

IMANE FIHER

IMPACT DE SUBSTITUTIONS DE RÉSIDUS DE LA
CHARNIÈRE 4-5 ET DU DOMAINE 5 DE LA
GLUTAMYL-ARN_t SYNTHÉTASE
D'*Escherichia coli* SUR SON
ACTIVITÉ CATALYTIQUE

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

Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé:

L'enzyme étudiée est la glutamyl-ARNt synthétase (GluRS) de la bactérie *Escherichia coli*. Son activité consiste principalement à charger l'acide glutamique sur l'ARNt^{Glu}. Cette GluRS se compose de 5 domaines structuraux, dont les deux derniers (#4 et 5) situés dans la partie C-terminale ont été acquis durant l'évolution et sont responsables de la reconnaissance de la boucle de l'anticodon de l'ARNt^{Glu}. Le domaine 4 est lié au domaine 5 par une charnière mobile (4-5) permettant à ce dernier de s'incliner et de s'adapter à l'anticodon de l'ARNt^{Glu} (Nureki et al., 1995). Cette GluRS bactérienne, qui joue un rôle essentiel dans la biosynthèse des protéines, est considérée comme une nouvelle cible de l'antibiothérapie grâce à l'existence d'analogues du glutamyl-AMP qui inhibent plus des GluRS bactériennes que la GluRS cytoplasmique des mammifères (Balg et al., 2007). La première partie de ce projet consiste à étudier le rôle de la charnière 4-5 sur l'activité de la GluRS en produisant par mutagenèse dirigée du gène *gluX* de *E. coli* des variants E366A, E455R et D333A, altérés dans les résidus qui pourraient influencer les orientations relatives des domaines 4 et 5. Les propriétés cinétiques de ces variants dans la réaction de formation du glutamyl-ARNt montrent qu'il n'y a pas d'effet majeur de ces substitutions sur les K_m sauf pour D333A. La constante de spécificité de l'enzyme sauvage reste plus grande que celle des variants ce qui suggère que la flexibilité de la charnière n'est pas grandement affectée par la substitution d'un seul de ces résidus. Accidentellement, un variant double charnière (#dc) a été obtenu dont le K_m pour l'ARNt^{Glu} est 7,7 fois plus grand que celui de la GluRS sauvage, et dont la constante de spécificité est 15 fois plus faible. Ce résultat suggère que la longueur de la charnière a peut-être autant d'influence que la nature de ces résidus pour le bon fonctionnement de la GluRS. La deuxième étape du projet est de tester l'hypothèse selon laquelle la flexibilité de la charnière 4-5 de la GluRS est importante pour l'activité catalytique de cette enzyme. Des formes tronquées de ces variants ne contenant que les 2 derniers domaines 4 et 5 ont été surproduites et purifiées pour la mesure de la flexibilité de la charnière 4-5 par résonance magnétique nucléaire (RMN). Une analyse préliminaire de la GluRS tronquée sauvage par RMN a montré qu'elle est bien repliée. Notre étude structure-fonction de la charnière 4-5 facilitera le design rationnel de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de la GluRS. Ceux-ci pourraient être des composés de départ (« lead compounds ») pour la conception d'un nouvel antibiotique.

Remerciement

Mes premières expressions de remerciements vont tout d'abord à mon directeur de recherche, professeur Jacques Lapointe. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, et je vous remercie aussi de m'avoir fait confiance traduite par une grande latitude dans la recherche. Mon passage dans votre laboratoire m'a permis d'acquérir beaucoup d'expérience dans le domaine de la biologie moléculaire; les problèmes et les remises en question qui sont survenus au cours de mon travail m'ont permis de développer en moi un apprentissage et la prise d'initiative. Ce qui m'a aidé à bien mener mon projet de maîtrise.

Je me dois d'adresser des remerciements plus particuliers au Dr. Samia Mezouari, avec qui j'ai travaillé au laboratoire, pour sa disponibilité et l'aide qu'elle m'a fournie dans l'aboutissement de mon projet. Je la remercie tout particulièrement pour sa générosité, son assistance scientifique et surtout pour sa contribution indéfectible dans la correction de mon mémoire.

Ce mémoire n'aurait finalement pas pu être achevé sans le support financier et moral de mes parents. Aucune dédicace ne saurait vous exprimer mon profond amour, ma reconnaissance et mon dévouement pour votre affection et pour les immenses sacrifices consentis durant des années et spécialement pour l'accomplissement de mes études. Puisse Dieu, Le Tout Puissant, vous garde et vous procure santé et bonheur.

Je tiens à remercier les membres du comité aviseur d'avoir accepté d'être membres du jury. Par cette occasion, je présente mes chaleureux remerciements au Dr. Manon Couture pour sa gentillesse, sa disponibilité et son empressement à répondre à mes interrogations. Je voudrais bien souligner que son cours en enzymologie m'a servi de base et de référence dans mon travail de recherche tout au long de ces années. Encore une fois MERCI.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du laboratoire, et spécialement Jonathan Huot pour ses orientations et les nombreux conseils au laboratoire surtout au début de mon projet. Comme je remercie aussi Jean-Baptiste Duvignaud pour ces discussions fructifiantes sur la résonance magnétique nucléaire.

Table de matière:

Résumé.....	II
Remerciements.....	III
Table de matière.....	IV
Liste des abréviations.....	VIII
Liste des figures et des tableaux.....	XI
Chapitre I : Introduction	1-16
I La biosynthèse des protéines.....	2
1 Les étapes de la biosynthèse des protéines.....	2
1-1 La transcription.....	2
1-2 La traduction.....	3
1-3 Généralités sur les ARNt.....	4
2 La réaction d'aminacylation des ARNt.....	5
II Les aminoacyl-ARNt synthétases.....	6
1 Les classes d'aaRS.....	6
2 La glutamyl-ARNt synthétase bactérienne.....	7
3 La structure de la GluRS.....	8
4 La reconnaissance de l'anticodon de l'ARNt ^{Glu} par la GluRS.....	10
5 Changement conformationnel de la GluRS lors de la liaison de l'ARNt ^{Glu}	11
6 Résultats antérieurs obtenus avec des GluRS tronquées.....	12
III Problématique.....	14
IV Objectifs.....	15
Chapitre II: Matériels et méthodes	17-43
I Surproduction des GluRS pleine longueur et des GluRS tronquées, sauvages et variants.....	19
1 Les milieux de culture.....	19
1-1 Milieu LB.....	19
1-2 Milieu des sels minimum.....	19
1-3 Milieu minimum M9.....	19
1-4 Antibiotiques.....	20
2 Souches de <i>Escherichia coli</i> , et plasmides.....	20
2-1 Souche JP1449 (DE3) pLysS.....	20
2-2 Souche BL21(DE3) pLysS.....	20
2-3 Souche XL1-Blue.....	21
2-4 Souche DH5 α /pKR-15.....	21
2-5 Plasmide pET-28c.....	22
3 Mutagenèse dirigée.....	23
4 Transformation.....	24

5	Techniques de surproduction des GluRS pleine longueur et des GluRS tronquées, sauvages et variants.....	25
5-1	Préculture et culture des cellules.....	25
5-2	Récolte des cellules.....	25
6	Purification des enzymes par chromatographie d'affinité pour le nickel	26
6-1	Préparation des extraits cellulaires.....	26
6-2	Chromatographie d'affinité au nickel.....	26
6-2-1	Préparation de la colonne.....	27
6-2-2	Les étapes de purification.....	27
6-2-3	Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante «SDS-PAGE» des fractions de recueillies pendant la chromatographie d'affinité.....	28
6-2-4	Dialyse des fractions contenant l'enzyme purifiée.....	30
6-3	Chromatographie échangeuse d'ions.....	31
6-3-1	Caractéristiques de la colonne MonoQ HR10/10.....	31
6-3-2	Préparation de la colonne MonoQ HR10/10.....	32
6-3-3	Déroulement de la purification.....	32
6-4	Concentration des enzymes pleine longueur dans le tampon HEPES.....	33
6-5	Dosage des enzymes concentrées.....	33
7	Technique de surproduction et de purification de l'ARNt ^{Glu}	34
7-1	Culture et récolte des cellules DH5 α /pKR-15.....	34
7-2	Purification des ARNt non fractionnés enrichis en ARNt ^{Glu}	34
7-3	Activation de l'ARNt.....	35
7-4	Test de détermination de l'activité acceptrice de l'ARNt ^{Glu}	35
7-5	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-urée.....	36
II	Dosage de l'activité d'aminacylation catalysée par la GluRS pleine longueur sauvage et variants.....	36
1	Tampons utilisés.....	36
2	Substrats de la GluRS.....	37
3	Préparation du mélange réactionnel.....	38
4	Déroulement de la réaction d'aminacylation.....	38
III	Technique de clonage des gènes codant les deux derniers domaines C-terminaux de la GluRS de type sauvage et variants chez <i>E. coli</i>	40
1	Le choix des oligonucléotides.....	40
2	Clonage des gènes codant les domaines 4 et 5 sauvage et variants de la GluRS.....	41
2-1	Production des copies de gène codant les domaines 4 et 5 par PCR.....	41
2-2	Digestion du plasmide pET-28c et des produits PCR par <i>Bam</i> HI et <i>Nco</i> I.....	41
2-3	Déphosphorylation du plasmide pET-28c.....	42
2-4	Inactivation des enzymes de restriction <i>Bam</i> HI et <i>Nco</i> I.....	42
2-5	Ligation.....	43

Chapitre III: Résultats et Discussion	44-75
PARTIE I: L'impact des substitutions d'acides aminés, potentiellement impliqués dans le mouvement du domaine 5 par rapport au domaine 4, sur les paramètres cinétiques de la GluRS de <i>E. coli</i>	45
1 Vérification de l'obtention des variants de la GluRS pleine longueur par séquençage du gène <i>gltX</i>	45
2 Surproduction de la GluRS pleine longueur sauvage et variants.....	46
2-1 Vérification de la solubilité des enzymes surproduites.....	46
2-2 Profil d'élution de la GluRS pleine longueur et ses variants.....	48
3 Dosage de la concentration des enzymes pleine longueur.....	52
3-1 Dosage par méthode de Bradford.....	52
3-2 Dosage par spectrophotomètre.....	53
3-3 Evaluation de la concentration des enzymes sur gel «SDS-PAGE».....	54
4 Rendement des purifications des enzymes pleine longueur.....	55
5 Vérification de l'état de l'ARNt et dosage de la concentration du mélange de l'ARNt non fractionné enrichi en ARNt ^{Glu}	56
5-1 Vérification de l'état de l'ARNt avant et après activation.....	56
5-2 Dosage et détermination de la concentration totale de l'ARNt par spectrophotomètre.....	57
5-3 Test de l'activité acceptrice de l'ARNt pour le glutamate.....	57
6 Réaction de glutamylation: Analyse cinétique de la GluRS pleine longueur sauvage et de ses variants.....	58
6-1 Détermination de K_m pour l'ARNt ^{Glu}	59
6-2 Détermination de K_m pour le glutamate.....	60
PARTIE II: Etude de l'impact des substitutions d'acides aminés, potentiellement impliqués dans le mouvement du domaine 5 par rapport au domaine 4, sur la flexibilité de la charnière liant les domaines 4 et 5	64
1 Clonage des gènes codant les domaines C-terminaux de la GluRS sauvage et variants	64
1-1 Production des copies de gène codant les domaines 4 et 5 par PCR.....	64
1-2 Dosage et quantification du vecteur et des inserts.....	66
1-3 Vérification de la ligation.....	66
2 Séquençage des gènes encodant les GluRS tronquées sauvage et variants.....	68
3 Surproduction, purification et caractérisation des GluRS tronquées sauvage et variants chez <i>E. coli</i> BL21.....	68
3-1 Vérification de la solubilité des GluRS tronquées sauvage et variants.....	69

3-2	Purification de la GluRS tronquée sauvage par chromatographie d'affinité au nickel.....	71
3-3	Purification de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions.....	72
3-4	Séquençage de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage par spectroscopie de masse.....	74
3-5	Caractérisation de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage par RMN.....	76
4	Evaluation des pertes au cours des étapes d'analyses.....	77
 Chapitre IV: Conclusion et Perspectives		80-82
	Conclusion.....	81
	Perspectives.....	82
	Bibliographie	83-87
	Annexes	88-91
	Annexe 1.a.....	89
	Annexe 1.b.....	90
	Annexe 2.a.....	91
	Annexe 2.b.....	91

<i>Abréviation</i>	<i>Nom complet</i>
aaRS	Aminoacyl-ARNt synthétase
A37	Adénosine à la position 37
ADN	Acide désoxyribonucléique
AdT	Aminoacyl-ARNt amidotransférase
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
Ala	Alanine
Arg	Arginine
ArgRS	Arginyl-ARNt synthétase
ARN	Acide ribonucléique
ARNt ^{Gln}	ARN de transfert spécifique à la glutamine
ARNt ^{Glu}	ARN de transfert spécifique à l'acide glutamique
Asp	L'acide aspartique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BSA	albumine sérique bovine
Cpm	coups par minute
°C	Degrés Celsius
C34	Cytidine à la position 34
C36	Cytidine à la position 36
C ₃₁₃₋₄₇₁	Domaines 4 et 5 de la GluRS sauvage
C ₃₁₃₋₄₇₁ D333A	Domaines 4 et 5 de la GluRS D333A
C ₃₁₃₋₄₇₁ E455R	Domaines 4 et 5 de la GluRS E455R
C ₃₁₃₋₄₇₁ E366A	Domaines 4 et 5 de la GluRS E366A
C ₃₁₃₋₄₇₁ E366A#dc	Domaines 4 et 5 de la GluRS E366A#dc
D333A	Substitution de l'acide aspartique par une alanine à la position 333
CaCl ₂	Chlorure de calcium
cm	Centimètre
DMSO	di-méthylsulfoxyde
D.O.	Densité optique
D.O./ml	Unité de densité optique par millilitre
dpm	Désintégration par minute
DTT	1,3-dithiothréitol
E366A	Substitution du glutamate par une alanine en position 366
E366A#dc	Substitution du glutamate par une alanine en position 366 avec un ajout d'un segment de 10 acides aminés en amont de la charnière 4-5
E455R	Substitution du glutamate par un arginine en position 455
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Sel disodique de l'acide éthylènediamine tétraacétique
EtBr	Bromure d'éthidium ou bromure de 2,7-diamino-10-éthyl 9-phenyl phénantridium
g	gramme
Gln	Glutamine
GlnRS	Glutaminyl-ARNt synthétase
GluRS ou ERS	Glutamyl-ARNt synthétase

Glu	Glutamate
Gly	Glycine
His	Histidine
HEPES	acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanol-sulfonique]
Ile	Isoleucine
Imidazole	1,3-diaza-2,4-cyclopentadiène
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
K ₂ HPO ₄	Hydrogène-orthophosphate de dipotassium
<i>k</i> _{cat}	Constante catalytique (turnover number)
kDa	kilodalton
<i>K</i> _m	Constante de Michaelis
KOH	Hydroxyde de potassium
l	litre
Leu	Leucine
Lys	Lysine
M	Molaire ou 1 mole par litre
Met	Méthionine
mAU	milli unité d'absorbance
mg	milligramme
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
ml	millilitre
mM	millimolaire
mm	millimètre
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfate d'ammonium
NiSO ₄	sulfate de nickel
Ni-NTA	Nickel acide nitrotriacétique
nm	nanomètre
Phe	Phénylalanine
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pro	Proline
psi	livre par pouce carré (pound per square inch)
rpm	rotation par minute
SC-fold	“stem-contact fold” ou domaine de contact avec les tiges de l'ARNt
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
Ser	Serine
TCA	Acide trichloroacétique
TDE	tampon de dilution d'enzyme
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
Thr	Thréonine
Tris	tris (hydroxyméthyle) aminométhane
Tyr	Tyrosine
U35	Uridine à la position 35

μg	microgramme
μm	micromètre
Val	Valine
V	Volt
V_{max}	vitesse maximale de la réaction enzymatique
V_i	vitesse initiale
Xa-(His) ₆	site de reconnaissance du Facteur Xa et queue de six histidines

Liste des figures et des tableaux

<i>Identification</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
Fig. 1	Illustration schématique du mécanisme de la transcription chez les procaryotes	3
Fig. 2	Représentation schématique illustrant le mécanisme de la traduction chez les bactéries	4
Fig. 3	Mécanisme de la réaction d'aminacylation	6
Fig. 4	Structure tridimensionnelle en ruban de la GluRS de <i>T. thermophilus</i> illustrant les différents domaines	9
Fig. 5	Représentation des deux domaines C-terminaux de la GluRS en liaison avec les 3 bases dans la boucle d'anticodon de l'ARNt ^{Glu}	11
Fig. 6	Changements conformationnels dans la GluRS lors de la liaison de l'ARNt ^{Glu}	12
Fig. 7	Présentation des interactions des acides aminés de la GluRS de <i>T. thermophilus</i> avant et après la liaison de l'ARNt ^{Glu}	15
Fig. 8	Diagramme des étapes de la partie Matériels et méthodes	18
Fig. 9	Construction du plasmide pKR-15 utilisé pour la surproduction constitutive de l'ARNt ^{Glu} in vivo. Schéma adapté de la thèse de Kelly Conner Rogers	22
Fig. 10	Illustration schématique des étapes de la chromatographie d'affinité sur colonne de résine Ni-NTA	27
Fig. 11	Appareil FPLC ÄKTA utilisé, de la compagnie Amersham Pharmacia Biotech	31
Fig. 12	Alignement des séquences d'acides aminés de la GluRS pleine longueur sauvage de <i>E. coli</i> et de ses variants D333A, E455R, E366A et E366A#dc déduites des séquences de nucléotides de leur gène	46
Fig. 13	Vérification de solubilité de la GluRS pleine longueur et de ses variants	47
Fig. 14	Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproduites de la GluRS pleine longueur sauvage	48

Fig. 15	Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproduites du variant D333A de la GluRS pleine longueur	49
Fig. 16	Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproduites du variant E455R de la GluRS pleine longueur	49
Fig. 17	Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproduites du variant E366A de la GluRS pleine longueur	50
Fig. 18	Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproduites du variant E366A#dc de la GluRS pleine longueur	51
Fig. 19	Courbe standard de la densité optique en fonction de la concentration de BSA selon la méthode de Bradford	52
Tab. 1	Concentrations stock de la GluRS pleine longueur sauvage variants calculées selon la méthode de Bradford	52
Tab. 2	Concentrations stock de la GluRS pleine longueur sauvage et de ses variants dans les fractions «élution» calculées selon la loi de Beer-Lambert	53
Fig. 20	Confirmation visuelle de la concentration des enzymes sur gel «SDS-PAGE»	54
Tab. 3	Rendement des GluRS pleine longueur en milligramme de protéine par gramme de cellule	55
Fig. 21	Séparation d'ARNt enrichi en ARNt ^{Glu} sur gel de polyacrylamide-urée (15%-8M)	56
Tab. 4	L'estimation de la concentration d'ARNt total non fractionné et purifié	57
Fig. 22	Test d'activité acceptrice de l'ARNt non fractionné enrichi en ARNt ^{Glu}	58
Fig. 23	Détermination des constantes cinétiques pour l'ARNt ^{Glu} par régression non-linéaire utilisant le logiciel KaleidaGraph	59

Fig. 24	Détermination des constantes cinétiques pour le glutamate par régression non-linéaire utilisant le logiciel KaleidaGraph	60
Tab. 5	Paramètres cinétiques de la GluRS d' <i>E. coli</i> pleine longueur sauvage et variants dans la réaction d'aminocyclation	61
Fig. 25	Alignement des séquences d'acides aminés de la charnière 4-5 de diverses GluRS de structures connues	62
Fig. 26	Sélection sur gel d'agarose des inserts encodant la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage et variants produits par PCR à différentes températures	65
Fig. 27	Dosage quantitatif du vecteur et des inserts sur gel d'agarose	66
Tab. 6	Quantification et concentration des inserts et du vecteur	66
Fig. 28	Vérification sur gel d'agarose des clones qui ont incorporé les plasmides contenant le gène codant la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage et variants par digestion avec <i>Bam</i> HI et <i>Nco</i> I	67
Fig. 29	Alignement des séquences d'acides aminés de la GluRS tronquée sauvage de <i>E. coli</i> et de ses variants déduites des séquences de nucléotides de leurs gènes	68
Fig. 30	Vérification de la solubilité de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage et de ses variants	69
Fig. 31	Vérification par électrophorèse de la surproduction de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ par BL21 sur gel «SDS-PAGE»	70
Fig. 32	Profil d'élution de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ par chromatographie d'affinité surproduite à partir des souches d' <i>E. coli</i> , BL21 et JP1449	71
Fig. 33	Profil d'élution de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage par chromatographie sur colonne MonoQ HR 10/10 échangeuse d'ions	73
Fig. 34	Analyse par électrophorèse sur gel «SDS-PAGE» des fractions d'élution de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇ sauvage récoltées	73
Fig. 35	Fractions d'élution de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage par analyse par SDS-PAGE des aliquotes de chaque étape de chromatographie	74

Fig. 36	Alignement des séquences des résidus des peptides, identifiés par spectroscopie de masse, avec la séquence de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage	75
Fig. 37	Alignement des séquences des peptides, identifiés par spectroscopie de masse, avec les GluRS pleine longueur d' <i>E. coli</i>	75
Fig. 38	Spectre 1D de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ par RMN obtenu dans le laboratoire du Dr. Stéphane Gagné	76
Tab. 7	Pertes de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage pendant les étapes de purification	77
Tab. 7.1	Perte de la GluRS C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage dans la dernière centrifugation durant la dernière étape de concentration	77
Fig. 39	Analyse de la nature des pertes de la fraction flowthrough et la suspension du lavage de la paroi du filtre sur gel «SDS-PAGE»	78
Annexe1.a	Alignement des séquences des nucléotides de la GluRS pleine longueur sauvage et de ses variants D333A, E455R et E366A	89
Annexe1.b	Séquences des nucléotides du variant de la GluRS pleine longueur E366A#dc	90
Annexe2.a	Alignement des séquences des nucléotides de la GluRS tronquée sauvage et de ses variants D333A, E366A, E455R	90
Annexe2.b	Séquences des nucléotides du variant de la GluRS tronquée E366A#dc	91

Chapitre I

Introduction

I- La biosynthèse des protéines

1- Les étapes de la biosynthèse des protéines

La biosynthèse des protéines se résume en un processus qui permet la formation de polypeptides à partir des acides aminés présents dans le cytoplasme guidé par l'information génétique contenue dans l'ADN. Ce processus qui consomme une bonne partie de l'énergie de la cellule se déroule en deux grandes étapes représentées par la transcription et la traduction.

1-1 La transcription

La transcription est le phénomène qui permet le passage de l'information génétique contenue dans l'ADN vers un transcrit appelé l'ARN messager (ARNm). Chez les bactéries la transcription est assurée par l'ARN polymérase; cette enzyme permet la création d'un ARNm complémentaire à des régions codantes de l'ADN en formant une liaison phospho-diester entre des ribonucléotides. Cette polymérase nécessite la présence d'une molécule d'ADN double brin, même si un seul brin est transcrit en ARN.

La transcription (Fig. 1) s'effectue en trois étapes dont la première est l'initiation qui se récapitule dans la fixation de l'ARN polymérase au promoteur pour former un complexe ADN/ARN polymérase qui entraîne l'ouverture sur quelques paires de bases de la double hélice conduisant ainsi au démarrage de la transcription. La seconde étape se présente dans l'élongation où l'ARN polymérase continue la polymérisation en combinant les ribonucléotides complémentaires au brin codant. La dernière étape qui est la terminaison est définie comme le processus conduisant à la dissociation du complexe ARN polymérase de l'extrémité 3' du gène. Les transcrits d'ARNm ainsi formés vont servir comme gabarit pour construire des molécules protéiques correspondant selon le code génétique à la séquence des nucléotides (Voet et Voet, 2011, chapitre 31: Transcription).

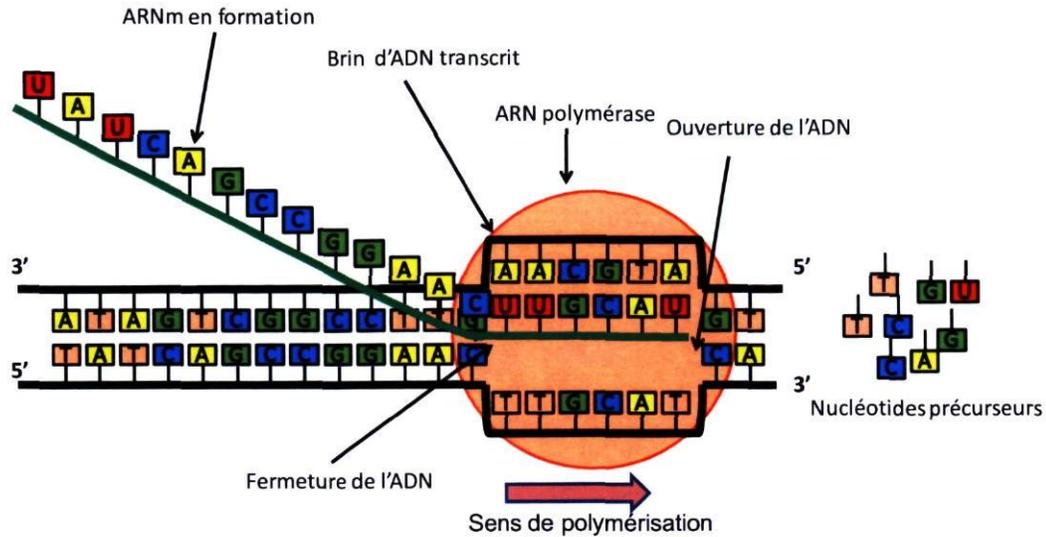


Fig. 1: Illustration schématique du mécanisme de la transcription chez les procaryotes.

1-2 La traduction

La traduction est un mécanisme qui se déroule au niveau du ribosome et par lequel se fait la conversion de l'information génétique contenue dans l'ARNm en polypeptide (protéine). Toute une machinerie de traduction est chargée de cette tâche permettant en premier lieu de reconnaître les triplets de codons positionnés les uns à côté des autres, et par la suite de positionner les acides aminés activés (sur l'ARNt) consécutifs et finalement d'établir une liaison covalente dite liaison peptidique. L'ARNm est déchiffrée par le biais de molécules clefs appelées ARN de transfert (ARNt).

Ce phénomène de traduction (Fig. 2) se déroule également en trois étapes: l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation est l'étape d'association de l'ARNm et de l'aminoacyl-ARNt initiateur à la petite sous-unité du ribosome suivie par la fixation de la grande sous-unité. L'élongation constitue la synthèse du polypeptide avec la fixation du peptidyl-ARNt dans le site P du ribosome alors que l'ARNt porteur d'un acide aminé en attente se fixe sur le site A, et ensuite le site E permet la libération de l'ARNt désacylé qui a cédé son acide aminé. La terminaison est déterminée par les codons STOP (Voet et Voet, 2011, chapitre 32: Translation).

La réaction d'aminoacylation de l'ARNt est catalysée par une enzyme particulière appelée aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS). C'est une enzyme qui joue un rôle primordial dans la biosynthèse des protéines en effectuant le chargement de l'acide

aminé sur son propre ARNt pour produire aa-ARNt qui formera un complexe avec le facteur d'élongation EF-Tu, et regagnera le ribosome pour la traduction. D'autre part, il est important de noter que l'aaRS est une enzyme multi-domaine qui joue un rôle central dans la haute fidélité de la traduction (Ibba et Söll, 2004).

