

Aminoacyl-tRNA synthétases et tRNA : études fonctionnelles, structurales et génétiques d'une famille de molécules essentielles pour l'expression du code génétique.

Gilbert Eriani

► **To cite this version:**

Gilbert Eriani. Aminoacyl-tRNA synthétases et tRNA : études fonctionnelles, structurales et génétiques d'une famille de molécules essentielles pour l'expression du code génétique.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2001. tel-00266855

HAL Id: tel-00266855

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00266855>

Submitted on 25 Mar 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Faculté des Sciences de la Vie de
l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

Habilitation à Diriger des Recherches

Présentée par

Gilbert ERIANI

Chargé de Recherche au CNRS

Membres du jury :

M. H. Grosjean	Rapporteur externe
M. M. Mirande	Rapporteur externe
M. P. Plateau	Rapporteur externe
M. B. Ehresmann	Rapporteur interne
M. R. Giegé	Examineur
M. D. Moras	Examineur
M. J. Gangloff	Examineur

14 Décembre 2001

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Messieurs Henri Grosjean, Marc Mirande et Pierre Plateau qui ont accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs externes.

Je tiens à remercier tout particulièrement M. Bernard Ehresmann, pour m'avoir accueilli il y a dix ans dans l'UPR 9002 du CNRS. Ses encouragements et ses précieux conseils m'ont été fort utiles pour la préparation de cette soutenance. Je le remercie également d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur interne.

Mes remerciements s'adressent également à Messieurs Richard Giegé et Dino Moras qui me font l'honneur d'examiner ce travail.

Je ne saurais également trop exprimer mon admiration et ma reconnaissance pour Jean Gangloff qui a su éveiller et me faire partager sa passion pour la recherche... Il fut mon mentor de la première heure, mon directeur de thèse et mon directeur de recherche. Durant ces 15 années passées à ces côtés son influence a été déterminante. Sa très grande expérience, son sens critique et sa rigueur scientifique m'ont été fort précieux et se reflètent dans ce travail. Qu'il soit remercié aussi pour sa générosité, sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Je remercie chaleureusement mes collègues et amis du laboratoire, étudiants ou permanents, pour ces longues années de travail et d'amitié, qu'ils ont su rendre productives et agréables...

1. PARCOURS DANS LA RECHERCHE

Mon activité de recherche a été initiée à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire dans le laboratoire de Biochimie du Prof. G. Dirheimer sous la direction du Dr. Jean Gangloff. L'axe majeur de mon travail de thèse s'est articulé autour de la détermination de plusieurs structures primaires d'aminoacyl-tRNA synthétases, ce qui nous a permis d'établir la classification de ces enzymes en deux classes distinctes de dix enzymes (ceci en collaboration avec le groupe du Dr. D. Moras). Après la soutenance de ma thèse en 1990 et un séjour dans le laboratoire du Prof. Schulman (Albert Einstein College of Medicine, NY), j'ai intégré, en 1991, le CNRS au grade de CR1 dans le groupe du Dr. Jean Gangloff au sein de l'UPR 9002 (Structure des Macromolécules Biologiques et Mécanismes de Reconnaissance) dirigée par le Prof. B. Ehresmann.

Depuis cette date, et à l'aide d'approches biochimiques, cristallographiques et génétiques (en collaboration avec les équipes des Dr. D. Moras, R. Giegé et R. Jund), nous avons pu progresser dans la connaissance de deux systèmes modèles : le système aspartique pour la classe II des aminoacyl-tRNA synthétases et le système arginine pour la classe I de ces enzymes. Plusieurs doctorants ont participé et contribué de façon notable à ces travaux : Franck Martin (Thèse soutenue en 1995), Laurent Ador (Thèse soutenue en 1998), Renaud Geslain (Thèse en cours). Ces travaux ont fait l'objet d'environ trente articles parus dans des journaux scientifiques internationaux et ont donné lieu à une douzaine de communications orales lors de congrès (pour la plupart internationaux). Ces études ont été partiellement soutenues par plusieurs contrats de recherche : Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Haut-Rhin, 1996), Programme d'échange international de la DRI du CNRS, Union Européenne (4^{ème} Programme des Biotechnologies).

Actuellement, je poursuis mes travaux dans le Département « Mécanismes et Macromolécules de la Synthèse Protéique et Cristallogénèse » de l'UPR9002.

ERIANI Gilbert

Né le 08/08/62 à Forbach (57)

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire,

UPR 9002 Structure des Macromolécules Biologiques et Mécanismes de Reconnaissance

15 rue René Descartes

67084 STRASBOURG Cedex

Tél. # 03 88 41 70 42

G.Eriani@ibmc.u-strasbg.fr

<http://www-ibmc.u-strasbg.fr/upr9002/Equipes/gangloff/index.html>

Cursus dans la recherche

1990 Doctorat de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

1990 Séjour dans le laboratoire du Professeur L.H. Schulman (New York)

Oct.-Déc. 1990 : Séjour dans le laboratoire du Professeur L.H. Schulman (New York)

« Etude de la reconnaissance croisée AspRS d'*E. coli*-tRNA^{Asp} de levure ».

Mai 1991 : Séjour dans le laboratoire du Dr. M. Springer (IBPC, Paris). « Construction de délétants du gène codant pour l'AspRS d'*E. coli* »

1991 Intégration au CNRS, grade CR1, à l'IBMC de Strasbourg, UPR9002 Structure des Macromolécules Biologiques et Mécanismes de Reconnaissance.

Oct.-Nov. 98 : Séjour dans le laboratoire du Prof. Wang Enduo (Shanghai Institute of Biochemistry, Shanghai, Chine) sur le thème de l'arginyl-tRNA synthétase d'*E. coli*.

Sep.-Oct. 00 : Second Séjour au Shanghai Institute of Biochemistry (Shanghai, Chine), sur le thème de la leucyl-tRNA synthétase d'*Aquifex aeolicus*.

Encadrement d'étudiants de troisième cycle (Directeur de thèse : Jean Gangloff)

Franck MARTIN, DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire (1990), ayant soutenu sa thèse au laboratoire en 1995.

Véronique SHUÉ, DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire en 1991.

Laurent ADOR, DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire (1993), ayant soutenu sa thèse en 1998 au laboratoire.

Renaud GESLAIN, DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire (1999), actuellement doctorant en troisième année de thèse.

Présentations orales des travaux

Congrès de la SFBBM Villepinte 3 Décembre 1991

« Etude de l'aspartyl-tRNA synthétase de levure par mutagenèse dirigée »

Journées J.-P. Ebel. 21-22 Janvier 93. IBMC Strasbourg.

« Class II active site seen through aspartyl-tRNA synthetase »

15th International tRNA workshop. 30 Mai-04 Juin 93. Cap d'Agde.

« Analysis of *in vivo* produced heterodimers of yeast aspartyl-tRNA synthetase »

Workshop on « The Aminoacyl tRNA Synthetases and the Evolution of the Genetic Code »

University of California-Berkeley, 18 - 20 Juillet 1994. "The active site of class II aminoacyl-tRNA synthetases »

Procope Workshop Strasbourg-Bayreuth, Mont St Odile, 6 - 9 Décembre 1994

« Amber suppressors of *E. coli* tRNA^{Asp} and tRNA^{Asn} »

16th International tRNA Workshop (University of Wisconsin, Madison)

27 Mai - 1 Juin 1995 « Variants of yeast aspartyl-tRNA synthetase with relaxed tRNA specificity »

Groupe Thématique "SIFRARN" - (Ecole Polytechnique, Palaiseau) 4-6 décembre 1996

« Recherche de mutants létaux de l'aspartyl-tRNA synthétase de levure à l'aide d'un crible génétique »

17th International tRNA Workshop (Chiba, Japon) 10-15 Mai 1997

« Active site mapping of yeast aspartyl-tRNA synthetase by *in vivo* selection of enzyme mutations lethal for cell growth »

Conférence au Shanghai Institute of Biochemistry (Shanghai, Chine) 21 Mai 1997

« Yeast aspartyl-tRNA synthetase: an example of class II aminoacyl-tRNA synthetase »

Conférence au Shanghai Institute of Biochemistry (Shanghai, Chine) 11 Nov 1998

« Yeast ArgRS: recent results of a structure-function relationship study »

EU Meeting, « Design of RNA domains, substrates inhibitors of tRNA-recognising proteins »

March 23-25, 2000 (Munster, France) « A genetic method to reveal the functional domains in yeast arginyl-tRNA synthetase »

18th International tRNA Workshop, April 8-12, 2000 (Cambridge, UK) « *In vivo* selection

of lethal mutations reveals two functional domains in arginyl-tRNA synthetase »

Conférence au Shanghai Institute of Biochemistry (Shanghai, Chine) 11 Nov 2000 « *In vivo*

selection of lethal mutations reveals two functional domains in arginyl-tRNA synthetase »

Publications

1. Prévost, G., Eriani, G., Kern, D., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1989) Study of the arrangement of the functional domains along the yeast cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.* 180, 351-358.
2. Eriani, G., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1989) Isolation and characterization of the gene coding for *Escherichia coli* arginyl-tRNA synthetase. *Nucl. Acids Res.* 17, 5725-5736.
3. Eriani, G., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1990) Study of the structure-function relationship of arginyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: Isolation and characterization of the *argS* mutation MA 5002. *Nucl. Acids Res.* 18, 1475-1479.
4. Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. and Moras, D. (1990) Partition of all aminoacyl-tRNA synthetases into two classes by two mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347, 203-206.
5. Eriani, G., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1990) Aspartyl-tRNA synthetase from *E. coli*: cloning, sequencing, characterization of its gene and homologies with asparaginyl- and lysyl-tRNA synthetases. *Nucl. Acids Res.* 23, 7109-7118.
6. Mikol, V., Vincendon, P., Eriani, G., Hirsch, E. and Giegé, R. (1991) Diagnostic of protein crystallization by dynamic light scattering. *Journal of Crystal Growth* 110, 195-200.
7. Gasparini, S., Vincendon, P., Eriani, G., Gangloff, J., Boulanger, Y., Reinbolt, J. and Kern, D. (1991) Identification of structurally and functionally important histidine residues in cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 30, 4284-4289.
8. Eriani, G., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1991) Cysteinylyl-tRNA synthetase: determination of the last *E. coli* aminoacyl-tRNA synthetase primary structure. *Nucl. Acids Res.* 19, 265-269.
9. Eriani, G., Prévost, G., Kern, D., Vincendon, P., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1991) Cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*: study of its functional organisation by deletion analysis. *Eur. J. Biochem.* 200, 337-343.
10. Eiler, S., Boeglin, M., Martin, F., Eriani, G., Gangloff, J., Thierry, J.-C. and Moras, D. (1992) Crystallization of aspartyl-tRNA synthetase-tRNA^{Asp} complex from *E. coli* and first crystallographic results. *J. Mol. Biol.* 224, 1171-1173.
11. Roth, A., Eriani, G., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1993) Kinetic properties of pure overproduced *Bacillus subtilis* phenylalanyl-tRNA synthetase do not favour its *in vivo* inhibition by ochratoxin A. *FEBS Letters* 326, 87-91.
12. Oguiza, J. A., Malumbres, M., Eriani, G., Pisabarro, A., Mateos, L. M., Martin, F. and Martin, J. F. (1993) A gene encoding arginyl-tRNA synthetase is located in the upstream region of the *lysA* gene in *Brevibacterium lactofermentum*: regulation of *argS-lysA* cluster expression by arginine. *J. Bacteriol.* 175, 7356-7362.
13. Eriani, G., Cavarelli, J., Martin, F., Dirheimer, G., Moras, D. and Gangloff, J. (1993) Role of dimerization in yeast aspartyl-tRNA synthetase and importance of the class II invariant proline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10816-10820.
14. Martin, F., Eriani, G., Eiler, S., Moras, D., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1993) Overproduction and purification of native and queuine-lacking *Escherichia coli* tRNA^{Asp}. Role of the wobble base in tRNA^{Asp} acylation. *J. Mol. Biol.* 234, 965-974.
15. Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M., Boeglin, M., Mitschler, A., Martin, F., Gangloff, J., Thierry, J.-C. and Moras, D. (1994) The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *EMBO J.* 13, 327-337.

