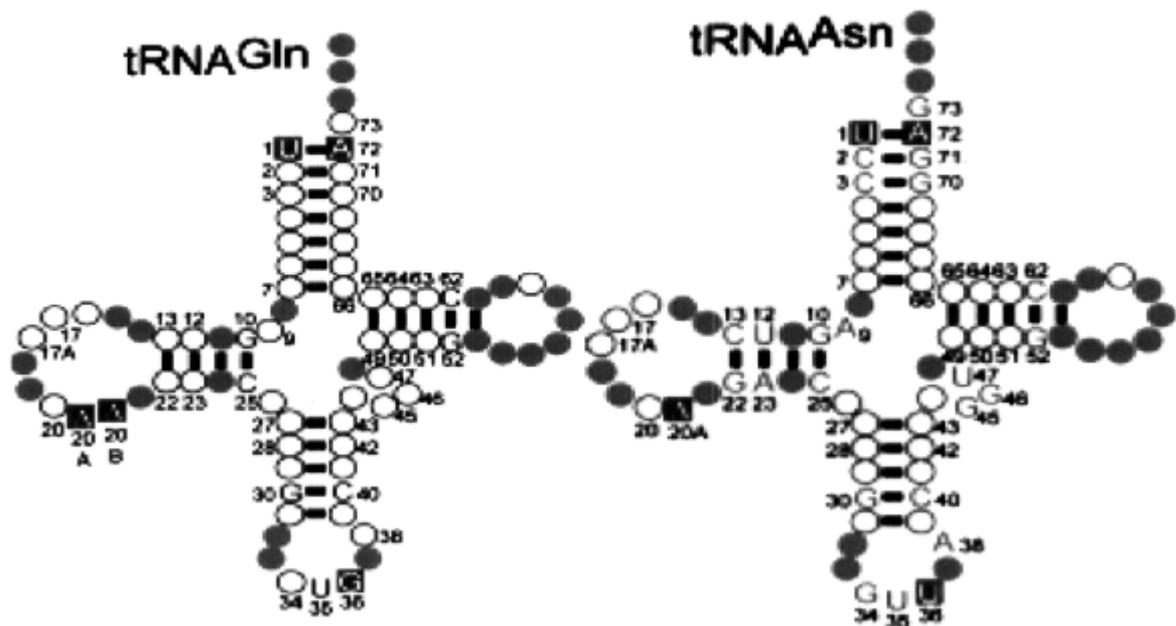


Figure 10 : Structures secondaires de l'ARNt^{Gln} et de l'ARNt^{Asn} des bactéries, et leurs éléments d'identité pour l'AdT (carrés rouges) (Bailly *et al.*, 2006).

1.7 Les types d'inhibition

Un inhibiteur est un effecteur qui modifie la vitesse d'une réaction enzymatique en la diminuant. Certaines molécules peuvent, selon les conditions, se comporter comme un activateur ou un inhibiteur (Shaw *et al.*, 1989). Les inhibiteurs naturels peuvent prendre de multiples formes : antibiotiques, toxines, drogues, poisons. L'étude de l'effet d'un inhibiteur permet d'affiner le mécanisme catalytique d'une réaction enzymatique, de mieux connaître la spécificité d'une enzyme, d'obtenir des données physiques et chimiques concernant le site actif et de cristalliser des enzymes. Certains inhibiteurs s'associent de manière réversible à l'enzyme en interagissant de manière non covalente. D'autres se fixent de manière irréversible et sont souvent utilisés pour déterminer les groupes actifs du site catalytique. Enfin, selon le type d'inhibiteur, l'enzyme peut fixer le substrat, l'inhibiteur ou les deux à la fois.

1.7.1 Inhibition compétitive

Il n'existe qu'un site de fixation pour les deux molécules. La fixation mutuellement exclusive résulte d'une analogie de structure entre le substrat et l'inhibiteur (Cornish-Bowden et *al.*, 1995). Il existe cependant d'autres modèles où le substrat et l'inhibiteur se fixent sur des sites distincts. L'inhibition est malgré tout de type compétitif pour diverses raisons structurales. Enfin, l'un des principaux modes de régulation des voies métaboliques est la rétro-inhibition (Cornish-Bowden et *al.*, 1975). Cependant, le substrat et l'inhibiteur n'ont pas (ou peu) d'homologie structurale: c'est le changement de conformation de l'enzyme induit par la fixation de l'inhibiteur qui empêche celle du substrat (et réciproquement). En présence de ce type d'inhibiteur, la K_m est augmenté mais la V_m n'est pas modifiée.

1.6.2 Inhibition non-compétitive

Un inhibiteur non compétitif classique n'a aucune influence sur la fixation du substrat (et réciproquement). Les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont distincts. En conséquence, l'inhibiteur se fixe à l'enzyme libre et au complexe enzyme-substrat. De même, le substrat se fixe à l'enzyme libre et au complexe enzyme-inhibiteur. Les inhibiteurs non compétitifs n'ont pas d'homologie structurale avec le substrat. La fixation de l'inhibiteur ne modifie pas la manière dont se fixe le substrat, mais elle empêche les ajustements conformationnels en formant un complexe ternaire inactif: enzyme-substrat-inhibiteur (Cornish-Bowden et *al.*, 1995). En présence de ce type d'inhibiteur, la V_m est diminuée, une partie des molécules d'enzyme se trouvant sous la forme enzyme-inhibiteur et enzyme-substrat-inhibiteur, conjointement au complexe enzyme-substrat. Il y a donc moins de molécules d'enzyme productives. La K_m n'est pas modifié, les sites de fixation étant distincts. La saturation par le substrat des molécules d'enzyme libre E n'est pas modifiée.

1.7.3 Inhibition incompétitive

Ce type d'inhibition est aussi appelé "inhibition par blocage du complexe intermédiaire". Cette appellation décrit mieux le mécanisme : l'enzyme et le substrat forment d'abord le

complexe enzyme substrat (le complexe intermédiaire), puis l'inhibiteur se fixe à ce complexe. Il y a ainsi formation d'un complexe ternaire enzyme-substrat-inhibiteur inactif. Ce type d'inhibition est essentiellement observé pour des réactions impliquant plusieurs substrats (Cornish-Bowden et *al.*, 1995). En présence de ce type d'inhibiteur, les deux paramètres (V_m et K_m) sont modifiés par le même facteur.

1.7.4 Inhibition irréversible

L'action d'un inhibiteur est irréversible quand il se forme une liaison covalente entre l'enzyme et l'inhibiteur : on l'appelle l'inactivateur (Walsh et *al.*, 1979).

1.6.5 Inhibition par excès de substrat

Ce type d'inhibition par le substrat lui-même peut avoir lieu quand il est en très grande concentration. Le site de fixation du substrat est dans ce cas grand et contient plusieurs sous-sites, chacun fixant une partie du substrat (Cleland et *al.*, 1979)

1.8 Les inhibiteurs de l'AdT

1.8.1 Les analogues de l'ATP

Parmi plusieurs analogues de l'ATP testés avec l'AdT (Tableau 5), on trouve l'ATP- γ S (Figure 11), qui inhibe la réaction transamidase et active la réaction glutaminase de la Glu-AdT de *S. pyogenes*.

Tableau 5 : Activation et/ou inhibition de l'AdT de *S. pyogenes* par des analogues de l'ATP (Horiuchi et al., 2001)

	glutaminase % activity	transamidase IC ₅₀ (mM)
no ATP	100	
ATP	312	
AMP-PCP	28	2.3
ADP	4	0.026
ATP- γ S	339	0.19
TNP-ATP	71	2.4
ATP γ -AmNS	73	no inhibition
FSBA	100	no inhibition
(no tRNA)	4.5	

Horiuchi et al. (2001) estiment que l'intermédiaire thiophosphoryl- γ -Glu-tRNA^{Gln} est coincé dans l'enzyme en présence de l'ATP- γ S, ce qui entraîne une stimulation de la réaction glutaminase et une inhibition de la réaction transamidase.

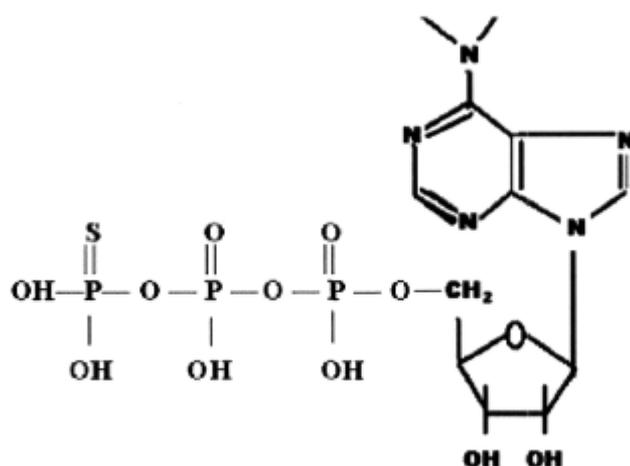


Figure 11 : Structure de l'ATP- γ S

1.8.2 Un analogue de la glutamine :

L'acide γ -Glu boronique (Figure 12) est un inhibiteur compétitif à l'activité glutaminase de l'AdT avec une $K_{ic} = 73 \pm 13$ nM

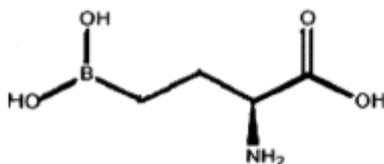


Figure 12 : Structure de l'acide γ -Glu boronique (communication personnelle du Dr. Stéphane Bernier).

L'acide γ -Glu boronique bloque la réaction glutaminase au niveau de GatA, ce qui entraîne un arrêt d'acheminement de NH_3 dans le canal d'ammonium de GatA vers GatB, où se fait la réaction de transamidation (Decicco et *al.*, 2001).

1.7.3 Les analogues de l'aa-ARNt

La glutamycine et l'aspartycine (Figure 13.A et 13.B) sont deux inhibiteurs compétitifs à l'activité transamidase de l'AdT trimérique (GatCAB) de *H. pylori*, avec une constante K_i de valeurs 134 μM et 103 μM respectivement. (Huot et *al.*, 2007).

Nous avons testé ces deux inhibiteurs pour l'AdT de *P. aeruginosa* (voir résultats et discussions)

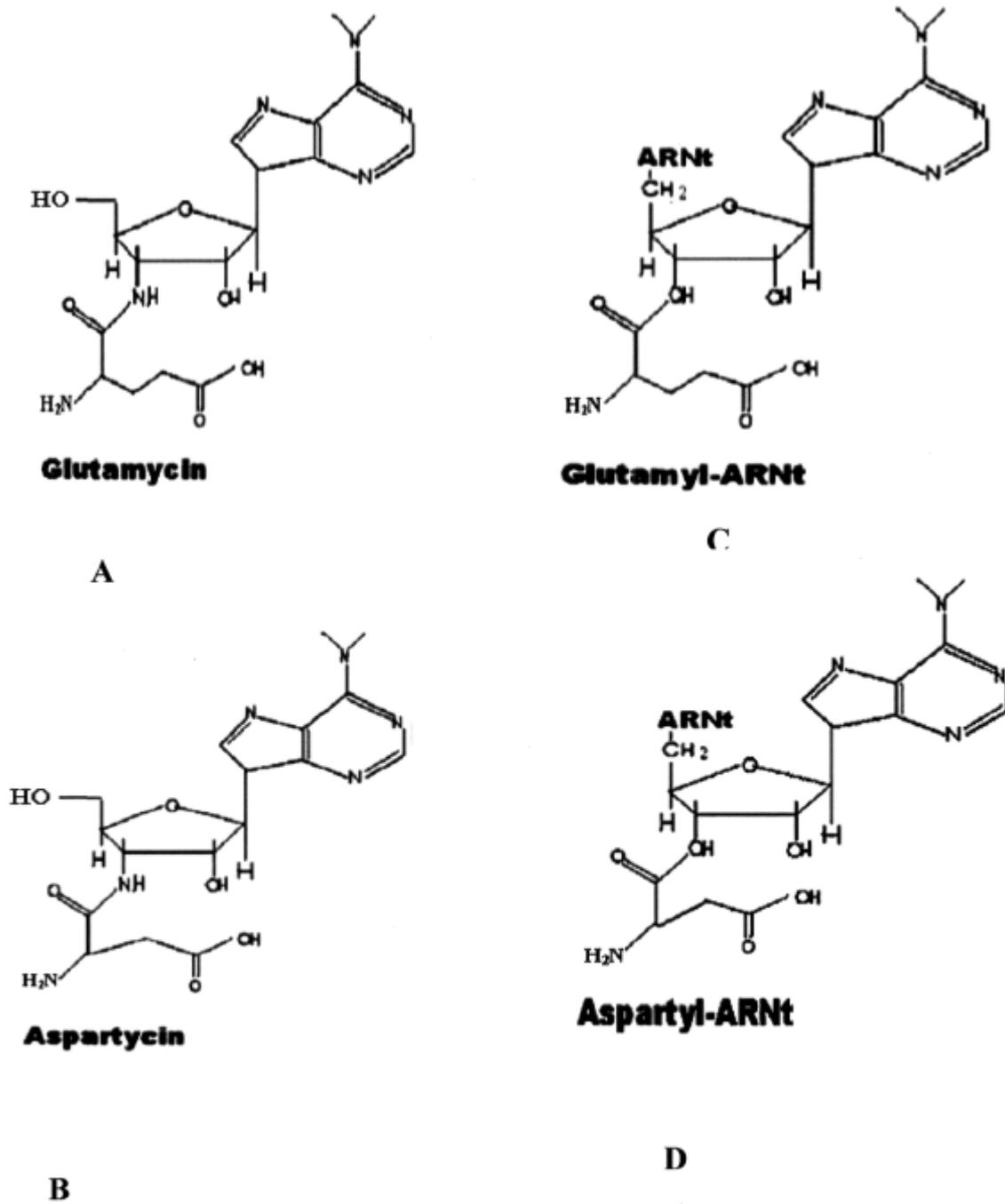


Figure 13 : Structure de la glutamycine (A), l'aspartycine (B), le Glu-ARNt (C) et l'Asp-ARNt (D)

2 Motivations et objectif :

2.1 Motivations

La *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie que l'on retrouve de plus en plus dans les surinfections hospitalières et qui est responsable de nombreux décès chez les immunodéprimés, les brûlés, les patients atteints de mucoviscidose et en particulier les personnes souffrant de la fibrose kystique. Cette bactérie Gram- est résistante à la plupart des drogues actuelles (Pitt et al., 2005; Stover et al., 2000).

En l'absence du gène qui code pour une asparaginyl-ARNt synthétase (AsnRS), le *P. aeruginosa* synthétise de l'Asn-ARNt^{Asn} par la voie indirecte catalysée par une AspRS-ND et une AdT hétérotrimérique. Comme l'AdT est une enzyme essentielle pour la croissance de *P. aeruginosa*, et qu'elle est absente du cytoplasme des organismes eucaryotes, elle est une cible pour des antibiotiques à venir pour lutter contre le *Pseudomonas*. Ces antibiotiques pourraient être aussi utilisés contre plusieurs autres bactéries pathogènes (*Moraxella catarrhalis*, *Helicobacter pylori*,...) qui utilisent l'AdT dans des voies indirectes de synthèse de l'Asn-ARNt^{Asn} et/ou du Gln-ARNt^{Gln}.