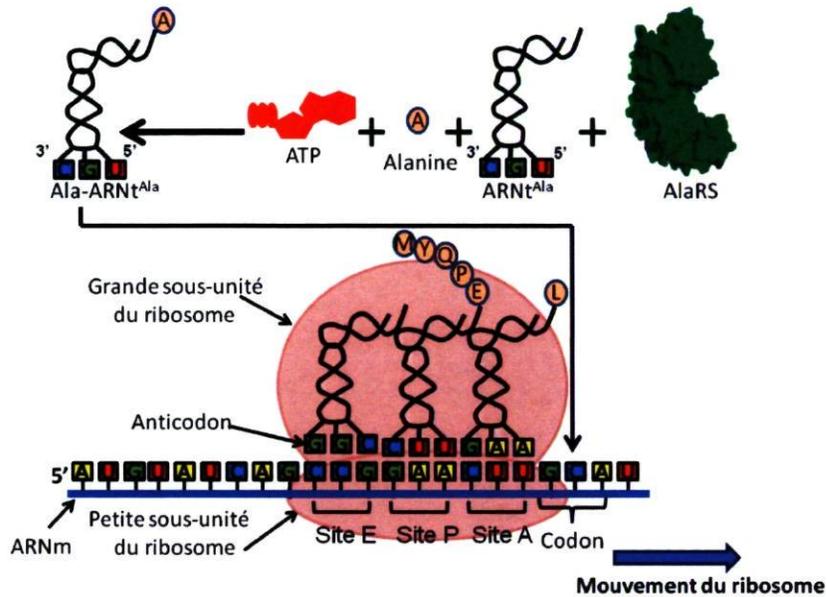


Fig. 2: Représentation schématique illustrant le mécanisme de la traduction chez les bactéries.

1-3 Généralités sur les ARNt

L'ARNt (acide ribonucléique de transfert) est une molécule stable composée généralement de 76 nucléotides (Jühling *et al.*, 2009). La tige acceptrice de l'ARNt se termine généralement par la séquence nucléotidique CCA₇₆ responsable de l'acceptation de l'acide aminé. Le nucléotide A₇₆ est important pour les réactions d'aminocyclisation et d'édition. La nature des nucléotides C₇₄ et C₇₅ est plus importante pour la réaction d'aminocyclisation que pour la réaction d'édition (Zhou *et al.*, 2011). L'ARNt est essentiel pour la lecture du code génétique sous forme de triplets de codons traduits en une chaîne d'acides aminés grâce à la complémentarité de ces codons avec les anticodons de l'ARNt. Les différents aa-ARNt qui participent à l'élongation partagent les mêmes éléments qui leur permettent de se loger dans le site A du ribosome pour

l'élongation; mais d'autre part, ces ARNt ont des points de différences qui caractérisent chaque type d'ARNt. La spécificité de ces molécules est due entre autres aux bases modifiées qui sont impliquées dans leur stabilité et leurs interactions avec les aaRS. Les ARNt contiennent des bases modifiées qui coopèrent à leur conformation adéquate en permettant un repliement conforme, comme dans le cas des bases modifiées se trouvant dans la boucle d'anticodon (Giegé et Frugier, Translation Mechanisms, 2003, Chapitre1). La base modifiée mnm^5s^2U34 optimise la stabilité de l'ARNt^{Glu} ainsi que son action comme cofacteur de la GluRS pour la reconnaissance des deux autres substrats à savoir l'ATP et le glutamate (Madore et *al.*, 1999). Ces bases modifiées permettent aussi la reconnaissance des codons de l'ARNm.

2- La réaction d'aminacylation des ARNt

Le décodage de l'ARNm est effectué grâce aux molécules d'ARNt chargées par des acides aminés correspondant à leur anticodon. Ces ARNt sont chargés par des enzymes particulières nommées aaRS, et le phénomène qu'elles effectuent est appelé réaction d'aminacylation. Pour le bon déroulement de cette réaction, les aaRS ont besoin des trois substrats, à savoir l'acide aminé, l'ARNt correspondant et l'ATP qui est la principale source d'énergie pour la réaction.

La réaction d'aminacylation (Fig. 3) se déroule en deux différentes étapes: la première consiste à la fixation de l'acide aminé, et l'ATP sur l'enzyme produisant l'intermédiaire aminoacyl adénylate qui est la forme activée de l'acide aminé, et libérant ainsi une molécule de pyrophosphate. La deuxième étape est le transfert de l'acide aminé activé sur un des groupements hydroxyle du ribose de l'adénosine terminale de la tige acceptrice en 3' de l'ARNt; cependant le groupement adénylate est libéré sous forme d'AMP (Söll et Schimmel, 1974; Schimmel et Söll, 1979).

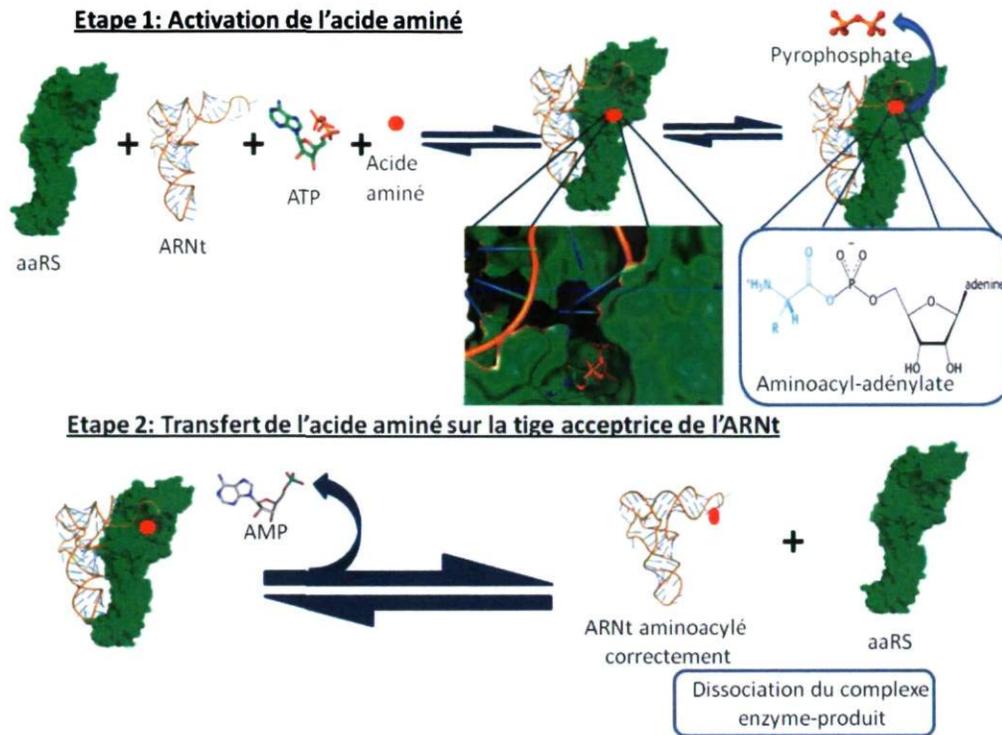


Fig. 3: Mécanisme de la réaction d'aminocyclation.

II- Les aminoacyl-ARNt synthétases

Les aaRS sont des enzymes qui participent dans l'étape clef de la traduction contribuant au transit de l'information génétique contenue dans les acides nucléiques vers la naissance des protéines qui vont jouer des rôles importants au sein de la cellule.

Le rôle des aaRSs est d'effectuer des liaisons entre un acide aminé et son propre ARNt. Les aaRSs coopèrent à la fidélité de la traduction du code génétique qui est estimé de 1 par 10^4 acides aminés mal incorporé dans la protéine (Voet et Voet, 2011, chapitre 32: Transfer RNA and its aminoacylation p: 1355); cette coopération consiste à la reconnaissance exacte des ARNt correspondant aux acides aminés.

1- Les classes d'aaRS

Selon des critères structuraux et fonctionnels, les aaRSs sont partagées en deux classes, I et II (Eriani et al, 1990 revue par Ibba et söll, 2000 et par Ribas et Pouplana et Schimmel, 2001). En se basant sur les caractéristiques fonctionnelles on distingue la

classe I des aaRS de la classe II par la position de l'attachement de l'acide aminé sur la tige acceptrice de l'ARNt. La classe I caractérise les aaRS qui effectuent l'attachement des acides aminés en position 2'-OH du ribose de l'adénosine terminale de la tige acceptrice de l'ARNt, tandis que les aaRS de la classe II attachent les acides aminés en position 3'-OH excepté la PheRS qui effectue le chargement en 2'-OH. Structurellement, les aaRS de la classe I sont caractérisées par une conformation spécifique en N-terminale appelée "Rossmann fold" (Brunie et *al.*, 1990) qui est d'une part un domaine liant les nucléotides appelé "nucleotide binding fold", et aussi bien un site actif qui lie les deux autres substrats qui sont l'ATP et l'acide aminé. La classe II définit les aaRS qui ont un site actif organisé autour d'un feuillet β antiparallèle (Cusack et *al.*, 1990).

2- La glutamyl-ARNt synthétase bactérienne

Chez les bactéries, la glutamyl-ARNt synthétase (GluRS) appartenant à la classe I est groupée avec la GlnRS dans la même sous-classe puisqu'elles ont subi les mêmes voies d'évolution concernant leurs domaines catalytique (Lamour et *al.*, 1994, Siatecka et *al.*, 1998). La GluRS est représentée selon deux formes: la première est illustrée par le groupe des GluRS non discriminatrices qui est le plus répandu. Ce type charge le glutamate sur l'ARNt^{Glu} produisant Glu-ARNt^{Glu} et sur l'ARNt^{Gln} formant Glu-ARNt^{Gln}. L'erreur commise dans le chargement de l'ARNt^{Gln} par le mauvais acide aminé (glutamate) est corrigée par la transamidation par une enzyme particulière appelée amidotransférase (AdT) (Roger et Söll 1995, Curnow et *al.*, 1997). Cette enzyme va se servir de Glu-ARNt^{Gln} comme substrat afin de transformer le glutamate en glutamine. Le deuxième type, représenté par les GluRS discriminatrices trouvées chez certaines protéobactéries par exemple, *E. coli*, charge le glutamate uniquement sur l'ARNt^{Glu}. Il a été constaté que ce type de GluRS caractérise purement les bactéries les plus évoluées et par la suite il a été démontré que cette catégorie de GluRS est apparue à partir d'une GluRS non discriminatrice suite à l'apparition de la glutamyl-ARNt synthétase (GlnRS) par un transfert horizontal à partir des eucaryotes (Lamour et *al.*, 1994).

La GluRS forme avec d'autres aaRS comme l'arginyl-ARNt synthétase (ArgRS) et la glutamyl-ARNt synthétase (GlnRS) un groupe qui possède un mécanisme de

régulation particulier pour éviter la formation de l'aminacyl-AMP en absence de l'ARNt (Sekine et *al.*, 2003). Les principaux éléments déterminants de la reconnaissance du complex GluRS-ARNt^{Glu} se trouvent dans la "augmented D-helix", le bras accepteur et le site actif de la GluRS (Sekine et *al.*, 1996). Avant la fixation de l'ARNt^{Glu} sur la GluRS, l'ATP est logé dans un sous-site «non-productif» où le phosphate α de l'ATP et le groupement α -carboxyl du glutamate dans le complexe GluRS/ATP/Glu sont très éloignés. L'interaction des trois régions de l'ARNt^{Glu} avec la GluRS cause des changements conformationels autour du site de liaison de l'ATP et permet par conséquent à l'ATP de se lier au sous-site «productif». Ce changement de conformation favorise le rapprochement de ces deux molécules. Il a été démontré que l'ARNt^{Glu} est essentiel non seulement au changement du mode de liaison de l'ATP mais aussi à la formation d'un site fonctionnel liant uniquement le L-glutamate (Sekine et *al.*, 2006). De plus, l'ARNt^{Glu} augmente l'affinité du site liant l'acide aminé envers le glutamate, alors que l'affinité pour d'autres acides aminés paraît être éliminée, ce qui favorise par conséquent la sélection de l'exact acide aminé (Sekine et *al.*, 2006).

3- La structure de la GluRS

La première structure tridimensionnelle connue d'une GluRS (Fig. 4) a été déterminée par diffraction des rayons X par des cristaux de la GluRS de *T. thermophilus* où seulement 4 domaines étaient identifiés (Nureki et *al.*, 1995). Ultérieurement il a été confirmé que cette enzyme est formée de cinq domaines structuraux (Sekine et *al.*, 2001). Le domaine 1 qui comprend le site catalytique nommé «Rossmann fold», coupé par le domaine 2 appelé peptide connecteur contenant un atome de zinc seulement chez *E. coli* (Liu et *al.*, 1993 et 1995). Le domaine 3 «SC fold» est un domaine de contact avec les tiges de l'ARNt (Sugiura et *al.*, 2001), est attaché à la partie C-terminale du domaine 1 dans sa partie C-terminale. Les derniers domaines 4 et 5 C-terminaux sont caractérisés par une structure en hélice α et ils sont responsables de la reconnaissance de la boucle d'anticodon de l'ARNt^{Glu}. Le domaine COOH-terminal (domaine 5, résidus 371 à 468) se compose de 6 hélices qui se plient en une forme hémisphérique en «cage α hélice» (Nureki et *al.*, 1995).

En revanche la GluRS de *T. thermophilus* montre trois motifs caractéristiques, Ins Glu-1, -2, et -3 (Nureki et *al.*, 1995). Ces 3 motifs insérés et les domaines α hélicoïdal COOH-terminaux constituent des structures spécifiques qui sont strictement impliquées dans la reconnaissance de l'ARNt^{Glu}. Dans le modèle du complexe GluRS/ARNt^{Glu}, Ins Glu-2 qui est sous forme de feuillet β antiparallèle est étendu et entre en contact avec le milieu de la tige acceptrice de l'ARNt.

La classe I des aaRS à laquelle appartient la GluRS montre deux autres motifs spécifiques hautement conservés. Le premier est dans le domaine de liaison de l'ATP nommé Rossmann-fold (revu par Carter, 1993) tandis que le deuxième est dans le domaine de contact avec les tiges de l'ARNt. Ces motifs sont présentés par une chaîne de 4 à 5 acides aminés dont le premier est HIGH (His-Ile-Gly-His) (Webster et *al.*, 1984 et 1987) et le second est KMSKS (Lys-Met-Ser-Lys-Ser) (Hountondji et *al.*, 1986). Par alignement de séquence, ces motifs ont été identifiés chez la GluRS de *E. coli* dont le premier motif est présenté par HVGG (His¹⁶-Val¹⁷-Gly¹⁸-Gly¹⁹) et le deuxième par KLSKR (Lys²³⁷-Leu²³⁸-Ser²³⁹-Lys²⁴⁰-Arg²⁴¹) (Breton et *al.*, 1986).

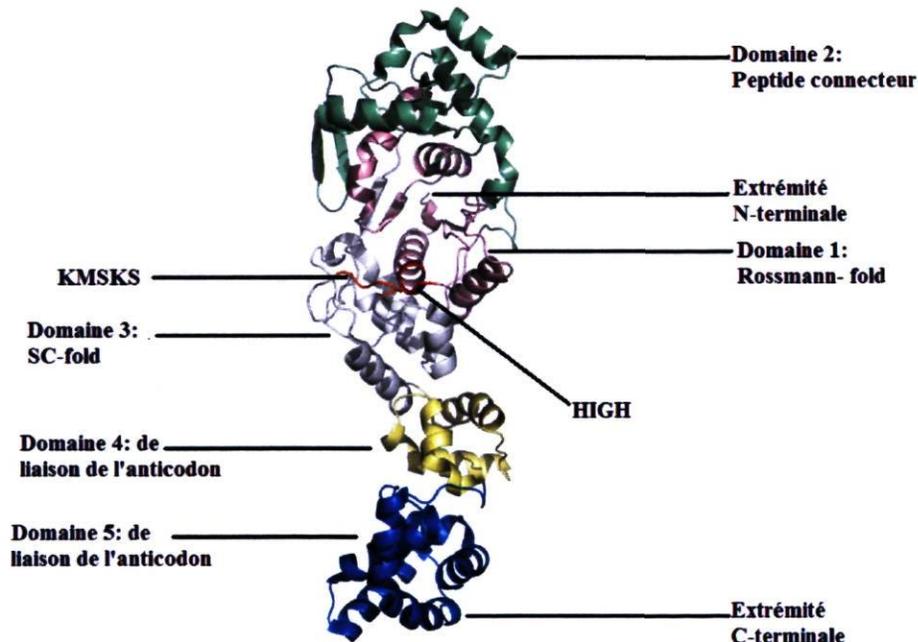


Fig. 4: Structure tridimensionnelle en ruban de la GluRS de *T. thermophilus* illustrant les différents domaines.

* PDB 1N75 traité par le logiciel Pymol.

4- La reconnaissance de l'anticodon de l'ARNt^{Glu} par la GluRS

Lors de la détermination de la structure de la GluRS, Nureki et *al.*, 1995 avaient confirmé que l'anticodon est localisé proche de la fente entre les domaines hélicoïdaux (domaines 4 et 5). Un potentiel électrostatique sur la surface de la GluRS accessible aux solvants a été détecté indiquant l'agglomération des charges positives autour de cette fente. Ces charges positives dérivent de l'Arg³¹⁹ du domaine 3 et des arginines Arg³⁴⁹, Arg³⁵⁰, et Arg³⁵⁸ se trouvant dans le domaine 4, suggérant que ces résidus basiques interagissent avec les nucléotides de l'anticodon.

Nureki était le premier qui a prédit la mobilité du domaine 5 par rapport au domaine 4 grâce à l'existence d'une charnière liant ces deux domaines. Il avait mentionné que «le domaine 5 est trop loin pour interagir avec l'anticodon de l'ARNt^{Glu}. Le domaine 5 est lié au domaine 4 par une charnière mobile. Par conséquent on suppose que le domaine 5 en «cage hélice α » s'incline et permet à la cavité d'être chargée positivement et de s'adapter à l'anticodon de l'ARNt^{Glu}». Ces résultats étaient confirmés plus tard en démontrant que le domaine 5 effectue une rotation de 8° par rapport au domaine 4 afin d'interagir avec la boucle d'anticodon (Sekine et *al.*, 2003). Le sillon latéral mineur de la boucle de l'anticodon interagit avec les domaines α hélicoïdaux 4 et 5 (Fig. 5a). Les 3 nucléotides de l'anticodon (C34-U35-C36) empilés les uns sur les autres sont pris dans une large cavité formée par les deux derniers domaines (Sekine et *al.*, 2001). Le premier et le deuxième nucléotide, C34 et U35 sont reconnus par une structure hélice α -boucle-hélice α (résidus 426-455) du domaine 5 tandis que le troisième nucléotide C36 est typiquement reconnu par le domaine 4 (Fig. 5a).

Le côté 5' de C34 interagit avec la chaîne latérale hydrophobe de Leu⁴²⁷, Leu⁴⁴⁷ et Phe⁴⁴⁸ (Fig. 5b). Le groupement carbonyle et le cycle azoté à la position 2 et 3 du C34 interagissent respectivement avec le groupement guanidinium de la chaîne latérale de l'Arg⁴³⁵ et le groupement amide de la chaîne principale de Leu⁴⁴⁷ via une liaison hydrogène. La base U35 est reconnue par la Thr⁴⁴⁴ via l'amide de la chaîne latérale et le groupement carbonyle de cette Thr⁴⁴⁴ respectivement avec les groupements 2-carbonyle et 3-amino du U35 par une liaison de type hydrogène. Le cycle azoté à la position 2 et 3 et le groupement carbonyle du C36 interagissent via une liaison hydrogène avec le groupement guanidinium du seul résidu Arg (Arg³⁵⁸) (Sekine et *al.*, 2001) (Fig. 5b).

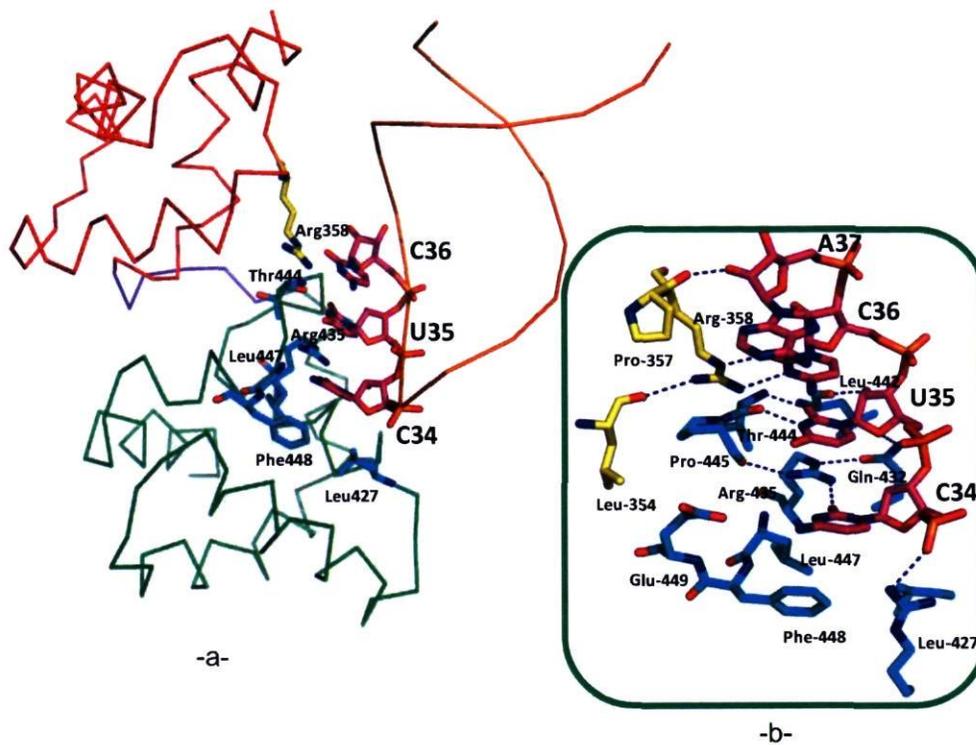


Fig. 5: Représentation des deux domaines C-terminaux de la GluRS en liaison avec les 3 bases dans la boucle d'anticodon de l'ARNt^{Glu}.

*l'ARNt est en couleur orangé et les bases en rose; les domaines 4 et 5 de la GluRS sont colorés respectivement en rouge et vert, et la charnière est présentée en mauve. Les résidus interagissants des domaines 4 et 5 sont colorés respectivement en jaune et cyan.

*PDB 1N77 traité par le logiciel Pymol adapté de la figure 2, Sekine et *al.*, 2001 .

5- Changement conformationnel de la GluRS lors de la liaison de l'ARNt^{Glu}

La GluRS subit un changement de conformation lors de la fixation de l'ARNt^{Glu} qui se présente dans l'inclinaison de chaque domaine par rapport au précédent. Le changement conformationnel résultant n'affecte pas les repliements des domaines de cette enzyme; par contre ces derniers subissent un changement d'orientation par une inclinaison de 7° du domaine CP (peptide connecteur ou domaine 2) par rapport au domaine 1, une inclinaison de 6° du domaine 4 relativement au domaine 3 (SC fold) et par une rotation de 8° du domaine 5 envers le domaine 4 (Sekine et *al.*, 2003).

La rotation effectuée par le domaine 5 rejoint la proposition de Nureki et *al.*, 1995 qui a suggéré la mobilité de ce domaine grâce à la charnière qui le lie au domaine précédant (domaine 4) expliquant que cette inclinaison est importante pour rapprocher le domaine 5 de l'anticodon de l'ARNt^{Glu}.

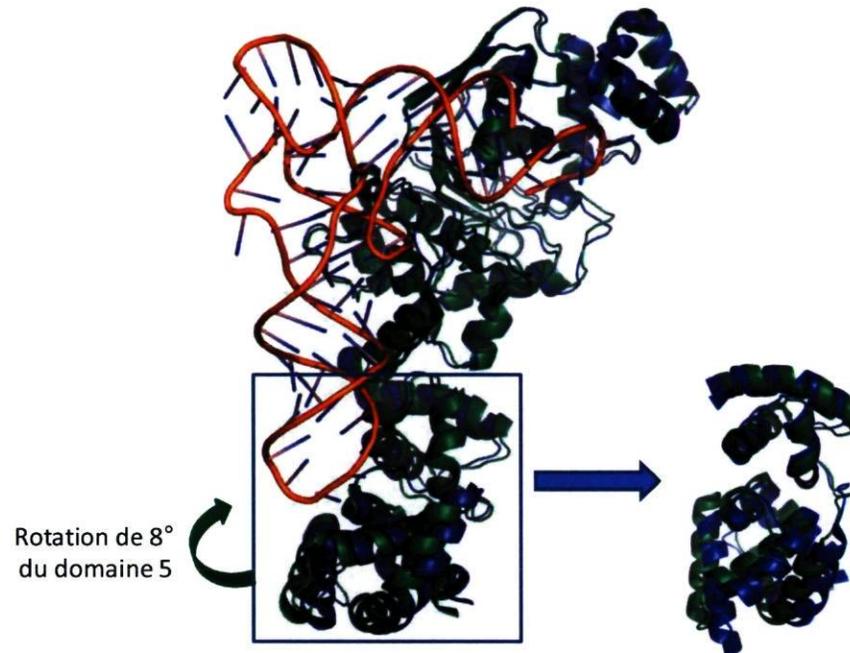


Fig. 6: Changements conformationnels dans la GluRS lors de la liaison de l'ARNt^{Glu}.

* Superposition des PDB 1N75 (GluRS sans ARNt^{Glu} colorée en bleu) et PDB 1N77 (GluRS avec ARNt^{Glu} colorée en vert) traitées par le logiciel Pymol; l'ARNt est présenté en couleur orangé.

6- Résultats antérieurs obtenus avec des GluRS tronquées

Des variants C-tronqués de la GluRS de *E. coli* ont été obtenus dans le but de tester le rôle des domaines 4 et 5 dans la réaction de glutamylation dépendante de l'ARNt^{Glu}. L'obtention du design des GluRS tronquées de *E. coli* était effectué par alignement de séquence de cette dernière avec la GluRS de *T. thermophilus*. La délimitation des domaines de la GluRS chez *E. coli* est basée sur la structure tridimensionnelle de référence de celle de *T. thermophilus* aussi bien que sur des données d'identité (34%) et de similarité (58%). Les variants ainsi produits sont N₁₋₃₁₃ et N₁₋₃₆₂ présentant

respectivement les domaines 1-3 et 1-4 et leurs domaines complémentaires C₃₁₄₋₄₇₁(domaine 4 et 5) et C₃₆₃₋₄₇₁ (domaine 5). Ces GluRS tronquées qui étaient solubles sous les conditions physiologiques, étaient destinées pour la surproduction et les tests d'aminacylation (Dubois et *al.*, 2009).

La délétion d'un ou de deux domaines C-terminaux n'a pas d'effet sur les K_m sauf pour le variant N₁₋₃₆₂ où la K_m pour l'ARNt^{Glu} a augmenté de 16 fois en présence d'un excès du domaine 5; cependant la k_{cat} pour l'aminacylation de l'ARNt a été affectée. La k_{cat} du variant N₁₋₃₆₂ est 2000 fois plus faible par rapport à celle de la GluRS sauvage; en outre l'addition du domaine 5 augmente la valeur de la k_{cat} de 100 fois pour diminuer l'écart de 2000 fois à 20 fois. La stimulation issue de l'addition du domaine 5 reflète que la connectivité covalente entre les domaines 4 et 5 n'est pas primordial pour le positionnement approprié de la partie terminale de la tige acceptrice de l'ARNt^{Glu} dans le site actif.

La vitesse de la réaction d'activation du glutamate pour le variant N₁₋₃₆₂ est 19 fois plus faible comparée à celle de la GluRS pleine longueur alors que la réaction d'aminacylation pour le même variant est de 2000 fois plus faible à celle de la GluRS sauvage. La vitesse de catalyse de la réaction d'activation du glutamate pour variant N₁₋₃₁₃ est 8 fois plus faible tandis qu'elle est 400 fois plus faible pour la réaction d'aminacylation en comparaison avec la GluRS sauvage. L'analyse de ces résultats ont permis d'avancer quelques explications:

- a- La réaction d'activation se fait dans le corps de l'enzyme (site actif).
- b- Les deux derniers domaines sont ajoutés durant l'évolution pour améliorer la vitesse de la deuxième étape de la réaction d'aminacylation (la réaction du transfert de l'acide aminé sur l'ARNt) ainsi que pour faciliter le relargage du produit de la réaction enzymatique (Glu-ARNt) (Dubois et *al.*, 2009).