16. Martin, F., Eriani, G., Reinbolt, J., Dirheimer, G. and Gangloff, J. (1995) Genetic selection for active *E. coli* amber tRNA^{Asn} exclusively led to glutamine inserting suppressors. *Nucl. Acids Res.* 23, 779-784.
17. Eriani, G., Cavarelli, J., Martin, F., Ador, L., Rees, B., Thierry, J.C., Gangloff, J. and Moras, D. (1995) The class II aminoacyl-tRNA synthetases and their active site: evolutionary conservation of an ATP binding site. *J. Mol. Evol.* 40, 499-508.
18. Wang, E.-D., Huang, Y.-W., Wang, Y.-L., Eriani, G. and Gangloff, J. (1995) The role of Lys378 and Lys381 on the enzyme activity of *E. coli* arginyl-tRNA synthetase. *Acta Biochem. Biophys. Sinica* 27, 37-43.
19. Wang, E.-D., Gu, W.-L., Wang, Y.-L., Eriani, G. and Gangloff, J. (1995) Lys306 of *E. coli* arginyl-tRNA synthetase is necessary for the activity of this enzyme. *Acta Biochem. Biophys. Sinica* 27, 123-128.
20. Boeglin, B., Dock-Brégeon, A.-C., Eriani, G., Gangloff, J., Ruff, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Thierry, J.-C. and Moras, D. (1996) Crystallization of *Escherichia coli* aspartyl-tRNA synthetase in its free state and in a complex with yeast tRNA^{Asp}. *Acta Cryst. D52*, 211-214.
21. Martin, F., Reinbolt, J., Dirheimer, G., Gangloff, J. and Eriani, G. (1996) Selection of tRNA^{Asp} amber suppressor mutants having alanine, arginine, glutamine and lysine identity. *RNA* 2, 919-927.
22. Giegé, R., Florentz, C., Kern, D., Gangloff, J. Eriani, G. and Moras, D. (1996) Aspartate identity of transfer RNAs. *Biochimie* 78, 605-623.
23. Martin, F., Sharples, G.J., Lloyd, R.G., Eiler, S., Moras, D., Gangloff, J. and Eriani G. (1997) Characterisation of a thermosensitive *Escherichia coli* aspartyl-tRNA synthetase mutant. *Journal of Bacteriology* 179, 3691-3696.
24. Sissler, M., Eriani, G., Martin, F., Giegé, R. and Florentz C. (1997) Mirror-image alternate interaction patterns of a same tRNA with either class I arginyl-tRNA synthetase or class II aspartyl-tRNA synthetase. *Nucl. Acids Res.* 24, 4899-4906.
25. Cavarelli, J., Delagoutte, B., Eriani, G., Gangloff, J. and Moras, D. (1998) L-arginine recognition by yeast arginyl-tRNA synthetase. *EMBO Journal* 17, 5438-5448.
27. Ador, L., Camasses, A., Erbs, P., Cavarelli, J., Moras, D., Gangloff, J. and Eriani, G. (1999) Active site mapping of yeast aspartyl-tRNA synthetase by *in vivo* selection of enzyme mutations lethal for cell growth. *J. Mol. Biol.* 288, 231-242.
28. Eriani, G. and Gangloff, J. (1999) Yeast aspartyl-tRNA synthetase residues interacting with tRNA^{Asp} identity bases connectively contribute to tRNA^{Asp} binding in the ground- and transition state complex and discriminate against non cognate tRNAs. *J. Mol. Biol.* 291, 761-773.
29. Wu J.-F., Wang, E.-D., Wang, Y.-L., Eriani, G. and Gangloff, J. (1999) Gene cloning, overproduction and purification of *Escherichia coli* tRNA^{Arg2}. *Acta Biochem. Biophys. Sinica* 31, 226-232.
30. Liu, W., Huang, Y.-W., Eriani, G., Gangloff, J., Wang, E.-D. and Wang, Y.-L. (1999) A single base substitution in the variable pocket of yeast tRNA^{Arg} eliminates species-specific aminoacylation. *Biochem. Bioph. Acta* 1473, 356-362.
31. Geslain, R., Martin, F., Delagoutte, B., Cavarelli, J., Gangloff, J. and Eriani, G. (2000) *In vivo* selection of lethal mutations reveals two functional domains in arginyl-tRNA synthetase. *RNA* 6, 434-448.
32. Giegé, R. and Eriani, G. (2001) tRNA recognition by synthetases. *Encyclopedia of Life Sciences*
33. Moulinier, L., Eiler, S., Eriani, G., Gangloff, J., Thierry, J. C., Gabriel, K., McClain, W. H. and Moras, D. (2001) The structure of an AspRS-tRNA^(Asp) complex reveals a tRNA-dependent control mechanism. *EMBO Journal* 20, 5290-5301.

2. SYNTHÈSE DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

2.1. Introduction – Les aminoacyl-tRNA synthétases, dogmes et découvertes récentes

2.1.1. À propos d'évolution

Les aminoacyl-tRNA synthétases (ARS) sont des enzymes qui fascinent les biologistes depuis les années 60. En effet, ces enzymes font le lien entre le langage des protéines et le langage des acides nucléiques en aminoacylant de façon très précise les tRNAs, ces molécules assimilées à des « adaptateurs » par F. Crick en 1958. Celui-ci avait postulé que la traduction précise des protéines nécessitait des tRNAs correctement aminoacylés, suggérant que chaque acide aminé devait être chargé par une ARS spécifique. Par conséquent, l'existence de 20 ARS était prédite, ainsi que les problèmes liés à la reconnaissance des acides aminés aux propriétés physico-chimiques voisines. Ceci a naturellement engendré de très nombreuses études des relations structure-fonction sur ces enzymes, afin de comprendre à la fois les mécanismes de reconnaissance des substrats (acides aminés, ATP et tRNAs) et la catalyse d'aminoacylation. Un autre aspect de l'intérêt suscité par ces enzymes a concerné leur possible co-évolution avec le code génétique. En effet, on pouvait supposer que l'apparition des acides aminés, des tRNAs et des ARS allait laisser des traces qui permettraient de suivre et de comprendre l'attribution des différentes cases du code génétique. Mais à l'heure actuelle, il est plutôt admis que les ARS n'ont pas joué un rôle significatif dans la mise en place du code génétique (Nagel & Doolittle, 1995), par contre elles sont un indicateur de la dynamique de l'évolution des génomes. En effet, depuis la fin des années 90, les programmes de séquençage des organismes fournissent un nombre sans cesse grandissant de séquences d'ARS dont la comparaison laisse apparaître une très grande dynamique dans leur évolution (Woese et al., 2000). Ainsi, d'un point de vue phylogénétique, et au contraire des autres protéines et acides nucléiques de la machinerie traductionnelle, un grand nombre d'ARS violent les règles canoniques de distribution dans les différents phylums procaryotiques, eucaryotiques et archaebactériens. Cet aspect disparate et atypique que peuvent présenter les ARS dans leur schéma évolutif peut s'expliquer par la nature même de ces enzymes. Ce sont des enzymes modulaires qui fonctionnent indépendamment des autres protéines de l'appareil de traduction et du reste de la cellule (exception faite des contacts avec leurs tRNAs). De plus, leur universalité ainsi que leur capacité à fonctionner dans un large spectre d'environnements cellulaires, sans désavantage pour l'hôte, leur a permis d'être transférées horizontalement au travers des différents phylums. Ainsi, les nombreux transferts horizontaux de gènes d'ARS ont donné naissance à des arbres phylogénétiques souvent complexes ; à l'heure actuelle, seul un petit nombre d'ARS (Asp-, Glu-, Leu- et TrpRS) obéissent au modèle standard d'évolution avec une radiation des bactéries précédant la séparation des archaebactéries et eucaryotes (Doolittle & Handy, 1998; Wolf et al., 1999; Woese et al., 2000). Dans la plupart des cas, le déplacement horizontal des ARS s'est fait à partir des eucaryotes vers les procaryotes (bactéries symbiotiques ou parasites) ou plus rarement au départ des archaebactéries. Quelques exemples ont également été observés dans le sens des procaryotes vers les eucaryotes, mais avec une origine mitochondriale pour le gène transféré (Wolf et al., 1999).

2.1.2. Les aminoacyl-tRNA synthétases, les dogmes, les exceptions

2.1.2.1. *Les dogmes*

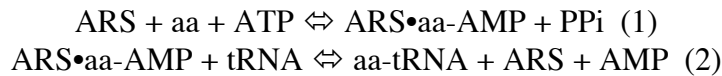


Figure 1

La réaction d'aminocyclation des tRNAs débute par l'activation de l'acide aminé par l'ATP (1), suivie de l'étape de transfert ou charge sur le tRNA (2). Les deux étapes nécessitent des ions Mg^{2+} .