2.2 Objectif

L'objectif est la détermination des constantes cinétiques de l'AdT de *P. aeruginosa* et des constantes d'inhibition de certains analogues d'aa-ARNt dans la réaction de transamidation.

Les étapes sont les suivantes :

1. Surexpression de l'ARNt^{Asn} et de l'AdT de *P. aeruginosa*
2. Détermination de la demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn} et de l'Asn-ARNt^{Asn}
3. Mesure des constantes cinétiques de l'AdT pour son substrat Asp-ARNt^{Asn} (K_m), et pour des inhibiteurs analogues à l'aa-ARNt (K_i)

3 Méthodologie :

3.1 Stratégie de surexpression de l'AdT de *P. aeruginosa* chez *E. coli*

3.1.1 Isolation du plasmide pUCPSK/*gatBCA*

Des séquences codant pour 8 histidines ont été placées du côté 5' des gènes *gatB* et *gatC* (Figure 14.A). Ensuite, les gènes *gatA*, *gatB* et *gatC* sont clonés dans le plasmide pUCPSK et introduits dans la souche *P. aeruginosa* ADD1976 (Akochy et al., 2004). À l'aide du «High pure isolation kit» fourni par Quiagen, nous avons isolé 10 µg de plasmide à partir de 10 ml de culture bactérienne. Les cellules d'une culture de nuit de *P. aeruginosa* ADD1976 contenant le plasmide pUCPSK/(His)*sgatB*(His)*sgatCA* sont récoltées par centrifugation pendant 15 min à 13 000 rpm (15700 x g) dans une centrifugeuse de table. En suivant le protocole expérimental fourni avec cette trousse de Quiagen, de la lyse des cellules jusqu'à l'élution des plasmides, nous avons obtenu 10 µg de plasmides, que nous avons utilisés pour transformer des cellules d'*E. coli* (voir section 3.1.3).

3.1.2 Migration des acides nucléiques sur gel d'agarose :

Le gel d'agarose contient habituellement 1% d'agarose (1g d'agarose dans 100 mL de tampon TBE : Tris-base 0.1 M, acide borique 0.1 M et EDTA 2 mM pH 8,3). Les échantillons d'ADN, après l'addition du tampon de charge (EDTA 10 mM pH 8,0, xylène cyanol et bleu de bromophénol 0.025%) sont déposés dans les puits de gel et séparés pendant une heure de migration à 12 V/cm dans une solution de TBE. Les acides nucléiques sont colorés par une solution de bromure d'éthidium 0.5 µg/mL, lavés avec de l'eau bidistillée et visualisés sous UV.

3.1.3 Transformation des cellules compétentes de *E. coli* par le plasmide pUCPSK/*gatBCA*

Une solution de 10 µL contenant 1 µg de plasmide pUCPSK/*gatBCA* (Figure 14.A) purifié précédemment est ajoutée à 300 µL d'une suspension de cellules d'*E. coli* BL21 (DE3) à haute compétence (Novagen). Les cellules sont mises sur la glace pendant 5 min, puis transférées à 42 °C pendant 30 secondes. Ensuite, les cellules sont mises sur la glace

pendant 2 min, transférées dans un milieu LB, et incubées à 37°C pendant une heure. Des aliquotes de 5 à 50 µL des cellules transformées sont étalées sur un milieu LB solide sélectif contenant 100 µg/mL d'ampicilline et laissées pendant une nuit à 37°C.

3.1.4 Clonage et surexpression de *gatCAB* de *P. aeruginosa* chez *E. coli*

Les cellules transformées sont tout d'abord repiquées dans 5 ml de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline et incubées à 37°C sous une agitation de 300 rpm pour toute la nuit. Par la suite, 1 ml de chaque culture est transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et une nouvelle isolation du plasmide est faite comme précédemment (3.1.1).

Les plasmides isolés sont soumis à une simple et à une double digestion. On ajoute à l'ADN à digérer les éléments suivants : 1 µl de tampon approprié à l'enzyme utilisée, 1 µl de BSA 1 mg/mL, 0,1 unité de chaque endonucléase de restriction (KpnI et XbaI) par µg d'ADN à digérer et de l'eau distillée stérile pour un volume total de 10 µL. La digestion de l'ADN s'effectue à 37 °C pendant deux heures. Les tailles des vecteurs et de l'insert obtenus par digestion sont vérifiées par une migration électrophorétique sur un gel d'agarose de 1 % en présence d'un marqueur d'ADN de 1000 Kpb déposé avec les échantillons au début de la migration électrophorétique (Figure 14.B). La visualisation du gel par UV permet d'identifier les souches qui ont le plasmide pUCPSK avec l'insert *(His)₈gatB(His)₈gatCA* (Figure 14.B). Une culture de la souche qui contient le plasmide pUCPSK/*(His)₈gatB(His)₈gatCA* est faite dans un litre du milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline suivi d'une purification du protéine surexprimée (voir la purification de la protéines 3.4).

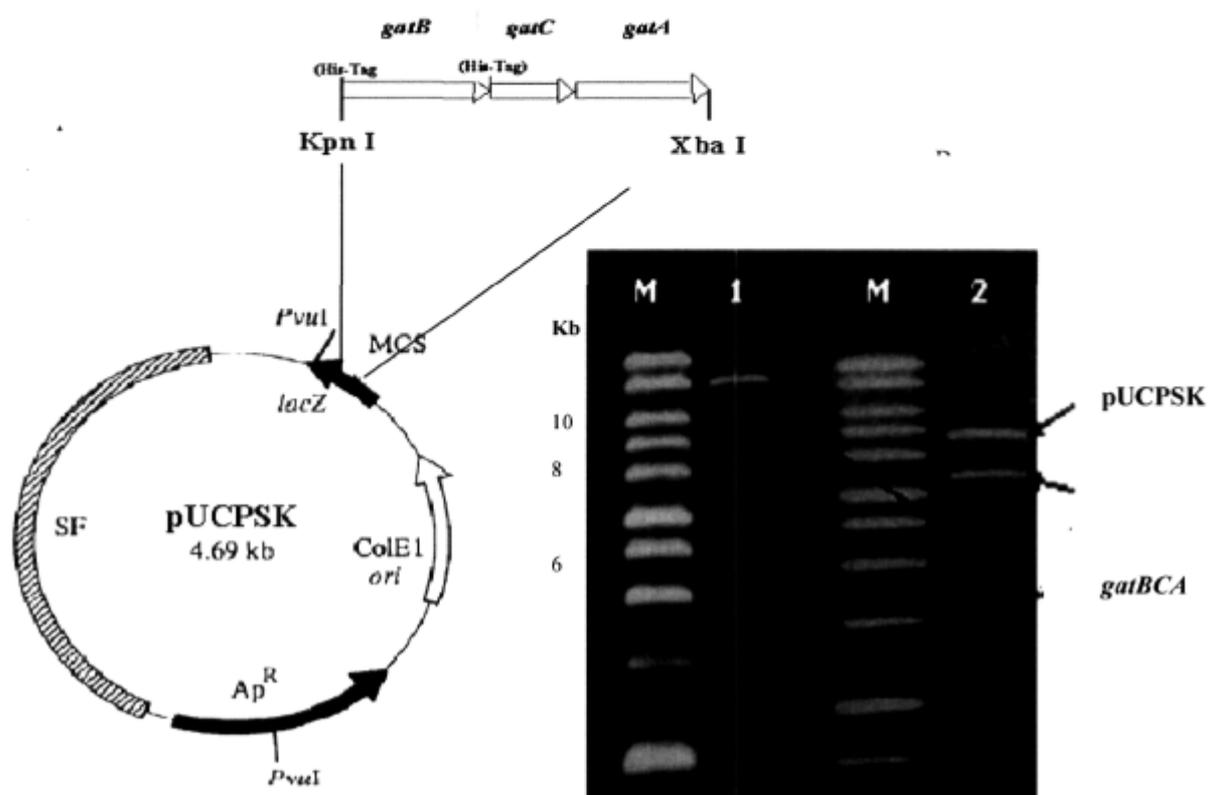


Figure 14 : Le plasmide pUCPSK/*gatBCA* : (A) Description du plasmide pUCPSK et l'emplacement de *gatBCA* entre Kpn I et Xba I, (B) électrophorèse sur un gel d'agarose 1% montre la taille du plasmide linéaire pUCPSK/*gatBCA* (1), le plasmide linéaire pUCPSK et l'insert *gatBCA* (2) et le marqueur d'ADN (M).

3.2 Stratégie de surexpression de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* chez *E. coli*

3.2.1 Clonage du gène de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa*

Le séquençage et le clonage du gène de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* ont été faits dans notre laboratoire par le Dr. Pierre-Marie Akochy. Le gène de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* a été cloné dans le plasmide pGFIB entre les deux sites de restrictions EcoR I et Pst I. Puis, le

plasmide portant le gène de l'ARNt^{Asn} (pGFIB/ARNt^{Asn}) est utilisé pour transformer des cellules d'*E. coli* DH5 α . Les cellules transformées, *E. coli* DH5 α /pGFIB/ARNt^{Asn}, sont tout d'abord repiquées dans 5 mL de milieu LB avec 100 μ g/mL d'ampicilline pour une incubation à 37°C et sous une agitation de 250 rpm pour toute la nuit. Par la suite, 1.5 ml de chaque culture sont transférés dans un tube Eppendorf de 1.5 ml et une nouvelle isolation du plasmide est faite comme précédemment (3.1.1). Ensuite une digestion des plasmides isolés par les enzymes de restrictions appropriés est faite dans les mêmes conditions que précédemment (3.1.2). La taille de l'insert est vérifiée par une migration électrophorétique sur un gel d'agarose 4 %

3.2.2 Surexpression de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* chez *E. coli*

Une mini-culture de la souche contenant le plasmide avec l'insert pGFIB/ARNt^{Asn} est faite dans 750 mL du milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline, suivi d'une purification de l'ARNt total (voir la purification de l'ARNt 3.3.1). Enfin, nous avons aminoacylé de l'ARNt purifié avec l'AspRS-ND pour vérifier le taux de chargement de l'ARNt^{Asn} surproduit.

3.3 Préparation de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* surexprimé chez *E. coli*

3.3.1 Purification de l'ARNt total

Une préculture de nuit à 37°C sous une agitation de 200 rpm de la souche *E. coli* DH5 α /pGFIB/ARNt^{Asn} dans un milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline est suivie d'une culture de 48 heures dans les mêmes conditions. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 7000 rpm dans un rotor Sorvall® GS3 (DuPont) pendant 15 min. La préparation de l'ARNt est faite par l'extraction au phénol en traitant le culot cellulaire dans un tampon de Tris-HCl 20 mM pH 7.9 avec un égal volume du phénol tamponné à pH 7.9 et sous une agitation magnétique pendant une heure à 4°C. La phase aqueuse qui contient les acides nucléiques est récupérée par centrifugation à 10 000 rpm à 4°C dans un rotor Sorvall® SA-600 pendant 30 min. Une deuxième extraction est effectuée sur la phase aqueuse avec un égal volume de phénol pH 7.9, comme précédemment. Ensuite, 1/3 du volume d'acétate de potassium 1M pH 5.0 et trois volumes d'éthanol 95% sont ajoutés à la

phase aqueuse pour précipiter les acides nucléiques. Les acides nucléiques précipités sont récupérés par centrifugation et séchés à la température de la pièce. Ils sont ensuite resuspendus dans une solution de NaCl 1 M, puis conservés à la température de la pièce pendant une heure afin de permettre la précipitation des gros ARN et de l'ADN contaminant. Les petits ARN sont précipités à l'éthanol 95% à -80°C pendant 30 min ou à -20°C pendant une nuit. Les petits ARN sont recueillis par centrifugation et resuspendus dans une solution de Tris-HCl 20 mM pH 7.0. À ce stade, nous purifions les ARNt en utilisant une colonne QIAGEN-tip 100-500 (QIAGEN Inc., Valencia, CA) comme suit :

- a) Pré-équilibrer la colonne (QIAGEN-tip) avec 10 volumes de colonne du tampon E (Tris-HCl 20 mM pH 7.0 et isopropanol 15 %);
- b) Laver la colonne avec 5 volumes du tampon 2 (Tris-HCl 20 mM pH7.0);
- c) Déposer l'ARNt préparé précédemment sur la colonne QIAGEN-tip 100-500 pré-équilibrée;
- d) Laver la colonne avec 10 volumes du tampon 3 (Tris-HCl 20 mM pH7.0 et NaCl 0.2 M);
- e) L'ARNt est élué avec 4 volumes du tampon 4 (TrisHCl 20 mM pH 7.0, NaCl 0.7 M et éthanol 15%);
- f) La colonne est régénérée par 5 volumes du tampon R (TrisHCl 20 mM pH 7.0 et NaCl 1.8 M) pour les prochaines purifications.

La pureté de l'ARNt est estimée sur un gel de 12% acrylamide-bisacrylamide (29/1) dénaturant et urée 8 M.

3.3.2 Activation des ARNt

Certains ARNt se trouvent sous une forme inactive après leur purification (Madore et *al.*, 1999). L'activation de ces ARNt se fait à 65°C pendant 30 min en présence de MgCl₂ 10 mM. Ensuite, le mélange est refroidi à la température de la pièce.

3.3.3 Mesure de la concentration de l'ARNt

La détermination de la concentration des ARNt se fait par la formule suivant :

$$C = b \times (a \text{ DO}_{260} \times 1660 \text{ pmoles/ DO}_{260})/\text{mL}$$

(a : la valeur trouvée par le spectrophotomètre et b : facteur de dilution)

C est en pmoles d'ARNt/mL.

3.3.4 La conservation des ARNt

L'ARNt total est conservé dans une solution de MgCl₂ 10 mM, DTT 2 mM et Tris-HCl 40 mM à -20 °C.

3.4 Purification des protéines

3.4.1 Culture cellulaire

Une pré-culture de nuit est faite à 37°C et sous agitation à 300 rpm des souches de *P. aeruginosa* ADD1976 contenant le plasmide pUCPSK/*aspS(His)₈*, ou de 250 rpm d'*E. coli(BI21)* contenant le plasmide pUCPSK/*(His)₈gatB(His)₈gatCA* dans un milieu LB contrôlé par la carbénécilline (250 µg/ mL) ou l'ampicilline (100 µg/ mL) respectivement. Cette pré-culture est suivie d'une culture de jour dans les mêmes conditions comme précédemment, jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO₅₉₀) de 0.4. À ce stade nous ajoutons de l'IPTG pour induire la surproduction de la protéine, dont le gène est exprimé sous le contrôle du promoteur T7. Par la suite, les cellules sont collectées par centrifugation quatre heures après l'induction et congelées immédiatement à -80°C.

3.4.2 Lyse cellulaire

Le culot cellulaire est resuspendu dans le tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM, imidazole 5 mM, NaCl 0.5 M et trois comprimés d'inhibiteurs de protéases " Complete Mini, EDTA-Free"(Roche) sont ajoutés. La lyse des cellules se fait au sonicateur de modèle Virsonic 420 muni d'une sonde. Subséquemment, le surnageant est récupéré par centrifugation à 10000 rpm à 4°C dans un rotor Sorvall® SA-600 pendant une heure, et filtré sur une membrane

dont les pores ont environ 0.45 μm (Corning).