L'hypothèse b est appuyée par Dasgupta et *al.*, 2009 qui ont aussi suggéré la présence d'autres éléments dans le site catalytique favorisant davantage la reconnaissance de l'ARNt.

III- Problématique

L'analyse de la structure de la GluRS de *T. thermophilus* avant et après la liaison de l'ARNt^{Glu} utilisant le logiciel Pymol a permis de mettre en évidence quelques interactions entre des résidus appartenant aux domaines 4 et 5 et la charnière qui les lie. Ces interactions pourraient expliquer la rotation de 8° que fait le domaine 5 afin d'interagir avec la boucle d'anticodon de l'ARNt^{Glu}. Les résidus ainsi impliqués interagissent par des liaisons hydrogènes par l'intermédiaire de leurs chaînes latérales.

Avant la liaison de l'ARNt^{Glu}:

Pymol a permis d'identifier la charnière liant les domaines 4 et 5 de la GluRS chez *T. thermophilus* qui est une boucle constituée de 7 résidus Thr-374, Glu-375, Glu-376, Asp-376, Tyr-377, Pro-378 et Val-379. Le deuxième résidu de la charnière Glu-375 est lié à l'Arg-462 du domaine 5. D'autres interactions ont été mises en évidence tel que l'Arg-461 du domaine 5 qui est coordonné au Glu-457 du domaine 5 et l'Arg-458 du domaine 5 est coordonné au Glu-343 du domaine 4 (Fig. 7).

Par alignement de séquence des GluRS de *T. thermophilus* et de *E. coli*, les résidus constituant la charnière chez *E. coli* ont été identifiés comme Glu-366, Asp-367, Phe-368, Ala-369, Glu-370, Phe-371.

Après la liaison de l'ARNt:

Glu-375 qui a été lié à l'Arg-462 devient hautement coordonné à trois autres arginines du domaine 5 (Arg-458, Arg-461, et Arg-465) (Fig. 7). Dans le cadre de séquences similaires (EDY chez *T. thermophilus* et EDF chez *E. coli*), l'alignement de la GluRS chez *T. thermophilus* et *E. coli* montre que le Glu-375 dans la première bactérie correspond au Glu-366 dans la deuxième; de plus Arg-452 (*E. coli*) correspond à Arg-458 (*T. thermophilus*), Arg-456 (*E. coli*) correspond à Arg-462 (*T. thermophilus*), Lys-459 (*E. coli*) correspond à Arg-465 (*T. thermophilus*) et Glu-455 (*E. coli*) correspond à Arg-461.

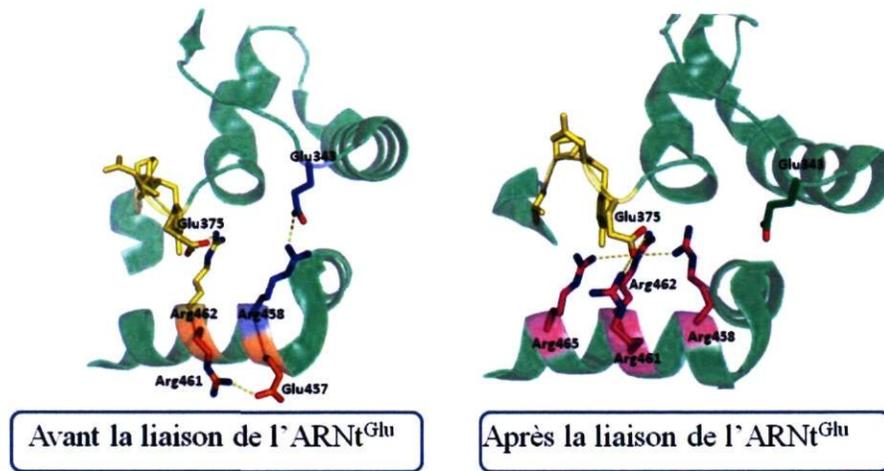


Fig. 7: Présentation des interactions des acides aminés de la GluRS de *T. thermophilus* avant et après la liaison de l'ARNt^{Glu}.

* PDB traité par Pymol.

IV- Objectifs:

Cette étude comprend deux parties qui se résument comme suit:

1- Le premier objectif de ce travail est de tester l'hypothèse qui met en valeur le rôle de la charnière 4-5 de la GluRS de *E. coli* dans le mouvement du domaine 5 par rapport au domaine 4, et son influence sur l'activité catalytique de cette ligase. Le choix des mutations est basé sur les interactions observées sur Pymol avant et après la liaison de l'ARNt^{Glu}. Le premier choix est le variant E366A «le résidu lieur», ce glutamate en position 366 devient coordonné à quatre arginines après la liaison de l'ARNt^{Glu}. Un autre variant «E455R» a été choisi car le Glu455 est un résidu qui interagit avec Glu-366 de la charnière qu'après la liaison de l'ARNt^{Glu}. D333A a été choisi comme un troisième variant car il constitue d'une part le seul résidu qui appartient au domaine 4 et qui rentre dans ce groupe d'interaction; et d'autre part de fermer le cercle de mutation en mutant un résidu qui est lié à une arginine (Arg452) parmi les trois qui deviennent coordonnés au Glu366 après la liaison de l'ARNt^{Glu}.

Le glutamate en position 366 est un résidu acide, et cette acidité lui confère l'aptitude à coordonner les quatre arginines d'où le choix de la mutation par une alanine qui est un résidu apolaire. La mutation de l'aspartate 333 par une alanine joint le même raisonnement. La mutation du glutamate 455 par une arginine était choisie dans le but de vérifier l'effet d'une mutation d'un résidu acide par un autre basique.

2- Le deuxième objectif consiste à tester l'influence possible de la flexibilité de la charnière 4-5 de la GluRS de *E. coli* sur son activité catalytique. Dans ce contexte, des variants tronqués contenant seulement les domaines 4 et 5 seront surproduits et purifiés pour une analyse par RMN.

Chapitre II

Matériels et méthodes

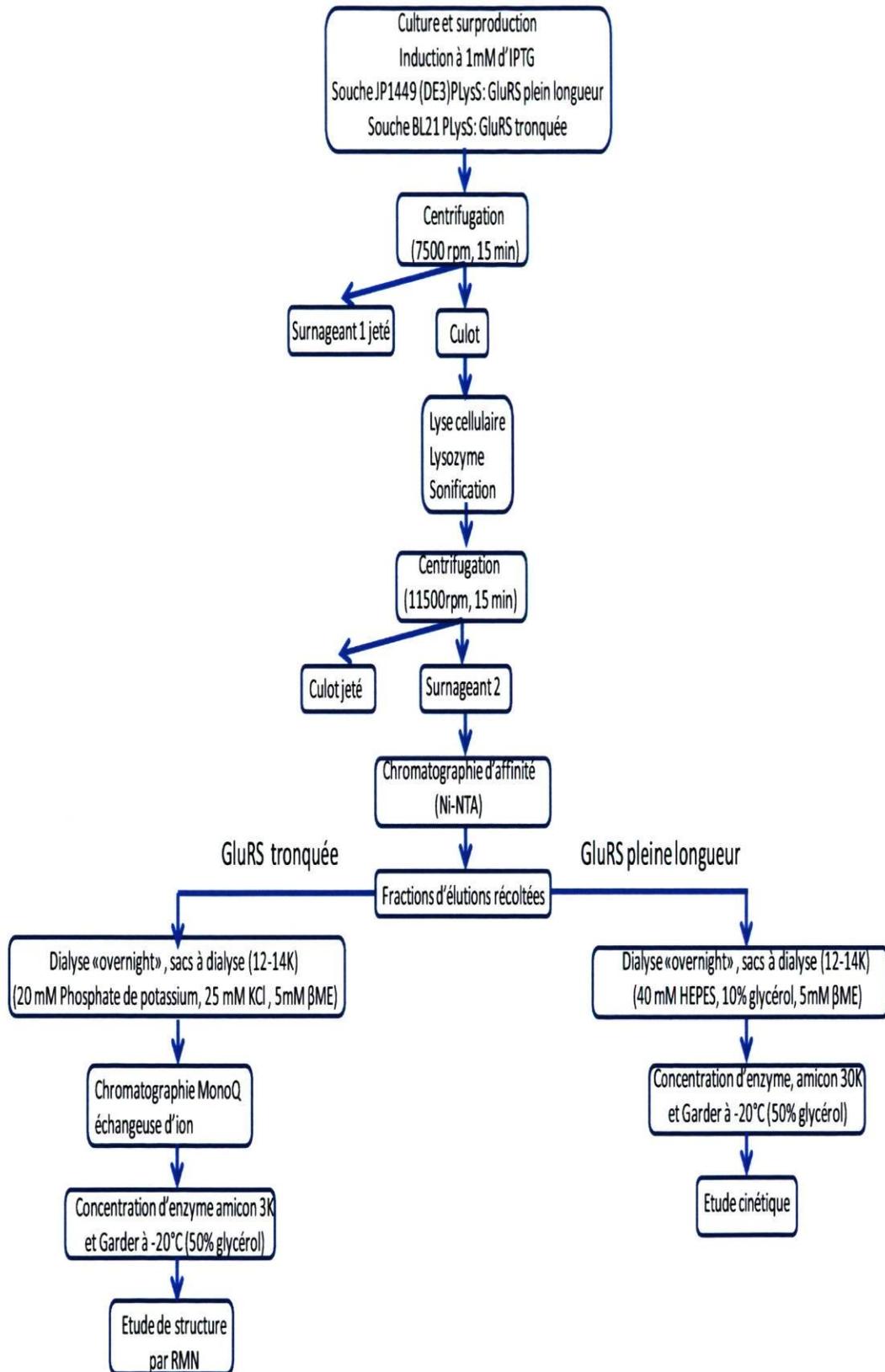


Fig. 8: Diagramme des étapes de la partie Matériels et méthodes.

I- Surproduction des GluRS pleine longueur et des GluRS tronquées, sauvages et variants

1- Les milieux de culture

1-1 Milieu LB

Pour la surproduction des protéines et la production d'une grande quantité de plasmides, nous avons utilisé le milieu de culture Luria Bertani (LB) (Sambrook et *al.*, 1989). C'est un milieu composé de 5 g d'extrait de levure (Becton et Dickinson "BD"), 5 g de NaCl (Anachemia) et 10 g de tryptone-peptone (BD) dissous dans un litre d'eau bi-distillée. Après sa préparation, le milieu LB est stérilisé par autoclavage durant 20 minutes sous une température de 121°C et une pression de 15 psi. Les antibiotiques sont ajoutés à une concentration finale de 35 µg/ml après refroidissement du milieu et juste avant la culture dans le but de sélectionner les souches.

1-2 Milieu des sels minimum

Le milieu des sels minimum (Coligan et *al.*, 1995) est utilisé pour la surproduction de l'ARNt^{Glu} qui est un substrat de la GluRS. Il est préparé en deux étapes dont la première consiste à dissoudre les constituants suivants: 4,5 g de KH₂PO₄ (Anachemia), 10 g de K₂HPO₄ (Anachemia), 1 g de (NH₄)₂SO₄ (BDH) et 0,5 g de citrate de sodium tribasique (BDH) dans un litre d'eau bi-distillée et à autoclaver. La deuxième étape est l'ajout de 0,8 ml de MgSO₄ (1 M), 10 ml de solution stock de glucose (20%), 0,5 ml de solution stock de thiamine (1%) et enfin l'ampicilline à une concentration finale de 200 µg/ml. Les solutions MgSO₄ et le glucose 20% sont stérilisées par autoclavage; par contre les solutions de thiamine et d'ampicilline sont stérilisées par filtration à l'aide d'une seringue et d'un filtre (VWR) 0,2 µm.

1-3 Milieu minimum M9

Le milieu minimum M9 est utilisé pour la surproduction des GluRS tronquées en vue de leur étude par RMN. On dissout en premier lieu, les constituants suivants: 6,4 g de Na₂HPO₄ (BDH) (ou 12,8 g NaHPO₄.7H₂O), 3 g de KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl (Aldrich chemical company, Inc.) (marqué en ¹⁵N), 0,5 g de NaCl dans 900 ml. Le pH est ajusté à 7,5 avec NaOH (10 M) et le milieu est autoclavé. Un volume de 100 ml de glucose 3,5% a été ajouté au milieu autoclavé. Des éléments traces sont ensuite ajoutés en

conditions stériles pour chaque litre de culture: 2 ml de MgSO₄ (1 M), 20 µl de FeCl₃ (0,1 M), 100 µl de CaCl₂ (1 M), 500 µl ZnSO₄ (0,1 M), 500 µl de thiamine (0,5%). Ces solutions ont été filtrées dans des conditions stériles par une seringue et un filtre (VWR) de 0,2 µm.

1-4 Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés sont préparés à une concentration stock de 35 mg/ml pour la kanamycine (Mannheim de Roche Diagnostics) et le chloramphénicol (Boehringer Mannheim) et à 200 mg/ml pour l'ampicilline (Bio Basic Inc). La stérilisation est faite par filtration à 0,2 µm pour la kanamycine et l'ampicilline puisqu'elles sont dissoutes dans l'eau bi-distillée, tandis que le chloramphénicol n'a pas été filtré en raison de sa dissolution dans l'éthanol 95%.

2- Souches de *Escherichia coli*, et plasmides

2-1 Souche JP1449 (DE3) pLysS

La souche utilisée est *E. coli* JP1449(DE3) pLysS qui est une souche thermosensible due à la mutation *gltX-351* dans le gène encodant la GluRS. Cette mutation entraîne la substitution du résidu glycine se trouvant en position 254 par un acide aspartique, ce qui interrompt la synthèse des protéines à une température supérieure à 42°C (Russell et Pittard., 1971), et qui rend la GluRS thermosensible (Lapointe et Delcuve, 1975). Un prophage DE3 est inséré dans le génome de la bactérie et il contient la séquence codante pour la T₇ ARN polymérase. Cette souche est transformée par le plasmide pLysS (Novagen) qui possède le gène de résistance au chloramphénicol. Le pLysS contient la séquence codante pour le T₇ lysozyme qui réduit le niveau d'expression des gènes sous contrôle du promoteur de la T₇ ARN polymérase et l'inhibe. Cette souche est rendue électrocompétente pour une transformation par le plasmide pET-28c contenant le gène de la GluRS ou un de ses variants.

2-2 Souche BL21(DE3) pLysS

BL21(DE3) pLysS (EMD4Biosciences) est une souche utilisée pour surproduire la GluRS tronquée et ses variants. Cette souche a été choisie après que nous ayons utilisé JP1449(DE3) pLysS qui a montré une faible surproduction des GluRS tronquées dans

une deuxième tentative. Les deux souches BL21 et JP1449 diffèrent entre autres par la mutation *glx-351*.

2-3 Souche XL1-Blue

XL-1 Blue de génotype *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)*] est une souche d'*E. coli* chimiocompétente résistante à la tétracycline, et commercialisée par Stratagene. Nous avons rendu cette souche électrocompétente pour l'obtention de grandes quantités de plasmides désignés. Un vieux stock de ces cellules chimiocompétentes était inoculé dans 10 ml de LB liquide et incubé à 37°C sous une agitation de 250 rpm durant toute la nuit. Un volume de 3 ml de cette préculture sert à démarrer un litre de culture fraîche. La densité optique (D.O.) est enregistrée jusqu'à atteinte d'une D.O. entre 0.5 et 0.6 à 600 nm. L'erlenmeyer contenant cette culture est refroidi sur glace pendant 30 minutes. La culture est centrifugée à 4°C durant 15 min à 4000 rpm dans un rotor F10 (2600 x g). Le surnageant est jeté tandis que le culot est dissout dans 1 litre d'eau froide stérile et centrifugé à nouveau à 4000 rpm pendant 15 min. Le culot ainsi isolé est redissous dans 0.5 litre d'eau froide, et cette solution est centrifugée à 4000 rpm pendant 15 min. Le culot récolté est dissous dans 20 ml de glycérol 10% froid et stérile, et resédimenté par une dernière centrifugation avec les mêmes paramètres. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans 2.5 ml de glycérol 10% aliquotés en 150 µl dans des tubes eppendorfs qui sont congelés rapidement avant de les garder à -80°C.

2-4 Souche DH5α/pKR-15

La souche DH5α/pKR-15 de génotype (F'Φ80*dlacZ Δ(lacZYA-arg F)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1/F' proAB+ lacIqZΔmM15 Tn10(tel^r)*) est une souche d'*E. coli* possédant un plasmide pKR-15 (voir Fig. 9) qui contient un gène codant pour l'ARNt^{Glu} ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline permettant sa sélection. Le promoteur T₇ est cloné entre les deux sites de clonage *EcoRI* et *PstI* à partir du plasmide pGFIB (Normanly et al., 1986). La cassette contenant le promoteur T₇ et le gène de l'ARNt^{Glu} est clonée dans le plasmide pKR-15 de manière à ce qu'elle soit précédée du promoteur *lpp* qui contrôle le gène d'une protéine membranaire. La surproduction de l'ARNt^{Glu} se fait d'une manière constitutive sans induction puisque le gène d'ARNt^{Glu} qui est toujours exprimé est sous le contrôle

du promoteur *lpp* (thèse de Kelley Conner Rogers, Yale University, 1993). La souche DH5 α contenant le plasmide pKR-15 a été fournie à notre laboratoire par le Dr. Dieter söll et le Dr. Kelly Rogers (Madore et *al.*, 1999).

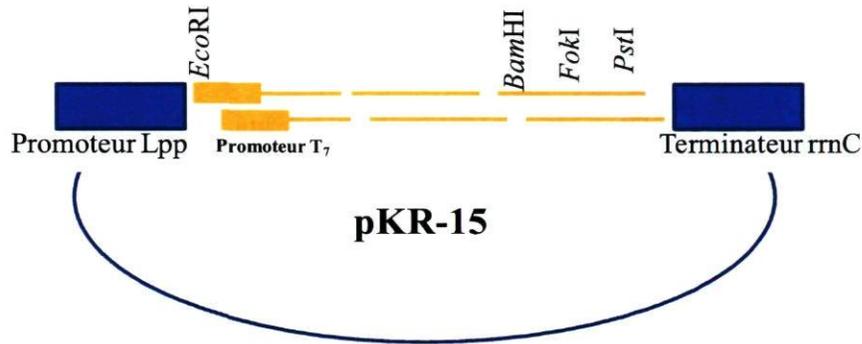


Fig. 9: Construction du plasmide pKR-15 utilisé pour la surproduction constitutive de l'ARNt^{Glu} in vivo. Schéma adapté de la thèse de Kelly Conner Rogers

2-5 Plasmide pET-28c

Le vecteur plasmidique pET-28c (Novagen) contient un gène de résistance à la kanamycine. Le gène *gltX* qui code pour la GluRS est inséré dans ce vecteur d'une manière qu'il soit précédé par le promoteur T₇ ARN polymérase et est régulé par l'opérateur lacO. L'induction par l'IPTG (un analogue non métabolisable du lactose) de l'opérateur lac stimule la transcription du gène de la T₇ ARN polymérase et ensuite la production de l'enzyme T₇ ARN polymérase. Cette T₇ ARN polymérase transcrit le matériel génétique se trouvant en aval du promoteur T₇ dans le vecteur pET, déclenchant le départ de surproduction de la GluRS juste après le moment d'induction par l'ajout de l'IPTG à la culture. Le gène codant pour la GluRS exprime d'une part une queue poly(His)₆ en C-terminale, qui permet la purification de la protéine grâce à l'affinité naturelle du nickel à ce résidu histidine, et d'autre part un site de reconnaissance (IEGR) de la protéase du facteur Xa qui se situe juste avant cette queue poly(His)₆. Ce vecteur était modifié (Dubois et *al.*, 2009) par élimination de deux sites de restrictions, à savoir *Cla* I et *Bpu*1102 dans le but d'assurer leur présence juste dans le gène et non pas dans le vecteur. Le site de restriction *Cla*I existant dans le gène de

résistance à la kanamycine éliminé par une mutation silencieuse, tandis que le site de restriction *Bpu*1102 est détruit.

3- Mutagenèse dirigée:

La mutagenèse dirigée sert à effectuer des mutations ponctuelles dans des parties du gène encodant les résidus désignés (D-333, E-366, E455) en utilisant le plasmide double brin pET-28c ERSXT. Avant d'entamer cette mutagenèse il faut premièrement faire un design des oligonucléotides contenant la mutation voulue qui serviront d'amorces pour construire les nouveaux plasmides. La conception des oligonucléotides est basée sur deux critères dont le premier est le nombre de nucléotides qui doit être entre 25 et 45, et contenir la mutation au milieu. Le deuxième critère est la température de fusion (T_m) qui doit être supérieure ou égale à 78°C calculée à l'aide de l'équation ci dessous:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%G+C) - 675/N - \% \text{ mésappariement}$$

*N = la longueur de l'amorce en bases.

Les oligonucléotides sont:

E366A-FOR: 5' - GCCGTTATTTCTACGCA GATTTTGCTGAGTTCGATGC -3'

E366A-REV: 3' - CGGCAATAAAGATGCGTCTAAAACGACTCAAGCTACG -5'

$$T_m = 79.39^\circ\text{C}$$

D333A-FOR: 5' - GCAGGAAAATATCGCGACCCGTAACGGCCCGCAGC -3'

D333A-REV: 3' - CGTCCTTTTATAGCGCTGGGCATTGCCGGGCGTCG -3'

$$T_m = 79,78^\circ\text{C}$$

E455R-FOR: 5' - GACCCGCAGTATCCGGCGTATCAACAAAGCGCTGG -3'

E455R-REV: 3' - CTGGGCGTCATAGCCGCATAGTTGTTTCGCGTCC -5'

$$T_m = 81.1^\circ\text{C}$$

La mutagenèse dirigée est effectuée à l'aide du PCR (Polymerase Chain Reaction) dont les grandes étapes impliquent en premier lieu la dénaturation du plasmide par la chaleur. La séparation des deux brins d'ADN ainsi produite permettra la liaison des deux oligonucléotides qui contiennent la mutation désirée. Pour ce faire, il faut préparer

selon le manufacturier (STRATAGENE Quik-change® II Site-Directed Mutagenesis Kit) un mélange réactionnel contenant 5 µl de tampon de réaction (10X), 20 ng d'ADN double brin (plasmide pET-28cERSXT), 125 ng de chaque oligonucléotides FOR («forward») et REV («reverse»), 1 µl de dNTP mix, ensuite ajuster avec de l'eau bi-distillée pour un volume final de 50 µl et finalement ajouter 1µl de *PfuUltra* HF DNA polymérase (2.5 U/µl). La polymérase *Pfu* commence la synthèse de l'ADN de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' et produit avec une grande fidélité des copies du plasmide portant la mutation désirée. La polymérase *Pfu* possède une activité 3'-5' exonucléase lui permettant de corriger les erreurs commises lors d'une incorporation incorrecte des nucléotides. La dernière étape de la mutagenèse se résume dans l'élimination des plasmides parentaux sauvages par digestion à l'aide de l'endonucléase *Dpn* I. Cette enzyme digère tous les plasmides ayant une adénine méthylée ou hémiméthylé dans son site de reconnaissance caractérisant ainsi les ADN parentaux méthylés par le système Dam. Les plasmides obtenus seront utilisés pour la transformation de la souche XL1-Blue supercompétente d'*E. coli* (Stratagene). Cette souche permet l'amplification des plasmides contenant la mutation désirée afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le séquençage. Pour la surproduction de la GluRS pleine longueur et tronquée avec leurs variantes, ces plasmides sont utilisés pour transformer respectivement les souches JP1449 et BL21.

4- Transformation

La transformation est le phénomène par lequel on introduit un matériel génétique (ADN) en solution au sein d'une cellule bactérienne. Dans le cas qui nous concerne, ce matériel génétique d'ADN bicaténaire est sous forme de plasmide. Les cellules de *E. coli* (JP1449, BL21 et XL-1Blue) qui sont rendues électrocompétentes seront transformées pour les objectifs cités précédemment. Pour ce faire, il faut déposer 250 µl d'une suspension de ces cellules électrocompétentes dans des cuvettes à électroporation (compagnie Bio Rad) laissées préalablement 30 min sur glace. Un volume de 1 µl de solution du plasmide pET-28c contenant le gène de la GluRS pleine longueur ou tronquée est ajouté au mélange. L'appareil Genepulser est utilisé pour transformer ces souches en appliquant une tension de 2,4 kV entre deux électrodes séparées par une distance de 0,2 cm avec les paramètres suivants: 200 OHMS et 25 µF. Un volume de 250 µl de LB stérile est rajouté au mélange avec prise de 20 µl qu'on étale sur une

gélose (LB 2% d'agar, 35 µg/ml de kanamycine pour XL-1Blue et 35 µg/ml de chloramphénicol et kanamycine pour les souches JP1449 et BL21). Cette dernière va être incubée immédiatement toute la nuit à 37°C. Le restant du mélange est mis dans un tube de polypropylène de 14 ml à fond rond (FALCON® de la compagnie BECTON DICKINSON) qu'on laisse agiter pendant 1 heure à 37°C, 250 rpm. Un volume de 20 µl de ce mélange (incubé et agité 60 min après transformation) est pris afin de l'inoculer sur une autre gélose qu'on incube dans les mêmes conditions.

5- Techniques de surproduction des GluRS pleine longueur et des GluRS tronquées, sauvages et variants

5-1 Préculture et culture des cellules

La préculture des cellules d'*E. coli* (JP1449 et BL21) est effectuée dans 100 ml de milieu LB liquide en présence de chloramphénicol et kanamycine présentant une concentration finale de 35 µg/ml dans le milieu. Cette préculture est incubée à 37°C sous une agitation de 250 rpm pendant toute la nuit et sera utilisée le jour suivant pour le démarrage d'une culture fraîche dans des erlenmeyers de 2 litres contenant 750 ml de LB avec les antibiotiques. Pour commencer, un volume de préculture équivalent à 1/100 du volume du milieu de culture a été ajouté dans chaque erlenmeyer. L'étape subséquente est la mesure des densités optiques à 600 nm en fonction du temps. Des prises d'aliquotes de 1 ml sont effectuées jusqu'à obtention d'une D.O. entre 0.4 et 0.5. Une fois que la D.O. est atteinte, l'induction est effectuée par ajout de l'IPTG (Laboratoire MAT) à une concentration finale de 1 mM signalant ainsi le début de la surproduction de l'enzyme. Après induction, la culture a été incubée à 26°C pendant toute la nuit.

5-2 Récolte des cellules

Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4°C pendant 15 min à 7500 rpm dans un rotor F10 (FIBER Lite®, 6-500X). Après séparation, le surnageant est jeté alors que les culots sont congelés immédiatement à -80 °C et sont pesés juste avant utilisation.

6- Purification des enzymes par chromatographie d'affinité pour le nickel

6-1 Préparation des extraits cellulaires

Pour préparer l'extrait cellulaire, un culot de cellules congelées à - 80°C est utilisé. Ce culot est pesé (environ 11,6 g) ensuite placé dans un bécher sur glace jusqu'à ce qu'il prenne une consistance visqueuse. Le culot de cellules est resuspendu dans 150 ml de tampon lyse et adsorption (20 mM de Tris-HCl pH 7,9, 5 mM d'imidazole) auquel sont ajoutés une petite quantité de lysozyme de blanc d'œuf de poulet (le bout d'une petite spatule) et une pastille d'inhibiteur de protéase Complete TM (Roche Diagnostics). La lyse s'effectue sur glace après l'obtention d'une suspension très visqueuse. Cette viscosité, due à la libération de l'ADN dans le milieu, est une indication d'une bonne lyse. L'ADN est digérée ultérieurement par ajout de 250 U de DNase (DNase I RNase free, ROCHE Diagnostocs). L'agent réducteur β -mercaptoéthanol (Sigma) est ajouté au lysat pour une concentration finale de 1 mM. Pour dégrader l'ADN non digéré, les extraits de la GluRS pleine longueur sauvage et des variants sont soniqués dans un sonificateur (Virsonic Digital 475, Ultrasonic Cell Disrupter, VirTis company) pendant 4 minutes, avec 30 secondes de sonification et 30 secondes de pause. Les lysats des GluRS tronquées n'ont pas été soniqués parce que les sondes du sonificateur étaient brisées. Dans les deux cas, le lysat de la GluRS pleine longueur et tronquée est centrifugé pendant 45 minutes à 11500 rpm à 4°C dans un rotor F18 (FIBER Lite[®],12-50X). Le surnageant est filtré sur un filtre de 0,45 μ m puis refiltré à 0,20 μ m. Le filtrat ainsi obtenu est prêt pour une analyse chromatographique.