Les ARS forment une famille d'enzymes ubiquitaires qui catalysent la réaction d'aminocyclation des tRNAs (ou charge des tRNAs). Cette réaction, universelle dans le monde vivant, se déroule en deux étapes (figure 1). Au cours de la première étape, l'acide aminé est activé par l'ATP en aminoacyl-adénylate, avec formation de PPi (1). Puis, l'acide aminé activé est transféré sur l'extrémité 3' acceptrice du tRNA lors de l'étape de charge qui s'accompagne d'une libération d'AMP (2). Une partie de l'énergie de la liaison phosphoanhydride de l'ATP se trouve ainsi transférée dans la liaison ester, qui sera rompue dans le cœur catalytique du ribosome lors de la formation de la liaison peptidique.

Pendant longtemps, l'idée d'une cellule contenant 20 ARS s'était imposée, une pour chaque acide aminé, capable de reconnaître parfois plusieurs tRNAs isoaccepteurs différents. Pour assurer la reconnaissance spécifique de substrats aux propriétés physico-chimiques très similaires, ces enzymes ont évolué au cours du temps en donnant naissance à une famille d'enzymes différant grandement en taille et structure oligomérique. Cependant, le séquençage des gènes d'ARS, a permis d'identifier progressivement des homologues entre ARS jusqu'à l'obtention d'une classification en deux classes distinctes de dix enzymes, contenant chacune des motifs consensus propres (Eriani et al., 1990)(Tableau 1). La classe I des ARS contient les Met-, Val-, Leu-, Ile-, Cys-, Arg-, Glu-, Gln, Tyr-, et TrpRS, la classe II les Asp-, Asn-, Lys-, Ser-, Thr-, Pro-, Gly-, His-, Ala-, et PheRS. Par ailleurs, cette classification prend en compte des données fonctionnelles connues depuis le milieu des années 70 : les enzymes de la classe I aminoacylent les tRNAs sur le 2'OH de l'adénosine terminale, alors que les ARS de la classe II préfèrent le 3'OH (Fraser & Rich, 1975; Sprinzl & Cramer, 1975). De plus, nous savons désormais que cette séparation en deux familles est liée à la présence de deux sites catalytiques distincts : les enzymes de la classe I possèdent un site actif bâti selon le modèle du « Rossmann fold » (alternance de brins β parallèles et d'hélices α), alors que les enzymes de classe II possèdent un feuillet à six brins β antiparallèles rarement retrouvé dans d'autres protéines. À cela se rajoutent des modes de fixation de l'ATP tout à fait distincts (conformation linéaire ou coudée pour les enzymes de classe I et de classe II respectivement), et une approche symétrique des tRNAs sur les enzymes (par la face du dihydroU pour les enzymes de classe I et par la face du bras variable pour les enzymes de classe II).

Greffés en N- et C-terminal ou dans des boucles des cœurs catalytiques, un nombre variable de domaines additionnels (ou modules) confèrent les propriétés de reconnaissance spécifique à chaque ARS. Ils peuvent également participer à la dimérisation ou à la correction de l'aminocyclation erronée (ou « proofreading »)(Nureki et al., 1998; Dock-Bregeon et al., 2000).

Classe I	Classe II
HIGH et KMSKS Aminoacylation du 2' OH Rossmann fold ATP en conformation linéaire Approche du tRNA par le coté de la boucle du dihydroU	Trois motifs consensus Aminoacylation du 3' OH Feuillet à 7 brins antiparallèles ATP en conformation coudée Approche du tRNA par la face du bras variable
ArgRS α MetRS $\alpha, \alpha 2$ IleRS α ValRS α LeuRS α CysRS $\alpha, \alpha 2$	SerRS $\alpha 2$ ThrRS $\alpha 2$ ProRS $\alpha 2$ HisRS $\alpha 2$ GlyRS $\alpha 2, \alpha 2\beta 2$ AlaRS $\alpha, \alpha 2, \alpha 4$
TrpRS $\alpha 2$ TyrRS $\alpha 2$	AspRS $\alpha 2$ AsnRS $\alpha 2$ LysRS $\alpha 2$
GluRS α GlnRS α	PheRS $\alpha, \alpha 2\beta 2$
« Classe I LysRS » α	

Tableau 1

Classification des aminoacyl-tRNA synthétases en deux classes distinctes.

Ainsi, la variabilité des modules greffés sur les cœurs catalytiques est responsable de la grande diversité de taille retrouvée chez les ARS. Cependant, certains de ces modules sont partagés par des enzymes de spécificités différentes, générant des sous-groupes d'ARS particulièrement homologues (Cusack et al., 1991). Certaines ARS comme la GlyRS, ont évolué sous deux formes distinctes ($\alpha 2$ ou $\alpha 2\beta 2$), la forme dimérique présente une structure semblable à celle de l'HisRS du sous-groupe de la SerRS, alors que la forme tétramérique semble très différente (Mazauric et al., 1998). L'AlaRS est rattachée au sous-groupe de la SerRS du fait d'une homologie significative détectée dans son domaine C-terminal avec le domaine N-terminal de la ThrRS (Sankaranarayanan et al., 1999). Cette classification en sous-groupes reste cependant sujette à une perpétuelle révision du fait des nouvelles données de séquence qui viennent sans cesse souligner la grande diversité des ARS. Cette diversité est en grande partie due à la nature modulaire des ARS qui permet un échange et une évolution importante de ces protéines (Delarue & Moras, 1993).

Actuellement, un grand nombre de domaines additionnels ont été identifiés et décrits dans les 18 structures cristallographiques d'ARS connues. Il s'agit souvent des domaines de liaison à l'anticodon du tRNA, qui sont parfois partagés par plusieurs enzymes. Mais, fait plus surprenant, certains de ces domaines sont parfois retrouvés dans les deux classes à la fois. Citons le domaine carboxy-terminal constitué d'hélices α qui est trouvé dans les Arg-, Met-, Ile-, Leu-, ValRS et dans une ARS de classe II : la GlyRS bactérienne (sous-unité β) (Wolf et al., 1999). Le domaine désigné sous l'appellation « OB fold » des Asp-, Asn-, LysRS, fixe l'anticodon des tRNAs, mais cette structure est également utilisée à d'autres fins, dans le domaine EMAP de certaines MetRS bactériennes, TyrRS humaine ou sous-unité β de la PheRS. Enfin, un domaine α - β est retrouvé dans les ARS de la sous-classe de la SerRS (exception faite cependant de la SerRS). D'autres éléments additionnels ont été rajoutés chez

les eucaryotes supérieurs, ainsi les GluPro-, Gly-, Trp-, His- et MetRS partageraient une structure en hélice-boucle-hélice impliquée dans l'interaction avec les acides nucléiques et l'assemblage des complexes multi-enzymatique.

2.1.2.2. Les exceptions : source de diversité

Hormis la variabilité observée dans la répartition des ARS dans les sous-groupes d'ARS, le dogme des deux classes de dix enzymes est resté intact durant sept ans, avant que n'apparaissent les premières exceptions et déviations, concernant le nombre et la répartition des ARS au sein des classes. Bien que quelques exceptions à la règle « 20 ARS » aient été trouvées chez les bactéries, archaebactéries et organelles d'eucaryotes, celles-ci ne semblaient être que des anomalies évolutives. Cependant, des découvertes récentes liées au séquençage des génomes de bactéries et d'archaebactéries ont contredit ces conclusions. Il est actuellement admis que de nombreux organismes ne possèdent pas 20 ARS et que le nombre réduit d'ARS est complété par une variété de nouveaux enzymes et voies métaboliques destinés à fournir les aminoacyl-tRNAs requis dans la synthèse protéique (Tumbula et al., 1999).

L'exception la plus répandue est liée aux voies métaboliques de transamidation. Pour synthétiser les Gln-tRNA^{Gln} et Asn-tRNA^{Asn} certains organismes n'utilisent pas la voie directe d'aminocyclation (figure 1) mais préfèrent une voie indirecte dite de transamidation-tRNA dépendante (Ibba et al., 2000). Ainsi les GlnRS ne sont retrouvées que chez les eucaryotes (organelles exceptées) où elles seraient apparues tardivement par duplication puis divergence d'un gène de GluRS eucaryotique (Lamour et al., 1994; Siatecka et al., 1998). On retrouve les AsnRS chez les eucaryotes et de nombreuses bactéries mais rarement chez les archaebactéries, leur plus grande distribution, comparée à celle de la GlnRS, suppose une apparition antérieure au cours de l'évolution (Woese et al., 2000). Les voies indirectes de transamidation-tRNA dépendante se déroulent en deux étapes (figure 2). Elles débutent par la misacylation des tRNAs en Glu-tRNA^{Gln} et Asp-tRNA^{Asn} par les GluRS et AspRS respectivement. Les tRNAs misacylés sont ensuite pris en charge spécifiquement par des amidotransférases (GluAdT et AspAdT respectivement) dont le rôle est de catalyser la formation du groupe amide (Ibba et al., 2000). Ces voies indirectes soulèvent d'intéressantes questions relatives aux mécanismes de misacylation par les GluRS et AspRS, et au devenir des produits misacylés dans la cellule (qui ne sont pas pris en charge par EF-Tu)(Ibba et al., 1997b).

GluRS catalyse :



GluAdT catalyse :



Figure 2

Voie métabolique tRNA-dépendante de formation du Gln-tRNA^{Gln}. L'amido transférase (GluAdT) peut utiliser de la Gln, ou des ions ammonium indifféremment. La voie métabolique tRNA-dépendante de formation de l'Asn-tRNA^{Asn} utilise le même type de réaction mais avec de l'Asp, de l'Asn et un tRNA^{Asn}.

Le système de cystéinylation chez les archaebactéries reste à ce jour l'objet d'études contradictoires. Absente des premiers génomes d'archaebactéries séquencés, l'existence d'une voie directe d'aminocyclation du tRNA^{Cys} a été mise en doute au profit d'une voie indirecte faisant appel à une SerRS mischargeant le tRNA^{Cys} (à l'instar du système de séléno-cystéinylation (Bock et al., 1991)). Cependant, l'absence d'activité d'aminocyclation du

tRNA^{Cys} par la SerRS n'a pas permis de valider cette hypothèse (Kim et al., 1998). Une activité CysRS a été isolée de *Methanococcus jannashii*, mais à la surprise générale, l'enzyme isolée présentait également une séquence et une activité de ProRS canonique (Stathopoulos et al., 2000). Chez ce type d'organisme, une enzyme de petite taille (53kDa) serait donc responsable des deux fonctions d'aminocyclation, avec des sites d'activation partiellement chevauchants, et un besoin de tRNA^{Cys} pour la catalyse d'activation de la cystéine (dont l'efficacité catalytique reste faible)(Stathopoulos et al., 2000). Par ces aspects, cette enzyme contraste avec la GluProRS des métazoaires qui est une enzyme bifonctionnelle résultant de la fusion des deux chaînes peptidiques (Cerini et al., 1991). Des études plus récentes ont cependant pu montrer l'existence d'une CysRS propre chez ces archaebactéries, de structure primaire peu homologue aux CysRS canoniques, mais dont l'efficacité catalytique est supérieure à l'activité de la ProCysRS (Fabrega et al., 2001). Ces archaebactéries seraient donc bien pourvues de CysRS, mais dont la séquence aurait suffisamment divergé pour devenir indétectable par comparaison de séquence ordinaire.