3.4.3 Purification des protéines surproduites, par chromatographie sur une colonne de Ni-NTA (Figure 15)

Une colonne de Ni-NTA-superdex d'agarose (Qiagen) a été préparée par sédimentation jusqu'à l'obtention du volume désiré. Ensuite, la colonne a été lavée par trois volumes d'eau stérile, puis 3 volumes du tampon de charge formé du sulfate de nickel 100 mM ont été ajoutés à la colonne. Par la suite, la colonne a été équilibrée par le tampon de lavage (imidazole 5mM, NaCl 0.5 M et Tris-HCl 20 mM pH 7.5). À ce stade, nous déposons l'extrait cellulaire sur la colonne. Puis, il y a cinq lavages successifs par trois volumes de chacun des tampons suivants: T1 (NaCl 0.5 M, de Tris-HCl 20 mM et imidazole 5 mM); T2 (NaCl 0.5 M, de Tris-HCl 20 mM et imidazole 15 mM); T3 (NaCl 0.5 mM, de Tris-HCl 20 mM et imidazole 30 mM); T4 (NaCl 0.5 M, de Tris-HCl 20 mM et imidazole 45mM), et T5 (NaCl 0.5 M, de Tris-HCl 20 mM et imidazole 65 mM). Enfin, les protéines sont éluées par 5 volumes du tampon E (imidazole 200 mM, NaCl 0,5 M et Tris-HCl 20 mM).

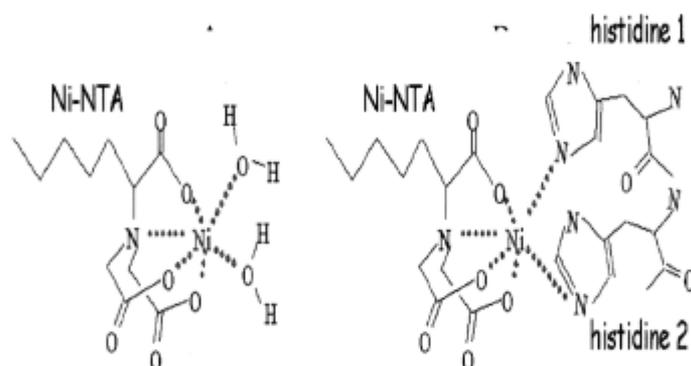


Figure 15: Structure d'une colonne de Ni-NTA : (A) Ni-NTA en liaison avec deux molécules d'eau et (B) Ni-NTA en liaison avec deux histidines dans une chaîne polypeptidique.

Les fractions riches en protéines recherchées sont identifiées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

3.4.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Cette technique permet d'évaluer la pureté et le poids moléculaire apparent des protéines (Weber et *al.* 1969). Le gel de polyacrylamide est un copolymère constitué d'un gel de concentration à faible maillage qui permet la concentration des protéines et un gel de résolution qui permet ensuite la séparation des protéines les unes des autres en fonction de leurs poids moléculaires apparents. Le gel de concentration est formé à l'aide de 680 μ L de solution d'acrylamide-bisacrylamide 29/1, 500 μ L Tris HCl 1.5 M pH 6.8, 40 μ L SDS 10%, 40 μ L d'ammonium persulfate 10% et 4 μ L du TEMED. Le gel de résolution est formé à l'aide de 3,2 mL de solution d'acrylamide/bis-acrylamide, 2 mL de Tris-HCl 1.5 mM pH 8,8, 1 mL d'eau, 80 μ L SDS 10%, 80 μ L de persulfate d'ammonium 10% et 4.6 μ L de TEMED. Une fois coulée, la solution qui formera le gel de séparation est recouverte par de l'isopropanol afin de rendre le haut de gel parfaitement rectiligne. Après la polymérisation, l'isopropanol est enlevé et le gel est rincé par l'eau. Ensuite, le pré-gel ("stacking") est ajouté. La migration des protéines se fait à 12 V/cm pendant une heure. La coloration du gel se fait dans une solution de bleu de Coomassie 0.25% pendant 30 minutes. Enfin, le gel est transféré pour la décoloration dans une solution d'acide acétique : méthanol : eau (5 : 1 : 1) pendant 30 minutes. Les extraits jugés riches en protéines éluées ont été rassemblés dans un tube de filtrations 10 K, en éliminant l'imidazole par filtration, en le remplaçant par le tampon phosphate (phosphate 50 mM pH 7 et NaCl 150 mM) pour la prochaine étape. L'élimination d'imidazole se fait par une filtration et une dilution par le tampon phosphate, suite à plusieurs centrifugation à 4 °C des tubes 10K contenant les fractions des protéines pendant 15 min dans le rotor HS-4 à 4000 rpm.

3.4.5 Purification par filtration sur gel d'une colonne "Superdex 200" à l'aide d'un appareil FPLC d'une fraction de protéines purifiées par chromatographie d'affinité

Cette technique permet de séparer les protéines selon leurs tailles et leurs formes. La phase stationnaire de la colonne est formée des billes d'un gel d'agarose et du dextrane. Les protéines qui ont des tailles supérieures à celles des pores sont exclues du gel et sont éluées dans un volume mort. La colonne a une limite d'exclusion de 300 KDa. Les protéines de petites tailles sont éluées et séparées dans des volumes de tampon de phosphate. Nous avons réussi à séparer tous les contaminants présents dans les fractions obtenues par

chromatographie d'affinité Ni-NTA. Les fractions contenant les protéines pures sont estimées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 12% (SDS-Page).

3.4.6 La concentration et la conservation des protéines

Les extraits jugés riches en protéines éluées ont été rassemblés en utilisant des tubes de filtration 10K, en éliminant le tampon phosphate et en le remplaçant par le Na-Hepes 40 mM (voir 3.4.4). La détermination de la concentration des protéines se fait par la méthode de Bradford (Bradford et *al.*, 1976). Les protéines purifiées sont conservées à -20°C en présence de glycérol 50%, de DTT 3 mM et de Na-Hepes 40 mM pH 7.5.

3.5 Préparation de l'Asp-ARNt^{Asn}

L'aminocyclation est une réaction catalysée par une enzyme spécifique (aaRS) et utilisant trois substrats : l'ARNt, un acide aminé et de l'ATP. La réaction nécessite par ailleurs un ion Mg⁺⁺.

La réaction d'aminocyclation de l'ARNt^{Asn} se fait à 37°C pendant une heure dans le tampon suivant : Na-Hepes 50 mM pH 7.2, MgCl₂ 15 mM, KCl 25 mM, DTT 2 mM, et en présence d'ATP 1.3 mM, d'ARNt^{Asn}, de [¹⁴C]Asp 70µM et d'AspRS-ND 250 nM. Lorsque le plateau d'aminocyclation est atteint, nous ajoutons 1/3 de volume d'acétate de potassium 1 M pH 5,0 pour arrêter la réaction. Ensuite trois volumes de phénol/chloroforme sont ajoutés, on renverse le tube contenant la solution de 6 à 10 fois. Enfin, une centrifugation à 13000 rpm (15700 x g) est faite pendant 30 min. L'ARNt présent dans la phase aqueuse est précipité à l'éthanol 95% pendant 30 min à -80°C, puis la suspension est centrifugée pendant 45 min à 13 000 rpm (15700 x g). L'ARNt est séché puis resuspendu dans l'eau pour la réaction de transamidation. L'ARNt total contenant l'Asp-ARNt^{Asn} est ajouté au mélange réactionnel de transamidation.

3.6 Transamidation de l'Asp-ARNt^{Asn}

La réaction de transamidation se fait à 37 °C dans le tampon suivant: Na-Hepes 50 mM pH 7.2, MgCl₂ 15 mM, KCl 25 mM, DTT 2mM et en présence de l'ATP 1.3 mM, l'ARNt séparé précédemment enrichi de l'Asp-ARNt^{Asn}, glutamine 1.2 mM et de l'AdT 17.5 nM.

La durée de cette réaction est indiquée pour chaque résultat présenté. Ensuite nous ajoutons à chaque réaction de transamidation 1/3 du volume de KOH 1M pour arrêter la réaction. Par la suite, les tubes sont transférés à 37°C pendant 30 min pour désacyler tous les ARNt chargés, tels que l'Asp-ARNt^{Asp}, Asp-ARNt^{Asn} et l'Asn-ARNt^{Asn}. Enfin, 1 µL de cette solution est déposé sur un plaque de couche mince de cellulose LK2 (TLC) (20 cm x 20 cm) d'épaisseur 150 µm. Après la chromatographie ascendante dans le tampon : ammoniacque : éthanol (1 : 4), la plaque TLC est séchée sous la hotte à la température de la pièce, puis 1 µL de chaque solution d'une série standards du [14C]-Asp de concentration connue sont déposés sur la plaque TLC. Enfin, le chromatogramme est exposé sur la face active d'une plaque de Phosphorimager pendant 12 heures et chaque acide aminé radioactif sera détecté au comptage.

L'intensité de chaque tache de [¹⁴C]Asn formé par l'AdT est quantifiée par le logiciel "ImageQuant TL Toolbox" puis convertie en pmoles à partir de standard du [14C]Asp utilisé. Chaque asparagine formée correspond à un Asp-ARNt^{Asn} transamidé par l'AdT.

3.7 Mesure de l'inhibition de l'AdT par des analogues d'aa-ARNt

Nous avons testé trois inhibiteurs analogues au substrat Asp-ARNt de l'AdT de *P. aeruginosa* : la glutamycine, l'aspartycine et la sulfone. Ces trois inhibiteurs ont été synthétisés dans le laboratoire du Dr Robert Chênevert (département de chimie, Université Laval) et obtenus sous forme des cristaux. Ils sont purs à environ 95%. Les conditions de mesure de la constante d'inhibition (K_i) sont mentionnées dans la partie résultats et discussions (voir section 4.8)

4 Résultats et discussions :

4.1 Purification de l'ARNt total enrichi en ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* surproduit chez *E. coli*

Une culture de la souche d'*E. coli* DH5 α /pGFIB/ARNt^{Asn} est faite dans 8 L du milieu LB. En suivant les étapes de la purification comme décrites dans la méthodologie (3.3.1), nous avons réussi de purifier 40 mg d'ARNt total, ce qui correspond à 1mg d'ARNt total par 1 g de cellules. Cette quantité d'ARNt total contient 20% d'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa*. Afin de vérifier la pureté de la solution d'ARNt, des aliquotes de celle-ci sont déposées sur un gel d'acrylamide-bisacrylamide (29/1) 12% et 8M urée. La migration s'effectue dans un tampon de TBE sous une différence de potentiel de 100 V. L'ARNt est séparé par électrophorèse montre trois bandes : les deux bandes qui ont migré le plus loin correspondent à l'ARNt total, et la plus lente correspond aux ARNs contaminants (Figure 16).

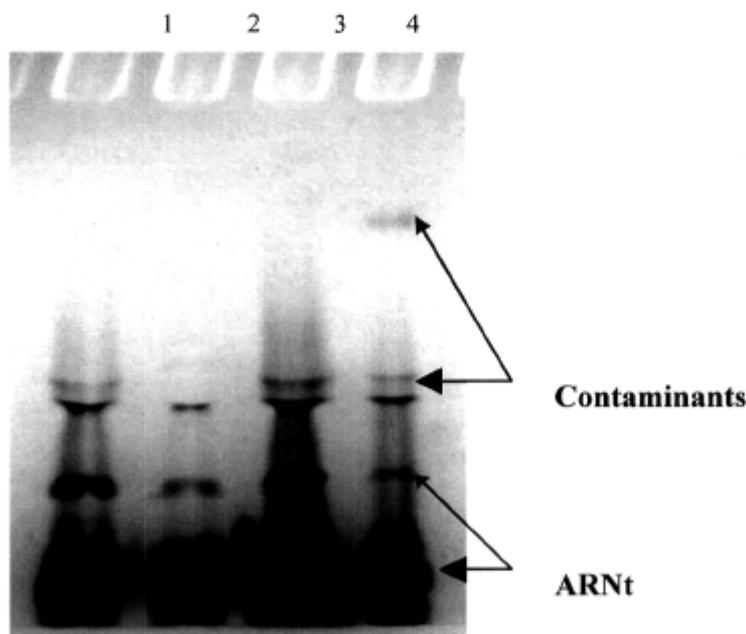


Figure 16: Électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dénaturant de diverses fractions d'ARNt : (1) ARNt total commercial d'*E. coli* (2) ARNt (ARNt^{Asn} *P. aeruginosa* et ARNt total d'*E. coli*) purifié par la colonne QIAGEN-tip 100-500 (3) ARNt total de *P. aeruginosa* purifié par la colonne QIAGEN-tip 100-500 (4) ARNt total de *P. aeruginosa* avant le passage par la colonne QIAGEN-tip 100-500

L'ARNt total d'*E. coli* enrichi par l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* purifiés doivent être activés (voir section 3.3.2) avant la réaction d'aminacylation.

4.2 Purification de l'AspRS-ND de *P. aeruginosa*

Le *P. aeruginosa* ADD1976 porteur du vecteur pUCPSK/*aspS* est utilisé pour la purification de l'AspRS-ND. Le gène *aspS* est sous le contrôle du promoteur T7 RNA polymérase inducible par l'IPTG qui permet la surproduction de l'AspRS.

Nous avons choisi le protocole de purification mis au point dans notre laboratoire pour purifier cette enzyme (voir méthodologie 3.4). Après deux étapes de purification l'AspRS-ND(His)₆ de *P. aeruginosa* est pure à presque 100% (Figure 17, puits 2).

La première étape est une chromatographie d'affinité sur une colonne de Ni-NTA. Nous avons remarqué l'existence d'un contaminant (36 KDa) qui a une affinité au Ni-NTA semblable à celle de l'AspRS (Figure 17, puits 1). Ce contaminant n'a aucun effet sur l'aminacylation de l'ARNt^{Asn} par l'AspRS (Akochy, 2004). Dans cette étape, nous avons une surproduction de 6 mg d'AspRS-ND par 20 g de cellules.

La deuxième étape est une purification par chromatographie sur un gel de filtration "superdex-200" à l'aide d'un appareil FPLC. Nous avons réussi à purifier l'AspRS-ND à l'homogénéité (Figure 17, puits 2). L'AspRS-ND purifiée dans cette étape est de l'ordre de 4 mg par 20 g de cellules. Il y a une perte de 2 mg d'enzymes dans cette préparation. Elle est due à l'élimination du contaminant et de l'AspRS-ND perdu pendant la filtration.