6-2 Chromatographie d'affinité au nickel

6-2-1 Préparation de la colonne

La chromatographie se déroule dans une chambre à 4°C sous pression atmosphérique utilisant une colonne de 2 cm de diamètre fixée à un robinet. La résine Ni-NTA Superflow (15 ml) est déposée puis sédimentée et subséquemment rincée par passage de trois volumes d'eau bi-distillée. Un disque de 2 cm de diamètre de papier Whatman 3M est déposé à la surface de la résine afin d'empêcher la resuspension de la résine lors du dépôt de l'extrait cellulaire. Ensuite 1 ml NiSO₄ (tampon de charge, 100 mM, Laboratoire MAT) est ajouté afin de régénérer la résine qu'on lave ensuite avec 3

volumes d'eau bi-distillée. La colonne est chargée avec 4 volumes de tampons de lyse et adsorption utilisé pour la lyse cellulaire.

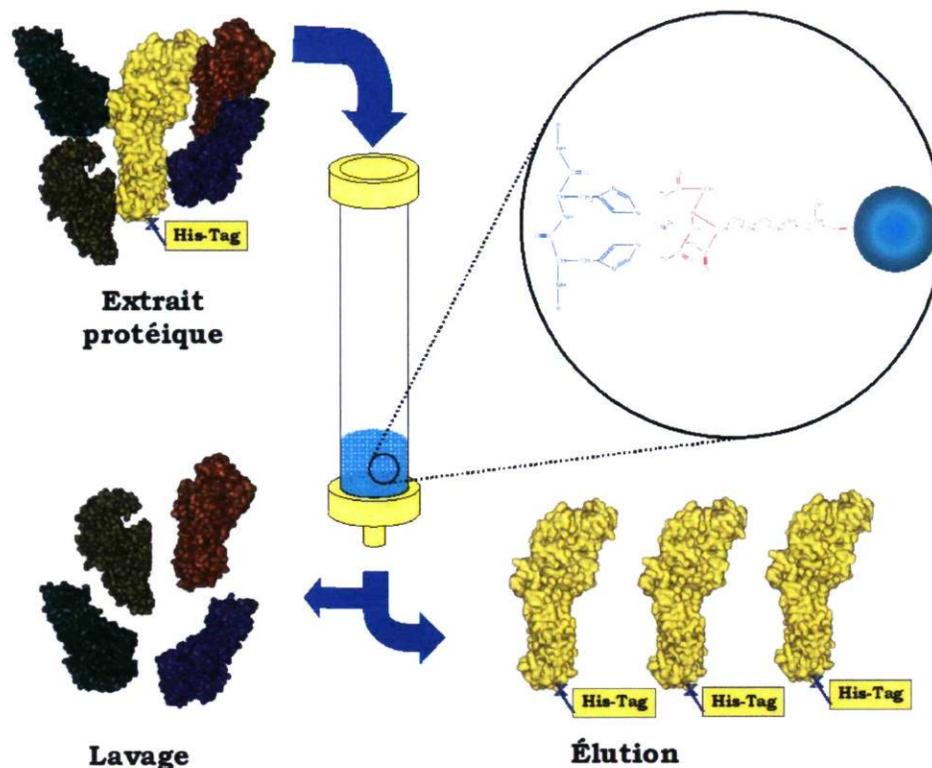


Fig. 10: Illustration schématique des étapes de la chromatographie d'affinité sur colonne de résine Ni-NTA. Schéma fait par Sébastien Blais.

6-2-2 Les étapes de la purification

La GluRS sauvage et ses variants surproduits vont être purifiés par chromatographie d'affinité au nickel. La résine Ni-NTA superflow de la compagnie Qiagen est généralement utilisée. Cette chromatographie s'appuie sur l'affinité de l'histidine au nickel lié à la résine. La première étape consiste à déposer le lysat sur la colonne qui passe à travers la résine. Les protéines qui ont la queue poly(His)₆ demeurent accrochées tandis que les autres passent tout droit. Ensuite on fait passer sur la colonne 3 volumes de tampon d'adsorption pour éliminer toute protéine non fixée sur la colonne. La colonne doit être lavée par 5 volumes de tampon Lavage (20 mM de Tris-HCl pH 7,9, 20 mM d'imidazole et 1 mM de β -mercaptoéthanol) afin d'éliminer toute protéine ayant une faible affinité pour le Ni. La GluRS est récupérée par élution en

passant 7 volumes de tampon d'élution (20 mM de Tris-HCl pH 7,9, 1 M d'imidazole et 1 mM de β -mercaptoéthanol) recueillis à la fin en quatre fractions. L'imidazole en forte concentration entre en compétition avec l'histidine sur les sites de liaison au nickel ce qui permet le décrochage de la protéine cible. Les fractions de lavage et d'élution sont dialysées séparément. Finalement la résine est nettoyée par passage de cinq volumes du tampon nettoyage (20 mM de Tris-HCl pH 7,9, 100 mM d'EDTA et 500 mM de NaCl). Le disque de papier whatman est retiré tandis que la résine est lavée par passage de 10 volumes d'eau bi-distillée puis rééquilibrée par 10 volumes d'éthanol 20% et enfin mise dans un tube vissé et gardé à 4°C pour une utilisation ultérieure (Dubois et *al.*, 2009).

6-2-3 Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante («SDS-PAGE») des fractions recueillies pendant la chromatographie d'affinité

L'appareil utilisé est Mini-PROTEAN®III Cell (BIO-RAD).

Les fractions recueillies par chromatographie sont analysées pour identifier celles qui vont être dialysées et concentrées. L'analyse consiste à déposer les échantillons de chaque fraction sur gel de polyacrylamide. Les échantillons sont préparés par mélange de 20 μ l de chaque fraction avec un demi-volume du tampon SDS 3X (composition inconnue) obtenu de la compagnie New England Biolabs. Ces échantillons sont chauffés à 95°C pendant 10 min avant de les déposer sur gel. Deux types de gel sont préparés: le premier est un gel de concentration à 5% d'acrylamide pH 6,8 qui permet la concentration des protéines de différentes tailles leur permettant d'atteindre en même temps le deuxième gel de séparation ayant un pH 8,8. Ce dernier sert à séparer les protéines selon leur taille (généralement 8% d'acrylamide pour l'analyse de la GluRS pleine longueur et 15% d'acrylamide pour la GluRS tronquée). Les gels sont préparés selon Harlow et Lane (1988) (Molecular Cloning, second edition, edited by Chris Nolan, 1989, ISBN0-87969-3096, p18.52).

Composition de 20 ml de solution pour la préparation d'un gel de 8 % d'acrylamide:

- 9,3 ml d'eau bi-distillée
- 5,3 ml d'acrylamide mix 30% (mélange aqueux contenant 29,2% d'acrylamide et 0,8% de bis-acrylamide, Boehringer Mannheim)
- 5 ml de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)
- 200 µl de SDS 10% (Laboratoire MAT)
- 200 µl de persulfate d'ammonium 10%
- 12 µl de TEMED (Boehringer Mannheim).

Composition de 20 ml de solution pour la préparation d'un gel de 15 % d'acrylamide:

- 4,6 ml d'eau bi-distillée
- 10 ml d'acrylamide mix 30%
- 5 ml de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)
- 200 µl de SDS 10%
- 200 µl de persulfate d'ammonium 10%
- 8 µl de TEMED

La migration a été effectuée dans le tampon Tris-glycine pH 8,3 (24 mM de Tris, 250 mM de glycine et 0,1% de SDS) sous une tension électrique de 100 V jusqu'à concentration de l'échantillon en une seule bande puis le voltage est changé à 150 V. Le gel est récupéré après migration et coloré dans une solution aqueuse contenant 45% de méthanol, 10% d'acide acétique glacial qu'on sature avec le bleu de Coomassie brillant R-250. Les gels sont décolorés par plusieurs lavages successifs avec la même solution sans bleu de Coomassie. Un gel de polyacrylamide 15% a été effectué pour l'analyse de l'enzyme tronquée C₃₁₃₋₄₇₁ (domaines 4 et 5) en utilisant la spectroscopie de masse. La coloration est faite par le bleu de coomassie G-250 (0,5%), 50% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial durant 5 min. Le gel est rincé avec de l'eau puis décoloré à 3 reprises avec 40% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial pendant 20 min. L'appareil G:BOX ChemiHR16 (Chemiluminescence Capture and Analysis System, SYNGENE company) et le logiciel GenSnap sont utilisés pour la prise des photos des gels obtenus.

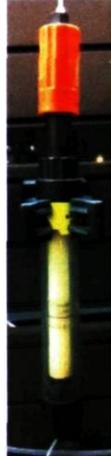
Les fractions d'élution et de lavage qui contiennent la GluRS pleine longueur et ses variants ont été dialysées et concentrées dans le tampon HEPES pour l'obtention d'un stock conservé à -20°C. Par contre les fractions de la GluRS tronquée sont dialysées contre le tampon phosphate (20 mM de tampon phosphate de potassium pH 6,8, 25 mM de KCl et 5 mM de β -mercaptoéthanol) pour une analyse par RMN (Molecular Cloning, second edition, edited by Chris Nolan, 1989, ISBN0-87969-3096, B.21).

6-2-4 Dialyse des fractions contenant l'enzyme purifiée

La dialyse a été effectuée dans des «sacs à dialyse» à membrane tubulaire (Spectra/Por[®] de Spectrum). Ces membranes contiennent des pores qui ne laissent diffuser que des molécules de poids moléculaire inférieur à 14 kDa. Les membranes sont hydratées par trempage dans l'eau bi-distillée au moins 30 minutes avant utilisation. La dialyse est faite dans 2 litres de tampon appelé tampon de dialyse contenant 40 mM d'HEPES (Sigma) et 20 mM de β -mercaptoéthanol et 40% de glycérol pour les enzymes pleine longueur. Les enzymes tronquées sont dialysées dans le tampon phosphate de potassium pour une purification subséquente sur une colonne échangeuse d'ions MonoQ HR10/10 (Amersham Pharmacia Biotech). Ce tampon phosphate est conseillé pour l'étude par RMN. Les sacs remplis de solution d'enzyme sont mis dans un bécher contenant le tampon, puis dialysés toute la nuit à 4°C sous une lente agitation. Le jour d'après, le tampon est renouvelé pour une autre dialyse dans les mêmes conditions. Un volume de 2 litres du tampon frais est utilisé pour la GluRS pleine longueur, et de 4 litres pour les enzymes tronquées.

6-3 Chromatographie échangeuse d'ions

La séparation des protéines a été effectuée sur une résine échangeuse d'anions à l'aide de l'appareil « Fast Protein Liquid Chromatography » (FPLC)



La colonne MonoQ HR10/10



Fig. 11: Appareil FPLC ÄKTA utilisé, de la compagnie Amersham pharmacia biotech

6-3-1 Caractéristiques de la colonne MonoQ HR10/10

- C'est une colonne échangeuse d'anions constituée d'une résine hydrophile chargée d'un groupe $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.
- La capacité ionique de la résine: 0,27-0,37 mM/ml.
- Dimensions de particule: 10 μm
- La colonne est stable jusqu'à une pression maximale de 5 MPa. Et inférieur à 2 MPa pour la pression opérationnelle (au cours de la détection)
- Flow rate maximum recommandé: 4 ml/min

- Température: entre 4 et 40°C
- La MonoQ HR10/10 est stable dans des solutions alcool/H₂O (alcool: C₁-C₄) et dans l'eau aussi
- La MonoQ HR10/10 permet la séparation des molécules de poids moléculaire jusqu'à 10⁷ Da

6-3-2 Préparation de la colonne MonoQ HR10/10

Après un rinçage de la colonne MonoQ HR10/10 avec de l'eau pendant toute la nuit, le tampon (A) (20 mM de tampon phosphate de potassium pH 6,8, 25 mM de KCl et 5 mM de β-mercaptoéthanol) qui a servi pour la dialyse des enzymes tronquée est utilisé pour équilibrer la colonne. Le tampon est filtré à 0,2 µm et dégazé pendant 45 min avant utilisation. La fin de l'équilibration est déterminée par la stabilisation de la conductivité après un changement subit lors du remplacement de l'eau par ce tampon. La colonne est rééquilibrée graduellement avec le même tampon phosphate de potassium qui a été rajusté à 1 M de KCl (B). La colonne est rééquilibrée une dernière fois avant injection de l'échantillon avec le tampon A pour éliminer tous les anions non rattachés à la colonne.

6-3-3 Déroulement de la purification

Les enzymes tronquées dialysées dans 4 litres de tampon (A) vont être récupérées puis concentrées dans un centricon 3K à un volume qui ne dépasse pas 10 ml. L'échantillon est injecté graduellement dans la colonne (5 fois 2 ml puisque la boucle ne peut contenir que 2 ml de solution). L'appareil FPLC (amersham pharmacia biotech de la compagnie ÄKTA FPLC) est programmé pour effectuer les étapes de lavage et d'élution sous les conditions suivantes:

- Maximum presssure: 4,5 MPA
- Flow rate: 1ml/min
- Column equilibration: 2 column volumes (CV)
- loop injection: 4 ml
- Flowthrough fractionation: 6 ml
- Wash out unbound sample: 2 CV
- Elution fractionation: 3 ml.

L'éluion de l'enzyme tronquée se fait par augmentation graduelle de la concentration du KCl.

6-4 Concentration des enzymes pleine longueur dans le tampon HEPES

Les fractions récupérées par chromatographie sont concentrées par centrifugation à travers une membrane tangentielle (Ultrafree-15 Centrifugal filter device, Millipore) à 4000 rpm à une température de 4°C dans un rotor à godets basculants Sorvall® HS-4 (ou le rotor F18), Cette membrane retient l'enzyme et laisse passer le tampon. Les fractions contenant l'enzyme sont concentrées jusqu'à un volume ne dépassant pas 1 ml. Ces fractions concentrées sont par la suite diluées dans un volume de glycérol (80%), et sont ensuite conservées à -20°C. L'enzyme pleine longueur se trouve donc conservée dans le tampon HEPES (40 mM Hepes, 10 mM β-mercaptoéthanol et 50% glycérol).

6-5 Dosage des enzymes concentrées

Le dosage des enzymes est effectué par deux méthodes:

a- Méthode de Bradford: Le dosage Bradford se fait par coloration au bleu de coomassie G-250 qui adhère aux protéines et plus précisément sur les acides aminés aromatiques en milieu acide. Le colorant passe du bleu au rouge et l'absorbance se fait à 595 nm.

b- La méthode de spectrophotométrie qui se base sur la loi de Beer-Lambert

$$A_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \epsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l$$

* A : Absorbance à 280 nm

* I₀ : Intensité de la lumière incidente

* I_t : Intensité de lumière sortante

* C: La concentration (M)

* l: La longueur de la cuve (1 cm)

* ε: Coefficient d'extinction molaire

* λ: Longueur d'onde

Les acides aminés aromatiques qui absorbent la lumière UV présentent un maximum d'absorption à 280 nm.

La confirmation des concentrations stock des enzymes par comparaison des deux méthodes se fait par une évaluation de concentration des enzymes sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes («SDS-PAGE»).

7- Technique de surproduction et de purification de l'ARNt^{Glu}

7-1 Culture et récolte des cellules DH5 α /pKR-15

Une préculture de la souche DH5 α /pKR-15 a été effectuée dans 400 ml de milieu de culture LB. Une culture de 20 litres est réalisée dans un milieu des sels minimum en inoculant 9 ml de préculture saturée dans 1 litre de milieu supplémenté avec: 0,8 ml de MgSO₄ (1 M), 0,5 ml de thiamine (1%), 10 ml de glucose (20%) et 1 ml d'ampicilline (200 mg/ml). L'opération s'est déroulée dans des conditions stériles. La surproduction des cellules est effectuée par incubation à 30°C avec une agitation de 150 rpm pendant 48 heures. Les cellules sont récoltées après centrifugation de 15 min à 7500 rpm dans un rotor F10. Les culots de cellules ainsi récoltés sont congelés et gardés à -80°C jusqu'à utilisation.

7-2 Purification des ARNt non fractionnés enrichis en ARNt^{Glu}

Les culots de cellules obtenus sont pesés et dégelés sur glace puis resuspendus dans un volume déterminé (2 ml pour 1 g de cellules) du tampon Tris (50 mM pH 7.9 et 100 mM β -mercaptoéthanol). Un volume de phénol est ajouté à la suspension mis dans des bouteilles résistantes au phénol qu'on agite pendant 4 heures à 4°C. Le phénol sert à perméabiliser les membranes cellulaires et à précipiter les protéines. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 45 min à 8000 rpm dans un rotor F10. La phase aqueuse est récupérée par pipetage à laquelle on rajoute un autre volume de phénol. Le mélange est agité pendant 1 heure à 4°C et puis centrifugé pendant 30 min. La phase aqueuse est transférée dans une autre bouteille et traitée deux fois par ajout de 0.75 à 1 volume de chloroforme qui permet une meilleure séparation des deux phases (aqueuse et organique) avec une interphase plus nette. Cette phase aqueuse est une fois encore agitée 10 min à 4°C, puis centrifugée à 8000 rpm pendant 10 min. La phase aqueuse récupérée est ajustée à une concentration finale de 20% d'isopropanol et 1 M de NaCl. On agite à 4°C pendant 30 min et puis on laisse le mélange à -20°C pendant toute la nuit. Cette étape permet de séparer les ARN par précipitation par rapport à leur poids

moléculaire. Les ARN à bas poids moléculaire demeurent solubles par contre ceux à haut poids moléculaire précipitent. Le jour d'après, le mélange est centrifugé à 4°C à 8000 rpm pour récupérer la phase aqueuse qu'on ajuste à 60% d'isopropanol permettant la précipitation des ARN à bas poids moléculaire. Le mélange est agité puis conservé pendant 1 heure à -20°C. La suspension est centrifugée à 11500 rpm pendant 30 min. Le surnageant est enlevé, alors que l'ARN_t est précipité dans le culot. Afin d'enlever les sels restants, le surnageant est remplacé par l'éthanol 80%. Une autre centrifugation est effectuée pour récupérer le culot qui sera séché sous vide pendant toute la nuit. Les culots séchés sont resuspendus dans un minimum de tampon d'activation (30 mM de Tris-HCl pH 7.9, 10 mM de MgCl₂ et 1 M de DTT «1,3-dithiothréitol» (Boehringer Mannheim)). Le dosage de l'ARN_t non fractionné enrichi en ARN_t^{Glu} est effectué par spectrophotomètre (Gene Quant pro de la compagnie Gene Quant) à des longueurs d'onde 260 nm et 280 nm. L'information sur le degré de pureté est donnée par le ratio 260/280. La concentration est exprimée par unité de D.O. par ml (D.O./ml). Une unité de D.O./ml correspond à 43 µg/ml d'ARN (Bailly et al., 2008).

7-3 Activation de l'ARN_t

Un stock d'ARN_t non fractionné a été activé avant son utilisation comme un substrat de l'enzyme. Certains ARN_t incluant l'ARN_t^{Glu} d'*E. coli* doivent être activés en les dénaturant par la chaleur suivis d'une lente renaturation (Madore et al., 1999). Le chauffage a été effectué à 65°C pendant 10 min, suivi par un lent refroidissement durant environ 90 min. Le refroidissement est fait par dépôt des tubes d'ARN_t chauffés dans un écrin de polystyrène recouvert de papier aluminium. Juste après refroidissement, les tubes sont gardés à -20°C jusqu'à utilisation. Un test d'activité acceptrice a été effectué pour les stocks activés et non activés pour une meilleure comparaison.

7-4 Test de détermination de l'activité acceptrice de l'ARN_t^{Glu}

Le test de l'activité acceptrice sert à déterminer la concentration d'ARN_t^{Glu} dans le mélange d'ARN_t purifié, à partir d'une réaction d'aminocyclation (Voir la section II-2) précise qui nous renseigne sur le pourcentage d'enrichissement de l'ARN_t^{Glu} dans le mélange d'ARN_t non fractionné. Cette réaction sert à atteindre le plateau d'aminocyclation de l'ARN_t reflétant la totalité des ARN_t^{Glu} glutamylés dans le milieu réactionnel. La quantité d'ARN_t^{Glu} utilisée dans le milieu réactionnel par calcul du

nombre de picomoles aminoacylables par unité de D.O. à 260 nm est effectuée par rapport à la règle suivante: 1 ml de solution de l'ARNt ayant une unité de D.O. à 260 nm correspond à 1660 pmol d'ARNt.

7-5 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-urée:

Afin de vérifier l'état de l'ARNt^{Glu}, des échantillons de 20 µl ont été déposés sur un gel de polyacrylamide-urée présentant la composition suivante:

- 15% de polyacrylamide (14,6% acrylamide et 0,1% de bis-acrylamide)
- 8 M d'urée (Boehringer Mannhiem)
- 1 X TBE.

On prend 20 ml de cette préparation acrylamide-urée auquel on ajoute 200 µl de persulfate d'ammonium et 8 µl de TEMED. Les échantillons de 20 µl sont préparés selon le manufacturier (New England Biolabs) par ajout d'un demi-volume de SDS 3X puis chauffés à 95°C pendant 10 min. Ces échantillons sont déposés sur le gel, ensuite une tension électrique de 100 V est appliquée pour le démarrage de la migration. Une fois la migration est terminée, le gel récupéré est coloré par le bleu de méthylène (Fisher) pendant 30 min et décoloré après par de l'eau chaude. Le gel est laissé sous une agitation pendant toute la nuit.

II- Dosage de l'activité d'aminocyclation catalysée par la GluRS pleine longueur sauvage et variants

Les constituants du mélange réactionnel pour la réaction d'aminocyclation sont préparés en fraction de 2 ml et conservés à -20 °C. Les ingrédients des solutions stock ainsi préparés sont détaillés comme suit:

1- Tampons utilisés:

1-1 Tampon Hepes-KOH pH 7,2

Ce tampon est préparé à une concentration stock de 500 mM stérilisé par autoclavage. Nous avons choisi ce tampon, dont le pK_a est 7,55 à 20°C, parce qu'il permet de maintenir le pH stable entre 7 et 8, et que nous voulons garder l'enzyme à pH 7,2.

1-2 MgCl₂

Ce facteur est essentiel pour le maintient aussi bien de la structure tridimensionnelle de l'ARNt^{Glu} que pour la formation du complexe Mg.ATP. Ce dernier est utilisé comme substrat facilitant l'activation de l'acide aminé qui se lie sur le phosphate α de l'ATP permettant ainsi la rupture de la liaison phosphodiester. La solution est préparée par dissolution du MgCl₂.6H₂O (Anachemia) dans H₂O bidistillée pour une concentration stock de 1 M puis la préparation est stérilisée par autoclavage.

1-3 1,3-dithiothréitol (DTT)

C'est une molécule qui est très utilisée dans les réactions biochimiques grâce à son potentiel réducteur sur les thiols empêchant l'oxydation des cystéines dans la protéine. Il est préparé à une concentration stock de 1 M.

1-4 Tampon de dilution des enzymes (TDE)

Ce tampon est constitué de 20 mM d'HEPES-KOH pH 7,2, 1 mM de DTT et 10% de glycérol. Le BSA (Albumine Sérique bovine) préparé à une concentration de 5 mg/ml (BSA 2X) est mélangé à 1 volume de TDE Avant la dilution des enzymes pour obtenir une concentration finale de 2,5 mg/ml (BSA 1X).

2- Substrats de la GluRS

2-1 Na-ATP

L'ATP constitue un substrat de la GluRS et présente aussi une source d'énergie essentielle pour le déroulement de la réaction d'aminocyclation. Ce constituant est préparé par dissolution du sel disodique de l'ATP (Sigma) dans l'eau bidistillée stérile qu'on filtre subséquentement (0.2 μ m).

2-2 L'ARNt

L'ARNt constitue un substrat crucial pour la réaction d'aminocyclation. L'ARNt enrichi en ARNt^{Glu} et purifié est utilisé pour les tests d'activité (section I-6-2).

2-3 Le glutamate

Le glutamate (L-acide glutamique) est l'un des trois substrats essentiels pour la réaction de glutamylation. Le glutamate marqué au carbone 14 (^{14}C) commercialisé par la compagnie Amersham Pharmacia Biotech est utilisé pour le suivi de la réaction d'aminocyclation. Comme la concentration du glutamate marqué est trop faible, on le mélange avec le glutamate froid (non-radioactif) pour une concentration finale de 2 mM et une radioactivité spécifique de 40 cpm/pmol. Le glutamate froid (BDH) est préparé à une concentration stock 50 mM. Le pH est ajusté à 7.2 avec une solution de KOH filtré (0.2 μm).

3- Préparation du mélange réactionnel

Les concentrations des composants et le volume du mélange réactionnel sont préparés selon les exigences des tests à effectuer. Les concentrations finales des constituants sont: 50 mM d'HEPES-KOH, 32 mM MgCl_2 , 4 mM Na-ATP, 3 mM DTT. Les composants variables sont ceux du glutamate et de l'ARNt. Il a été montré qu'un quotient $[\text{MgCl}_2]/[\text{ATP}] = 8$ optimise l'activité de la GluRS (Kern et Lapointe 1979)

Pour le test de détermination de la K_m du glutamate, six concentrations ont été choisies dans un intervalle de concentrations du glutamate allant de 30 à 900 μM ; et de 0,25 à 12 μM pour la K_m de l'ARNt. Les concentrations des enzymes sont choisies pour pouvoir mesurer les vitesses initiales.

4- Déroulement de la réaction d'aminocyclation

Le milieu réactionnel et les enzymes sont incubés séparément à 37°C pendant 2,5 min. Le démarrage de la réaction est effectué par ajout de l'enzyme au milieu réactionnel. Des aliquotes sont prélevés à des intervalles de temps précis (2,5 min). La réaction est interrompue par le dépôt de ces aliquotes sur des papiers whatman qu'on plonge dans TCA à 5% à 0°C (Tremblay, 1984).

Il est essentiel de faire un échantillon à blanc et un standard afin de pouvoir interpréter les résultats. Le blanc contient le milieu réactionnel dépourvu d'enzyme qui est remplacée par un volume équivalent d'eau. Le blanc sert à évaluer le niveau de la radioactivité qui est retenu sur papier whatman en absence d'aminocyclation et ceci grâce à l'affinité du glutamate libre pour ce papier (bruit de fond). Par ailleurs, le

standard consiste en une aliquote non précipitée dans le TCA 5% et non lavée témoignant sur la radioactivité totale du mélange réactionnel.

Le calcul des paramètres cinétiques qui sont la constante de Michaelis Menten (K_m), la constante catalytique (k_{cat}) sera réalisé à l'aide du logiciel kaleidagraph d'où la constante de spécificité k_{cat}/K_m sera déduite.

III- Technique de clonage des gènes codant les deux derniers domaines C-terminaux de la GluRS de type sauvage et variants chez *E. coli*

Pour atteindre le deuxième objectif de cette étude (vérification de l'influence possible de la flexibilité de la charnière 4-5 de GluRS de *E. coli* sur son activité catalytique), il est nécessaire de construire des plasmides contenant le gène codant seulement pour les deux derniers domaines 4 et 5. Dans ce contexte, le clonage a été effectué selon les étapes suivantes:

1- Le choix des oligonucléotides

La détermination des oligonucléotides est basée sur plusieurs critères.