La LysRS constitue un autre exemple de déviation aux règles canoniques de présence et distribution des synthétases au sein des deux classes. L'absence de LysRS dans *M. jannashii* a été très problématique pour la raison qu'aucune voie indirecte, telle la transamination-tRNA dépendante, n'était facilement envisageable pour transformer un acide aminé donné en lysine, en particulier lorsqu'il est fixé sur l'extrémité 3' acceptrice d'un tRNA. Une activité LysRS a finalement été purifiée d'extraits de *M. maripaludis* (Ibba et al., 1997a) conduisant à l'identification du gène codant pour cette protéine. Celle-ci ne présente aucune homologie avec les LysRS connues (de classe II) mais présente les motifs consensus des synthétases de classe I (HIGH et KMSKS). À l'instar des Arg-, Gln- et GluRS (dont elle se rapproche le plus, d'un point de vue séquence primaire), la LysRS de classe II nécessite le tRNA^{Lys} pour catalyser l'activation de la lysine. Cette LysRS de classe I est retrouvée chez la plupart des archaebactéries et dans quelques bactéries (*Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia prowazekii*, *Treponema pallidum*), où elles seraient apparues par transfert horizontal de gène.

Enfin, et contrairement aux exceptions précédentes, un grand nombre d'organismes présentent plus de vingt gènes d'ARS. Il s'agit souvent de duplications d'un, voire de plusieurs gènes d'ARS. Peu d'exemples ont fait l'objet d'études approfondies, cependant pour la LysRS d'*E. coli* et les Thr- et TyrRS de *B. subtilis* il a été montré que l'une des deux formes n'est exprimée qu'en conditions de stress ou de carence en acide aminé (Putzer et al., 1992; Brevet et al., 1995). Le cas des IleRS de *Staphylococcus aureus* est particulier puisqu'une des copies d'IleRS est plasmidique et confère la résistance à la mupirocine, un analogue de l'Ile. Elle aurait été acquise par transfert horizontal à partir d'une bactérie résistante (Woese et al., 2000). Un certain nombre de ces gènes dupliqués pourraient être inactifs et correspondraient à un stade intermédiaire dans le phénomène d'échange de gènes par transfert horizontal (Woese et al., 2000).

2.1.3. Des traces d'aminocyl-tRNA synthétases dans d'autres protéines

Il est désormais couramment admis que les ARS primordiales étaient composées des seuls domaines catalytiques de classe I ou classe II (Schimmel et al., 1993). En vue d'améliorer leur spécificité ou leur efficacité catalytique des domaines supplémentaires, parfois empruntés à d'autres protéines, ont été progressivement ajoutés au cœur catalytique. Il s'en est suivi la diversification de taille et de structure oligomérique que nous pouvons actuellement observer. Ainsi, nombre de ces modules « accessoires » ont été retrouvés dans d'autres protéines (Wolf et al., 1999). Plus rarement observées sont les protéines apparentées

au cœur catalytique des ARS (Weiner, 1999; Schimmel & Ribas De Pouplana, 2000). Ces protéines, qualifiées de « paralogues », ont parfois conservé un rôle en relation avec la fonction d'ARS. Ainsi, l'asparagine synthétase (*AsnA*) convertit l'acide aspartique en asparagine par une réaction utilisant un intermédiaire adénylate (aspartyl-AMP). La structure de cet enzyme est très proche de celle du site catalytique des AspRS et AsnRS (Nakatsu et al., 1998). Une autre protéine apparentée à la SerRS, le répresseur de biotine BirA, synthétise un biotinyln-adenylate qui joue le rôle d'effecteur allostérique (Artymiuk et al., 1994). Chez *Lactococcus lactis*, une protéine apparentée au cœur catalytique de l'HisRS (*HisZ*) catalyse la première étape de la chaîne de biosynthèse de l'histidine (ATP phosphoribosyl-transférase)(Sissler et al., 1999) ; contrairement aux précédentes, cette protéine ne catalyserait pas la formation d'adénylate, mais pourrait être régulée par la fixation d'histidine. Chez les eucaryotes, la protéine kinase GCN2 est constituée d'un domaine Ser/Thr kinase fusionné à un domaine « HisRS-like » (Wek et al., 1989). Dans ce cas, l'activité kinase est régulée par la fixation du tRNA^{His} non chargé sur le domaine « HisRS-like ». Celle-ci induit une phosphorylation du facteur eIF2 α qui entraîne une augmentation de l'expression du facteur GCN4 lui-même impliqué dans le contrôle général des acides aminés (Wek et al., 1989). On le voit, ces exemples de « synthétases-like » impliquent la fixation d'acide aminé, d'ATP ou de tRNA et peuvent avoir des fonctions régulatrices ; à ce jour elles n'impliquent que des ARS de classe II. D'autres « synthétases-like » ont été identifiées dans les banques de données mais leurs fonctions restent à déterminer (Schimmel & Ribas De Pouplana, 2000; Woese et al., 2000).

2.1.4. D'autres fonctions pour les aminoacyl-tRNA synthétases

En dehors de leur rôle canonique dans l'aminocyclation des tRNAs, les ARS participent à d'autres fonctions cellulaires (pour une revue : (Martinis et al., 1999)). Elles sont impliquées dans certains mécanismes de régulation (ThrRS, AlaRS), dans la fixation à l'ADN (PheRS), dans le splicing mitochondrial (TyrRS, LeuRS), ou dans l'apoptose (TyrRS humaine). Certaines ARS sont capables de synthétiser les alarmones Ap4A et Ap3A qui stimulent la synthèse d'enzymes de réparation en réaction à un stress cellulaire (Plateau & Blanquet, 1994). Les ARS peuvent également aminoacyler des tRNAs non canoniques comme les tRNA-like des virus de plante ou le tmRNA (par l'AlaRS).

2.1.5. La complexité des ARS eucaryotiques

Les eucaryotes supérieurs contiennent un complexe multi-enzymatique constitué de l'assemblage de 9 ARS et de 3 protéines auxiliaires. Des progrès considérables ont été accomplis dans la connaissance du complexe tant au niveau de l'assemblage, que de l'agencement spatial et du rôle des protéines auxiliaires (Quevillon & Mirande, 1996; Agou & Mirande, 1997; Norcum & Warrington, 1998; Norcum & Dignam, 1999; Quevillon et al., 1999). L'une d'entre elles, la protéine p43, est aussi le précurseur du facteur EMAP II activant les monocytes endothéliaux, une cytokine inflammatoire impliquée dans l'apoptose (Quevillon et al., 1997). Des expériences d'immunodétection ont permis de détecter 2 sites de fixation de p43 dont l'un au centre de la particule. Cette localisation permettrait une rapide dégradation du complexe et un arrêt de la traduction en cas de signal d'apoptose (Norcum & Warrington, 2000). Le domaine N-terminal de p43 (aussi appelé précurseur pro-EMAP II) interagit avec l'extension N-terminale de l'ArgRS humaine. Le domaine C-terminal interagit avec différents tRNAs. L'interaction avec pro-EMAP II stimulerait l'activité de l'ArgRS en lui délivrant le tRNA fixé à son extrémité (Park et al., 1999). En dépit de son activité cytokine, EMAP II n'est homologue à aucune autre cytokine connue, mais ressemble aux

régions C-terminales de certaines MetRS, PheRS (Simos et al., 1996; Quevillon et al., 1997), à la TyrRS humaine (Kleeman et al., 1997), à la protéine Arc1p de levure qui stimule l'activité de certaines synthétases auxquelles elle est associée (Simos et al., 1996) et à la protéine Trbp111 (Morales et al., 1999). Le produit de protéolyse de pro-EMAP II (EMAP II) accélère l'apoptose, suggérant un rôle double, à la fois dans la viabilité cellulaire et sa mort. Un phénomène semblable a été observé avec la TyrRS humaine qui est clivée en 2 cytokines distinctes (Wakasugi & Schimmel, 1999). Récemment, la structure de EMAP II humaine a été résolue à 1,8Å (Kim et al., 2000b), révélant un domaine de fixation au tRNA très voisin du domaine en tonneau β retrouvé chez les Asp-, Asn-, Lys-, et PheRS. Il s'en distinguerait cependant dans sa fonction de reconnaissance des tRNAs très élargie et non spécifique. La protéine apparentée Trbp111 présente le même type de repliement en tonneau (Swairjo et al., 2000). Il a été suggéré que Trbp111 interagirait sous forme de dimère, avec l'angle externe de la structure en L du tRNA. Ainsi fixée, elle pourrait stabiliser la structure tertiaire du tRNA.

La protéine auxiliaire p38 formerait un dimère dans le complexe multi-enzymatique et interagirait avec bon nombre des synthétases : Arg-, Gln-, Asp-, Lys-, GluProRS ainsi que p43 (Quevillon et al., 1999). Elle pourrait avoir un rôle structurant essentiel au sein du complexe. La troisième protéine auxiliaire du complexe (p18) présente des homologies avec les sous-unités β et γ du facteur d'élongation EF-1H (également homologue à la GluProRS humaine (Fett & Knippers, 1991), à l'extension N-terminale de la SerRS humaine (Miseta et al., 1991), de la ValRS (Quevillon & Mirande, 1996) et à l'une des isoformes de la CysRS (Kim et al., 2000a)), elle pourrait servir de point d'ancrage au facteur d'élongation et en quelque sorte d'interface aux différents composants de la machinerie traductionnelle. Ces interactions sont cependant trop faibles pour permettre l'isolement du facteur d'élongation avec le complexe multi-enzymatique (à l'opposé du complexe stable qu'il forme avec la ValRS (Bec et al., 1989; Negrutskii et al., 1999)), elles supportent néanmoins l'hypothèse du « channeling » du tRNA, de son lieu d'aminoacylation (dans le complexe) vers son lieu d'utilisation (le ribosome) via le facteur d'élongation (Negrutskii & Deutscher, 1991; Stapulionis & Deutscher, 1995).