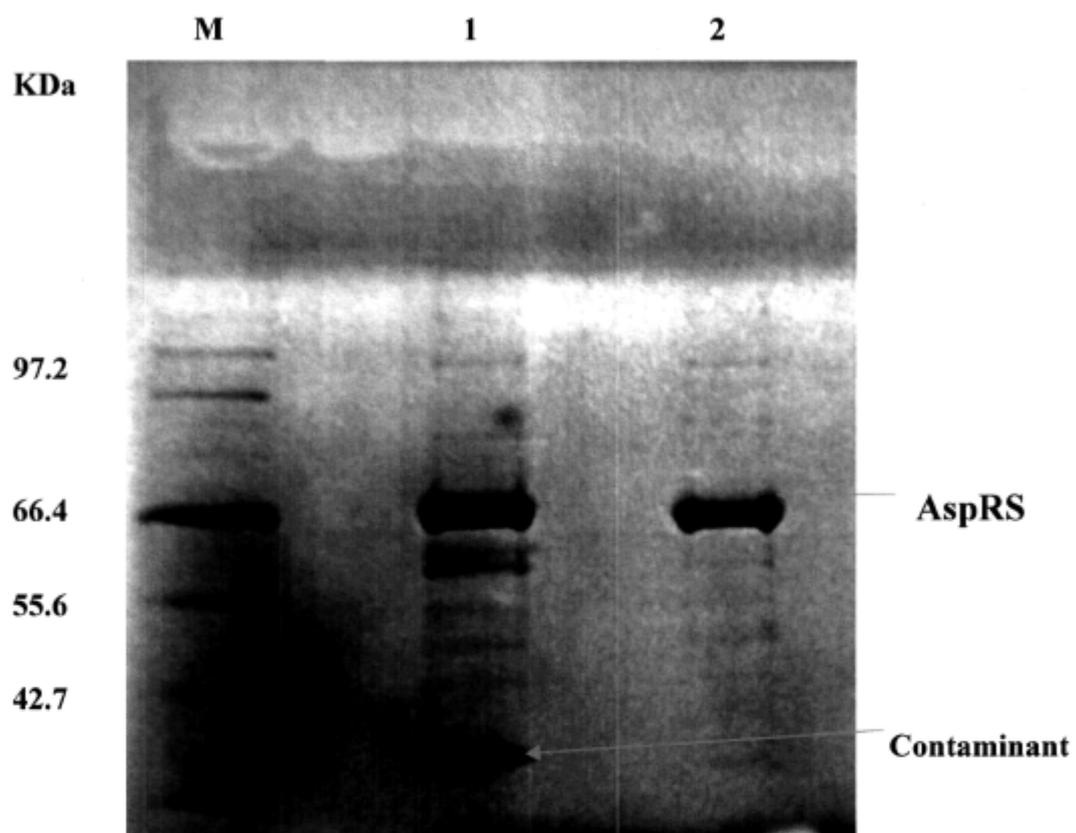


Figure 17: Électrophorèse (SDS-PAGE 10%) de fractions d'AspRS-ND purifiées par :

- (1) chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA
 - (2) chromatographie d'affinité Ni-NT suivie d'une filtration sur gel "Superdex-200" à l'aide d'un appareil FPLC
- (M) marqueur de poids moléculaire

4.3 L'aminacylation de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa*

La réaction d'aminacylation, quantifiée in vitro en utilisant l'acide aminé radioactif, permet de déterminer les paramètres suivants: le taux de chargement de l'ARNt avec l'aspartate, et la préparation du substrat Asp-ARNt^{Asn} pour la caractérisation de l'AdT.

Le taux de charge représente l'équilibre entre la forme aminacylée et non aminacylée de l'ARNt. Cet équilibre dépend des vitesses d'aminacylation, de désacylation spontanée et enzymatique, et de la réaction inverse (Bonnet et *al.*, 1972).

Les conditions optimales d'aminacylation de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* se font dans le mélange réactionnel comme décrit dans la section de méthodologie (3.5). Les tests sont réalisés à 37 °C dans un volume final de 500 µL avec une quantité adéquate d'ARNt^{Asn} (100 µM). Dans ces conditions, la durée d'une réaction d'aminacylation de l'ARNt^{Asn} par l'AspRS-ND (250 nM) est d'environ 60 min pour atteindre un plateau de charge d'environ 20 % d'Asp-ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* et 5% d'Asp-ARNt^{Asn} et Asp-ARNt^{Asp} d'*E. coli* par rapport à l'ARNt total (Figure 18). Ensuite, nous isolons l'ARNt chargé et libre par extraction au phénol/chloroforme (voir méthodologie 3.5).

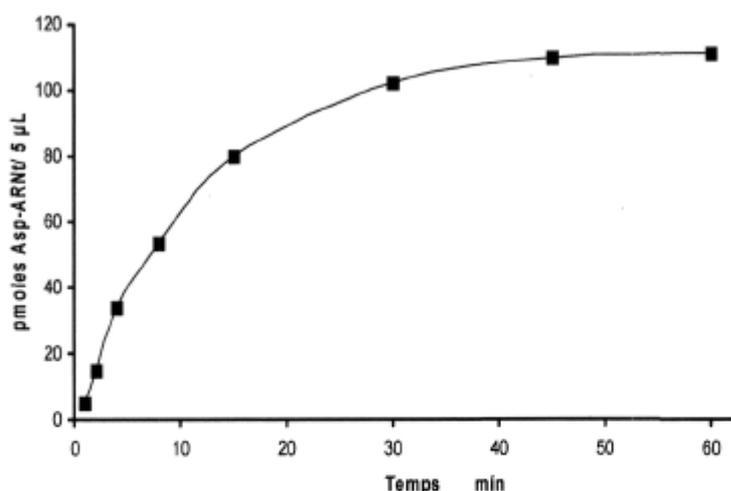


Figure 18 : Test d'aminacylation de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* par l'AspRS-ND

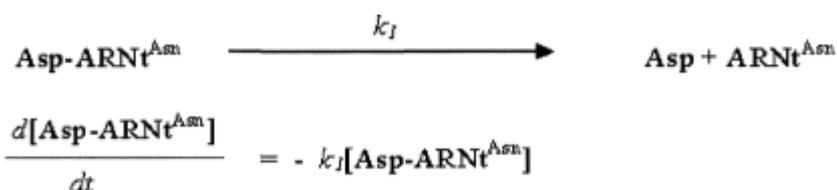
Le plateau de charge de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* est atteint après 30 min d'incubation à 37°C. Le taux d'aminacylation de l'ARNt^{Asn} aspartylé est de l'ordre de 25% de l'ARNt total.

4.4 La demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn}

Il est important de connaître la demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn} avant de mesurer les constantes cinétiques de l'AdT. L'Asp-ARNt^{Asn} est le produit formé par l'AspRS au cours d'un test d'aminacylation. Un aspartate est fixé sur un ARNt^{Asn}, ce qui est une exception dans la nature (voir l'introduction). Nous avons trouvé la valeur de la demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn} dans les conditions suivantes : après une aminacylation de l'ARNt^{Asn} par l'aspartate (voir méthodologie) nous avons séparé l'ARNt par phenol/chloroforme puis sur une colonne G25 pour le débarrasser de l'ATP et l'acide aminé libre. En suite 600 pmoles d'ARNt total contenant 150 pmoles d'ARNt chargés (Asp-ARNt^{Asn}) sont mis dans un mélange réactionnel (Na-Hepes 50 mM pH 7.2, MgCl₂ 1mM, KCl 30 mM et DTT 2 mM) pendant 120 min à 37°C. Une aliquote de 25 µL est déposée sur un disque de papier de Whatman à chaque 20 min. Ensuite, ces derniers sont lavés trois fois dans une solution de TCA 5% à 0°C pour les débarrasser des acides aminés radioactifs libres, suivi d'un lavage à l'éthanol 95% pour éliminer le TCA. Enfin, les papiers Whatman sont séchés et passés au comptage par le compteur de la scintillation. La valeur de la demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn} est de 74 min (Figure 19). Cette valeur ressemble aux demi-vies des autres aa-ARNt chargés correctement (Dale et al., 2005). Le fait que cette demi-vie soit longue est favorable pour les mesures de cinétique de la réaction de transamidation

Méthode de mesure de la demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn} (Fersht et al., 1985)

Réaction irréversible :



$$\text{Log} [\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}]_t / [\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}]_0 = -k_1 t \longrightarrow [\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}]_t = [\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}]_0 e^{-k_1 t}$$

La demi-vie de la réaction, $t_{1/2}$, est le temps requis pour que :

$$[\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}] = [\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}]_0 / 2$$

$$[\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}]_0 / 2 = [\text{Asp-ARNt}^{\text{Asn}}]_0 e^{-k_1 t}$$

$$\frac{1}{2} = e^{-k_1 t_{1/2}} \longrightarrow t_{1/2} = 0.693 / k_1$$

k_1 est déterminé à partir de $t_{1/2}$ mesuré par cinétique :

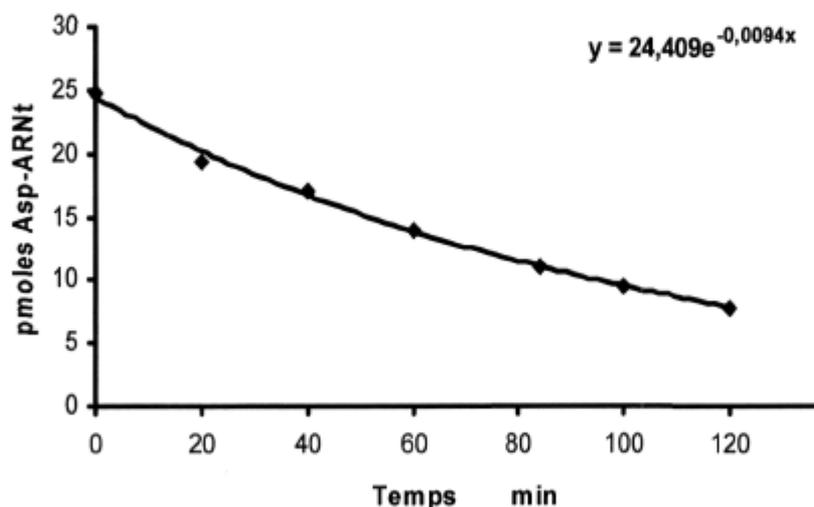


Figure 19: Mesure de la désacylation de l'Asp-ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* PAO1 au cours du temps

4.5 Surproduction de l'AdT de *P. aeruginosa*

L'AdT de *P. aeruginosa* est surexprimée chez *E. coli*, en raison des problèmes techniques rencontrés pendant l'utilisation de la souche de *P. aeruginosa* (sécrétion de polysaccharides). En utilisant la souche BI21/pUCPSK/(His)₈gatB(His)₈gatCA nous avons réussi à produire deux fois plus d'AdT (voir section suivante) qu'en utilisant la souche *P. aeruginosa* ADD1976/pUCPSK/(His)₈gatB(His)₈gatCA. Cette enzyme n'est pas toxique pour la bactérie comme l'est l'AspRS-ND. Le gène (His)₈gatB(His)₈gatCA est sous le contrôle du promoteur T7 RNA polymérase inductible par l'IPTG qui permet la surproduction de l'AdT.

4.6 Purification de l'AdT de *P. aeruginosa*

Nous avons choisis le protocole de purification mis au point dans notre laboratoire pour purifier l'AdT (voir méthodologie 3.4). L'AdT de *P. aeruginosa* est purifié en deux étapes et donne des fractions qui sont pures à presque 100%. Tout d'abord, nous avons purifié l'AdT par chromatographie d'affinité sur une colonne de Ni-NTA (Figure 20.A). Ensuite,

nous faisons une purification par chromatographie sur un gel de filtration "superdex-200" sur un appareil FPLC. Nous avons réussi à purifier l'AdT à l'homogénéité (Figure 20.B). La quantité de l'AdT de *P. aeruginosa* purifiée chez *E. coli* est 0.4 mg de protéine pure par 1 g de cellules.

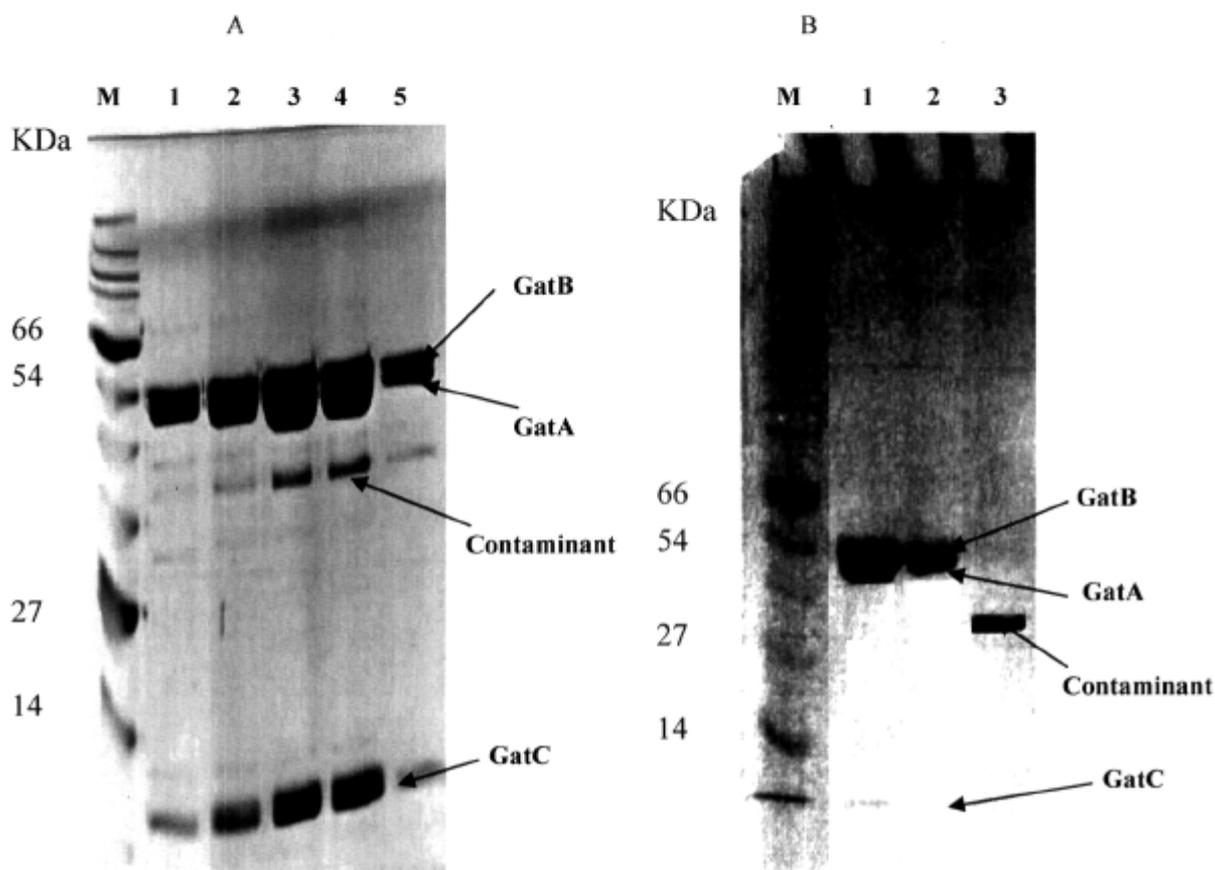


Figure 20: Électrophorèse (SDS-PAGE 10%) de fractions de l'AdT de *P. aeruginosa* purifiées chez *E. coli* (*BL21*). **(A)** Par chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA. Les fractions 1 à 5 ont été éluées à l'aide des concentrations croissantes d'imidazole, 1 : 70 mM, 2 : 80 mM, 3 : 90 mM, 4 : 100 mM, 5 : 150 mM. **(B)** Par chromatographie sur un gel de filtration "Superdex 200". Deux pics de densité optique à 280nm ont été observés dans l'éluât. Comme le système d'enregistrement de la DO était défectueux sur notre appareil, des fractions correspondant à la première et à la deuxième partie du premier pic élué (fractions 1 et 2) et au deuxième pic élué séparément plus tard (fraction 3) ont été récoltées. M : marqueur de poids moléculaire, les fractions : 1 et 2 : AdT, 3 : contaminant

4.7 Caractérisation de l'AdT de *P. aeruginosa*

4.7.1 Test d'activité de l'AdT

Le premier test d'activité de l'AdT de *P. aeruginosa* a été fait en 2004 dans notre laboratoire (Akochy *et al.*, 2004). Lors de mes premiers tests d'activité de l'AdT, j'ai utilisé la méthode de Jahn *et al.*, (1990) pour mesurer la quantité d'asparagine formé lors de la réaction de transamidation. Cette méthode, qui consiste à isoler les aa-ARNt, à les désacyler, et à isoler et quantifier les acides aminés formés après chaque test de transamidation, ne permet pas une quantification précise de l'asparagine formé. Nous avons remarqué que lors de l'isolation des aa-ARNt par précipitation à l'éthanol, une partie de l'asparagine formée par l'AdT est perdue (Figure 23).