- a- Le nombre des nucléotides doit être entre 15 et 25. Cette longueur est suffisante pour la spécificité et la complémentarité avec le gène cible ainsi que pour l'accrochage de l'ADN polymérase.
- b- La température de fusion (T_m) qui doit être entre 52°C et 58°C est calculée à l'aide de l'équation $T_m = [4 * (G + C)] + [2 * (A + T)]$ °C. La teneur en G + C permet de préciser la longueur et la température de fusion de l'amorce.
- c- Le choix des endonucléases qui vont être utilisées pour digérer ces amorces. La séquence de site de reconnaissance des ces enzymes de restriction vont faire partie de la séquence des amorces. *Bam*HI et *Nco*I ont été choisi parce qu'elles ont un seul site de reconnaissance dans le plasmide pET-28c ainsi que dans le gène codant les domaines 4 et 5. Par contre *Nco*I est choisi pour la séquence de son site de reconnaissance contenant un codon ATG qui sert comme un codon d'initiation.

Les séquences des amorces choisies: ₃₁₃ERS FOR 5'GGGAATTCCCATGGCGCTGCCGCC 3'

$T_m = 58^\circ\text{C}$

₃₁₃ERS REV 5' CCGGGATCCTCATTAAATGATGATG 3'

$T_m = 58^\circ\text{C}$

2- Clonage des gènes codant les domaines 4 et 5 sauvage et variants de la GluRS

2-1 Production des copies de gène codant les domaines 4 et 5 par PCR

Le clonage du gène codant les domaines 4 et 5 est effectué à l'aide du PCR pour produire plusieurs copies de ce gène en utilisant le plasmide pET-28c ERSXT. Les plasmides utilisés pour les variants tronqués sont les plasmides obtenus par mutagenèse dirigée. La première étape est la dénaturation du plasmide par la chaleur à 95°C. Les deux brins sont séparés permettant la liaison des amorces. Ces deux amorces ont la même séquence de début et de la fin du gène qui code pour les domaines 4 et 5 mais dans le sens opposé. Les deux brins d'ADN plasmidique seront amplifiés en toute longueur de manière linéaire durant 30 cycles thermiques (2-5 min à 95°C, 30 sec à 55°C-65°C, 1 min à 72°C) pour aboutir à des fragments d'ADN semblables au gène d'intérêt à la fin de la réaction. Le mélange a été préparé selon le manufacturier (New England BioLabs): 5 µl de tampon Thermopol Reaction (10X), 1 µl de dNTP (100 mM), 2,5 µl des amorces FOR et REV (10 µM), 20 ng d'ADN plasmidique (pET-28c ERSXT), 2 mM de MgSO₄ et 0,2 µl de la polymérase Deep Vent_RTM DNA (2 U/ml). Le mélange est ajusté avec de l'eau bi-distillée pour un volume final de 50 µl. La polymérase Deep Vent_RTM DNA commence la synthèse de l'ADN de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' avec une haute fidélité. Cette polymérase possède une activité 3'-5' exonucléase lui permettant de corriger les erreurs commises lors d'une incorporation incorrecte des nucléotides. Les inserts obtenus sont dosés par électrophorèse sur gel d'agarose (Genetic Technology Grade, ICN Biomedicals, Inc.) à 0,8% dilué dans le tampon TAE (composé de Tris, d'acide acétique et d'EDTA; pH = 8). La migration a été effectuée à 100 V.

2-2 Digestion du plasmide pET-28c et des produits PCR par *Bam*HI et *Nco*I

Les produits PCR résultants ont été purifiés en utilisant «PCR purification Kit» (Qiagen) qui permet la purification des fragments de gène des autres constituants de la réaction de clonage tels que le vecteur et la polymérase. Le gène codant les domaines 4 et 5 aussi bien que le vecteur pET-28c vont être l'objet d'une digestion avec les endonucléases *Bam*HI et *Nco*I. Cette procédure permet l'incorporation du gène codant

les domaines 4 et 5 (Insert) dans le vecteur pET-28c grâce à l'aboutissement des mêmes extrémités complémentaires entre le gène et le vecteur. Deux tubes de réaction ont été préparés séparément A (digestion du plasmide) et B (digestion de l'insert). Selon le manufacturier New England Biolabs, le tube A contenant 5 µl du vecteur pET-28c (100 ng/ml) est mélangé avec 1 µl de BSA 10X, 1 µl de tampon 3 et 0,2 µl de *Bam*HI (20000 U/ml) et 0,2 µl de *Nco*I (10000 U/ml), et finalement on ajuste avec de l'eau bi-distillée pour un volume final de 10 µl. Le tube B contient le même mélange que le tube A en remplaçant 5 µl de vecteur par 5 µl de l'insert. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures.

2-3 Déphosphorylation du plasmide pET-28c

Le vecteur pET-28c est déphosphorylé juste après sa digestion pour éviter sa recirculation qui pourrait empêcher l'introduction du gène dans le vecteur. Le protocole de déphosphorylation selon le manufacturier New England Biolabs est donné comme suit: un dixième de volume d'Antarctic phosphatase Buffer 10X est ajouté directement à l'ADN digérée par *Bam*HI et *Nco*I. Un volume de 1 µl de l'Antarctic phosphatase est ajouté au mélange puis incubé à 37°C pendant 15 min. La réaction est arrêtée par inactivation de la phosphatase par chauffage à 65°C durant 5 min.

2-4 Inactivation des enzymes de restriction *Bam*HI et *Nco*I

Les enzymes de restriction *Bam*HI et *Nco*I sont désactivées dans le but d'éliminer toute possibilité de digestion après ligation. Dans ce contexte, 1 volume de phénol est ajouté pour précipiter les enzymes, et puis la suspension est centrifugée à 13000 rpm durant 5 min. 1 volume de chloroforme/alcool isoamyl (24:1) est rajouté pour interagir avec le phénol pour donner une interface visible permettant une bonne récupération du surnageant. Une seconde centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions. On ajoute 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5 et 2,5 volumes d'éthanol 95% pour précipiter les acides nucléiques après une centrifugation de 30 min à 13000 rpm. Le surnageant résultant est enlevé puis remplacé par 50 µl d'éthanol 70% qu'on vortex avant une dernière centrifugation de 30 min. L'éthanol 70% sert d'une part à dissoudre les sels et d'autre part à garder les acides nucléiques précipités. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 50 µl du tampon EB (tampon du kit miniprep de Qiagen) après l'avoir séché sous vide durant 15 min. Les inserts codant la GluRS

C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage et variants sont dosés à partir du gel d'agarose en se basant sur l'intensité des bandes du marqueur.

2-5 Ligation

La ligation est la réaction par laquelle l'insert est introduit dans le vecteur. Le mélange réactionnel est préparé selon le manufacturier Invitrogen comme suit:

Un volume de 4 µl de tampon de réaction de ligase (5X) est mélangé avec un ratio (wt/wt) d'insert/vecteur (3:1) présentant une quantité totale d'ADN de 0,13 µg. Finalement, 2 µl de T₄ DNA ligase (1U/µl) sont ajoutés après avoir ajusté avec de l'eau bidistillée stérile pour un volume final de 20 µl. Le tube est laissé à la température ambiante (23-26°C) pendant 1 heure. Le produit de ligation est ensuite dilué 5 fois, et un volume de 20 µl est pris pour transformer des cellules d'*E. coli* XL1-Blue électrocompétentes. Une colonie résultante est inoculée dans 10 ml de LB liquide dans le but d'amplifier le plasmide qui a introduit le gène qu'on appelle "pET-28c₃₁₃ERSXT". L'extraction du plasmide est effectuée en utilisant le kit miniprep de Qiagen. Ce plasmide nouvellement synthétisé est utilisé pour transformer des cellules BL21pLysS d'*E. coli* dans le but de surproduire la protéine tronquée (domaine 4-5).

Chapitre III

Résultats et Discussion

PARTIE I: L'impact des substitutions d'acides aminés, potentiellement impliqués dans le mouvement du domaine 5 par rapport au domaine 4, sur les paramètres cinétiques de la GluRS de *E. coli*

1- Obtention des variants de la GluRS pleine longueur par séquençage du gène *gluX*

Les mutations effectuées par mutagenèse dirigée sont confirmées par le séquençage du gène *gluX*. Ce séquençage consiste à confirmer les mutations cibles et à vérifier l'absence de mutations non désirées ou de saut de lecture dû à des insertions ou des délétions.

La Fig. 12 montre l'alignement de séquence des acides aminés de la GluRS pleine longueur sauvage et variants obtenus comme suit: Après la mutagenèse, les plasmides ayant subi une digestion par *DpnI* sont utilisés pour transformer la souche XL-1Blue. Des colonies de chaque variant ont servi pour repiquer des géloses et des tubes contenant le milieu LB. Par la suite, ces colonies ont été choisies pour effectuer une mini-prép en se servant du Kit Qiaprep de Qiagen (page 22-23) afin d'extraire les plasmides. Ces plasmides sont séquencés dans le laboratoire Plate-forme d'analyses génomique de l'Université Laval pour confirmer les mutations effectuées.

Les gènes des variants séquencés mettent en évidence les mutations désirées générant les variants D333A, E366A, E455R (Fig. 12). Ces gènes ne contiennent pas d'autres mutations non désirées. Un variant E366A obtenu présente une insertion d'un fragment d'ADN similaire à la séquence de la charnière liant les domaines 4 et 5. Cette insertion qui n'a pas affecté le cadre de lecture se trouve en amont de la charnière d'origine constituant un variant à double charnière appelé E366A#dc. Ce variant est similaire au variant E366A sauf dans la partie de la charnière 4-5 qui présente un allongement avec une mutation E366A.

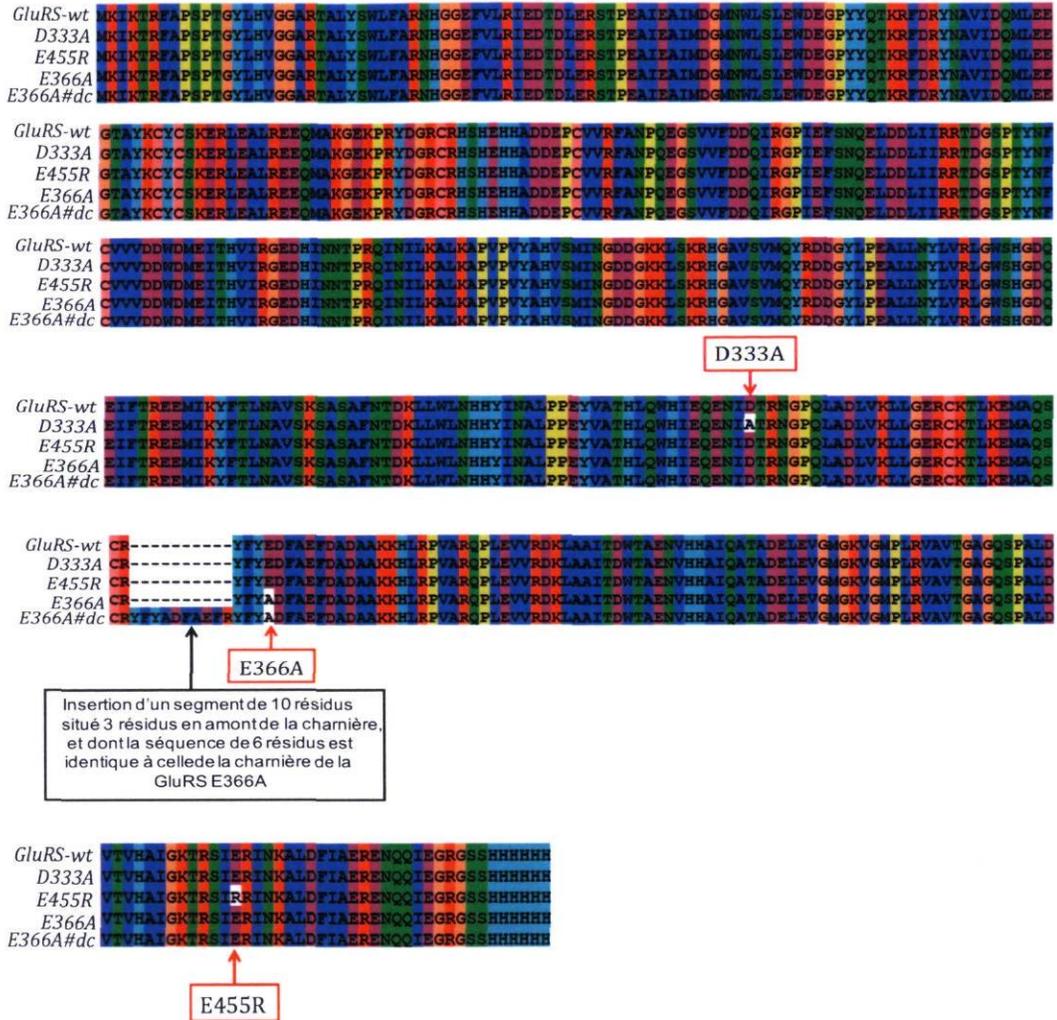


Fig. 12: Alignement des séquences d'acides aminés de la GluRS pleine longueur sauvage de *E. coli* et de ses variants D333A, E455R, E366A et E366A#dc déduites des séquences de nucléotides de leurs gènes (voir annexes 1a et 1b, pages 89 et 90)

* L'alignement a été effectué en utilisant le logiciel ClustalX2

2- Surproduction de la GluRS pleine longueur sauvage et de ses variants chez *E. coli* JP1449

2-1 Vérification de la solubilité des enzymes surproduites

La souche JP1449 est surproduite à 37°C, et puis lysée par sonification et l'ajout de lysozymes. L'extrait cellulaire est centrifugé et le culot et le surnageant sont séparés et analysés par électrophorèse sur gel "SDS-PAGE". Les deux fractions (culot et surnageant) ont fait l'objet d'une analyse de solubilité.

La bande intense se trouvant à une hauteur correspondant à 55,6 kDa est la GluRS et ses variants tel que indiqué dans la Fig. 13. La culture des cellules JP1449 est incubée tout d'abord à 37 °C, et puis à 26 °C après induction. Ces conditions opératoires utilisées ont favorisé la solubilité de la GluRS et de ses variants dans le surnageant ce qui a facilité leur récupération par centrifugation. L'approche utilisée dans ce cas est l'analyse de la composition du culot sur gel "SDS-PAGE". Comme le montre la Fig. 13 (1- 3 -5 -7 -9), une partie non négligeable de ces enzymes est toujours présente dans le culot, ce qui signifie son insolubilité et cela sans présenter un effet toxique vu que les cellules croient d'une façon exponentielle après induction. Cette insolubilité pourrait être attribuée à la formation des corps d'inclusion, ce qui aurait été une indication d'une formation incomplète ou d'un mauvais repliement de ces protéines.

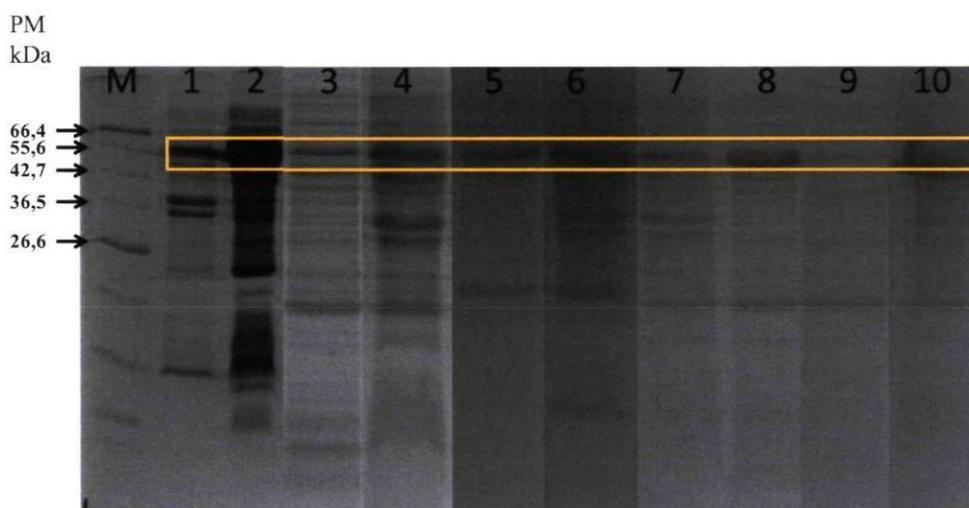


Fig. 13: Vérification de la solubilité de la GluRS pleine longueur et de ses variants.

* M- Marqueur de poids moléculaire (Protein Marker, Broad Range); 1- le culot de la GluRS-wt; 2- le surnageant de la GluRS-wt; 3- le culot de la GluRS-D333A; 4- le surnageant de la GluRS-D333A; 5- le culot de la GluRS-E455R; 6- le surnageant de la GluRS-E455R; 7- le culot de la GluRS-E366A#dc; 8- le surnageant de la GluRS-E366A#dc; 9- le culot de la GluRS-E366A; 10- le surnageant de la GluRS-E366A.

2-2 Profil d'élution de la GluRS pleine longueur et ses variants

Lors de la purification de la GluRS pleine longueur et ses variants sur chromatographie d'affinité au nickel immobilisé, des fractions ont été prises pour suivre

les étapes de récupération de l'enzyme. Ces fractions étaient l'objet d'une analyse sur gel «SDS- PAGE» à 8%. Les gels illustrés par les Figs 14 à 18 représentent les profils d'éluition de la GluRS sauvage et des variants D333A, E455R, E366A ainsi que du variant double charnière E366A#dc.

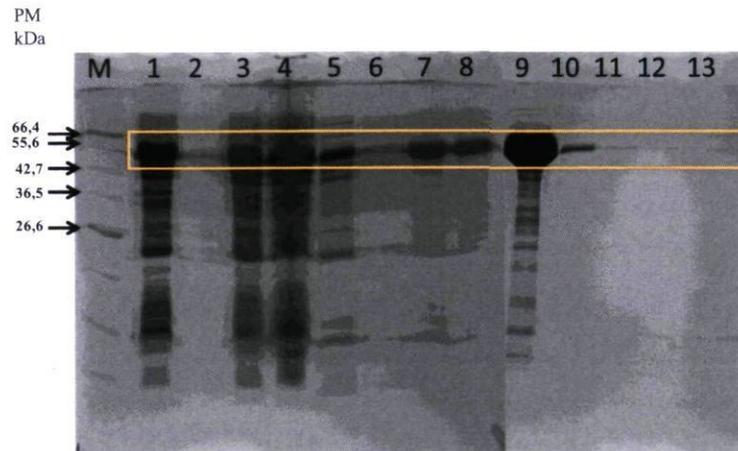


Fig.14: Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproductrices de la GluRS pleine longueur sauvage

* M- Marqueurs de poids moléculaire; 1- Surnageant de l'extrait cellulaire; #2-4 suspension non retenue par la colonne; #5-6 20 μ l de fractions de binding (5 mM imidazole); #7 -8 20 μ l de fractions de lavage (20 mM d'imidazole); #9-12 20 μ l de fractions d'éluition (1 M d'imidazole); 13- fraction nettoyage (100 mM EDTA).

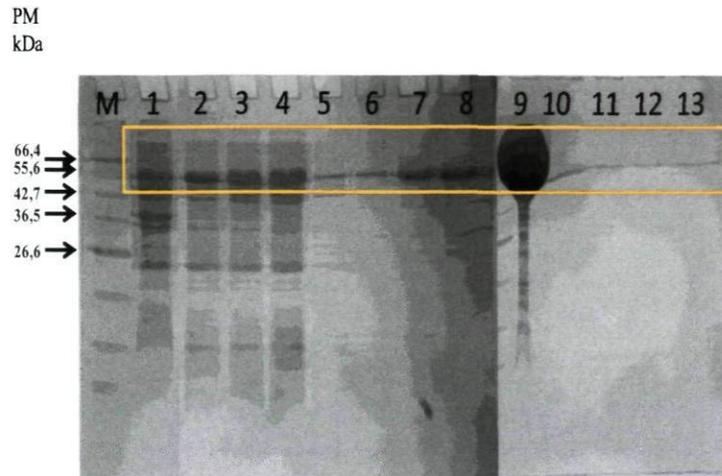


Fig.15: Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproductrices du variant D333A de la GluRS pleine longueur

M- Marqueurs de poids moléculaire; 1- Surnageant de l'extrait cellulaire; #2-4 suspension non retenue par la colonne; #5-6 20µl de fractions de binding (5 mM imidazole); #7 -8 20µl de fractions de lavage (20 mM d'imidazole); #9-12 20µl de fractions d'élution (1 M d'imidazole); 13- fraction nettoyage (100 mM EDTA).

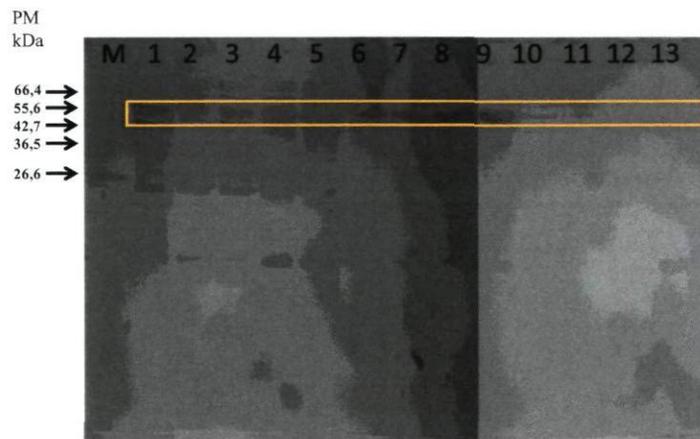


Fig. 16: Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproductrices du variant E455R de la GluRS pleine longueur

M- Marqueurs de poids moléculaire; 1- Surnageant de l'extrait cellulaire; #2-4 suspension non retenue par la colonne; #5-6 20µl de fractions de binding (5 mM imidazole); #7 -8 20µl de fractions de lavage (20 mM d'imidazole); #9-12 20µl de fractions d'élution (1 M d'imidazole); 13- fraction nettoyage (100 mM EDTA).

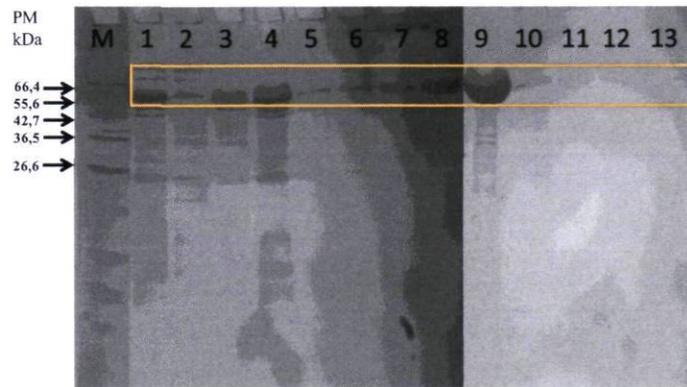


Fig. 17: Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproductrices du variant E366A de la GluRS pleine longueur

M- Marqueurs de poids moléculaire; 1- Surnageant de l'extrait cellulaire; #2-4 suspension non retenue par la colonne; #5-6 20µl de fractions de binding (5 mM imidazole); #7 -8 20µl de fractions de lavage (20 mM d'imidazole); #9-12 20µl de fractions d'élution (1 M d'imidazole); 13- fraction nettoyage (100 mM EDTA).

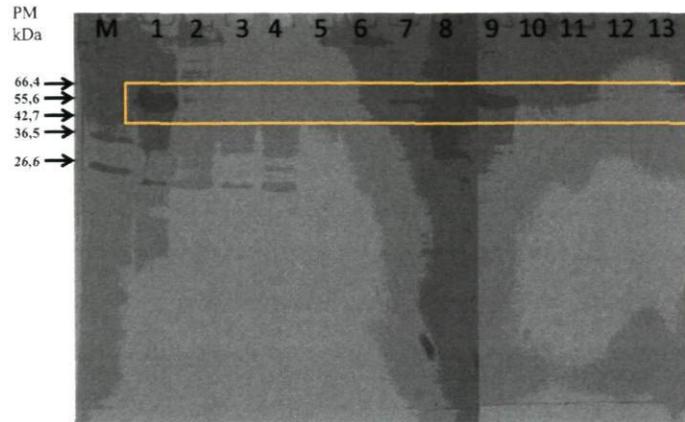


Fig. 18: Analyse par «SDS-PAGE» des fractions éluées de la colonne de Ni-NTA durant la chromatographie du surnageant de l'extrait des cellules surproductrices du variant E366A#dc de la GluRS pleine longueur

M- Marqueurs de poids moléculaire; 1- Surnageant de l'extrait cellulaire; #2-4 suspension non retenue par la colonne; #5-6 20µl de fractions de binding (5 mM imidazole); #7 -8 20µl de fractions de lavage (20 mM d'imidazole); #9-12 20µl de fractions d'élution (1 M d'imidazole); 13- fraction nettoyage (100 mM EDTA).

En se basant sur les résultats des gels, la GluRS sauvage et ses variants sont récupérés dans les fractions de lavage et d'élution. Les enzymes sont dialysées et concentrées après chromatographie d'affinité au nickel et puis dosées par deux méthodes: La spectrophotométrie en utilisant le coefficient d'extinction molaire, et la méthode de Bradford. Ensuite, les deux dosages sont vérifiés sur gel «SDS-PAGE».

3- Dosage de la concentration des enzymes pleine longueur

3-1 Dosage par méthode de Bradford

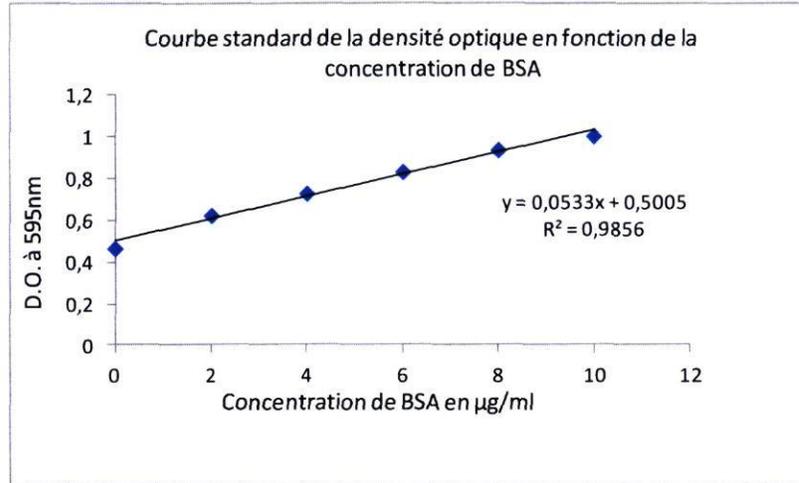


Fig. 19: Courbe standard de la densité optique en fonction de la concentration de BSA selon la méthode de Bradford

Les résultats des concentrations stock des enzymes pleine longueur (GluRS sauvage et variants) trouvés sont présentés dans le tableau 1.

Tab. 1: Concentrations stock de la GluRS pleine longueur sauvage et variants calculées selon la méthode de Bradford

Enzymes	Fractions	Volume des fractions (ml)	Concentration (mg/ml)
GluRS-wt	Lavage	1,4	15,6
	Elution	1,3	26,3
GluRS-D333A	Lavage	1,2	13,5
	Elution	2,4	14,2
GluRS-E455R	Lavage	1,2	97,8
	Elution	3,2	20,1
GluRS-E366A	Lavage	0,5	13,2
	Elution	1,2	26,0
GluRS-E366A#dc	Elution	1,2	9,0

Le test de la réaction de glutamylation montre que les enzymes de la fraction d'éluion sont plus actives que celle de lavage (résultats non présentés). Et les gels (Fig. 14-18) montrent que ces fractions d'éluion sont plus pures que celles de lavage. Etant plus actives et plus pures, ces fractions d'éluion ont été utilisées pour la détermination des paramètres cinétiques.