Un autre facteur impliqué dans l'assemblage du complexe a été identifié récemment. Il s'agit de la protéine chaperone Hsp90 qui interviendrait de façon dynamique dans l'assemblage du complexe multi-enzymatique (Kang et al., 2000). Celle-ci se fixe préférentiellement au niveau des tandems répétés de l'enzyme bifonctionnelle GluProRS où elle favoriserait la formation du sous-complexe GluProRS-IleRS (Rho et al., 1996). Elle interagit également avec les Met-, Gln-, AspRS et composant p38 (Kang et al., 2000). Son inactivation interfère avec l'incorporation, dans le complexe, des synthétases néosynthétisées.

À l'intérieur même des séquences de certaines ARS eucaryotiques un certain nombre de motifs répétés ont été identifiés. Ils sont trouvés au nombre de trois dans le peptide de séparation de la GluProRS et sous forme de copie unique dans les Gly-, Trp-, His- et MetRS. Leur rôle dans l'interaction de la GluProRS avec l'IleRS a été démontré ; ils peuvent également interagir avec d'autres synthétases comme l'ArgRS, et des acides nucléiques très variés, dont des tRNAs (Rho et al., 1996; Rho et al., 1998; Cahuzac et al., 2000). Ces motifs répétés se présentent sous la forme d'une structure hélice-coude-hélice présentant une polarité de charges positives (Cahuzac et al., 2000). Ils pourraient être un des éléments du processus de « channelling » qui vise à transférer directement les aminoacyl-tRNAs au facteur d'élongation sans dilution dans le fluide cellulaire, ils joueraient alors le rôle de gradient de charges positives durant le transfert (Cahuzac et al., 2000).

2.1.6. Les ARS eucaryotiques et le transport nucléo-cytoplasmique

La présence d'ARS dans le noyau a été suggérée à la suite de des études démontrant l'importance de l'aminacylation des tRNAs dans l'export des tRNAs du noyau vers le cytoplasme (Lund & Dahlberg, 1998; Sarkar et al., 1999). Il a été montré que l'aminacylation des tRNAs, qui ne s'effectue que sur des tRNAs parfaitement maturés, est une étape de contrôle qui précède le transport nucléo-cytoplasmique. La preuve de l'existence de synthétases dans le noyau a été apportée récemment avec l'isolement, à partir de noyaux de cultures cellulaires, des activités enzymatiques correspondant à 13 synthétases (Nathanson & Deutscher, 2000). Moins concentrées que dans le cytoplasme, elles seraient cependant retrouvées sous forme d'un complexe de très haut poids moléculaire qui contiendrait plusieurs des ARS retrouvées à l'état libre dans le cytoplasme. Ce complexe nucléaire pourrait interagir avec EF1, qui est également trouvé dans le noyau, ce qui favoriserait le transport des tRNAs aminacylés (Grosshans et al., 2000).

2.2. **Classification des aminoacyl-tRNA synthétases en deux classes distinctes**

Cette étude a été initiée et réalisée en grande partie durant la préparation de mon Doctorat d'Université, il est le résultat d'une étroite collaboration avec M. Delarue et O. Poch. La conclusion de ce travail a été publiée quelques semaines après la soutenance de ma thèse (Eriani et al., 1990). Faisant suite à une phase d'acquisition de structures primaires d'ARS (durant laquelle les gènes des Asp-, Arg-, Pro- et CysRS avaient été séquencés), nous avons pu mettre en évidence trois motifs peptidiques consensus communs aux dix ARS qui ne présentaient pas les motifs consensus HIGH et KMSKS. Il en résultait une classification en deux groupes de dix enzymes, aux propriétés structurales et fonctionnelles distinctes (voir plus haut). La nouvelle classe d'ARS (classe II) contenait l'AspRS sur laquelle nous avons engagé une étude des relations structure-fonction (Prévost et al., 1989; Eriani et al., 1991). Le choix de cet enzyme s'était donc rapidement imposé pour l'étude des nouveaux motifs peptidiques caractérisés, choix renforcé par la structure cristallographique qui était en cours de résolution. Par conséquent, une étude fonctionnelle visant à comprendre la fonction des motifs dans le mécanisme catalytique avait été engagée au laboratoire.

2.3. **Étude des structures fonctionnelles d'une aminoacyl-tRNA synthétase de classe II : l'aspartyl-tRNA synthétase de *S. cerevisiae***

2.3.1. Le motif 1 est impliqué dans la structuration et la communication des sites actifs du dimère (Eriani et al., 1993)

Nous avons abordé l'étude de la dimérisation de l'AspRS de levure, une des caractéristiques communes aux aminoacyl-tRNA synthétases de classe II. Pour tester la signification fonctionnelle de cette association nous avons choisi d'étudier un résidu proline situé au niveau de l'interface, dans le motif 1, que le caractère invariant au sein des classes II prédestinait à notre étude. Nous avons substitué cette proline et étudié l'effet de la mutation dans des homodimères d'AspRS et des hétérodimères constitués de l'association d'une sous-unité mutée et d'une sous-unité native. Le résultat majeur de cette étude est que la diminution d'activité provoquée par la mutation de cette proline peut être compensée en associant à la sous-unité mutée une sous-unité native. Ceci confirme l'importance de la proline dans la

dimérisation, et révèle l'interdépendance fonctionnelle des sous-unités de l'AspRS. Par ailleurs, cette étude révèle le rôle de la dimérisation dans le maintien de la conformation du site actif, et explique sa conservation dans la classe II des aminoacyl-tRNA synthétases.

2.3.2. Les motifs 2 et 3 interviennent dans la fixation de l'ATP (Cavarelli et al., 1994; Eriani et al., 1995)

Parallèlement, notre attention s'est focalisée sur le site catalytique de l'AspRS qui contient les motifs 2 des 3. Nous avons construit et étudié plusieurs dizaines de protéines mutantes que nous avons testées pour leurs propriétés cinétiques. La mesure des constantes d'affinité pour les substrats et les vitesses des deux réactions à l'état stationnaire ont permis de proposer un modèle d'interaction des substrats dans le site actif au cours des étapes de la réaction d'amination. Il s'agissait là du premier modèle proposé pour une aminoacyl-tRNA synthétase de classe II. L'étude a permis de montrer que les résidus invariants et très conservés sont impliqués dans la fixation de l'ATP (Arg325 et 531, Phe338) et des ions magnésium (résidus acides aux positions 471 et 478), et qu'ils stabilisent la molécule d'ATP dans une conformation coudée typique des enzymes de classe II. Certains des résidus conservés sont impliqués dans l'interaction avec l'autre sous-unité (Phe324, Glu337, Glu530), ils pourraient servir de relais de communication entre les deux sites actifs du dimère. Nous avons également identifié des résidus spécifiquement impliqués dans la fixation de l'acide aspartique (Gln303, Lys306, Gln307, Asp342, Glu344, Arg485, Gly526) et pu constater que celle-ci dépendait de la fixation préalable de l'ATP.

Ces résultats nous ont amené à penser que les motifs constituent une trame structurale ou certains résidus jouent invariablement le même rôle (par exemple les résidus invariants qui fixent l'ATP) alors que d'autres sont responsables de la spécificité de reconnaissance pour l'acide aminé, le tRNA, ou stabilisent l'état de transition de la réaction. Notons que les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec d'autres travaux réalisés dans d'autres laboratoires (Gatti & Tzagoloff, 1991; Madern et al., 1992; Filley & Hill, 1993; Davis et al., 1994; Lu & Hill, 1994; Commans et al., 1995; Willison et al., 1995; Lenhard et al., 1997; Stehlin et al., 1997) et que des études réalisées sur les protéines « paralogues » des ARS, asparagine synthétase A (Hinchman et al., 1992) et GCN2 (Ramirez et al., 1992), ont conduit aux mêmes conclusions.

2.3.3. Étude de l'interaction tRNA^{Asp} – AspRS (Eriani & Gangloff, 1999)

Durant les années 90, de nombreuses études ont porté sur la reconnaissance des tRNAs par les ARS. Les approches utilisées étaient basées pour la plupart sur la mutagenèse des tRNAs et sur la mesure de ses effets sur la croissance cellulaire ou sur les paramètres de charge par l'aminocyl-tRNA synthétase. À l'opposé, très peu d'études de reconnaissance ont pris pour cible l'ARS elle-même, ceci pouvant s'expliquer par la différence de taille de ces macromolécules (plusieurs centaines d'acides aminés contre 75 nucléotides pour le tRNA) et la complexité à produire et purifier ces enzymes.

Au laboratoire, nous nous sommes attachés à étudier les résidus de l'AspRS impliqués dans le maintien du complexe AspRS-tRNA^{Asp}; ces résidus avaient été identifiés précédemment par l'étude cristallographique. L'importance fonctionnelle des interactions correspondantes a été évaluée au travers des changements de propriétés catalytiques de l'AspRS que pouvait induire le remplacement de ces acides aminés par des résidus alanine. Les résultats ont montré que les interactions de l'AspRS avec l'adénosine terminale du tRNA n'étaient réalisées que dans l'état de transition de la réaction d'acylation alors que celles avec la base discriminatrice s'établissaient déjà au moment de la formation du complexe initial

AspRS-tRNA^{Asp}. La plus forte contribution en énergie libre à la stabilité du complexe enzyme-tRNA provenait des interactions avec les bases de l'anticodon. Nous avons montré, par mutagenèse multiple, que ces contacts favorisaient également la catalyse en agissant de manière coopérative entre eux ainsi qu'avec ceux de la base G73. Ceci implique l'existence d'un chemin moléculaire capable de transmettre le signal de reconnaissance de l'anticodon vers le site actif. Ce signal pourrait être convoyé via le tRNA^{Asp} comme le suggéreraient les importants changements conformationnels observés lors de son interaction avec l'AspRS. Par ailleurs, les valeurs d'énergie libre de liaison correspondant aux différents domaines d'interaction AspRS-tRNA^{Asp} suggèrent fortement que lors de la formation du complexe, l'anticodon se lie en premier. Cette suggestion est corroborée par les résultats cristallographiques du complexe intermédiaire AspRS (*T. thermophilus*)-tRNA^{Asp} (*E. coli*) qui montrent une interaction achevée avec l'anticodon alors que le bras accepteur du tRNA n'a pas encore atteint le site actif de l'enzyme (Briand et al., 2000).

Enfin, les activités d'aminocyclation des AspRS mutantes en présence du tRNA^{Asp} pur et non fractionné indiqueraient que les résidus d'AspRS interagissant avec les bases d'identité auraient également une action discriminatrice plus ou moins forte vis-à-vis des tRNAs non spécifiques.