L'activité de l'AdT est testée, en suivant la nouvelle méthode de transamidation (méthodologie) où il y a un dépôt de 1 μ L de tout le mélange réactionnel de l'AdT sans séparation de l'ARNt. Cette méthode a porté fruit parce que toute l'asparagine formé (libre et lié à l'ARNt^{Asn}) par l'AdT pendant la réaction de transamidation se trouve séparer de l'aspartate pendant la migration dans un tampon basique (Figure 21.A).

La quantité d'asparagine formée par l'AdT augmente au début de l'incubation et reste constante après 15 minutes formant ainsi un plateau (Figure 21.B). De plus nous avons remarqué au cours des tests de l'AdT que la quantité d'asparagine formée dans la réaction de transamidation ne dépasse pas 50 % de l'Asp-ARNt^{Asn} déposé dans la réaction de transamidation. L'explication de cette différence n'est pas connue.

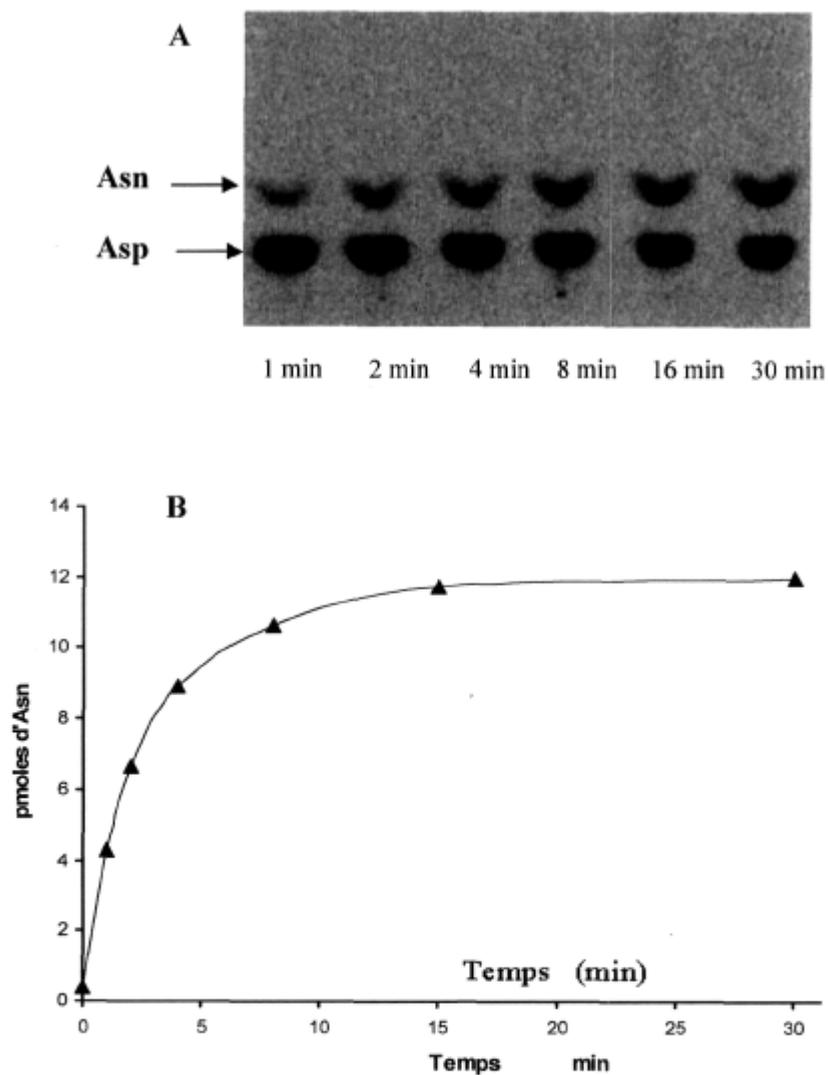


Figure 21: Test d'activité de l'AdT

A : des taches d'aspartate et d'asparagine séparés par chromatographie

B : la quantité d'asparagine formée au cours du temps

4.7.2 Influence de l'AspRS-ND sur la stabilité de l'Asp-ARNt^{Asn}

Dans les premiers tests de transamidation de l'Asp-ARNt^{Asn}, nous avons remarqué que le produit formé par l'AdT (Asn-ARNt^{Asn}) n'est pas stable au cours du temps lorsqu'on sépare l'ARNt par le phénol/chloroforme après la transamidation. L'asparagine est disparue après quelques minutes de transamidation (Figure 22.B). L'idée d'ajouter l'AspRS dans le mélange réactionnel de transamidation a porté fruit. Nous avons remarqué que le niveau d'asparagine formé par l'AdT reste élevé plus longtemps (Figure 22.C). L'asparagine formée par l'AdT pendant la réaction de transamidation se trouve désacylée. La séparation de l'asparagine de l'aspartate par chromatographie sans séparation de l'ARNt par le phénol/chloroforme après la réaction de transamidation (Figure 22. A) a montré que le niveau d'asparagine détecté est plus élevé que par les autres méthodes (Figure 22.B et C).

Pour montrer que l'AspRS a une influence sur la stabilité de l'Asp-ARNt^{Asn}, nous avons fait le test suivant : six tube d'Eppendorf (1 mL) contenant chacun, 14 pmoles d'ARNt total contenant 2.8 pmoles d'Asp-ARNt^{Asn} sont mis dans un mélange réactionnel (Na-Hepes 50 mM pH 7.2, MgCl₂ 1mM, KCl 30 mM et DTT 2 mM) et cinq concentrations différentes d'AspRS-ND pendant 30 min à 37 °C. Ensuite deux aliquotes de chaque tube de 10 µL aux temps 0 min et 30 min sont déposés sur des papiers de Whatman. Les résultats obtenus par le compteur à scintillation montrent que l'AspRS n'a aucun effet sur la stabilité de l'Asp-ARNt^{Asn} (Figure 23). Le taux des ARNt désacylés est le même dans les six tubes.

Dans le mélange réactionnel de transamidation, l'AspRS-ND protège l'Asn-ARNt^{Asn} en présence de l'AdT. Bailly en 2007 a montré que ces deux enzymes font un complexe en présence de l'ARNt^{Asn} (Bailly *et al.*, 2007). Cette protection de l'Asn-ARNt^{Asn} par les deux enzymes n'est pas totale. Le taux de l'Asn-ARNt^{Asn} en présence de l'AspRS n'atteint pas le niveau optimal (Figure 22.C). Cette désacylation rapide est soit causée par la présence de l'AdT, soit due aux propriétés de l'Asn-ARNt^{Asn} seule.

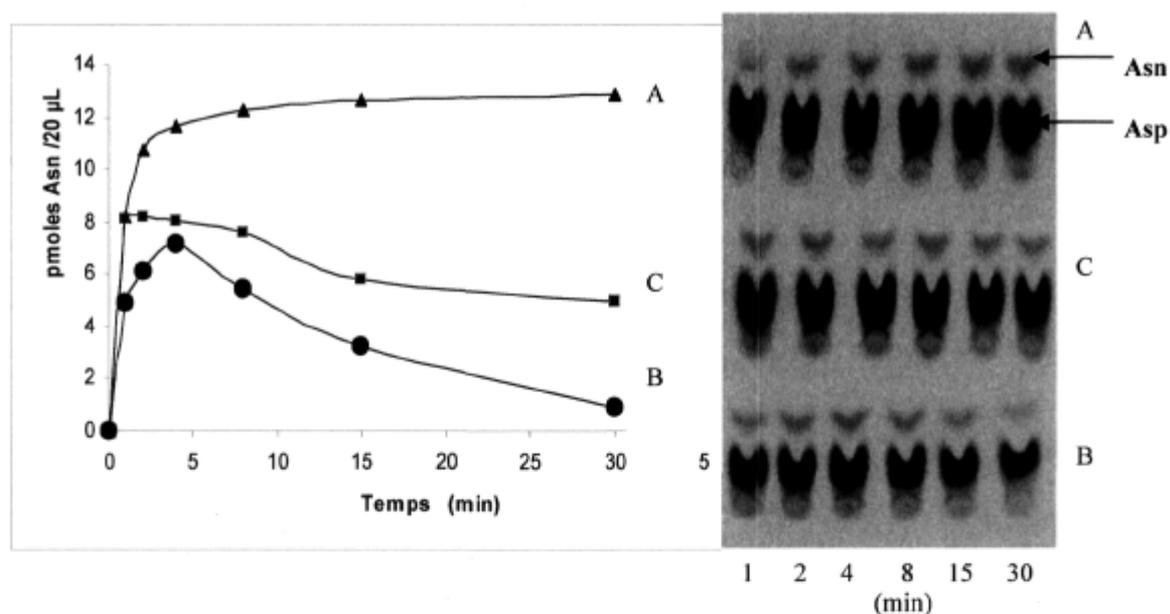


Figure 22 : Quantification du taux d'asparagine formé par l'AdT. (A) sans séparation de l'Asn-ARNt^{Asn} par le phénol/chloroforme après la réaction de transamidation, (B) séparation de l'Asn-ARNt^{Asn} par le phénol/chloroforme après la réaction de transamidation, (C) Addition de l'AspRS-ND (200 nM) dans le mélange réactionnel et séparation de l'Asn-ARNt^{Asn} par le phénol/chloroforme après la réaction de transamidation

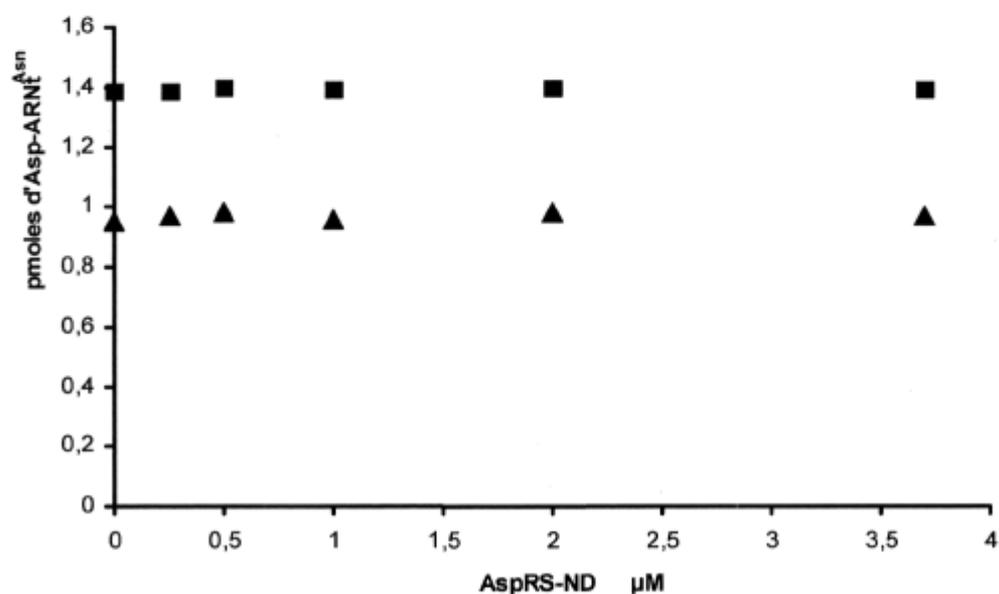


Figure 23: Influence de l'AspRS-ND sur la stabilité de l'Asp-ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* PAO1 (■ 0 min et ▲ 30 min)

Nous avons choisi les quatre derniers points de la figure 23 pour déterminer la demi-vie de l'Asn-ARNt^{Asn} en présence et en absence de l'AspRS-ND. Ce résultat montre que la demi-vie de l'Asn-ARNt^{Asn} est augmentée de 30 min en présence de l'AspRS (Figure 24).

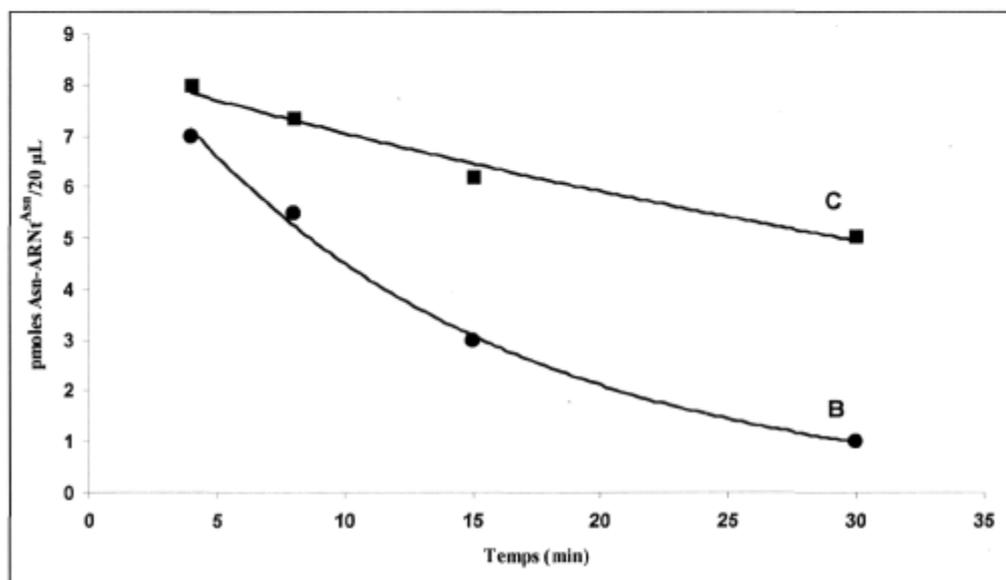


Figure 24: La demi-vie de l'Asn-ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa*

(B) en absence de l'AspRS-ND : 9 min

(C) en présence de l'AspRS-ND : 39 min

4.7.3 Les constantes cinétiques de l'AdT

Dans cette partie, nous avons déterminé la K_m de l'AdT pour le substrat Asp-ARNt^{Asn} ainsi que la k_{cat} et la V_m . Nous avons choisi l'Asp-ARNt^{Asn} comme substrat de premier ordre parce que nous voulons tester les inhibiteurs synthétisés dans le laboratoire du professeur Robert Chênevert (département de chimie, Université Laval). Ces inhibiteurs ressemblent au substrat Asp-ARNt^{Asn} de l'AdT.