3-2 Dosage par spectrophotomètre

Pour confirmer les résultats obtenus par la méthode de Bradford, le dosage par spectrophotométrie a été effectué.

Tab. 2: Concentrations stock de la GluRS pleine longueur sauvage et de ses variants dans les fractions «éluion» calculées selon la loi de Beer-Lambert

	Fraction	Dilution	A ₂₈₀	Concentration (µM)	Concentration (mg/ml)	Concentration moyenne (mg/ml)
GluRS-wt	Elution	50X	0,414	290,8	15,7	15,3
		200X	0,098	275,3	14,8	
		500X	0,058	407,3	22,0	
GluRS-D333A	Lavage	50X	0,323	226,8	12,2	12,6
		200X	0,077	216,3	11,6	
		500X	0,037	259,8	14,0	
GluRS-E455R	Elution	50X	0,449	315,3	17,0	17,5
		200X	0,109	306,2	16,5	
		500X	0,050	351,1	18,9	
GluRS-E366A	Lavage	50X	2,106	1479,0	79,7	85,5
		200X	0,605	1699,6	91,6	
		500X	0,225	1580,2	85,2	
GluRS-E366A#dc	Elution	50X	0,546	383,5	20,7	20,3
		200X	0,135	379,2	20,4	
		500X	0,052	365,2	19,7	
GluRS-E366A	Lavage	50X	0,294	206,5	11,1	12,4
		200X	0,070	196,6	10,6	
		500X	0,041	287,9	15,5	
GluRS-E366A#dc	Elution	50X	0,638	448,1	24,2	25,2
		200X	0,159	446,7	24,1	
		500X	0,072	505,7	27,3	
GluRS-E366A#dc	Elution	50X	0,118	72,5	4,3	6,4
		200X	0,047	126,7	6,8	
		500X	0,022	148,3	8,0	

* Les valeurs colorées en jaune présentes les concentrations de fractions utilisées pour les tests cinétiques

* ϵ extinction molaire de la GluRS-wt= 71195 M⁻¹.cm⁻¹

* ϵ extinction molaire de la GluRS-E366A#dc= 74175 M⁻¹.cm⁻¹

Les coefficients d'extinction molaires sont trouvés en entrant les séquences des acides aminés de la GluRS sauvage et de ses variants dans le site ExpASY ProtParam "<http://web.expasy.org/protparam/>". Les résultats trouvés par la méthode de Bradford sont bien confirmés par la méthode de spectrophotométrie.

3-3 Evaluation de la concentration des enzymes sur gel «SDS-PAGE»

Cette étape sert à estimer de façon visuelle les concentrations calculées à l'aide des deux méthodes Bradford et spectrophotométrie (Tab.1 et Tab.2). Des quantités de 1, 2 et 4 μg de concentration stock connue sont déposés pour chaque variant à partir d'une dilution préalablement définie. Ces échantillons sont analysés par «SDS-PAGE». L'intensité des bandes de chaque variant obtenue est comparée avec celle du marqueur Broad Range de la compagnie New England Bio Labs.

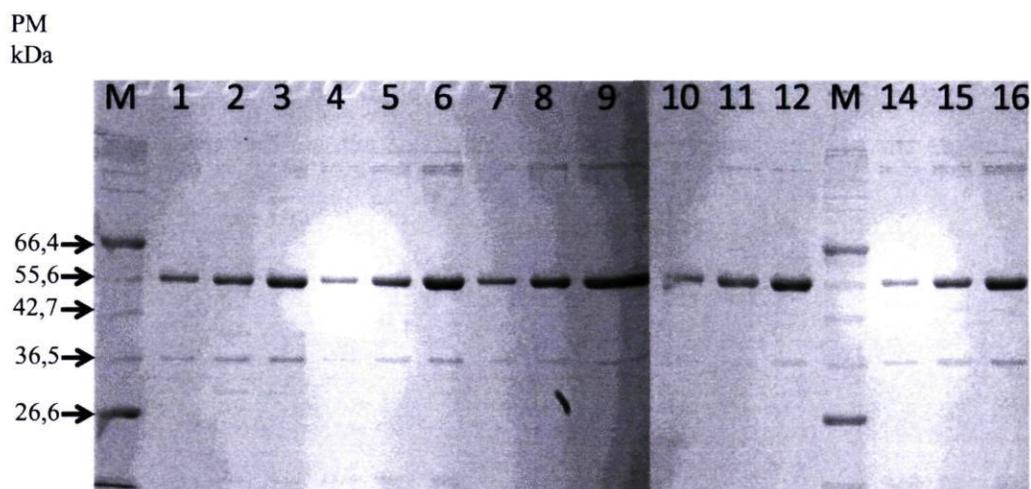


Fig. 20: Confirmation visuelle de la concentration des enzymes sur gel «SDS-PAGE»

M- Marqueur de poids moléculaire (Protein Marker Broad Range); 1-2-3 présentent respectivement 1, 2 et 4 μl d'une dilution connue de GluRS-wt; 4-5-6 présentent respectivement 1, 2 et 4 μg d'une dilution connue de GluRS-D333A; 7-8-9 présentent respectivement 1, 2 et 4 μg d'une dilution connue de GluRS-E366A; 10-11-12 présentent respectivement 1, 2 et 4 μg d'une dilution connue de GluRS-E366A#dc; 14-15-16 présentent respectivement 1, 2 et 4 μg d'une dilution connue de GluRS-E455R.

Les bandes intenses contiennent 4 μg de protéines et celles plus pales contiennent 2 μg de protéines. Cette méthode donne une estimation de la quantité d'enzyme en se basant sur les intensités de la coloration entre le marqueur et les enzymes. Cette méthode reste un moyen de vérification de la concentration effectuée par la méthode de Bradford et spectrophotométrie.

4- Rendement des purifications des enzymes pleine longueur

Les enzymes pleine longueur destinées pour la détermination des paramètres cinétiques sont celles recueillies dans les fractions d'éluion. Une bonne partie de ces enzymes est perdue dans les étapes de chromatographie à cause de la saturation de la résine (Fig. 14-18). Le tableau suivant présente les rendements de la purification pour la GluRS sauvage et ses variants.

Tab. 3: Rendement des GluRS pleine longueur en milligramme de protéine par gramme de cellule

Enzymes	Poids de cellules par gramme	Volume de la solution stock (ml)	Fractions	Concentration stock (mg/ml)	Quantité totale (mg)	Rendement (mg d'enzymes/g de cellules)
GluRS-wt	8,8	1,4	Elution	17	24,0	5,0
		1,3	Lavage	15,3	20,3	
D333A	13,5	1,2	Elution	12,6	15,1	4,2
		2,4	Lavage	17,5	42,0	
E455R	15,5	1,2	Elution	85,5	102	10,8
		3,2	Lavage	20,3	65,0	
E366A	10,4	0,5	Elution	12,4	6,2	3,5
		1,2	Lavage	25,2	30,2	
E366A#dc	11,0	1,2	Elution	6,4	7,6	0,7

Les résultats du Tab. 3 montrent que les rendements des variants D333A et E366A sont comparables à celle du sauvage, ce qui signifie que les mutations donnant naissance à ces variants n'ont pas d'influence significative sur le rendement. Par contre les rendements des variants E455R et E366A#dc sont affectés par les mutations. La mutation présente dans le vecteur encodant la GluRS E455R a induit une double augmentation du rendement, alors que l'insertion d'un fragment d'acide aminé (double charnière) entraîne une diminution de 7 fois. De ces résultats on déduit que le rendement est beaucoup plus affecté par le nombre de résidus.

5- Vérification de l'état de l'ARNt et dosage de la concentration du mélange de l'ARNt non fractionné enrichi en ARNt^{Glu}

L'ARNt^{Glu} est un substrat de la GluRS, et est donc indispensable pour la réaction de glutamylation. De ce fait, il est important de vérifier son intégrité et sa concentration dans la solution stock avant son utilisation dans la réaction d'aminocyclation. Dans ce travail, l'ARNt^{Glu} a été surproduit à partir de la souche DH5 α /pKR-15 et purifié comme il a été mentionné dans la partie matériels et méthodes (section I-7, page 34)

L'activation de l'ARNt se fait par chauffage à 65°C pendant 10 min suivi d'un lent refroidissement (environ 90 min). Les fractions d'ARNt purifiées enrichies en ARNt^{Glu} (activées et non activées) sont analysées sur gel de polyacrylamide-urée (15%, 8 M) pour vérifier leur intégrité. Ces fractions sont ensuite dosées par spectrophotomètre (260 nm) pour déterminer la concentration stock de l'ARNt total. Et finalement, pour le calcul de la concentration de l'ARNt^{Glu} se trouvant dans le mélange non fractionné, une réaction de glutamylation a été effectuée.

5-1 Vérification de l'état de l'ARNt avant et après activation

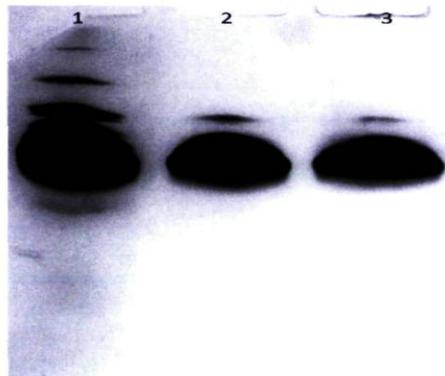


Fig. 21: Séparation d'ARNt enrichi en ARNt^{Glu} sur gel de polyacrylamide-urée (15%, 8 M)

1- ARNt^{Glu} commercial utilisé comme marqueur, 2- ARNt non activé, 3- ARNt activé

La Fig. 21 confirme le degré élevé de pureté de l'ARNt purifié à partir de la souche DH5 α /pKR-15 par rapport à l'ARNt commercial. L'ARNt purifié ne présente pas de dégradation.

5-2 Dosage et détermination de la concentration totale de l'ARNt par spectrophotomètre

Tab. 4: L'estimation de la concentration d'ARNt total non fractionné et purifié

Longueur d'onde	Absorbance de la dilution 1/100 de solution d'ARNt (Purification 1)	Absorbance de la dilution 1/500 de solution d'ARNt (Purification 2)
260 nm	0,962	0,769
280 nm	0,551	0,232
260/280	1,746	3,315
Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,038	0,032
	152 μM d'ARNt	638,27 μM d'ARNt
	38 mg d'ARNt dans 10 ml	48 mg d'ARNt dans 3 ml

La première purification a été effectuée à partir d'une masse cellulaire de 48,7 g, et puis le culot d'ARNt obtenu a été resuspendu dans 10 ml de tampon d'activation. Une deuxième purification a été faite à partir d'une masse cellulaire de 24 g, et culot d'ARNt obtenu est resuspendu dans 3 ml du même tampon d'activation. D'après le Tab. 4, la deuxième purification présente un rendement d'ARNt plus élevé par rapport à la première. Ceci pourrait être attribué à une meilleure surproduction d'ARNt pendant la deuxième culture même si la même souche a été utilisée. On remarque une augmentation du ratio A260/A280 pour la purification 2 qui est probablement due à une contamination au phénol. Le phénol absorbe à un pic de 270 nm et a un ratio A260/A280 de 1,2 ce qui a contribué à l'augmentation de ce ratio qui devrait être au environ de 2.

5-3 Test de l'activité acceptrice de l'ARNt pour le glutamate

Le test de l'activité acceptrice de l'ARNt permet la détermination de la concentration de l'ARNt^{Glu} dans le mélange d'ARNt non fractionné. La Fig. 22 montre le plateau d'aminacylation de l'ARNt, signifiant la glutamylation de la totalité de l'ARNt^{Glu} présente dans le milieu.

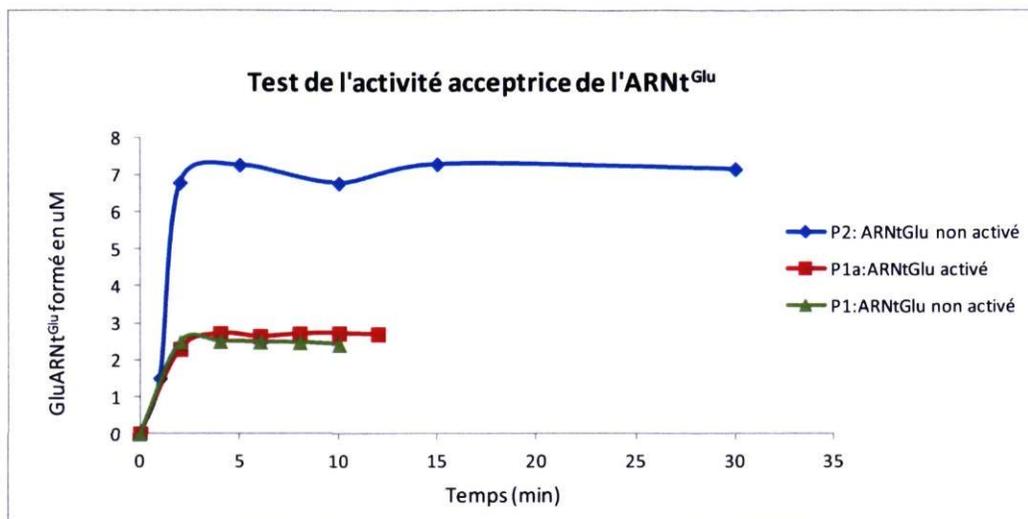


Fig. 22: Test d'activité acceptrice de l'ARNt non fractionné enrichi en ARNt^{Glu}

* P1: Fraction non activée de la première purification; P1a: Fraction activée de la première purification; P2: Fraction non activée de la deuxième purification

Selon les courbes de la première purification (P1, P1a), aucune différence n'a été observée entre l'ARNt activé et l'ARNt non activé. En se basant sur les résultats trouvés (Fig. 22), toutes les réactions d'aminacylation catalysées par la GluRS pleine longueur sauvage et par ses variants ont été effectuées avec l'ARNt non activé. L'ARNt^{Glu} de la première purification présente un pourcentage de 38% et une concentration de 60,27 μM d'ARNt^{Glu}, tandis que celui de la deuxième purification présente une concentration de 132 μM d'ARNt^{Glu} et un pourcentage de 20%.

6- Réaction de glutamylation: Analyse cinétique de la GluRS pleine longueur sauvage et de ses variants

Les résultats obtenus ci-dessus ont permis de planifier le déroulement de la réaction d'aminacylation effectuée dans le but de vérifier l'impact des substitutions des acides aminés sur les paramètres cinétiques de la GluRS de *E. coli* définis par la K_m et la k_{cat} .

6-1 Détermination de K_m pour l'ARNt^{Glu}

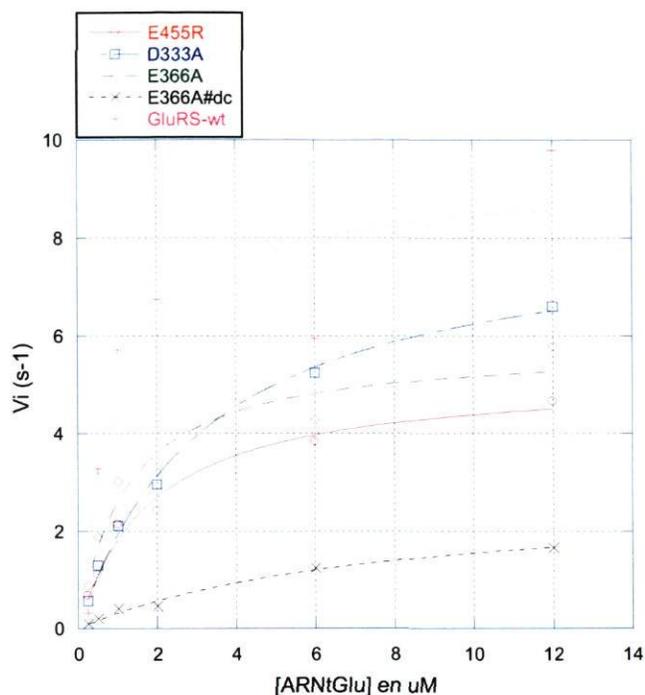


Fig. 23: Détermination des constantes cinétiques pour l'ARNt^{Glu} par régression non-linéaire utilisant le logiciel KaleidaGraph

Pour les mesures de K_m de l'ARNt^{Glu}, les concentrations suivantes ont été utilisées:

a- GluRS sauvage et les variants

- GluRS: 0,11 nM
- D333A: 0,15 nM,
- E455R: 0,15 nM
- E366A: 0,11 nM
- E366A#dc: 0,5 nM

b- Pour chaque enzyme une série de concentrations de l'ARNt^{Glu} a été utilisée: 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 6 μ M et 12 μ M.

c- Concentration du glutamate: 200 μ M

d- Concentration de l'ATP: 4 mM

6-2 Détermination de K_m pour le glutamate

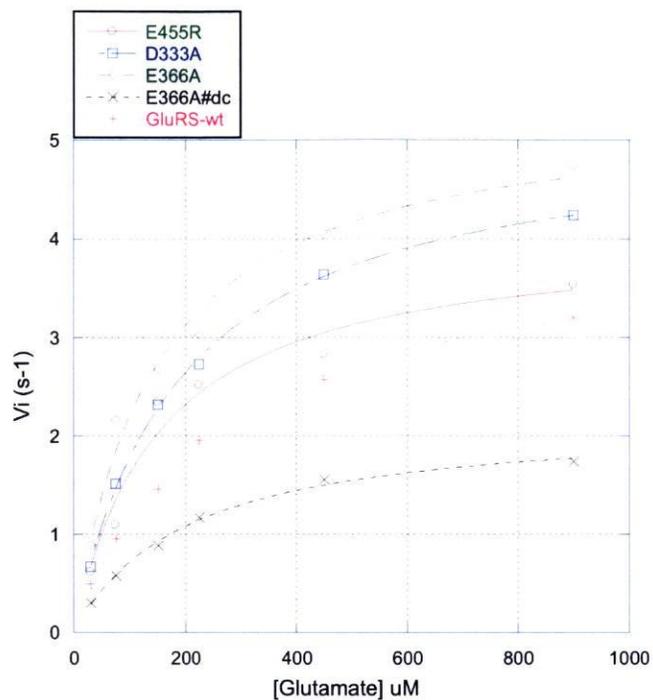


Fig. 24: Détermination des constantes cinétiques pour le glutamate par régression non-linéaire utilisant le logiciel KaleidaGraph

a- GluRS sauvage et les variants

- GluRS: 0,55 nM
- D333A: 0,7 nM,
- E455R: 0,7 nM
- E366A: 0,5 nM
- E366A#dc: 2,3 nM

b- Pour chaque enzyme une série de concentration du glutamate a été utilisée: 30 μM , 75 μM , 150 μM , 225 μM , 450 μM et 900 μM .

c- Concentration de l'ARNt^{Glu}: 10 μM

d- Concentration de l'ATP: 4 mM

Les résultats obtenus par régression non-linéaire utilisant le logiciel KaleidaGraph sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tab. 5: Valeurs des paramètres cinétiques* de la GluRS d'*E. coli* pleine longueur sauvage et variants dans la réaction d'aminocyclation

Enzymes	K_m		k_{cat}		k_{cat}/K_m	
	μM	Relatif	s^{-1}	Relatif	$\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$	Relatif
			ARNt ^{Glu}			
GluRS-wt	1 ± 0,5	1,0	9,3 ± 1,6	1,0	4,14	1,00
E455R	1,9 ± 0,4	1,9	5,2 ± 0,3	0,6	2,20	0,53
D333A	3,3 ± 0,4	3,3	8,3 ± 0,3	0,9	1,55	0,38
E366A	1,2 ± 0,4	1,2	5,8 ± 0,5	0,6	4,43	1,07
E366A#dc	7,6 ± 2	7,7	2,7 ± 0,3	0,3	0,28	0,07
			Glutamate			
GluRS-wt	253 ± 16	1,0	4,1 ± 0,1	1,0	0,016	1,00
E455R	150 ± 37	0,6	4,1 ± 0,3	1,0	0,027	1,69
D333A	187 ± 8	0,7	5,1 ± 0,1	1,2	0,027	1,69
E366A	143 ± 24	0,6	5,4 ± 0,3	1,3	0,038	2,33
E366A#dc	200 ± 18	0,8	2,1 ± 0,1	0,5	0,010	0,65

* Les erreurs sont rapportées par la régression non linéaire données par le logiciel KaleidaGraph

Des variations des k_{cat} pour la même enzyme ont été enregistrées en comparant les valeurs obtenues à partir des tests cinétiques où les substrats variables sont le glutamate ou l'ARNt^{Glu} (Tab. 5). Dans le cas où le glutamate est le substrat variable, les deux substrats fixes (ATP et ARNt^{Glu}) sont en concentrations saturantes pour la GluRS. Par contre, lorsque l'ARNt^{Glu} est le substrat variable la concentration d'un des substrats fixes, le glutamate, n'était pas saturante à cause de la faible disponibilité de la concentration du glutamate marqué au laboratoire. Cela nous a mené à choisir les valeurs de k_{cat} obtenues dans le cas où le glutamate et le substrat variable pour le calcul des constantes de spécificité.

Les résultats cinétiques obtenus montrent qu'il n'y a pas d'effet majeur sur les K_m de l'ARNt^{Glu} sauf pour les variants D333A et E366A#dc. Le K_m du variant E366A#dc est 7,7 fois plus élevé que celui de la GluRS sauvage, et 3 fois plus élevé pour le variant D333A. On remarque aussi une légère augmentation des k_{cat} pour le variant E366A; et

une diminution significative (2 fois plus faible) a été enregistrée chez le variant E366A#dc. La constante de spécificité du variant E366A#dc pour l'ARNt^{Glu} est 15 fois plus faible que celle du sauvage, mais la différence est négligeable pour le glutamate (Tab. 5). Ces résultats indiquent que les mutations d'un seul de ces résidus présentent un effet négligeable sur l'activité catalytique de la GluRS de *E. coli*. Cet effet négligeable de simple mutation pourrait être attribué au fait que la rotation du domaine 5 ne nécessite pas quatre liaisons hydrogènes où bien l'interférence des molécules d'eau comme alternative du pont hydrogène. De plus, la légère augmentation de la k_{cat} pour le variant E366A touchant le résidu lieur pourrait être interprété par la présence d'un autre résidu comme D367 qui pourrait prendre la relève. Par ailleurs l'allongement de la charnière (E366A#dc) affecte considérablement l'activité catalytique et l'affinité envers l'ARNt^{Glu} reflétée par une diminution de 15 fois de la spécificité envers l'ARNt^{Glu}. Ce résultat met en valeur l'influence du nombre de résidus constituant la charnière plus que leur nature sur l'activité catalytique de la GluRS puisque l'effet de ce deuxième paramètre requiert une étude sur des cas des mutants doubles ou triples. Cette conclusion nous a menés à analyser les structures des GluRS déterminées par cristallographie chez différentes bactéries dans le but de comparer la longueur de la charnière 4-5 (Fig. 25). Cette comparaison a montré que la longueur diffère d'une GluRS à une autre. Ceci suggère que la charnière de la GluRS de *E. coli* serait peut-être plus longue que celle déterminée à partir de l'alignement de séquence avec la GluRS modèle de *T. thermophilus*.



Fig. 25: Alignement des séquences des acides aminés de la charnière 4-5 de diverses GluRS de structures connues.

* L'alignement a été effectué en utilisant le logiciel ClustalX2

- * Tth: *Thermus thermophilus*
- * Tma: *Thermotoga maritima*
- * Mtu: *Mycobacterium tuberculosis*
- * Tel: *Thermococcus elongates*

Les résultats de cette première partie ont montré l'effet de la longueur de la charnière 4-5 et l'impact des substitutions sur les paramètres cinétiques de la GluRS de *E. coli* ainsi que la spécificité de cette dernière envers l'ARNt^{Glu}. Pour une meilleure compréhension du phénomène, la deuxième étape de ce travail est consacrée à comprendre l'influence de ces substitutions sur la flexibilité de la charnière qui permet le mouvement du domaine 5 par rapport au domaine 4.

PARTIE II: Etude de l'impact des substitutions d'acides aminés, potentiellement impliqués dans le mouvement du domaine 5 par rapport au domaine 4, sur la flexibilité de la charnière liant les domaines 4 et 5

Sekine *et al.*, 2003 ont rapporté le changement d'angle de 8° du domaine 5 par rapport au domaine 4 de la GluRS de *T. thermophilus* provoqué par la liaison de l'ARNt^{Glu}. De ce fait, il serait intéressant de savoir si cette inclinaison est dépendante du type de mutation effectuée. Dans ce contexte, les étapes suivantes ont été faites pour confirmer ou affirmer l'hypothèse avancée.

Les formes tronquées (sauvage et variants) ne contenant que les domaines 4 et 5 de la GluRS sont définies comme suit:

- * GluRS (4-5) sauvage: C₃₁₃₋₄₇₁
- * GluRS (4-5) contenant la mutation D333A: C₃₁₃₋₄₇₁D333A
- * GluRS (4-5) contenant la mutation E455R: C₃₁₃₋₄₇₁E455R
- * GluRS (4-5) contenant la mutation E366A: C₃₁₃₋₄₇₁E366A
- * GluRS (4-5) présentant un allongement de la charnière et la mutation E366A: C₃₁₃₋₄₇₁E366A#dc

1- Clonage des gènes codant les domaines C-terminaux de la GluRS sauvage et variants

1-1 Production des copies de gène codant les domaines 4 et 5 par PCR

Les inserts codants les 2 derniers domaines de la GluRS sauvage de *E. coli* et de ses variants ont été produits par PCR sous différentes conditions de température favorable pour le bon fonctionnement de la polymérase Deep Vent_RTM DNA. Les produits PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose pour sélectionner les inserts à utiliser pour les étapes subséquentes du clonage. Les gels d'agarose suivants résument les résultats obtenus sous différentes températures.

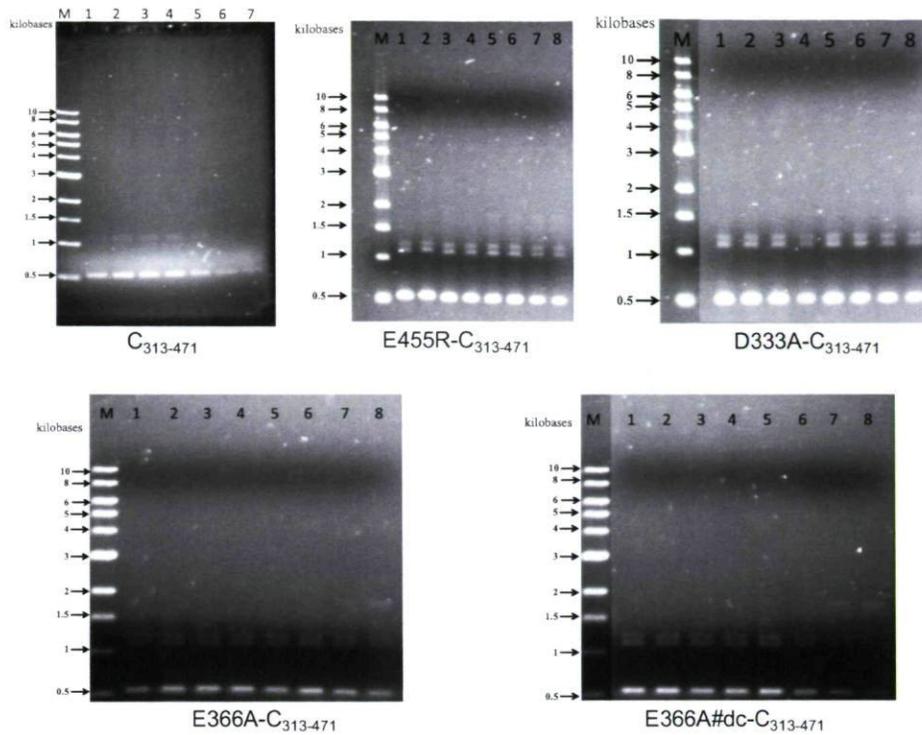


Fig. 26: Sélection sur gel d'agarose des inserts encodant la GluRS $C_{313-471}$ sauvage et variants produits par PCR à différentes températures.