2.3.4. Sélection *in vivo* de mutants létaux de l'AspRS (Ador et al., 1999)

Pour compléter l'étude du site actif de l'AspRS nous nous sommes tournés vers une approche plus cellulaire en vue d'intégrer dans nos résultats la complexité liée à l'environnement cellulaire. Il s'agissait, dans un premier temps, d'isoler un certain nombre de variants inactifs de l'AspRS, par leur incapacité à compléter une levure disruptée pour le gène codant pour l'AspRS (*APS*). Nous avons criblé une banque de gènes *APS* mutés au hasard grâce à un crible génétique basé sur le changement de coloration des levures (changement lié à la perte du marqueur ADE3). Nous avons isolé 23 gènes codant pour des AspRS mutantes. Vingt-deux gènes présentent des mutations localisées à proximité immédiate de l'ATP. Elles affectent des résidus en contact direct avec les substrats (ATP, acide aspartique, bras accepteur du tRNA), ou agissent par effet à courte distance. Treize de ces résidus avaient été précédemment étudiés par mutagenèse dirigée, tandis que l'importance des autres ne pouvait être déduite de la simple étude structurale. L'importance de la dimérisation a pu être confirmée par l'isolement d'un mutant situé à l'interface du dimère (le résidu Pro invariant), et par des expériences de complémentation *in vivo* conduisant à la formation d'hétérodimères. Enfin, la seule mutation « délocalisée » par rapport au site actif est située à une distance de plusieurs dizaines d'Å, au niveau du site de fixation de l'anticodon du tRNA. Nous avons pu montrer que la perte d'activité de la protéine est liée à une relaxation de la spécificité de reconnaissance du tRNA^{Asp}. *In vivo* il s'ensuit un phénomène de compétition des autres tRNAs pour l'enzyme mutée qui conduit à une inhibition de l'activité de charge du tRNA^{Asp} et entraîne la létalité cellulaire.

Cette étude a permis de confirmer et de préciser le modèle d'interaction précédemment proposé, elle souligne aussi l'importance de la bonne présentation des éléments d'interaction, c'est-à-dire de la conformation globale du site actif. L'intégration des paramètres cellulaires, telle la compétition des autres tRNAs par exemple, permet également d'arriver à une compréhension "plus exacte" du mécanisme d'aminocyclation, tel qu'il se déroule dans la cellule.

2.4. Modification de l'identité des tRNA^{Asp}_{CUA} et tRNA^{Asn}_{CUA} et des propriétés de reconnaissance l'AspRS (Martin et al., 1995; Martin et al., 1996)

Après avoir étudié les relations structure-fonction de l'AspRS par mutagenèse dirigée, nous avons utilisé des approches cellulaires en vue de sélectionner des mutants de tRNA et d'ARS présentant des capacités d'interaction nouvelles. Nous avons choisi d'utiliser les tRNAs suppresseurs comme outils génétiques destinés à l'étude de la reconnaissance tRNA-aminoacyl-tRNA synthétase *in vivo*. Nous étions préoccupés par deux grandes questions : i) quelle est l'identité des tRNA^{Asp} et tRNA^{Asn} lorsqu'ils contiennent un anticodon ambre ? ii) comment transformer une AspRS en enzyme capable de reconnaître un tRNA^{Asp} ou ^{Asn} contenant un anticodon ambre ?

Pour répondre à ces interrogations nous avons utilisé un crible génétique basé sur la complémentation de deux gènes d'*E. coli* contenant des mutations ambre dans les gènes *argE* et *lacZ*). Ainsi, nous avons sélectionné des mutants de tRNA et d'AspRS capables de compléter par suppression les deux gènes rapporteurs.

2.4.1. Recherche de suppresseurs actifs tRNA^{Asp} et tRNA^{Asn}

Au départ de cette étude aucun suppresseur actif de tRNA^{Asp} et tRNA^{Asn} n'était décrit dans la littérature. Par mutagenèse « PCR » puis sélection dans la souche 121R nous avons isolé des mutants actifs de ces deux tRNAs. L'identité acceptrice de ces suppresseurs a été déterminée par séquençage de l'acide aminé inséré au niveau d'un codon ambre présent à proximité de l'extrémité NH₂-terminale d'une protéine reporter (DHFR). Ainsi, 19 mutants de tRNA^{Asn}_{CUA} ont pu être isolés. Leur analyse révèle une identité glutamine, résultant dans la plupart des cas de la fragilisation ou l'ouverture de la première paire de base. Ceci est en conformité avec les données structurales du complexe GlnRS-tRNA^{Gln} qui laisse apparaître une ouverture de la première paire de base. Quinze mutants de tRNA^{Asp}_{CUA}, devenus actifs *in vivo*, ont également été sélectionnés en deux étapes successives. Comme pour le tRNA^{Asn}, ces tRNAs ont perdu leur identité originelle ; ils présentent désormais des identités alanine, lysine, arginine ou glutamine. Nous avons pu montrer que ces changements d'identité résultent du transfert des éléments de reconnaissance correspondant à ces spécificités ou du relâchement de la structure tertiaire du tRNA autorisant la reconnaissance non spécifique. Des éléments d'identité non décrits auparavant ont pu être identifiés dans les systèmes de reconnaissance lysine et alanine.

2.4.2. Étude de la reconnaissance AspRS-tRNA^{Asp} de *E. coli* (Martin, 1995)

À l'aide du même système génétique nous avons sélectionné des molécules d'AspRS capables de reconnaître un tRNA^{Asp}_{CUA}. L'objectif ainsi visé était double : générer des molécules d'AspRS présentant une nouvelle spécificité de reconnaissance, mais aussi mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la reconnaissance spécifique du tRNA. Un certain nombre d'AspRS mutantes ont été sélectionnées puis étudiées. La plupart des mutations sont situées à proximité du site de fixation de l'anticodon, elles tendraient à réorganiser le tissu d'interaction avec cette partie du tRNA. D'autres mutations sont situées dans d'autres domaines de l'enzyme et agiraient par effet à distance sur la fixation de l'anticodon. Nous avons pu montrer que la reconnaissance du tRNA^{Asp}_{CUA} résulte dans la plupart des cas d'un élargissement de la spécificité de reconnaissance des AspRS mutées. Parallèlement un second système génétique a été utilisé afin d'isoler des AspRS mutantes présentant une spécificité de reconnaissance encore davantage élargie, à un tRNA^{Asn}_{CUA} cette

fois-ci. Les molécules d'AspRS sélectionnées présentaient d'importantes délétions du domaine N-terminal replié en tonneau β , dont la fonction est précisément la reconnaissance de la boucle anticodon du tRNA.

Les résultats de ces deux sélections nous ont montré qu'il y a bien des voies à la création de nouvelles spécificités de reconnaissance ou à leur élargissement. L'étude *in vivo* présente à la fois l'avantage d'offrir des résultats compatibles avec la vie cellulaire et l'inconvénient d'exclure des mutations dont l'effet pourrait être trop efficace et incompatible avec les systèmes biologiques.

2.5. Étude des structures fonctionnelles d'une aminoacyl-tRNA synthétase de classe I : l'arginyl-tRNA synthétase de *S. cerevisiae*

Notre intérêt pour la connaissance de nouvelles structures tridimensionnelles d'ARS nous a orienté vers l'étude d'autres systèmes d'amination. Ainsi, nous avons cloné, surexprimé et établi des protocoles de purification de plusieurs aminoacyl-tRNA synthétases et de leurs tRNAs (Martin et al., 1993). Des études structurales ont été réalisées dans le laboratoire du Dr. D. Moras. Plusieurs variantes de complexes AspRS-tRNA^{Asp} ont été cristallisées et leurs structures résolues (Eiler et al., 1992; Eiler et al., 1999; Briand et al., 2000; Rees et al., 2000; Moulinier et al., 2001). Ces données cristallographiques nous ont permis, entre autres, d'élucider le rôle du résidu hautement conservé (Pro 555) dont la mutation conférait un phénotype thermosensible à une souche particulière d'*E. coli* (Martin et al., 1997). Des études du même type portant sur les ProRS et CysRS avec leurs tRNAs n'avaient, quant à elles, pas pu aboutir à la résolution des structures tridimensionnelles.

Plus récemment, nous avons engagé l'étude des relations structure-fonction du système ArgRS-tRNA^{Arg} de la levure *S. cerevisiae*. Le choix de ce système est lié à l'intérêt que présentent certaines de ses propriétés : l'activation du site de l'enzyme est induite par la fixation du tRNA et, ainsi que nous l'avons montré, l'ArgRS est capable d'aminocycler le tRNA^{Asp}. Nous avons isolé le gène codant pour l'ArgRS de levure et établi un protocole d'expression et de purification. Des cristaux d'enzyme ont été obtenus et la structure a été résolue à 2,75Å de résolution (Cavarelli et al., 1998). Cette structure, la première connue d'une ArgRS, montre un cœur catalytique typique d'ARS de classe I (Rossmann fold). Plusieurs modules additionnels sont greffés sur le cœur catalytique, dont l'un, à l'extrémité C-terminale est caractéristique du sous-groupe de la MetRS. Au niveau du Rossmann fold deux domaines d'insertion pourraient jouer un rôle dans l'interaction avec le bras accepteur du tRNA.

Alors que se déroulait l'étude structurale, nous avons développé une approche visant à identifier les résidus importants de la protéine, par la sélection *in vivo* de mutants de ces résidus induisant la létalité de la levure. La sélection de mutations létales a été basée sur le crible coloré déjà utilisé pour l'AspRS. Vingt-six mutations létales ont ainsi été isolées, dix-huit dans le cœur catalytique, huit dans le domaine C-terminal homologue à celui de la MetRS. Les dix-huit mutations situées dans le Rossmann fold affectent divers résidus, situés dans les motifs HIGH et KMSKS ou dans le site de fixation de l'arginine (visible dans le cristal). Le groupe de huit mutations constitue un second « foyer » qui semblait désigner le site de fixation de l'anticodon du tRNA^{Arg}. Ces mutations agissent, via le tRNA, sur le site actif où elles provoquent des chutes de vitesse d'activation de l'arginine. Notons que certaines mutations induisent une relaxation de la reconnaissance au profit d'un tRNA hétérologue, le tRNA^{Asp}, et que d'autres agissent préférentiellement sur la charge d'un tRNA isoaccepteur donné, ce qui suggère l'existence de site de fixation des tRNAs au moins partiellement

distincts (Geslain et al., 2000). Un phénomène analogue a été récemment observé dans le cas de la SerRS mitochondriale bovine et ses deux tRNA^{Ser} (Shimada et al., 2001).