4.7.3.1 Mesure de la K_m pour l'Asp-ARNt

Après la purification totale de l'AdT et la surexpression de l'ARNt^{Asn} nous avons décidé de caractériser l'AdT. En variant les concentrations de l'Asp-ARNt^{Asn} et à concentration saturantes des autres substrats de l'AdT (ATP et Gln), nous avons trouvé à chaque mesure une vitesse initiale (ou V_0) calculé par la pente de la droite (Figure 25). Ensuite une mesure de V_0 en fonction de la concentration de l'Asp-ARNt^{Asn} est faite, selon une mesure par régression linéaire (Lineweaver-Burk) (Figure 26) donné par le programme "kinetics-Enzyme". La valeur de K_m pour l'Asp-ARNt^{Asn} est $0.93 \mu\text{M} \pm 0.11 \mu\text{M}$, cette valeur est déterminée par une mesure cinétique de la formation d'asparagine par l'AdT en présence de différentes concentrations de l'Asp-ARNt^{Asn}. La valeur de l'erreur ($0.11 \mu\text{M}$) est estimée d'après la régression d'une seule série de donnée. La valeur de K_m ressemble aux autres valeurs obtenues pour des Asp-AdT d'autres bactéries (Sheppard et al., 2007) (voir tableau 6).

4.7.3.2 Mesure de la V_m pour l'Asp-ARNt

La vitesse maximale est obtenue par la mesure de Lineweaver-Burk (Figure 26.B). La valeur de V_m est de l'ordre de $0,84 \mu\text{mole}/\text{min} \pm 0,42 \mu\text{mole}/\text{min}$, en présence de 0.0175 micromole d'AdT. La valeur V_m ($0,84$) et l'erreur sont obtenues par régression linéaire donné par le programme "kinetics-Enzyme".

4.7.3.3 Mesure de la k_{cat}

La valeur de la constante catalytique ou k_{cat} est déduite à partir de la formule suivant :

$$V_m = k_{cat} \times [E_t] \quad \longrightarrow \quad k_{cat} = \frac{V_m}{[E_t]} = \frac{0,84 \pm 0,42}{0,0175 \pm 0,01} = 0,8 \text{ s}^{-1} \pm 0,35 \text{ s}^{-1}$$

V_m : la vitesse maximale (micromole/min)

$[E_t]$: la concentration de l'AdT mise dans les réactions de transamidation (micromole). Cette valeur est déterminée par la méthode de Bradford. La valeur de l'erreur est estimée de la moyenne d'une série de concentrations de l'AdT donnée par l'équation de Bradford.

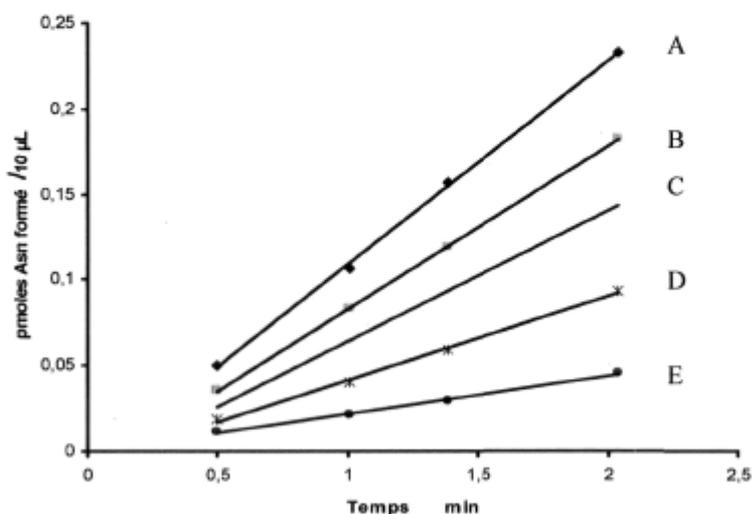


Figure 25 : Mesures de l'activité de l'AdT en présence de différentes concentrations de l'Asp-ARNt^{Asn} : (A) 5.3 µM, (B) 4 µM, (C) 2.7 µM, (D) 1.3 µM et (E) 0,67 µM.

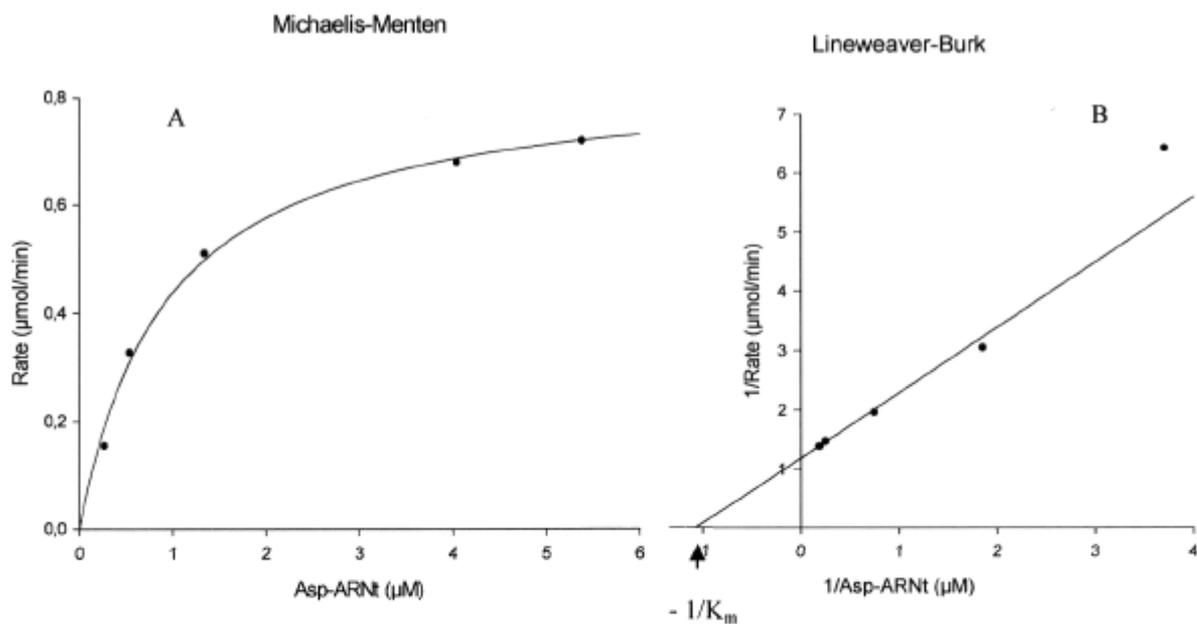


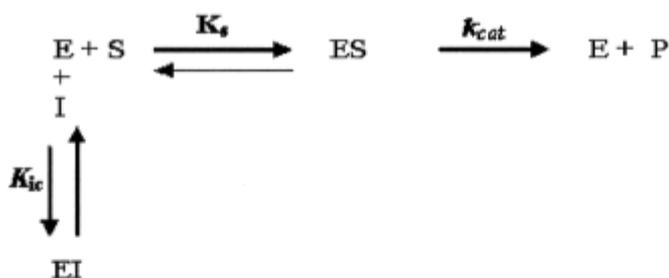
Figure 26 : Mesure de la K_m de l'AdT de *P. aeruginosa* pour l'Asp-ARNt^{Asn}, et de la V_m de la réaction de transamidation. (A) Représentation de Michaelis-Menten et (B) Représentation de Lineweaver-Burk

4.8 Les inhibiteurs de l'AdT

Les paramètres cinétiques permettent de préciser le spectre d'inactivation de l'AdT et l'on pourra comme pour toute enzyme, rechercher la constante d'inhibition K_i (μM) de différents inhibiteurs testés.

Tous les inhibiteurs (asparticine, glutamycine et sulfone) sont synthétisés par Christian Balg dans le laboratoire du Dr Robert Chênevert (département de chimie à l'université Laval), et ressemblent aux substrats Asp-ARNt^{Asn} ou Glu-ARNt^{Gln} de l'AdT. Nous avons considéré ces inhibiteurs comme des inhibiteurs compétitifs. Un inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le **substrat** et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le même site enzymatique (= effet iso-stérique). La réaction enzymatique est bloquée, soit parce que l'inhibiteur ne possède pas le groupement chimique transformé par l'enzyme, soit parce que la position de groupement chimique sur l'inhibiteur rend impossible sa reconnaissance par le **site actif**.

Le schéma et l'équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition compétitive s



La constante K_{ic} de tous les inhibiteurs testés est trouvé par la formule suivante :

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{V_m \times S}{S + K_m} & \text{et } v_i &= \frac{V_m \times S}{S + K_m(1+I/K_{ic})} \\
 \frac{v_i}{v} &= \frac{S + K_m}{S + K_m(1+I/K_{ic})} & \text{si } K_m = S &\longrightarrow \frac{v}{v_i} = \frac{I}{2K_{ic}} + 1 \\
 \text{d'où } I &= -2K_{ic} & \text{lorsque } v/v_i &= 0
 \end{aligned}$$

À partir d'une représentation graphique de V/V_i en fonction de la concentration de l'inhibiteur ($[Inhibiteur]$), nous pouvons déterminer la constante d'inhibition compétitive K_{ic} . Cette constante d'inhibition est exprimée en mole par litre correspond aussi à la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

Les conditions que nous avons utilisées pour tous les tests d'inhibitions sont les suivantes : Na-Hepes 50mM pH 7.2, MgCl 15mM, KCl 30 mM, DTT 2mM, ATP 1.3 mM, Gln 1.66 mM, Asp-ARNt^{Asp} 1 μ M, AdT 17.5 nM et différentes concentrations de l'inhibiteur.

4.8.1 La glutamycine

La glutamycine est un composé chimique de structure semblable au Glu-ARNt (Figure 10.A). La valeur de K_{ic} est trouvée après des tests cinétiques de l'AdT avec différents concentrations du glutamycine (Figure 26)

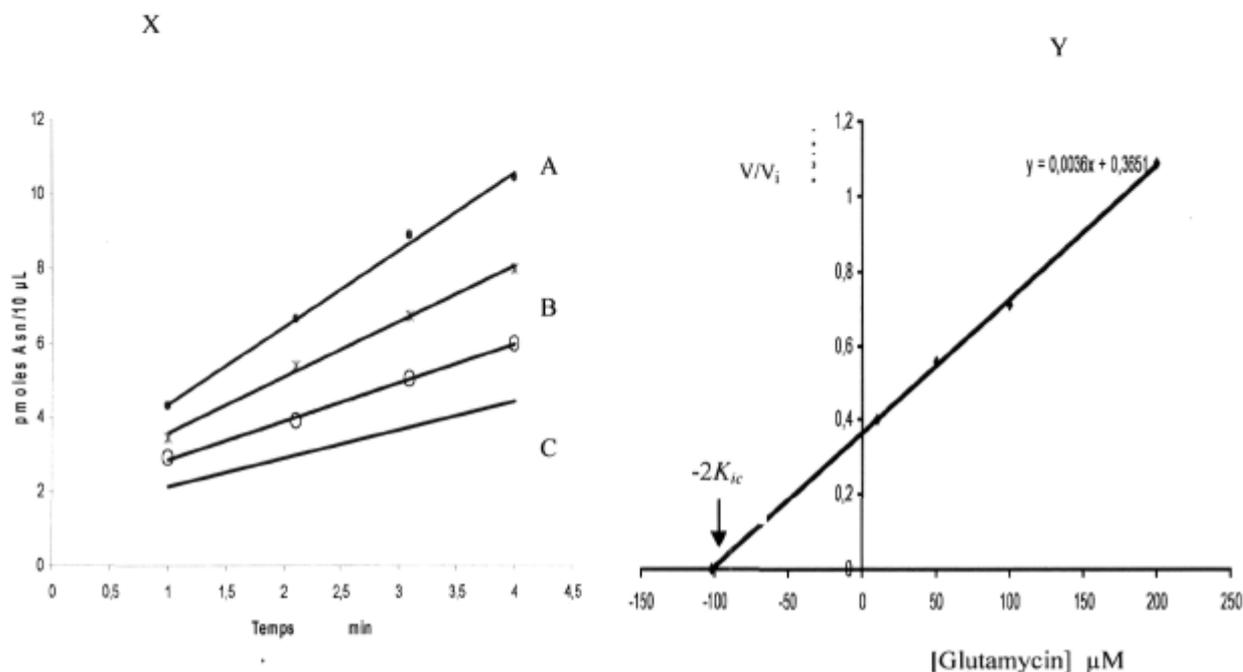


Figure 28: Détermination de la K_{ic} de glutamycine pour l'AdT

(X) vitesses initiales de l'activité de l'AdT en présence des concentrations différentes de la glutamycine (A = 10 μ M, B = 50 μ M, C = 100 μ M et D = 200)

(Y) représentation graphique de V/V_i obtenue en (X) en fonction de la concentration de glutamycine

L'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme est donnée par la constante d'inhibition K_{ic} . Ainsi, l'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus grande que la K_{ic} est petite. La K_{ic} de la glutamycine est 50 μ M.

4.8.2 L'asparticine

L'asparticine est un composé chimique de structure semblable à l'Asp-ARNt chargé (Figure 13.B). La valeur de la K_{ic} est trouvée après des tests cinétiques de l'AdT avec différentes concentrations de l'asparticine (Figure 29).

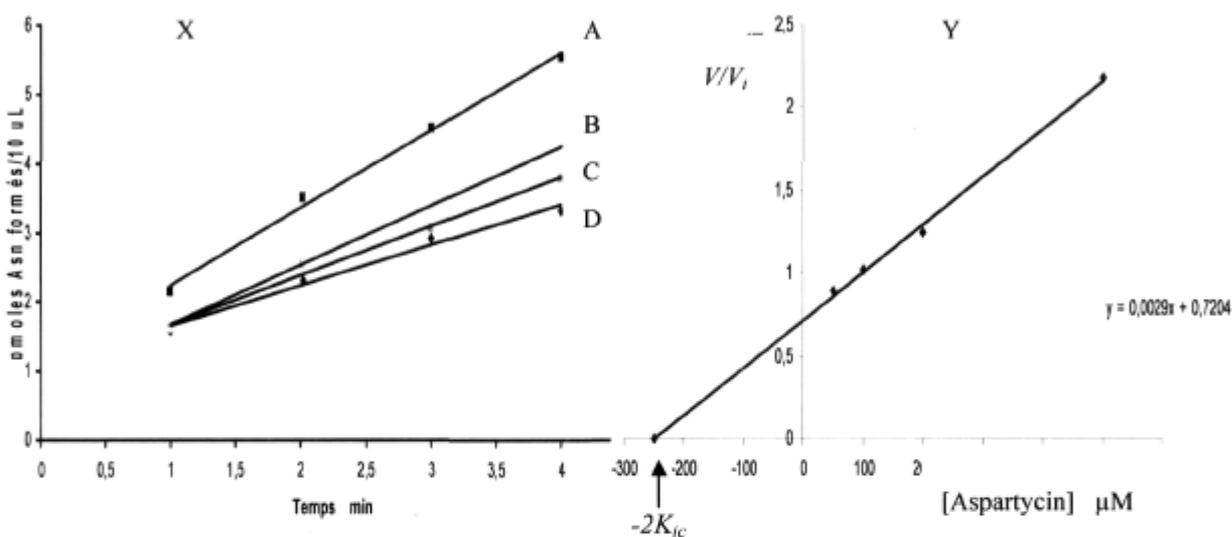


Figure 29: Détermination de la K_{ic} de l'asparticine pour l'AdT

(X) Vitesses initiales de l'activité de l'AdT en présence des concentrations différentes d'asparticin (A = 50 μ M, B = 100 μ M, C = 200 μ M et D = 500 μ M)

(Y) Représentation graphique de V/V_i obtenue en (X) en fonction de la concentration de l'asparticine

L'affinité de l'asparticine pour l'AdT est donnée par la constante d'inhibition K_{ic} . Ainsi, la K_{ic} de l'asparticin est 125 μ M. L'affinité de l'asparticine pour l'AdT est moins forte que celle de la glutamincine.