M- marqueur; 1- 55 °C; 2- 55,8 °C; 3- 57,5 °C; 4- 59,2 °C; 5- 60,8 °C; 6- 61,6 °C; 7- 63,1 °C;
8- 65 °C

Les gels montrent que la polymérase Deep Vent_RTM DNA est optimale dans l'intervalle des températures entre 55°C et 65°C et idéalement à 60°C c'est pour cette raison que les inserts produits à cette température ont été choisis. Ces fragments d'ADN (500 pb), qui codent pour les deux derniers domaines, et le plasmide pET-28c vont subir la digestion par les endonucléases *Bam*HI et *Nco*I (enzymes de restriction). Le vecteur et les inserts sont dosés à partir du gel d'agarose et les quantités à utiliser pour la réaction de ligation sont déterminées en se basant sur les intensités des bandes du marqueur.

1-2 Dosage et quantification du vecteur et des inserts

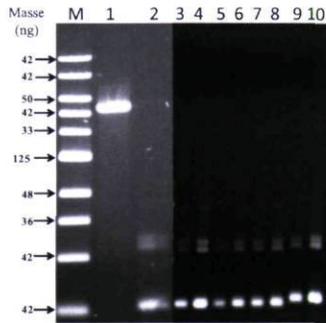


Fig. 27: Dosage quantitatif du vecteur et des inserts sur gel d'agarose

Tab. 6: Quantification et concentration des inserts et du vecteur

Inserts	Concentration Stock (fmol)	Quantité stock (ng)	dilution	Volume (µl) réactionnel	Concentration finale réactionnel (fmol)
C ₃₁₃₋₄₇₁	323,57	105	10X	5,56	90
D333A-C ₃₁₃₋₄₇₁	2590	840	10X	6,95	90
E455R-C ₃₁₃₋₄₇₁	3850	1250	10X	4,67	90
E366A-C ₃₁₃₋₄₇₁	2590	840	10X	6,95	90
E366A#dc-C ₃₁₃₋₄₇₁	3630	3630	10X	4,95	90
pET-28c digéré déphosphorylé	3630	12,5	20X	3,28	30

M- marqueur, 1- pET-28c digéré déphosphorylé, 2- insert C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage, #3-4 E455R-C₃₁₃₋₄₇₁, #5-6 D333A-C₃₁₃₋₄₇₁, #7-8 E366AC₃₁₃₋₄₇₁, #9-10 E366A#dc-C₃₁₃₋₄₇₁

La réaction de ligation a été effectuée à partir des données présentées dans le Tab. 6.

1-3 Vérification de la ligation

Le produit de ligation est dilué 5 fois puis utilisé pour transformer les cellules XL-1 Blue électrocompétentes. Les colonies obtenues ont été l'objet d'une culture permettant l'extraction des plasmides par des mini-prep à l'aide du kit Qiaprep de Qiagen. Les plasmides ainsi obtenus ont été digérés par *Bam*HI et *Nco*I pour identifier les clones qui ont introduit l'insert. Les produits des digestions effectuées sont présentés dans la Fig. 28.

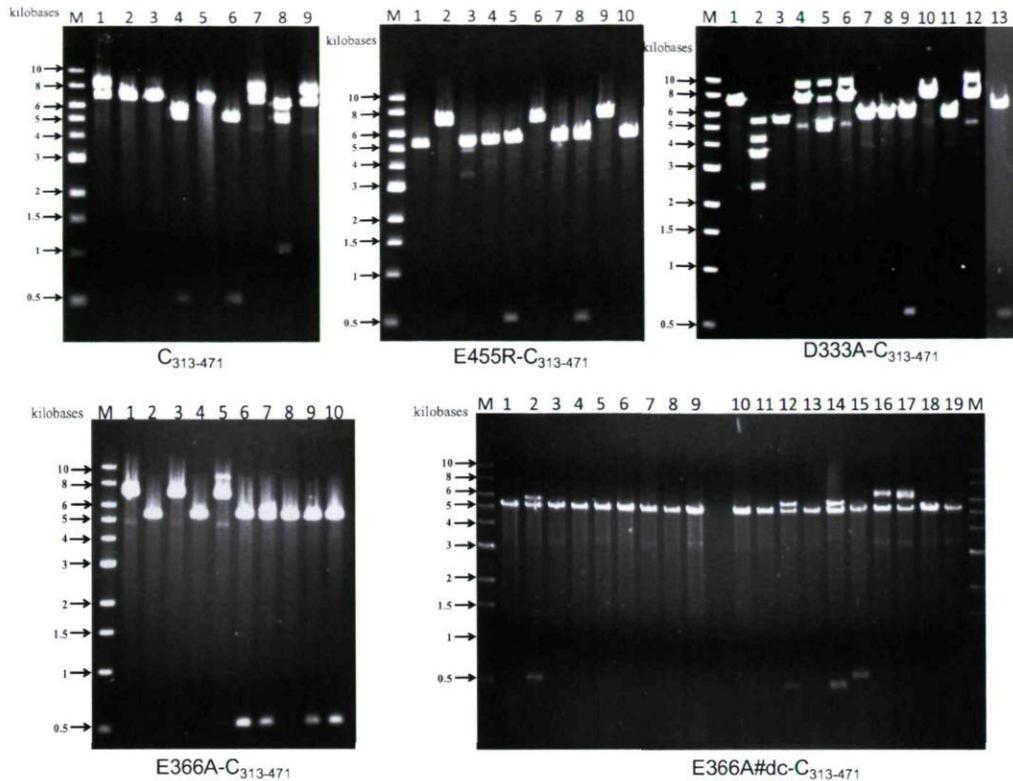


Fig. 28: Vérification sur gel d'agarose des clones qui ont incorporé les plasmides contenant le gène codant la GluRS $C_{313-471}$ sauvage et variants par digestion avec *BamHI* et *NcoI*.

M- marqueur, #1-19 montrent les plasmides des clones digérés avec *BamHI* et *NcoI*

La digestion avec les 2 endonucléases *BamHI* et *NcoI* a été utilisé pour vérifier la réussite de la ligation. La Fig. 28 montre que certains clones ont incorporé le plasmide contenant le gène encodant la GluRS $C_{313-471}$ sauvage et variants. Le plasmide ayant introduit le gène codant les 2 derniers domaines de la GluRS sera nommé **pET-28 c_{313} ERSXT**. Ces plasmides qui contiennent le gène d'intérêt présentent sur gel d'agarose deux fragments d'ADN de 500 et 5272 paires de bases (pb) après digestion avec *BamHI* et *NcoI*. Ces fragments de 500 pb présentent les gènes codant les deux derniers domaines. Les plasmides pET-28 c_{313} ERSXT ont été l'objet d'un séquençage pour vérifier s'il existe d'autres mutations non désirées.

2- Séquençage des gènes encodant les GluRS tronquées sauvage et variants

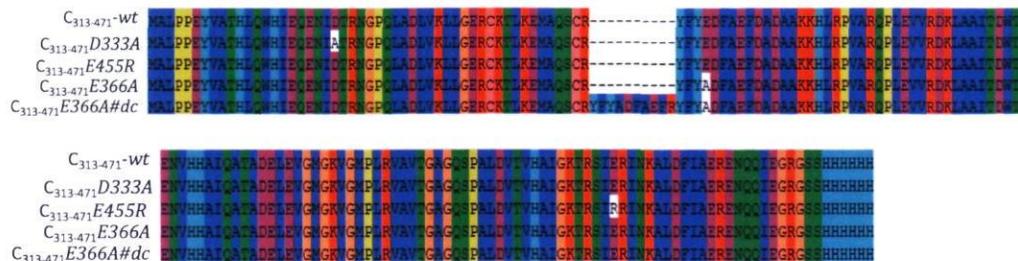


Fig. 29: Alignement des séquences d'acides aminés de la GluRS tronquée sauvage de *E. coli* et de ses variants déduites des séquences de nucléotides de leurs gènes (voir annexe 2.a-2.b page 91)

* L'alignement a été effectué en utilisant le logiciel ClustalX2

* Les petites cases en blanc mettent en évidence les différentes mutations

Les gènes codants les 2 derniers domaines de la GluRS sauvage ainsi que ses variants ont été séquencés. Le séquençage a permis de confirmer qu'il n'existe pas des mutations non désirées (Fig. 29). Ces plasmides servent à transformer la souche BL21pLysS pour surproduire les enzymes tronquées. Pour des raisons qu'on n'a pas pu expliquer, la souche JP1449 est devenue très difficile à faire croître dans un milieu riche. Comme substitut, on a choisi la souche BL21 pour la surproduction de l'enzyme.

3- Surproduction, purification et caractérisation des GluRS tronquées sauvage et variants chez *E. coli* BL21

La souche BL21 est surproduite à 37°C, et puis lysée par ajout de lysozyme. L'extrait cellulaire est centrifugé, le culot et le surnageant obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel "SDS-PAGE". Dans cette étude, il est à noter que deux autres méthodes ont été utilisées pour vérifier l'étape de la lyse, à savoir: méthode gel-dégel et EmulsiFlex. Ces GluRS tronquées ont fait l'objet d'une analyse de solubilité.

3-1 Vérification de la solubilité des GluRS tronquées sauvage et variants

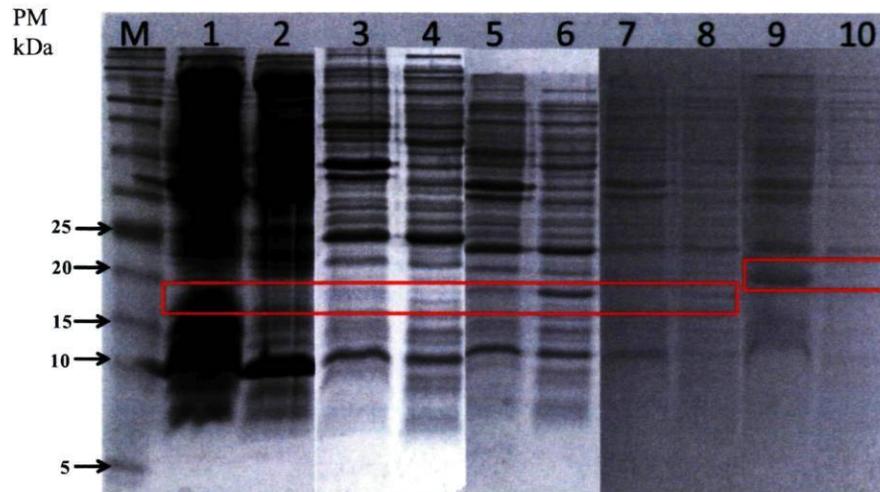


Fig. 30: Vérification de la solubilité de la GluRS $C_{313-471}$ sauvage et de ses variants

La lyse des cellules JP1449 surproduites à 37°C a été effectuée à l'aide de lysozyme. L'extrait cellulaire de la BL21 a été centrifugé et les deux phases, culot et surnageant, sont séparées et analysées sur gel "SDS-PAGE". M- Marqueur de poids moléculaire (ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230kDa)); 1- le culot de la $C_{313-471}$ -wt; 2- le surnageant de la $C_{313-471}$ -wt; 3- le culot de la $C_{313-471}$ -D333A; 4- le surnageant de la $C_{313-471}$ -D333A; 5- le culot de la $C_{313-471}$ -E455R; 6- le surnageant de la $C_{313-471}$ -E455R; 7- le culot de la $C_{313-471}$ -E366A; 8- le surnageant de la $C_{313-471}$ -E366A; 9- le culot de la $C_{313-471}$ -E366A#dc; 10- le surnageant de la $C_{313-471}$ -E366A#dc.

La GluRS tronquée et ses variants sont représentées par les bandes se trouvant à la hauteur correspondant à 19 kDa (Fig. 30). Selon la Fig. 30, la plus grande partie de ces enzymes reste dans le culot et juste une faible quantité a pu être récupérée dans le surnageant. Ces résultats peuvent être expliqués par plusieurs hypothèses.

- a- Formation de corps d'inclusion à cause des mauvais repliements de GluRS $C_{313-471}$ qui pourrait provoquer l'insolubilité de cette enzyme
- b- Formation du complexe insoluble que peut former la GluRS $C_{313-471}$ avec une autre molécule tel que l'ARNt^{Glu}

La surproduction et la purification ont été effectuées pour la GluRS tronquée sauvage ainsi que pour tous ses variants. Dans tous ces cas, nous avons obtenu une faible surproduction, et une faible récupération due au fait qu'une grande partie de ces enzymes se trouvaient dans le culot du lysat. C'est la raison qui nous a menés à travailler d'abord sur la GluRS tronquée sauvage, dans le but d'améliorer le protocole de surproduction et de purification.

Pour comprendre les problèmes liés à la récupération de la protéine, l'étude sur une toxicité probable de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ a été effectuée. Dans ce but, l'évolution de la surproduction de cette enzyme en fonction du temps a été examinée.

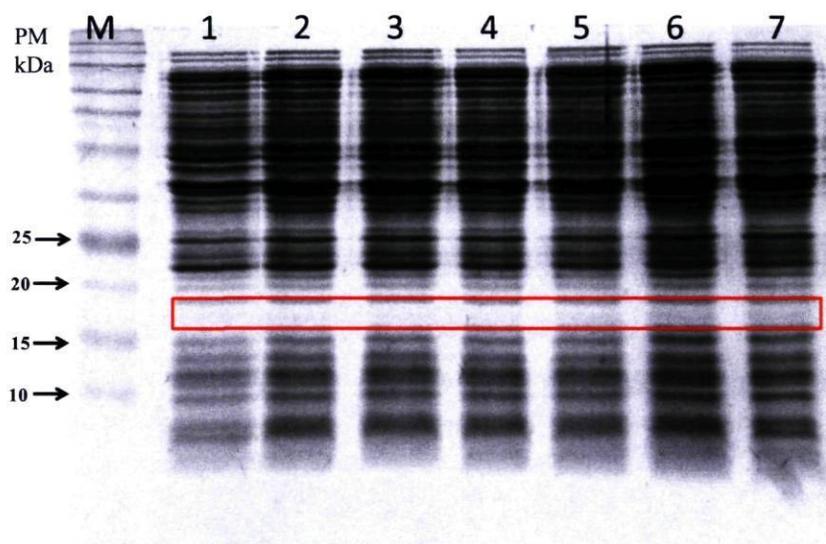


Fig. 31: Vérification par électrophorèse de la surproduction de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ par BL21 sur gel "SDS-PAGE"

* L'extrait total de BL21 est déposé sur gel polyacrylamide: 1- avant induction ; 2- Après 1 heure d'induction; 3- Après 2 heures d'induction; 4- Après 3 heures d'induction; 5- Après 16 heures d'induction; 6- Après 17 heures d'induction; 7- après 18 heures d'induction; M- marqueur de poids moléculaire.

La souche croit de façon normale dans les conditions de culture et d'incubation. De plus toutes les protéines sont synthétisées en grande quantité excepté la GluRS tronquée (C₃₁₃₋₄₇₁) qui est présentée par la bande très pale (encadrée) se trouvant à la hauteur de 19 kDa. Le fait qu'une partie minoritaire a été récupérée par purification sur une colonne Ni-NTA est peut-être dû à une instabilité de cette protéine tronquée non

naturelle qui a subi une dégradation par les protéases pendant la culture. Des résultats récents (non présentés) ont montré que la protéine est mieux surproduite à basse température (15 °C), ce qui appuie l'hypothèse de la dégradation de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ par les protéases dont l'activité est diminuée à 15°C. La vérification de la surproduction en utilisant d'autres souches telles que JP1449 et T7 express LysY a abouti au même résultat.

3-2 Purification de la GluRS tronquée sauvage par chromatographie d'affinité au nickel

Le surnageant du lysat récupérée a fait l'objet d'autres analyses pour récupérer la protéine cible qui est la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ en utilisant la chromatographie d'affinité au nickel.

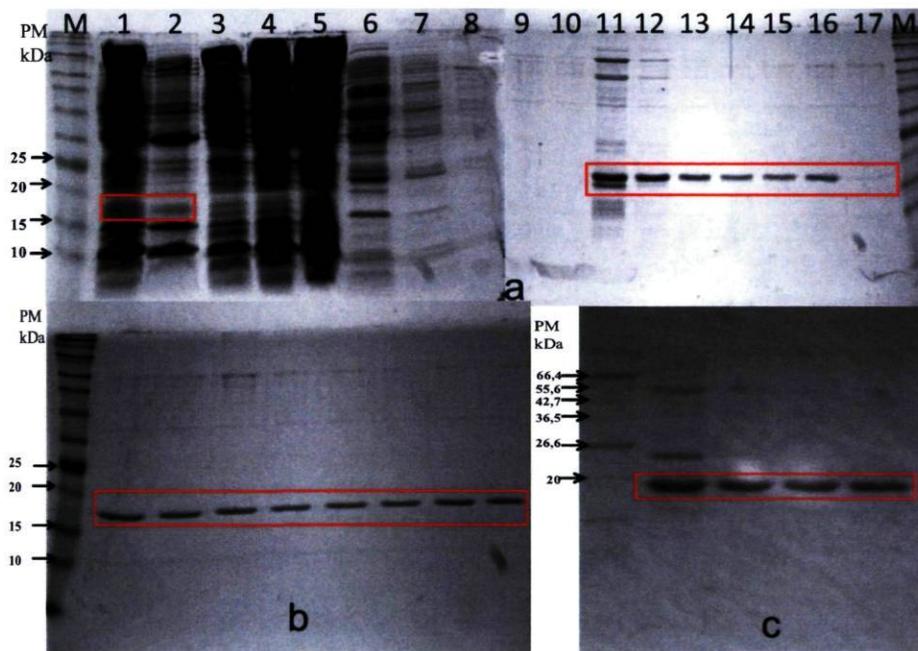


Fig. 32: Profil d'éluion de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ par chromatographie d'affinité surproduite à partir des souches d'*E. coli*, BL21 et JP1449

a: M- Marqueur de poids moléculaire; 1- culot de l'extrait cellulaire; 2- Surnageant de l'extrait cellulaire; # 3-5 suspension non retenue par la colonne; #6-7 20µl de fractions de binding (5mM imidazole); #8-10 20µl de fractions de lavage (20 mM d'imidazole); #11-16 20µl de fractions d'éluion (1M d'imidazole); 17- fraction nettoyage (100 mM EDTA); souche BL21.

b: Fractions 3, 4 et 5 de **a** qui ont subis une deuxième purification (souche BL21).

c: Fractions d'élution (1M imidazole) de purification de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ par chromatographie d'affinité à partir de la souche JP1449.

La Fig. 32 montre les fractions issues de la purification de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ à partir des deux souches BL21 (Fig. 32.a-b) et JP1449 (Fig. 32.c). Comme cette dernière a fini par montrer une faible surproduction des GluRS tronquées, la souche BL21(DE3) pLysS a été choisie pour les prochaines étapes de cette étude.

La purification de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ par chromatographie d'affinité à partir de la souche de BL21 a été effectuée dans 1ml de résine de nickel immobilisé dans le but de minimiser les contaminations. Pour réduire les pertes de cette enzyme dues à la portion non retenue par la résine à cause de sa saturation (fractions 3,4 et 5; gel Fig. 32.a), ces fractions ont été purifiées encore une fois dans une nouvelle colonne ayant les mêmes caractéristiques. La Fig. 32.b montre l'analyse des fractions éluées de la deuxième colonne par le «tampon d'élution».

La Fig. 32 montre que les fractions d'élution recueillies contenant les GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ nécessitent une autre purification pour améliorer le degré de pureté.

3-3 Purification de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions

Les fractions d'élutions recueillies par chromatographie d'affinité sont dialysées dans le tampon phosphate A (25 mM KCl) pH 6,8 afin de correspondre au tampon exigé au cours de l'utilisation de la RMN. Ces fractions dialysées ont été l'objet d'une purification par chromatographie sur colonne MonoQ HR 10/10 échangeuse d'anions. Cette succession de purification permet l'obtention des fractions d'enzymes tronquées plus pure pour une analyse par RMN. La Fig. 33 montre le profil d'élution de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage (mélange des fractions d'élutions des 2 souches BL21 et JP1449; Fig. 32).

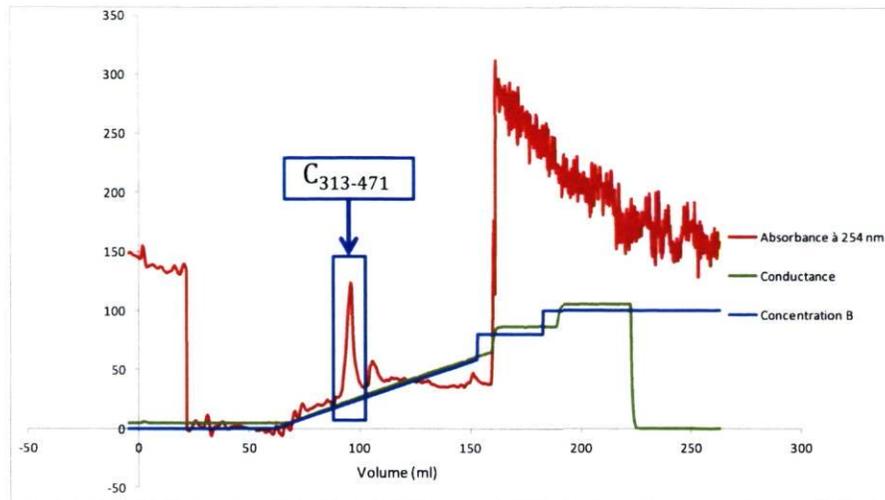


Fig. 33: Profil d'éluion de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage par chromatographie sur colonne MonoQ HR 10/10 échangeuse d'ions

Le pic détecté à une absorbance de 113 mAU à 254 nm (Fig. 33) présente l'éluion de la GluRS tronquée qui a été éluee à 22% du tampon B (1 M de KCl), équivalent à une concentration de 240 mM de KCl. Au fur et à mesure que l'éluion se déroule des fractions ont été recueillies dans des tubes à éluion pour une analyse sur gel «SDS-PAGE».

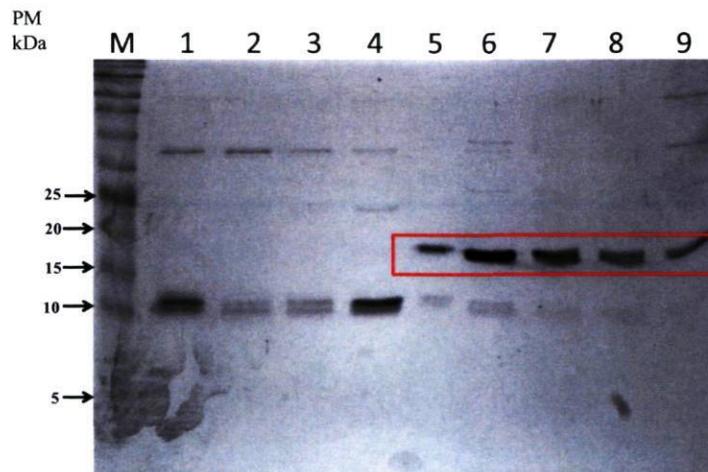


Fig. 34: Analyse par électrophorèse sur gel «SDS-PAGE» des fractions d'éluion de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage récoltées

La Fig. 34 indique que les fractions 5-9, représentant le pic détecté et encadré en bleu dans Fig. 33, ont le même poids moléculaire que l'enzyme tronquée (19 kDa). C'est important de notifier que la purification sur colonne échangeuse d'anions a permis l'amélioration de la pureté de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ et cela en comparaison avec celle obtenue dans Fig. 32. La deuxième purification a permis l'élimination des contaminants présentés dans Fig. 34, fractions 1-4. Pour une confirmation approfondie de la nature de la protéine détectée dans les fractions 5-9, un séquençage des fractions 5-9 a été effectué par spectroscopie de masse.

3-4 Séquençage de la GluRS C₁₃₁₋₄₇₁ sauvage par spectroscopie de masse

Pour une confirmation additionnelle de la nature de cette protéine, un séquençage par spectroscopie de masse a été effectué. La bande marquée en rouge sur gel «SDS-PAGE» à 19 kDa (Fig. 35) est découpée puis envoyée au laboratoire Plate-forme protéomique du centre de génomique de Québec, centre de recherche de CHUQ. Les résultats sont présentés par la Fig. 36.

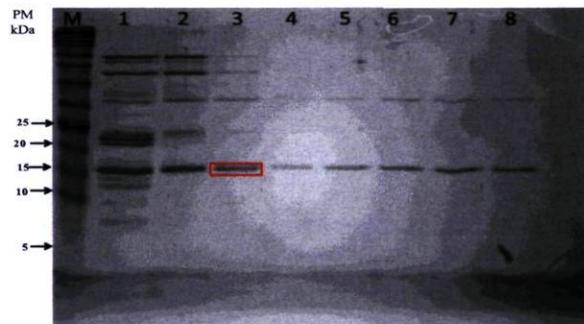


Fig. 35: Fractions d'élution de la GluRS C₁₃₁₋₄₇₁ sauvage par analyse par SDS-PAGE des aliquotes de chaque étape de chromatographie

M- Marqueur de poids moléculaire, #1-8 fraction d'élution (1M imidazole).

protein1 (100 %), 18 354,9 Da

313ERSXT-wt

9 unique peptides, 15 unique spectra, 55 total spectra, 85/164 amino acids (52 % coverage)

MALPPEYVAT H LQWHIEQEN IDTRNGPQLA DLV KLLGERC K TLKE AQS RYFYEDFAEF
 DADA AAKHLR PVAR QPLEVV RDK LAAITDW TAENVHHAIO ATADELEVGM GKVGMPLRVA
 VTGAGQSPAL DVTVHAIGK T RSIER INKAL DFIAERENQQ I EGR

A7ZPK7 (88 %), 53 816,3 Da

SYE_ECO24 Glutamy-tRNA synthetase [Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) [331111]]

1 unique peptides, 1 unique spectra, 1 total spectra, 58/471 amino acids (12 % coverage)

MKIKTRFAPS PTGYLHVGGAR TALYSWLFAR NHGGGEFVLR IEDTDLERST PEAIEAIMDGG
 MNWLSLEWDE GPYYQTKRFD RYNAVIDQML EEGTAYKCYC SKERLEALRE EQMAKGEKPR
 YDGRCRHSHE HHADDEPCVV RFANPQEGSV VFDDQIRGPI EFSNQELDDL IIRRTDGSPT
 YNFCVVVDDW DMEITHVIRG EDHINNTPRQ INILKALKAP VPHYAHVSMI NGDDGKLSK
 RHGAVSVMQY RDDGYLPEAL LNYLVRLGWS HGDQEIFTR EMIKYFTLNA VSKSASAFNT
 DKLLWLNHHY INALPPEYVA THLQWHIEQE NIDTRNGPQL ADLVKLLGER CKTLKEMAQS
 CR YFYEDFAE FDADA AAKHLR PVARQPLEV VRDKLAAITD WTAENVHHAIO ATADELEVGM
 MGKVGMPLRVA AVTGAGQSPA LDVTVHAIGK TRSIER INKA LDFIAERENQQ

Fig. 36: Aligment des séquences des résidus des peptides, identifiés par spectroscopie de masse, avec la séquence de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage. La différence entre la séquence MALPPEY et NALPPEY est le changement d'une asparagine par une méthionine à cause de la nécessité d'un résidu d'initiation pour l'expression de la GluRS tronquée.

Les résultats de spectroscopie de masse montrent l'existence de 9 peptides qui concordent avec la séquence de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage. Ce résultat confirme encore une fois que les bandes à 19 kDa sur gel «SDS-PAGE» (Fig. 34, Fraction 5-9 ou Fig. 35) sont bien la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage.