3. PROJETS SCIENTIFIQUES ET PERSPECTIVES

J'ai brièvement exposé ci-dessous les grandes lignes des principaux projets en cours de développement au laboratoire. Pour des raisons de clarté, j'ai omis d'exposer certains travaux en cours, portant sur l'AspRS, sur l'arginine-tRNA transférase (une enzyme utilisant l'Arg-tRNA^{Arg} comme donneur d'arginine) ainsi que sur une ARS de bactérie thermophile.

3.1. Arginyl-tRNA synthétase : une ribonucléoprotéine ?

La structure cristallographique du complexe ArgRS-tRNA^{Arg2} a été récemment résolue (Delagoutte et al., 2000). Ces données constituent désormais des bases structurales de notre étude du système arginine.

Actuellement nous analysons la fonction des domaines C- et N-terminaux de l'ArgRS, ces derniers étant suspectées intervenir dans la fixation du tRNA^{Arg}. À cette fin, nous avons engagé l'étude des résidus exposés à la surface de la protéine par leur mutagenèse en alanine. Les premiers résultats semblent relativiser l'importance du domaine N-terminal, tandis que le caractère essentiel du domaine C-terminal a pu être confirmé. Dans le même contexte d'étude, nous cherchons à isoler des mutations compensatoires dans le tRNA^{Arg} visant à compléter les déficiences de certaines mutations létales pour l'enzyme.

Un autre aspect de l'étude de l'ArgRS que nous nous proposons d'aborder portera sur le mécanisme de la réaction catalysée par cette enzyme. Le système ArgRS-tRNA^{Arg} est un modèle particulièrement intéressant puisque comme la Glu- et la GlnRS, l'ArgRS nécessite la présence du tRNA pour catalyser la réaction d'activation de l'acide aminé. À ce titre, elles peuvent être considérées comme des ribonucléoprotéines (du moins pour la première étape d'activation de l'acide aminé). Cette particularité mécanistique est rigoureusement conservée à travers l'évolution et sa finalité reste encore mal comprise. Dans un premier travail, nous tenterons d'établir la taille minimale du tRNA capable d'assurer l'activation de l'acide aminé. À cette fin, une approche *in vitro* par transcription à la T7 RNA polymérase sera utilisée pour générer des fragments d'ARN de tailles plus ou moins grandes. Le rôle joué par l'extrémité acceptrice dans la réaction d'activation sera tout spécialement étudié par l'utilisation de tRNA de synthèse dont l'adénine terminale aura été modifiée (délétions, substitutions des hydroxyles). Parallèlement, nous tenterons d'identifier, côté enzyme, les résidus intervenant dans l'activation de son site à la suite de la fixation du tRNA^{Arg}. Plusieurs résidus situés dans le site actif sont candidats à cette fonction. Ils pourraient augmenter l'affinité de l'enzyme pour l'un de ses substrats après fixation du tRNA et ainsi permettre la catalyse.

Dans un troisième volet de ce travail, nous nous intéresserons à la spécificité de reconnaissance des tRNA^{Arg}, le jeu d'identité des tRNA^{Arg} n'étant que partiellement connu à ce jour pour *S. cerevisiae* (Sissler et al., 1996). En dehors de la boucle de l'anticodon, aucun élément d'identité n'a été identifié dans le tRNA^{Arg}. Aussi, nous nous proposons d'effectuer l'inventaire de l'ensemble des éléments d'identité du tRNA^{Arg} impliqués dans la reconnaissance spécifique de l'ArgRS et ceci par une approche cellulaire ; elle fera appel à un criblage génétique mettant à profit le fait que le système arginine est composé d'une seule aminoacyl-tRNA synthétase et de quatre tRNAs isoaccepteurs. Deux tRNAs sont retrouvés de façon majoritaire dans le cytoplasme car codés par plusieurs copies de gènes, alors que les deux autres sont des tRNAs mineurs codés par une copie unique de gène. Cette situation nous a permis de construire des souches nulles pour ces gènes. Ainsi, la disruption du gène de

l'isoaccepteur CCG induit la létalité cellulaire, alors que le gène de l'isoaccepteur CCU peut être supprimé (sa capacité de lecture est sans doute prise en charge par l'isoaccepteur majeur UCU). Ainsi, la souche de levure disruptée pour l'isoaccepteur CCG est un outil idéal pour cribler des banques de gènes de tRNA (banques de gènes de tRNAs mutés aléatoirement ou mutants issus de mutagenèse dirigée). On identifiera ainsi les résidus essentiels du tRNA, qui interviennent dans l'identité mais aussi dans l'expression, dans la stabilité, ou dans les interactions avec les autres composants de la machinerie traductionnelle.

Avec cette même souche disruptée nous rechercherons des supprimeurs extragéniques dans la levure par mutagenèse aléatoire sur l'ensemble de la levure. Ce type de recherche nous conduira à aborder les questions de l'évolution du code génétique, en effet, en sélectionnant ces supprimeurs nous pourrions assister à des phénomènes de capture de tRNAs apparentés ou de modification de la machinerie traductionnelle.

3.2. Étude des relations structure-fonction de la protéine HBP

Enfin, le dernier volet du projet de recherche est lié à la récente intégration au CNRS du Dr F. MARTIN dans notre laboratoire. Il consiste en l'étude des relations structure-fonction d'un autre type de protéine et d'acide nucléique. Ce projet est consacré à l'étude de la protéine humaine HBP qui est impliquée dans le contrôle de l'expression des gènes histones chez les métazoaires. La protéine HBP (« Histone Binding Protein ») se fixe spécifiquement et très fortement sur une structure en tige boucle présente à l'extrémité 3' non traduite des ARN messagers d'histones. L'interaction entre la protéine HBP et son site de fixation sur les ARN messagers d'histones induit un ensemble de phénomènes intervenant dans leur expression, leur maturation, leur transport, leur traduction ainsi que leur stabilité. La protéine HBP se fixe sur son RNA cible avec une affinité extrêmement forte et elle ne présente absolument aucune homologie avec d'autres protéines de ce type. Nous avons abordé l'étude structure-fonction de cette protéine à l'aide de la technique des triples hybrides. Cette méthode a d'ores et déjà permis de sélectionner des mutations dans la protéine HBP qui abolissent la fixation sur l'ARN (Martin et al., 2000). Le système des triples hybrides va nous permettre de sélectionner des mutations compensatoires au niveau de l'ARN ou au niveau de la protéine HBP qui restaurent sa capacité de fixation sur la structure ribonucléique. La position des mutations compensatoires nous renseignera sur les résidus de la protéine et les nucléotides de l'ARN impliqués dans la formation du complexe. Nous envisageons également de sélectionner, toujours à l'aide du système des triples hybrides, des variants d'ARN capables de se fixer sur la protéine HBP sauvage. Ceci permettra de dégager d'autres molécules d'ARN qui pourraient ensuite être utilisées comme inhibiteurs spécifiques du complexe natif. Bien évidemment, nous envisageons l'étude structurale de la protéine HBP ainsi que de son complexe avec l'ARN, pour cela il nous faudra trouver un système d'expression performant et une méthode de purification efficace.

Conclusion

Ces dix années de recherche m'ont permis d'acquérir une certaine expertise dans le domaine des relations structure-fonction entre ARS et tRNAs, mais aussi dans les relations entre chercheurs aux spécialités distinctes. Les différentes approches que nous avons utilisées et les différentes collaborations engagées ont conduit à des résultats qui ont toujours valeur de référence à l'heure actuelle. Les études phylogénétiques et la mutagenèse dirigée alliées aux données cristallographiques nous ont permis de comprendre bien des aspects de la réaction d'aminacylation. Nous avons pu constater que les sélections génétiques s'avéraient essentielles pour localiser les régions importantes d'une protéine peu connue, mais aussi pour affiner des investigations déjà existantes (qui ne sont jamais exhaustives), de plus elles permettent de sélectionner des mutants aux propriétés de reconnaissance modifiées. Cependant, la bonne mise en œuvre de ces approches reste dépendante d'une condition *sine qua non* qui est de pouvoir disposer d'une grande quantité de protéine hautement purifiée (pour les études cristallographiques) ainsi que d'un système d'expression et de purification efficace pour l'analyse des nombreux mutants de protéine construits par mutagenèse dirigée ou sélectionnés *in vivo*.

À l'heure actuelle, la compréhension du fonctionnement des ARS dépasse le simple cadre de la connaissance fondamentale. Il a été démontré que ces enzymes sont impliqués plus ou moins directement dans plusieurs pathologies humaines. Leur implication dans les maladies autoimmunitaires est connue depuis le début des années 90 et depuis peu on s'intéresse aux maladies mitochondriales impliquant des tRNAs mutés. Il est également envisagé d'utiliser la haute spécificité de reconnaissance des ARS pour générer les nouvelles molécules qui seront ciblées sur les ARS bactériennes. Ainsi, accroître nos connaissances sur ces enzymes permettra peut-être à terme de mettre au point les agents thérapeutiques de demain.

Une réflexion similaire peut être engagée sur la protéine HBP humaine. En effet, la place centrale qu'elle occupe dans le processus de déclenchement de l'expression des gènes d'histones lors de la division cellulaire en fait une cible thérapeutique idéale pour tenter d'enrayer la division dans les cellules cancéreuses. Là aussi, accéder à la compréhension du fonctionnement de cette protéine, par le biais d'une étude des relations structure-fonction, pourrait se révéler être une étape incontournable.