4.8.3 La sulfone (PAN-Met)

La sulfone est un composé chimique de structure semblable au Met-ARNt (Figure 30). C'est un analogue de l'état de transition. La valeur de la K_{ic} est trouvée après des tests cinétiques de l'AdT avec différentes concentrations de la sulfone (Figure 31).

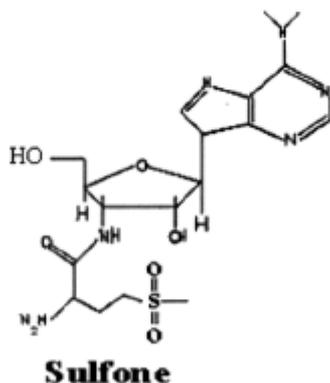


Figure 30 : Structure de la sulfone (PAN-Met)

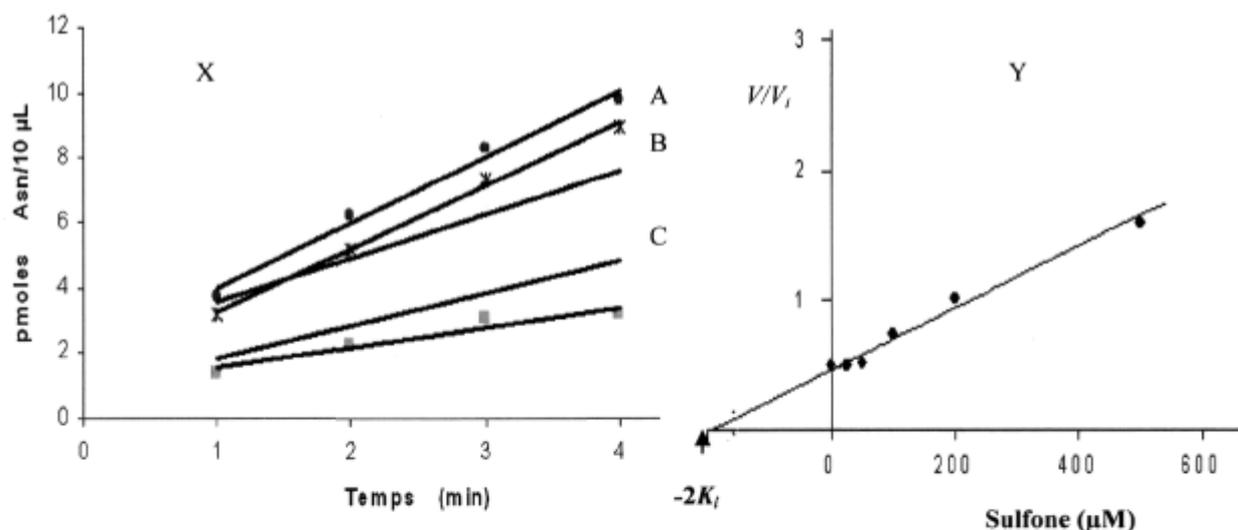


Figure 31: Détermination de la K_i du sulfone pour l'AdT. (X) Vitesses initiales de l'activité de l'AdT en présence des concentrations différentes de la sulfone (A = 10 μM , B = 50 μM , C = 100 μM , D = 200 μM et E = 500 μM) et (Y) Représentation graphique de V/V_i obtenue en (A) en fonction de la concentration de la sulfone.

L'affinité de sulfone pour l'AdT est donnée par la constante d'inhibition K_{ic} . La valeur de la constante d'inhibition K_{ic} est 65 μM .

5 Discussion générale et conclusions

Le travail de cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude de transamidation de l'Asp-ARNt^{Asn} par l'AdT de *P. aeruginosa*. La précision de cette réaction est cruciale puisqu'elle détermine la fidélité de la traduction de l'information génétique et la synthèse des protéines fonctionnelles. De nombreuses études portant sur la compréhension des systèmes d'aminacylation et de transamidation ont déjà été réalisées, cependant leur exploitation est loin d'être achevée. Les différents lignes de recherches de ce projet ont porté sur 5 points majeurs : (i) la surexpression de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* chez *E. coli*, et sa purification, (ii) la détermination de la demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn} et de l'Asn-ARNt^{Asn}, (iii) la purification de l'AspRS-ND et de l'AdT de *P. aeruginosa*, (iv) la détermination des constantes cinétiques de l'AdT et (v) la détermination des constantes d'inhibitions de certains analogues d'aa-ARNt.

5.1 La surexpression de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* chez *E. coli*, et sa purification

L'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* a été surexprimé chez *E. coli* et purifié sur une colonne QIAGEN-tip 100-500. Il a une grande capacité de chargement par l'AspRS (20% de l'ARNt total purifié) et un haut degré de pureté (Figure 16, puits 2) qui sont suffisants pour déterminer les constantes cinétiques de l'AdT. La quantité d'ARNt total d'*E. coli* enrichie par l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* est de l'ordre de 1 mg d'ARNt par 1 g de cellule. L'ARNt^{Asn} libre et chargé par l'aspartate sont reconnus par l'AspRS-ND et l'AdT, respectivement. Toutefois, l'ARNt^{Asp} aspartylé par l'AspRS-ND n'est pas reconnu par l'AdT, malgré la grande ressemblance de structure entre l'Asp-ARNt^{Asn} et l'Asp-ARNt^{Asp} chez *P. aeruginosa*. Ceci montre que le contexte structural de l'ARNt joue un rôle clé dans la spécificité de la transamidation. A ce jour, les éléments d'identités de l'ARNt^{Asp} pour l'AspRS ont été principalement étudiés par des approches *in vitro* au sein des systèmes des bactéries d'*E. coli* (Hasegawa et al., 1989; Nameki et al., 1992), de *T. thermophilus* (Becker et al., 1996) et eucaryotique de *S. cerevisiae* (Pütz et al., 1991; Frugier et al., 1994; Ryckelynck et al., 2003). Ces éléments sont globalement conservés (Giégé et al., 1996) et sont la base discriminante G73 et l'anticodon G34U35C36 pour les majeurs (aux deux

extrémités de l'ARNt) et la paire de base G10-U/C25 et le nucléotide C38 pour les mineurs. La paire de base U1-A72 et la base Δ A20 de l'ARNt^{Asn} sont deux éléments essentiels pour la transamidation par l'AdT (Bailly *et al.*, 2006). L'histidine 31 et la glycine 83 de l'AspRS-ND de *P. aeruginosa*, sont deux éléments importants pour la reconnaissance de l'ARNt^{Asn} mais pas pour l'ARNt^{Asp} (Bernard *et al.*, 2006)

5.2 La détermination de la demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn} et de l'Asn-ARNt^{Asn}

Nous avons montré la demi-vie de l'Asp-ARNt^{Asn} est 74 min (Figure 19). Cette durée est suffisante pour nous permettre d'obtenir les caractéristiques cinétiques de l'AdT. Par contre, la stabilité de l'Asn-ARNt^{Asn} après la réaction de transamidation est de l'ordre de 9 min (Figure 24.B). La demi-vie de l'Asn-ARNt^{Asn} peut augmenter lorsqu'on ajoute de l'AspRS-ND dans le mélange réactionnel de transamidation et devienne 39 min (Figure 24.C). La raison de cette stabilisation n'est pas encore connue. Cette durée n'est pas suffisante pour atteindre le plateau de transamidation (Figure 22.A).

5.3 La purification de l'AspRS-ND et de l'AdT de *P. aeruginosa*

La purification de l'AspRS-ND en utilisant le protocole de deux étapes (chromatographie d'affinité sur une colonne Ni-NTA et par filtration sur gel "Superdex 200") nous a permis de purifier cette enzyme jusqu'à homogénéité (Figure 17). L'AspRS-ND surproduit chez le *P. aeruginosa* est de l'ordre de 6 mg par 20 g de cellules pour la première étape et de 4 mg d'enzyme après la deuxième étape. Cette perte d'enzyme comprend le contaminant et l'AspRS perdu dans la colonne. Pendant la purification de l'AspRS-ND chez le *P. aeruginosa*, quelques limites techniques observées chez cette bactérie (sécrétion de polysaccharides) nous ont incité à surproduire l'AdT de *P. aeruginosa* chez *E. coli*. La surexpression de l'AdT de *P. aeruginosa* chez *E. coli* BL21(DE3) a été faite selon les conditions présentées dans la section 3.1. Nous avons obtenu une production de l'AdT deux fois supérieure à celle obtenue chez le *P. aeruginosa* ADD1976. L'AdT obtenue à la suite de cette purification en deux étapes (colonne Ni-NTA et filtration sur gel Superdex 200) est homogène presque à 100% (Figure 20.B puits 3). L'AdT surproduite chez *E. coli* est de l'ordre de 12 mg/20 g de cellules pour la première étape et de 8 mg/ 20 g de cellules après une filtration sur gel. L'AspRS-ND est toxique pour *E. coli*, et cette toxicité se manifeste

dans l'absence d'une protéine de correction de l'Asp-ARNt^{Asn} en Asn-ARNt^{Asn} comme l'AdT. Le mutant AspRS-ND (AspRS-D) de *P. aeruginosa* a été purifié chez *E. coli* (Chuawong et al., 2006) et dernièrement dans une notre laboratoire, Mlle Audrey Emond (stagiaire) a réussi de purifier l'AspRS-ND et l'AdT de *H. pylori* dans la même souche d'*E. coli*.

5.4 Les constantes cinétiques de l'AdT

Bien que le système d'aminocyclation canonique soit largement étudié, les fonctions des amidotransférases sont encore peu explorées. Nous avons réussi à mesurer les valeurs de K_m de l'Asp-ARNt^{Asn} pour l'AdT de *P. aeruginosa*, ainsi que k_{cat} et V_m . La valeur de la K_m de l'Asp-ARNt^{Asn} pour l'AdT de *P. aeruginosa* est de même ordre que celle trouvée chez *H. pylori* (tableau 6).

Tableau 6 : Comparaison des constantes cinétiques de l'AdT de *H. pylori* et de *P. aeruginosa*

Substrats	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (s^{-1}/mM)	Références
Asp-tRNA ^{Asn} de <i>H. pylori</i>	0.95 ± 0.30	1.30 ± 0.19	1368	Sheppard et al., 2007
Asp-tRNA ^{Asn} de <i>P. aeruginosa</i>	$0,93 \pm 0,11$	$0.8 \pm 0,35$	860	Ce mémoire

5.5 Les constantes d'inhibitions de l'AdT par certains analogues d'aa-ARNt

Face à l'émergence de bactéries pathogènes multi-résistantes aux drogues, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est devenue une priorité. Les AdTs sont des cibles potentielles de choix du fait de leurs fonctions, de leurs structures et de leurs particularités spécifiques, exploitables pour le «design» d'inhibiteurs sélectifs. Nous avons testé trois inhibiteurs (tableau 7) fournis par le Dr. Robert Chênevert (l'aspartycine, la glutamincine et la sulfone). Ensuite nous avons déterminé les valeurs de leurs constantes d'inhibitions (K_{ic}). Ces valeurs ressemblent à celle obtenues pour l'AdT de *H. pylori* (Huot et al., 2007) (voir tableau 7).

Tableau 7: Les constantes d'inhibition K_{ic} des analogues d'Asp-ARNt^{Asn} pour l'AdT de *H. pylori* et l'AdT de *P. aeruginosa*

	Glutamincine	Aspartycine	Sulfone	Références
Enzymes	K_{ic} (μ M)	K_{ic} (μ M)	K_{ic} (μ M)	
AdT de <i>H. Pylori</i>	105	134	ND	Huot et al., 2007
AdT de <i>P. aeruginosa</i>	50	125	65	Ce mémoire

Ces inhibiteurs ont des affinités moins fortes que le substrat Asp-ARNt^{Asn}. Cette faible affinité est expliquée par le fait que l'Asp-ARNt^{Asn} est une molécule volumineuse de 75 nucléotides et se lie avec l'AdT en d'autres sites de liaisons, par contre ces inhibiteurs sont composés d'un seul nucléotide. L'affinité de l'Asp-ARNt^{Asn} pour l'AdT n'est pas contrôlée juste par le dernier nucléotide qui porte l'acide aminée mais aussi par d'autre site de liaison comme la paire de base U1-A72 dans la tige accéptrice et la base Δ A20 dans la boucle D

(Bailly *et al.*, 2006). Ces inhibiteurs aideront à l'étude du mécanisme réactionnel de l'AdT, et à la recherche d'un nouveau inhibiteur qui a plus d'affinité que le substrat. Cet inhibiteur servira comme un composé de départ à la recherche d'un nouveau bactéricide.

6 Perspectives

Le *P. aeruginosa* a un gène *glnS* qui code pour une GlnRS. La synthèse de Gln-ARNt^{Gln} dans cette bactérie se fait par la voie directe. La détermination des caractéristiques enzymatiques de l'AdT (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) pour ses différents substrats tels que le Glu-ARNt^{Gln} de *P. aeruginosa* s'il est glutamylé par une GluRS-ND, l'ATP et le donneur de NH₃ (Gln/Asn) serait très intéressante. Premièrement, il faudrait déterminer les constantes cinétique et deuxièmement, faire une comparaison de l'affinité de l'AdT de *P. aeruginosa* pour ses substrats et la comparer avec d'autres AdT (*H. pylori*,...). Est ce que l'affinité de l'AdT pour le Glu-ARNt^{Gln} a été perdue ou diminuée à cause de la présence d'une GlnRS dans cette bactérie? L'AdT de *P. aeruginosa* est capable de reconnaître l'Asp-ARNt^{Asn} d'autres types de bactéries (*E. coli*, *H. pylori*...). Il serait intéressant de comparer l'affinité de ces Asp-ARNt^{Asn} à celle de l'ARNt^{Asn} de *P. aeruginosa* pour l'AdT.