Sequence Coverage	Protein	Accession	Prob	%Spec	#Pep	#Unq	#Spec	%Cov	Weight
	SYE_ECO24 Glutamy-tRNA synthetase [Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) [331111]]	A7ZPK7	88 %	0,023%	1	1	1	12%	53798
	E2N2W3_ECOLI Glutamy-tRNA synthetase [Escherichia coli 3827-70 [670880]]	E2N2W3	88 %	0,023%	1	1	1	12%	53828
	glutamy-tRNA synthetase [Escherichia coli OP50 [337912]]	UP1000.10018E4	88 %	0,023%	1	1	1	17%	39146
	E1L8K2_ECOLI Glutamy-tRNA synthetase (Fragment) [Escherichia coli MS 124-1 [679205]]	E1L8K2	88 %	0,023%	1	1	1	17%	39266
	E7HFB_ECOLI Glutamy-tRNA synthetase [Escherichia coli LT-68 [670890]]	E7HFB	88 %	0,023%	1	1	1	12%	53824

Fig. 37: Aligment des séquences des peptides, identifiés par spectroscopie de masse, avec les GluRS pleine longueur d'*E. coli*

Par aligment des résultats trouvés (Fig. 37) avec la séquence d'acides aminés de plusieurs protéines, on confirme que les fragments peptidiques s'alignent parfaitement avec les 2 derniers domaines de plusieurs GluRS de différentes souches d'*E. coli*. Ce résultat a été obtenu par une recherche dans la banque des protéines uniref_11_05_bacteria ainsi que dans une banque contenant la séquence des GluRS.

3-5 Caractérisation de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage par RMN

Le but de cette analyse est de vérifier l'état de structure de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage.

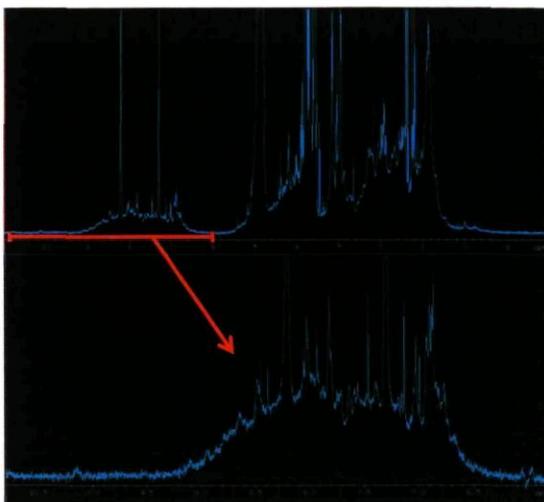


Fig. 38: Spectre 1D de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ par RMN obtenu dans le laboratoire du Dr. Stéphane Gagné

Le spectre RMN 1D montre une dispersion spectrale significative qui est une indication d'une bonne structuration confirmant le bon repliement de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage récupérée à partir du surnageant du lysat.

4- Evaluation des pertes au cours des étapes d'analyses

Tab. 7: Pertes de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage pendant les étapes de purification

Dosage du C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage pendant les étapes de purification	Nombre de fraction	Concentration (mM)	Concentration (mg/ml)	Quantité totale (mg)	Rendement en %
Avant Chromatographie échangeuse d'anions	Fraction 1	0,18	3,45	27,4	---
	Fraction 2	0,36	7,1		
	Fraction 3	0,56	10,86		
Après dialyse dans tampon phosphate	Fraction	0,103	2,02	27,3	99,6
Après Chromatographie échangeuse d'anions	Fraction 1	0,03	0,5	8,9	32,6
	Fraction 2	0,03	0,61		
Après concentration dans un centricon 10K (échantillon RMN)	Fraction 1	0,02	0,34	1,7	6,2
	Fraction 2	0,006	0,1		

Chaque étape a affecté différemment la quantité d'enzyme (Tab. 7). Aucune perte n'a été enregistrée dans l'étape de dialyse. Des pertes considérables de l'enzyme ont eu lieu pendant la chromatographie échangeuse d'ions et l'étape de concentration. Les pertes les plus marquantes sont observées pendant l'étape de chromatographie échangeuse d'ions. Ces pertes sont dues essentiellement à la précipitation de la protéine.

Les pertes observées pendant l'étape de concentration indiquent que l'enzyme ayant un poids moléculaire 19 kDa a bien traversé le filtre de 10 kDa comme le montre le Tab. 7.1.

Tab. 7.1: Perte de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ sauvage dans la dernière centrifugation durant la dernière étape de concentration

Dosage du C ₃₁₃₋₄₇₁ sauvage pendant les étapes de purification	Nombre de fraction	Concentration en μ M	Concentration en mg/ml	Quantité totale en mg	Rendement en %
La dernière centrifugation pour la concentration dans un centricon 10K	Paroi du filtre	9,1	0,1	0,56	2
	Flowthrough	7,43	0,14	0,72	2,6

Ces pertes pourraient être dues à une perte de structure. Afin de vérifier la nature des pertes, le «flowthrough» (la fraction passée à travers la membrane du filtre) et la suspension du lavage des parois du filtre ont été analysés sur gel de «SDS-PAGE» 15%.

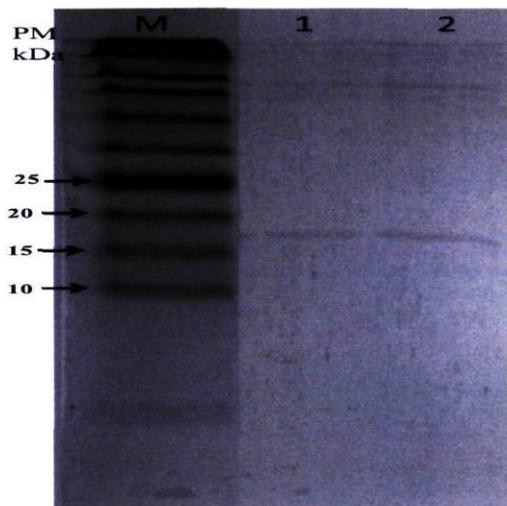


Fig. 39: Analyse de la nature des pertes de la fraction flowthrough et la suspension du lavage de la paroi du filtre sur gel «SDS-PAGE»

* M- Marqueur de poids moléculaire, 1 GluRS $C_{313-471}$ fixé à la paroi du filtre, 2- GluRS $C_{313-471}$ sortie à travers le filtre

Pendant la dernière centrifugation de l'étape de concentration, une perte de 1,28 mg d'enzyme est observée au niveau de la paroi du filtre et du flowthrough. Pour minimiser les pertes, la concentration a été effectuée dans un centricon 3 kDa et l'échantillon est concentré dans un volume de 600 μ l. Les précipités blanchâtres apparus ont été séparés par centrifugation avant analyse par RMN (Jean-Baptiste Duvignaud au laboratoire du Dr. Stéphane Gagné).

Chapitre IV

Conclusion et perspectives

Conclusion:

L'activité de la GluRS n'est pas affectée par les simples substitutions effectuées dans les résidus interagissant dans la région de la charnière 4-5. Cependant l'activité est affectée par l'ajout d'un segment ayant la même composition d'acides aminés que la charnière d'origine. Par ailleurs, l'affinité envers l'ARNt^{Glu} (K_m) et l'activité catalytique (k_{cat}) de l'enzyme ont été affectées par l'allongement de la charnière et par conséquent la spécificité de l'enzyme envers l'ARNt^{Glu} a diminué de 15 fois. Ce changement observé dans les paramètres cinétiques pourrait être expliqué comme suit:

a- Diminution de la k_{cat} : Le doublement de la longueur de la charnière aurait affecté le degré de rotation du domaine 5 pour reconnaître la boucle d'anticodon; cette rotation aurait affecté l'emplacement de la tige acceptrice dans le site actif et par conséquent la deuxième étape de la réaction d'aminacylation.

b- l'augmentation de la K_m : L'allongement de la charnière 4-5 aurait aussi retardé l'étape d'activation du glutamate due à la diminution de l'affinité de l'enzyme envers l'ARNt^{Glu}. Cette hypothèse est basée sur le fait que l'étape d'activation du glutamate exige l'interaction des 3 régions de l'ARNt^{Glu} avec la GluRS pour le changement du mode de liaison de l'ATP.

c- Comme les résultats cinétiques du variant double-charnière ont montré une diminution dans l'activité et dans la spécificité, on pourrait suggérer que la longueur de la charnière de la GluRS de *E. coli* est un paramètre important pour l'activité de la GluRS de *E. coli*.

- La mauvaise surproduction de la GluRS C₃₁₃₋₄₇₁ (domaines 4 et 5) pourrait être attribuée à une instabilité de cette protéine tronquée non naturelle qui a subi une dégradation par les protéases pendant la culture. Comme il a été déjà mentionné, une bonne partie de cette protéine surproduite reste dans le culot et seulement une faible partie a été récupérée. L'étude est en cours pour améliorer la surproduction et la solubilité de l'enzyme cible pour finaliser l'étude de la flexibilité de la charnière 4-5 par RMN.

Perspectives:

Ce projet ouvre d'autres aspects intéressants dans le domaine de la biosynthèse des protéines en particulier l'étude de l'influence de la flexibilité de la charnière 4-5 sur les paramètres cinétiques, en explorant les possibilités suivantes:

a- Il serait intéressant de déterminer les paramètres cinétiques d'un variant qui ne contient pas la charnière 4-5 pour tester l'effet de l'absence de cette dernière sur l'activité catalytique de la GluRS. Ce variant qui ne contiendra pas la charnière 4-5 pourrait mettre en valeur si la rotation de 8° effectuée par le domaine 5 est importante pour la reconnaissance de boucle de l'anticodon de l'ARNt^{Glu}. De plus, il serait avantageux de comparer l'effet de l'allongement et de l'excision de la charnière 4-5 sur les paramètres cinétique de la GluRS puisqu' il a été démontré que le nombre d'acides aminés constituant cette charnière est important pour l'activité catalytique de même que pour l'affinité de cette enzyme envers son substrat l'ARNt^{Glu}.

b- Fixation de la rotation du domaine 5 par rapport au domaine 4 à l'aide des ponts disulfures: un tel variant sert à annuler la rotation de 8° effectuée par le domaine 5 et appuyer les résultats du variant GluRS sans charnière. Et enfin, la détermination des paramètres cinétique de ce variant aidera à mieux comprendre le rôle de la charnière 4-5.

Bibliographie

- Balg, C., Blais, S. P., Bernier, S., Huot, J. L., Couture, M., Lapointe, J., et Chênevert, R. (2007). "Synthesis of β -ketophosphonate analogs of glutamyl and glutaminy adenylate, and Selective inhibition of the corresponding bacterial aminoacyl-tRNA synthetases." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**(1): 295-304.
- Bailly, M., Blaise, M., Roy, H., Deniziak, M., Lorber, B., Birck, C., Becker, H. D. and Kern, D. (2008). "tRNA-dependent asparagines formation in prokaryotes: characterization, isolation and structural and functional analysis of a ribonucleoprotein particle generating Asn-tRNA^{Asn}." *Methods* **44**(2): 146–163.
- Breton, R., H. Sanfacon, I. A. Papayannopoulos, K. Biemann, J. LaPointe 1986. Glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*. Isolation and primary structure of the *gltX* gene and homology with other aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* **261**:10610-10617
- Brunie, S., Zelwer, C., et Risler, J. L. (1990). "Crystallographic study at 2.5 Å resolution of the interaction of methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* with ATP." *Journal of Molecular Biology* **216**(2): 411-24
- Giegé, R. and Frugier, M. (2003). Transfer RNA structure and identity. In "Translation Mechanisms" (J. Lapointe & L. Brakier-Gingras, Eds) Landes Bioscience / Eureka.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers, chapter 1.
- Carter, C. W., Jr. (1993). "Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetase." *Annual Review of Biochemistry* **62**: 715-748.
- Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W., et Wingfield, P. T. (1995). *Current Protocols in protein science*. Brooklyn, N.Y., John Wiley & Sons Inc.
- Curnow, A. W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T. M. and Söll, D. (1997). "Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11819–11826.
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Hartlein, M., Nassar, N. Et Leberman, R., (1990). "A second classe of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2,5Å." *Nature* **347** (6290): 249-255.
- Dasgupta, S., Saha, R., Dey, C., Banerjee, R., Roy, S., et Basu, G. (2009). "The role of the catalytic domain of *E. coli* GluRS in tRNA^{Gln} discrimination." *FEBS Letters* **583**(12): 2114-2120.
- Dubois, D. Y., Blais, S. P., Huot, J. L., et Lapointe, J. (2009). "AC-Truncated Glutamyl-tRNA synthetase specific for tRNA^{Glu} is stimulated by its free complementary distal domain: Mechanistic and evolutionary implications." *Biochemistry* **48**: 6012-6021
- Voet, D., et Voet, J. G. *Biochemistry Fourth Edition*, 2011, ISBN13 978-0470-57095-1; JOHN WILEY & SONS, INC.

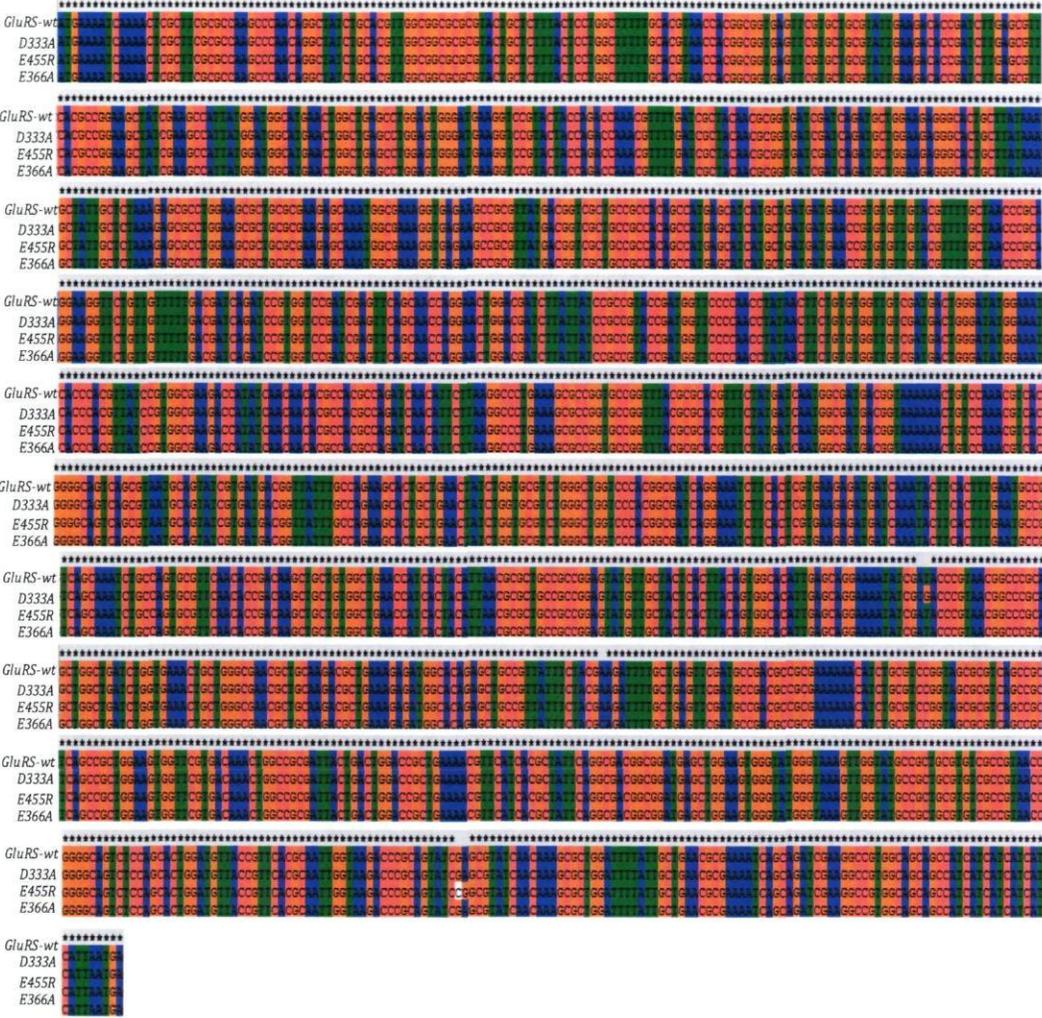
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., et Moras, D., (1990). "Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs." *Nature* **347**(6289): 203-206.
- Hountondji, C., Dessen, P. et Blanquet, S. (1986). "Sequence similarities among the family of aminoacyl-tRNA synthetases." *Biochimie* **68**(9): 1071-1078.
- Ibba, M. et Söll, D. (2000). "Aminoacyl-tRNA synthesis." *Annual Review of Biochemistry* **69**: 617-650
- Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F., et Pütz, J. (2009) "tRNA db 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes." *Nucleic Acids Research* **37**: D159-D162.
- Kern, D., et Lapointe, J. (1979). "The twenty aminoacyl-tRNA synthetases from *Escherichia coli*. General separation procedure, and comparison of the influence of pH and divalent cations on their catalytic activities." *Biochimie* **61**(11-12): 1257-1272.
- Lamour, V., Quevillon, S., Diriong, S., N'Guyen, V. C., Lipinski, M. et Mirande, M. (1994). "Evolution of the Glx-tRNA synthetase family: the Glutaminylyl enzyme as a case of horizontal gene transfer." *Proceeding of the National Academy of sciences of the United States of America* **91**(18):8670-8674
- Lapointe, J., et Delcuve, G. (1975), "Thermosensitive Mutants of *Escherichia coli* K-12 Altered in the Catalytic Subunit and in a Regulatory Factor of the Glutamyl-Transfer Ribonucleic Acid Synthetase" *Journal of Bacteriol.* **122**(2): 352-358
- Liu, J., Gagnon, Y., Gauthier, J., Furenlid, L., L'Heureux, P. J., Auger, M., Nureki, O., Yokoyama, S. et Lapointe, J. (1995). "The zinc-binding site of *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase is located in the acceptor-binding domain. Studies by extended x-ray absorption fine structure, molecular modeling, and site-directed mutagenesis." *Journal of Biological Chemistry* **270**(25): 15162-15169.
- Liu, J., Lin, S. X., Blochet, J. E., Pézolet, M. et Lapointe, J. (1993). "The glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* contains one atom of zinc essential for its native conformation and its catalytic activity." *Biochemistry* **32**(42): 11390-11396.
- Madore, E., Florentz, C., Giegé, R. et Lapointe, J. (1999). "Magnesium-dependent alternative foldings of active and inactive *Escherichia coli* tRNA^{Glu} revealed by chemical probing." *Nucleic Acids Research* **27**(17): 3583-3588.
- Madore, E., Florentz, C., Giegé, R., Sekine, S.-i., Yokoyama, S. Et Lapointe, J (1999). "Effect of modified nucleotides on *Escherichia coli* tRNA^{Glu} structure and on its aminoacylation by glutamyl-tRNA synthetase: Predominant and distinct roles of the mnm⁵ and S² modifications of U34". *European Journal of Biochemistry* **266**(3): 1128-1135.
- Normanly, J., Masson, J. M., Kleina, L. G., Abelson, J. et Miller, J. H. (1986). "Construction of two *Escherichia coli* amber suppressor genes: tRNA^{Phe}_{CUA} and tRNA^{Cys}_{CUA}." *Proceedings of the National Academy of science of the United States of America* **83**(17): 6548-52.

- Nureki, O., Vassilyev, D. G., Katayanagi, K., Shimizu, T., Sekine, S., Kigawa, T., Miyazawa, T., Yokoyama, S. et Morikawa, K. (1995). "Architectures of class-defining and specific domains of glutamyl-tRNA synthetase." *Science* **267**(5206): 1958-1965.
- Rogers, K.C. (1993). Discrimination between glutamate and glutamine tRNAs of *Escherichia coli*. Dissertation, Yale University, New Haven Connecticut, USA.
- Rogers, K.C. and Söll, D. (1995). "Divergence of glutamate and glutamine aminoacylation pathways: providing the evolutionary rationale for mischarging." *J. Mol. Evol.* **40**: 476-481.
- Russell, R. R. B. et Pittard, A. J. (1971). "Mutants of *Escherichia coli* unable to make protein at 42°C." *Journal of Bacteriology* **108**(2): 790-798.
- Sambrouk, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Laboratory.
- Schimmel, P. R. et Söll, D. (1979). "Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs." *Annual Review of Biochemistry* **48**: 601-648.
- Sekine, S.-i., Nureki, O., Sakamoto, K., Niimi, T., Tateno, M., Go, M., Kohno, T., Brisson, A., Lapointe, J., et Yokoyama, S. (1996). "Major identity determinants in the "augmented D helix" of tRNA^{Glu} from *Escherichia coli*." *J. Mol. Biol* **256**(4): 685-700.
- Sekine, S.-i., Nureki, O., Dubois, D. Y., Bernier, S., Chênevert, R., Lapointe, J., Vassilyev, D. G. et Yokoyama, S. (2003). "ATP binding by glutamyl-tRNA synthetase is switched to the productive mode by tRNA binding." *EMBO Journal* **22**(3): 676-688.
- Sekine, S.-i., Nureki, O., Shimada, A., Vassilyev, D. G. et Yokoyama, S. (2001). "Structural basis for anticodon recognition by discriminating glutamyl-tRNA synthetase." *Nature Structural Biology* **8**(3): 203-206.
- Sekine, S.-i., Shichiri, M., Bernier, S., Chênevert, R., Lapointe, J. et Yokoyama, S. (2006). "Structural bases of transfer RNA-dependent amino acid recognition and activation by glutamyl-tRNA synthetase." *Structure* **14**(12): 1791-1799.
- Siatecka, M., Rozek, M., Barciszewski, J. and Mirande, M. (1998). "Modular evolution of the Glx-tRNA synthetase family. Rooting of the evolutionary tree between the bacteria and archaea/eukarya branches." *Eur. J. Biochem.* **256**: 80-87.
- Söll, D. et Schimmel, P. R. (1974). "Aminoacyl-tRNA synthetase". *The enzymes*. Boyer, P. D., Academic Press. **10**: 489-538.
- Sugiura, I., Nureki, O., Ugaji-Yoshikawa, Y., Kuwabara, S., Shimada, A., Tateno, M., Lorber, B., Giegé, R., Moras, D., Yokoyama, S. et Konno, M. (2000). "The 2.0 Å crystal structure of *Thermus thermophilus* methionyl-tRNA synthetase reveals two RNA-binding modules." *Structure, with Folding and Design* **8**(2): 197-208.

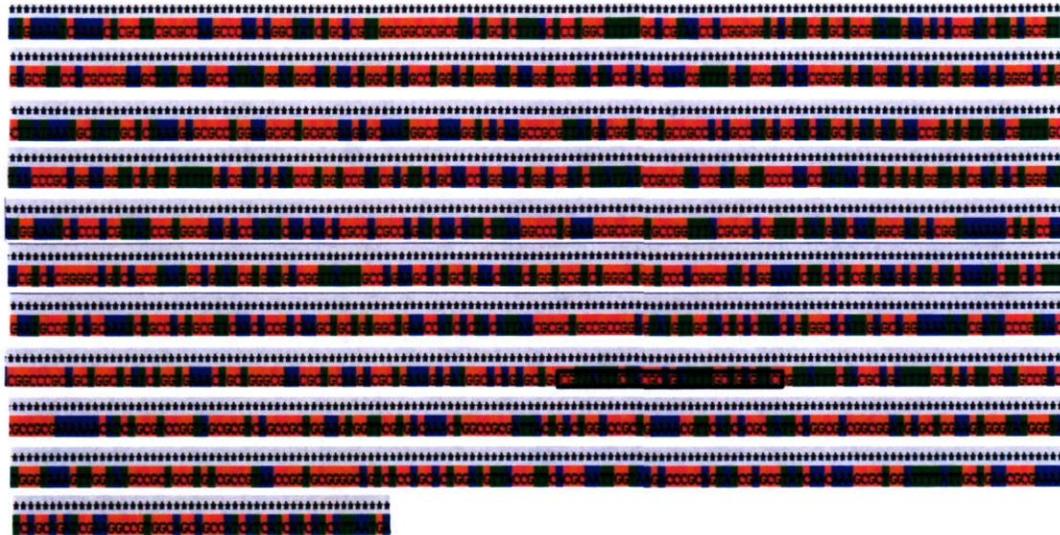
- Tremblay, T. L., (1984). "Etudes des forms natives et dénaturées des deux espèces de la tRNAGlutamate d'*Escherichia coli*." Mémoire de maîtrise, département de Biochimie et de microbiologie, Université Laval, Québec, Canada.
- Webster, T., Tsai, H., Kula, M., Mackie, G. A. Et schimmel, P. (1984). "Specific sequence homology and three-dimensional structure of an aminoacyl transfer RNA synthetase." *Science* **226**(4680): 1315-1317.
- Webster, T.A., Lathrop, R. H. et smith, T. F. (1987). "Prediction of a common structural domain in aminoacyl-tRNA synthetases through use of a new pattern-directed inference system." *Biochemistry* **26**(22): 6950-6957.
- Zhou, X.L., Du, D.H., Tan, M., Lei, H.Y., Ruan, L.L., Eriani, G. et Wang, E.D. (2011). "Role of tRNA amino acid-accepting end in aminoacylation and its quality control." *Nucleic Acids Research* **39**(20): 8857-8868.

Annexes

Annexe 1.a: Alignement des séquences des nucléotides de la GluRS pleine longueur sauvage et de ses variants D333A,, E455R et E366A



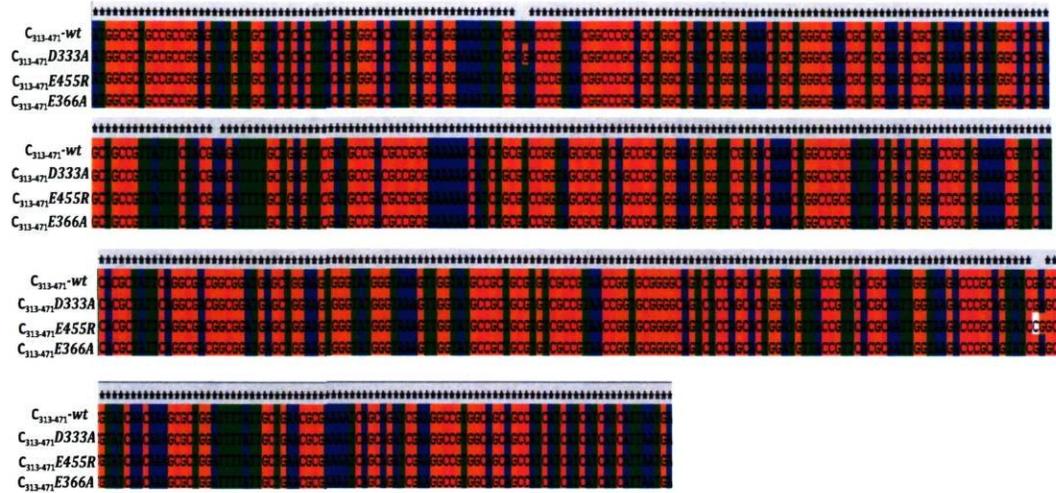
Annexe 1.b: Séquence des nucléotides du variant de la GluRS pleine longueur
E366A#dc



Ces séquences de nucléotides correspondent aux séquences de résidus d'acides aminés présentées dans la Fig. 12

* Le segment encadré: Insertion d'un segment de 30 nucléotides situé 9 nucléotides en amont de la charnière, et dont la séquence de 18 nucléotides est identique à celle de la charnière de la GluRS E366A

Annexe 2.a: Alignement des séquences des nucléotides de la GluRS tronquée sauvage et de ses variants D333A, E366A, E455R



Annexe 2. b: Séquence des nucléotides du variant de la GluRS tronquée E366A#dc



Ces séquences de nucléotides correspondent aux séquences de résidus d'acides aminés présentées dans la Fig. 29

* Le segment encadré: Insertion d'un segment de 30 nucléotides situé 9 nucléotides en amont de la charnière, et dont la séquence de 18 nucléotides est identique à celle de la charnière de la GluRS E366A