Nous avons remarqué au cours des réactions de transamidation de l'Asp-ARNt^{Asn} qu'il y a une désacylation rapide de l'Asn-ARNt^{Asn} (Figure 22.B); en effet, l'Asn-ARNt^{Asn} est rapidement désacylé après quelques minutes de transamidation, et le taux de transamidation n'atteint jamais le niveau optimal. Nous appuyant sur ces résultats, nous avons suggéré que cette désacylation est catalysée par l'AdT. Cette réaction permet la formation de l'asparagine à partir de l'Asn-ARNt^{Asn}. Pour tester cette hypothèse, une étude de la demi-vie de l'Asn-ARNt^{Asn} devrait être faite en absence et en présence de l'AdT. Cet Asn-ARNt^{Asn} pourrait être formé par l'AsnRS d'*E. coli*.

7 Références

- Akochy P., Bernard D, Roy P., Lapointe J (2004). Direct glutaminyl-tRNA biosynthesis and indirect asparaginyl-tRNA biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 186: 767-76.
- Akochy P. (2004). Thèse de doctorat. Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval
- Arnez J., Moras D. (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci*, 22:211-216.
- Bailly M., Blaise B., Lorber B., Becker D. and Kernl D. (2007). The Transamidosome: A Dynamic Ribonucleoprotein Particle Dedicated to Prokaryotic tRNA-Dependent Asparagine Biosynthesis. *Molecular Cell*, 28: 228–239
- Bailly M. Giannouli S. Blaise M. Stathopoulos C. Kern D and Becker H. (2006). A single tRNA base pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagines. *Nucleic Acids Research*, 34:6083–6094
- Becker H., Giegé R., Kern D. (1996). Identity of prokaryotic and eukaryotic tRNA^{Asp} for aminoacylation by aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, 35:7447-7458.
- Bernard D. (2006). Thèse de doctorat. Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval
- Bernard D, Akochy PM, Beaulieu D, Lapointe J, Roy PH. (2006). Two residues in the anticodon recognition domain of the aspartyl-tRNA synthetase from *Pseudomonas aeruginosa* are individually implicated in the recognition of tRNA^{Asn}. *J. Bacteriol.*, 188 : 269-74
- Blanquet S., Mechulam Y., Schmitt E. and Vial L.(2003). Aminoacyl-Transfer RNA Maturation, in *The Translation Mechanisms* (Lapointe J. and Brakier-Gingras L.) p 66, Eureka.com/Landes biosciences, Georgetown, Tx.

- Bonnet J, Ebel J-P. (1972). Interpretation of incomplete reactions in tRNA aminoacylation. Aminoacylation of yeast tRNA^{Val}III with yeast valyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem*, 31:335-344.
- Bradford, M.M (1976). *Biochem*, 72: 248-254
- Cathopoulos T. Chuawong P. and Hendrickson T. L. (2007) Novel tRNA aminoacylation mechanisms. *Mol. BioSyst*, 3:408-418
- Cavarelli J, Rees B, Thierry JC, Moras D. (1993). Yeast aspartyl-tRNA synthetase: a structural view of the aminoacylation reaction. *Biochimie*, 75:1117-23
- Chapeville F. Lipman F. Ehrenstein G. Weisblum B. Ray B. and Benzer S. (1962) On the role of soluble RNA in coding for amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 48: 1086-1092.
- Charron C. Roy H. Blaise M. Giege R. and Kern D. (2003). Non-discriminating and discriminating aspartyl-tRNA synthetases differ in the anticodon-binding domain. *EMBO*, 22: 1632-43.
- Chuawong P. and Hendrickson T. (2006) The Nondiscriminating Aspartyl-tRNA Synthetase from *Helicobacter pylori*: Anticodon-Binding Domain Mutations That Impact tRNA Specificity and Heterologous Toxicity. *Biochemistry*, 45: 8079 -8087
- Cleland W.W. (1979). *Meth. Enzymol.*, 63: 103-138
- Cornish-Bowden A. (1995). Fundamentals of Enzyme Kinetics, in inhibition and activation of Enzymes, pp: 93-121, Portland Press Ltd, London
- Crick FH, (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*, 12: 138-63.
- Curnow AW, Tumbula DL, Pelaschier JT, Min B, Soll D.(1998). Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 12838-43.

- Cusack S, Berthet-Colominas C, Härtle M, Nassar N, Leberman R. (1990). A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature*, 347: 249-255.
- Decicco CP, Nelson DJ, Luo Y, Shen L, Horiuchi KY, Amsler KM, Foster LA, Spitz SM, Merrill JJ, Sizemore CF, Rogers KC, Copeland RA, Harpel MR. (2001). Glutamyl-gamma-boronate inhibitors of bacterial Glu-tRNA(Gln) amidotransferase. *Bioorg Med Chem Lett*, 11:2561-2564
- Dubois D. Y., Lapointe J. and Sekine S. (2005). "Glutamyl-tRNA synthetases". The Aminoacyl-tRNA Synthetases. Ibba, M., Francklyn, C. and Cusack, S. Georgetown, Texas, Eureka.com/Landes. *Bioscience*: 89-98.
- Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J, Moras D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, 347: 203-206.
- Feng L., Tumbula-Hansen D., Min B., Namgoong S., Salazar G., Orellana O. and Soll D. (2005). Transfer RNA-Dependent Amidotransferases: Key Enzymes for Asn-tRNA and Gln-tRNA Synthesis in Nature, in Aminoacyl-tRNA Synthetases (Ibba M. Francklyn C. and Cusack S.) pp: 314-319, Eureka.com/Landes biosciences, Georgetown, Tx
- Fersht A. (1985). Enzyme Structure and Mechanism, Second Edition, pp:128-129, New York. W.H. Freeman & Co.
- Frugier M., Florentz C., Giegé R. (1994). Efficient aminoacylation of resected RNA helices by class II aspartyl-tRNA synthetase dependent on a single nucleotide. *EMBO J*, 13: 2218-2226
- Gagnon Y., Lacoste L., Champagne N. and Lapointe J. (1996). Widespread Use of the Glu-tRNA^{Gln} Transamidation Pathway among Bacteria. A Member of the α Purple bacteria lacks glutaminyl-tRNA synthetase. *J. Biol Chem*, 271: 1456-14863

- Giegé R., Florentz C., Kern D., Gangloff J., Eriani G., Moras D. (1996). Aspartate identity of transfer RNAs. *Biochimie*, 78:605-623.
- Giegé R. and Frugier M. (2003). Transfert RNA Structure and identity, in the Translation Mechanisms (Lapointe J. and Brakier-Gingras L.) p: 3, Eureka.com/Landes biosciences, Georgetown, Tx.
- Giegé R. and Rees B. (2005). Aspartyl-tRNA Synthetases , in The Aminoacyl-tRNA Synthetases (Ibbá M., Francklyn C. and Cusack S.) pp 210–240, Eureka.com/Landes biosciences, Georgetown, Tx
- Gupta R. (1985). Halobacterium volcanii tRNAs. Identification of 41 tRNAs covering all amino acids, and the sequences of 33 class I tRNAs. *J. Biol Chem*, 259: 9461-9471.
- Hasegawa T., Himeno H., Ishikura H., Shimizu M. (1989). Discriminator base of tRNA^{Asp} is involved in amino acid acceptor activity. *Biochem Biophys Res Comm*, 163:1534-1538.
- Hecht S. and Chinuault A. (1976): Position of aminoacylation of individual Escherichia coli and yeast tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 405–409
- Hames B.D, Hooper N.M (2000). Instant notes in biochemistry. *Annales de Biologie Clinique* 58 : 6-767
- Horiuchi K., Harpel M., Shen L., Luo Y., Rogers K., Copeland R. (2001). Mechanistic studies of reaction coupling in Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase. *Biochemistry*, 40: 6450-7.
- Harpel M., Horiuchi K., Luo Y., Shen L., Jiang W., Nelson D., Rogers K., Decicco K., and Copeland R. (2002). Mutagenesis and Mechanism-Based Inhibition of *Streptococcus pyogenes* Glu-tRNA^{Gln} Amidotransferase Implicate a Serine-Based Glutaminase Site. *Biochemistry*, 41: 6398 -6407.
- Huot J., Balg C., Jahn D., Moser J., Émond A., Blais S., Chênevert R., Lapointe J. (2007). Mechanism of a GatCAB Amidotransferase: Aspartyl-tRNA Synthetase

Increases Its Affinity for Asp-tRNA^{Asn} and Novel Aminoacyl-tRNA Analogues Are Competitive Inhibitors. *Biochemistry*, 46: 13190-13198

Jahn D., Kim Y., Ishino Y., Chen M. & Söll D. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 8059–8064.

Kern D. and Lapointe L. (1980) 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

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., V. Azevedo V., Bertero M. G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., A. Brans A., Braun M., Brignell S. C., Bron S., Brouillet S., C. V. Bruschi C. V., B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S.-K. Choi, J.-J. Codani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. Düsterhöft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S.-Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Hénaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M.-F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S.-M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauël, C. Médigue, N. Medina R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S.-H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B.-S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Tognoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandenbol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H.-F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa and A. Danchin

- (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256.
- Lapointe J., Duplain L. and 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
- Lee N., Bessho Y., Wei K., Szostak J. and Suga H. (2000). Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nature Struct Biol*, 7: 28-33.
- Maizels N, Weiner AM. (1994). Phylogeny from function: evidence from the molecular fossil record that tRNA originated in replication, not translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6729-34
- Mitra K. and Mehler A. (1967). The arginyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli*. *Biol. J. Chem*, 242: 5490-4.
- Min B., Pelaschier J., Graham D., Tumbula-Hansen D., and Söll D. (2002). Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: An essential route to asparagine formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2678-2683
- Nameki N., Tamura K., Himeno H., Asahara H., Hasegawa T., Shimizu M. (1992). E. coli tRNA^{Asp} recognition mechanism differing from that of the yeast system. *Biochem Biophys Res Comm* 189: 856-862.
- Oshikane H., Sheppard K., Fukai S., Nakamura Y., Ishitani R., Numata T., Sherrer R., Feng L., Schmitt E., Panvert M., Blanquet S., Mechulam Y., Soll D. and O. (2006). Nureki, Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science*, 312: 1950-4.
- Nakamura A., Min Y., Sarin C., Naoki S. and Isao T. (2006). Ammonia Channel Couples Glutaminase with Transamidase Reactions in GatCAB. *Science*, 312: 1954-1958
- Nameki N., Tamura K., Himeno H., Asahara H., Hasegawa T., Shimizu M. (1992) *Escherichia coli* tRNA(Asp) recognition mechanism differing from that of the

- yeast system. *Biochem Biophys Res Commun*, 189:856-62.
- Perona J., Rould M., Steitz T. (1993). Structural basis for transfer RNA aminoacylation by glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 32:8758-8771.
- Pitt T.L., Sparrow M., Warner M., Stefanidou M. (2005). Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax*, 58:794-796
- Pütz J., Puglisi J., Florentz C. and Giegé R. (1991). Identity elements for specific aminoacylation of yeast tRNA^{Asp} by cognate aspartyl-tRNA synthetase. *Science* 252:1696-1699.
- Racznik G., Becker H., Min B., and Söll D. (2001). A Single Amidotransferase Forms Asparaginyl-tRNA and Glutaminyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *J. Biol Chem*, 276: 45862-45867
- Rould M., Perona J., Söll D., Steitz T. (1989). Structure of E. coli glutaminyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP at 2.8Å resolution. *Science*, 246:1135-1142.
- Ruff M., Krishnaswamy S., Boeglin M., Poterszman A., Mitschler A., Podjarny A., Rees B., Thierry J. 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.
- Ryckelynck M., Giegé R. and Frugier M. (2003). Yeast tRNA^{Asp} charging accuracy is threatened by the N-terminal extension of aspartyl-tRNA synthetase. *J. Biol Chem*, 278:9683-9690.
- Saito H., Watanabe K. and Suga H., (2001). Concurrent molecular recognition of the amino acid and tRNA by a ribozyme. *RNA*, 7:1867-1878.
- Salazar J., Ahel I. Orellana O. Tumbula-Hansen D., Krieger R., Daniels L. and D. Soll

- (2003). Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 13863–8.
- Salazar J., Zúñiga R., Raczniak G., Becker H., Söll D., Orellana O. (2001). A dual-specific Glu-tRNA(Gln) and Asp-tRNA(Asn) amidotransferase is involved in decoding glutamine and asparagine codons in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Letters* 500: 129-131
- Sauerwald A., Zhu W., Major T., Roy H., Palioura S., Jahn D., Whitman W. Yates J., Ibba M., and Soll D. (2005). RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science*, 307: 1969–72
- Schimmel P. and Soll D. (1979). Aminoacyl-tRNA Synthetases: General Features and Recognition of Transfer RNAs. *Biochemistry*. 48, 601-648
- Schon A., Hottinger H. et Soll D. (1988). Misaminoacylation and transamidation are required for protein biosynthesis in *Lactobacillus bulgaricus*. *Biochimie*, 70: 391-394
- Sekine S., Nureki O., Dubois D., Bernier S., Chenevert R., Lapointe J., Vassylyev D. & Yokoyama S. (2003). « ATP binding by glutamyl-tRNA synthetase is switched to the productive mode by tRNA binding ». *J. EMBO* . 22: 676-688.
- Shaw E. (1989) in design of Enzyme inhibitors as drugs (M. Sandler and H.J. Smith, eds). Oxford Univrsity Press, Oxford, p.49
- Sheppard, Akochy P., Salazar , and D. Söll, (2007).The *Helicobacter pylori* Amidotransferase GatCAB Is Equally Efficient in Glutamine-dependent Transamidation of Asp-tRNAAsn and Glu-tRNAGln. *J. Biol Chem*, 282: 11866–11873,
- Skouloubris S., Labigne A., De Reuse H. and Hendrickson T. (2003). A Non-Cognate Aminoacyl-tRNA Synthetase that may resolve a Missing Link in Evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 11297–11302.

- Stanzel M, Schön A., and Sprinz M. (1994). Discrimination against misacylated tRNA by chloroplast Elongation Factor Tu. *Eur J Biochem*, 219: 435-439.
- Stover C. K., Pham X. Q., A. L. Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warren P., Hickey M. J., Brinkman F.S. L., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Y. Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K.-S., Wu Z., Paulsenk I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E. W., Lory S. and Olson M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964
- Tumbula D., Becker H., Chang W. and Soll D. (2000) Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature*, 407: 106–10.
- White BN, Bayley ST. (1972) Further codon assignments in an extremely halophilic bacterium using a cell-free protein-synthesizing system and a ribosomal binding assay. *Can J Biochem*, 50:600-9
- Walsh C.T. (1979) Enzyme Reaction Mechanisms. W.H. Freeman, San Francisco.
- Weber K. et OSBORN M. (1969).The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. *J Biol Chem*, 244: 4406-4412
- Wilcox M. (1969). γ -Glutamyl Phosphate Attached to Glutamine-Specific tRNA A Precursor of Glutaminyl-tRNA in *Bacillus subtilis*. *Eur J. Biochem.* 11 405-412
- Woese C., Olsen G., Ibba M. and Soll D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 202–36
- Woese C. (1990). Evolutionary questions: the "progenote". *Science*, 247: 789.
- Woese C. (1998). The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6854-6859