Références bibliographiques

- Ador, L., Camasses, A., Erbs, P., Cavarelli, J., Moras, D., Gangloff, J. & Eriani, G. (1999). Active site mapping of yeast aspartyl-tRNA synthetase by *in vivo* selection of enzyme mutations lethal for cell growth. *J. Mol. Biol.* **288**, 231-242.
- Agou, F. & Mirande, M. (1997). Aspartyl-tRNA synthetase from rat: *in vitro* functional analysis of its assembly into the multisynthetase complex. *Eur J Biochem* **243**(1-2), 259-267.
- Artymiuk, P. J., Rice, D. W., Poirrette, A. R. & Willet, P. (1994). A tale of two synthetases. *Nat Struct Biol* **1**(11), 758-60.
- Bec, G., Kerjan, P., Zha, X. D. & Waller, J. P. (1989). Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. I. Purification as a heterotypic complex in association with elongation factor 1. *J Biol Chem* **264**(35), 21131-7.
- Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J. & Baron, C. (1991). Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci* **16**(12), 463-7.
- Brevet, A., Chen, J., Leveque, F., Blanquet, S. & Plateau, P. (1995). Comparison of the enzymatic properties of the two *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase species. *J Biol Chem* **270**(24), 14439-14444.
- Briand, C., Poterszman, A., Eiler, S., Webster, G., Thierry, J. & Moras, D. (2000). An intermediate step in the recognition of tRNA(Asp) by aspartyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **299**(4), 1051-60.
- Cahuzac, B., Berthonneau, E., Birlirakis, N., Guittet, E. & Mirande, M. (2000). A recurrent RNA-binding domain is appended to eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *Embo J* **19**(3), 445-452.
- Cavarelli, J., Delagoutte, B., Eriani, G., Gangloff, J. & Moras, D. (1998). L-arginine recognition by yeast arginyl-tRNA synthetase. *EMBO Journal* **17**, 5438-5448.
- Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M., Boeglin, M., Mitschler, A., Martin, F., Gangloff, J., Thierry, J. C. & Moras, D. (1994). The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *The EMBO J.* **13**, 327-337.
- Cerini, C., Kerjan, P., Astier, M., Gratecos, D., Mirande, M. & Semeriva, M. (1991). A component of the multisynthetase complex is a multifunctional aminoacyl-transfer RNA synthetase. *EMBO J* **10**(13), 4267-4277.
- Commans, S., Blanquet, S. & Plateau, P. (1995). A single substitution in the motif 1 of *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase induces cooperativity toward amino acid binding. *Biochemistry* **34**(25), 8180-8189.
- Cusack, S., Hartlein, M. & Leberman, R. (1991). Sequence, structural and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res* **19**(13), 3489-98.
- Davis, M. W., Buechter, D. D. & Schimmel, P. (1994). Functional Dissection of a Predicted Class-Defining Motif in a Class 2 tRNA Synthetase of Unknown Structure. *Biochemistry* **33**(33), 9905-11.
- Delagoutte, B., Moras, D. & Cavarelli, J. (2000). tRNA aminoacylation by arginyl-tRNA synthetase: induced conformations during substrates binding. *Embo J* **19**(21), 5599-610.
- Delarue, M. & Moras, D. (1993). The aminoacyl-tRNA synthetases family: Modules at work. *BioEssays* **15**, 675-687.
- Dock-Bregeon, A., Sankaranarayanan, R., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Francklyn, C. S., Ehresmann, C. & Moras, D. (2000). Transfer RNA-mediated editing

- in threonyl-tRNA synthetase. The class II solution to the double discrimination problem. *Cell* **103**(6), 877-84.
- Doolittle, R. & Handy, J. (1998). Evolutionary anomalies among the aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 630-636.
- Eiler, S., Boeglin, M., Martin, F., Eriani, G., Gangloff, J., Thierry, J. C. & Moras, D. (1992). Crystallization of aspartyl-tRNA synthetase-tRNA^{Asp} complex from *Escherichia coli* and first crystallographic results. *Journal of Molecular Biology* **224**(4), 1171-1173.
- Eiler, S., Dock-Bregeon, A., Moulinier, L., Thierry, J. & Moras, D. (1999). Synthesis of aspartyl-tRNA(Asp) in escherichia coli-a snapshot of the second step [In Process Citation]. *Embo J* **18**(22), 6532-41.
- Eriani, G., Cavarelli, J., Martin, F., Ador, L., Rees, B., Thierry, J. C., Gangloff, J. & Moras, D. (1995). The class II aminoacyl-tRNA synthetases and their active site: evolutionary conservation of an ATP binding site. *J. Mol. Evol.* **40**, 499-508.
- Eriani, G., Cavarelli, J., Martin, F., Dirheimer, G., Moras, D. & Gangloff, J. (1993). Role of dimerization in yeast aspartyl-tRNA synthetase and importance of the class II invariant proline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10816-10820.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**, 203-206.
- Eriani, G. & Gangloff, J. (1999). Yeast aspartyl-tRNA synthetase residues interacting with tRNA^{Asp} identity bases connectively contribute to tRNA^{Asp} binding in the ground- and transition state complex and discriminate against non cognate tRNAs. *J Mol Biol* **291**, 761-773.
- Eriani, G., Prevost, G., Kern, D., Vincendon, P., Dirheimer, G. & Gangloff, J. (1991). Cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Study of its functional organisation by deletion analysis. *EJB* **200**, 337-343.
- Fabrega, C., Farrow, M. A., Mukhopadhyay, B., de Crecy-Lagard, V., Ortiz, A. R. & Schimmel, P. (2001). An aminoacyl tRNA synthetase whose sequence fits into neither of the two known classes. *Nature* **411**(6833), 110-4.
- Fett, R. & Knippers, R. (1991). The primary structure of human glutaminyl-tRNA synthetase. A highly conserved core, amino acid repeat regions, and homologies with translation elongation factors. *J Biol Chem* **266**(3), 1448-55.
- Filley, S. J. & Hill, K. A. (1993). Amino acid substitutions at position 73 in motif 2 of *Escherichia coli* alanyl-tRNA synthetase. *Arch Biochem Biophys* **307**(1), 46-51.
- Fraser, T. H. & Rich, A. (1975). Amino acids are not all initially attached to the same position on transfer RNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3044-3048.
- Gatti, D. L. & Tzagoloff, A. (1991). Structure and evolution of a group of related aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol.* **218**(3), 557-68.
- Geslain, R., Martin, F., Delagoutte, B., Cavarelli, J., Gangloff, J. & Eriani, G. (2000). In vivo selection of lethal mutations reveals two functional domains in arginyl-tRNA synthetase. *Rna* **6**(3), 434-48.
- Grosshans, H., Hurt, E. & Simos, G. (2000). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev* **14**(7), 830-40.
- Hinchman, S. K., Henikoff, S. & Schuster, S. M. (1992). A Relationship Between Asparagine Synthetase-A and Aspartyl Transfer RNA Synthetase. *J Biol Chem* **267**(1), 144-149.
- Ibba, M., Becker, H. D., Stathopoulos, C., Tumbula, D. L. & Soll, D. (2000). The Adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci* **25**(7), 311-316.
- Ibba, M., Bono, J., Rosa, P. & Söll, D. (1997a). Archaeal-type lysyl-tRNA synthetase in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14383-14388.

- Ibba, M., Curnow, A. W. & Soll, D. (1997b). Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. *Trends Biochem Sci* **22**(2), 39-42.
- Kang, J., Kim, T., Ko, Y. G., Rho, S. B., Park, S. G., Kim, M. J., Kwon, H. J. & Kim, S. (2000). Heat shock protein 90 mediates protein-protein interactions between human aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **275**(41), 31682-8.
- Kim, H. S., Vothknecht, U. C., Hedderich, R., Celic, I. & Soll, D. (1998). Sequence divergence of seryl-tRNA synthetases in archaea. *J Bacteriol* **180**(24), 6446-9.
- Kim, J. E., Kim, K. H., Lee, S. W., Seol, W., Shiba, K. & Kim, S. (2000a). An elongation factor-associating domain is inserted into human cysteinyl-tRNA synthetase by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **28**(15), 2866-72.
- Kim, Y., Shin, J., Li, R., Cheong, C., Kim, K. & Kim, S. (2000b). A novel anti-tumor cytokine contains an RNA binding motif present in aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **275**(35), 27062-8.
- Kleeman, T. A., Wei, D., Simpson, K. L. & First, E. A. (1997). Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine. *J Biol Chem* **272**(22), 14420-5.
- Lamour, V., Quevillon, S., Diriong, S., N'Guyen, V. C., Lipinski, M. & Mirande, M. (1994). Evolution of the Glx-tRNA synthetase family: the glutaminyl enzyme as a case of horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18), 8670-4.
- Lenhard, B., Filipic, S., Landeka, I., Skrtic, I., Söll, D. & Weygand-Durasevic, I. (1997). Defining the active site of yeast seryl-tRNA synthetase. Mutations in motif 2 loop residues affect tRNA-dependent amino acid recognition. *J Biol Chem* **272**(2), 1136-41.
- Lu, Y. & Hill, K. A. (1994). The invariant arginine of motif 2 of Escherichia coli alanyl-tRNA synthetase is important for catalysis but not for substrate binding. *J Biol Chem* **269**(16), 12137-41.
- Lund, E. & Dahlberg, J. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* **282**, 2082-2085.
- Madern, D., Anselme, J. & Hartlein, M. (1992). Asparaginyl-tRNA synthetase from the Escherichia coli temperature-sensitive strain HO202. A proline replacement in motif 2 is responsible for a large increase in Km for asparagine and ATP. *FEBS Lett* **299**(1), 85-9.
- Martin, F. (1995). Etude des structures fonctionnelles de l'aspartyl-tRNA synthétase. Détermination des bases moléculaires de la reconnaissance enzyme-substrats. PhD, Université Louis Pasteur.
- Martin, F., Eriani, G., Eiler, S., Moras, D., Dirheimer, G. & Gangloff, J. (1993). Overproduction and purification of native and queuine-lacking *Escherichia coli* tRNA^{Asp}. Role of the wobble base in tRNA^{Asp} acylation. *J. Mol. Biol.* **234**, 965-974.
- Martin, F., Eriani, G., Reinbolt, J., Dirheimer, G. & Gangloff, J. (1995). Genetic selection for active E.coli amber tRNA^{Asn} exclusively led to glutamine inserting suppressors. *Nucl. Acids Res.* **23**, 779-784.
- Martin, F., Michel, F., Zenklusen, D., Muller, B. & Schumperli, D. (2000). Positive and negative mutant selection in the human histone hairpin-binding protein using the yeast three-hybrid system. *Nucleic Acids Res* **28**(7), 1594-603.
- Martin, F., Reinbolt, J., Dirheimer, G., Gangloff, J. & Eriani, G. (1996). Selection of tRNA(Asp) amber suppressor mutants having alanine, arginine, glutamine, and lysine identity. *Rna* **2**(9), 919-27.
- Martin, F., Sharples, G. J., Lloyd, R. G., Eiler, S., Moras, D., Gangloff, J. & Eriani, G. (1997). Characterization of a thermosensitive Escherichia coli aspartyl-tRNA synthetase mutant. *J Bacteriol* **179**(11), 3691-3696.

- Martinis, S. A., Plateau, P., Cavarelli, J. & Florentz, C. (1999). Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. Mittelwihr, France, October 10-15, 1999. *Embo J* **18**(17), 4591-6.
- Mazauric, M. H., Keith, G., Logan, D., Kreutzer, R., Giege, R. & Kern, D. (1998). Glycyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*--wide structural divergence with other prokaryotic glycyl-tRNA synthetases and functional inter-relation with prokaryotic and eukaryotic glycylation systems. *Eur J Biochem* **251**(3), 744-57.
- Miseta, A., Woodley, C. L., Greenberg, J. R. & Slobin, L. I. (1991). Mammalian seryl-tRNA synthetase associates with mRNA in vivo and has homology to elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem* **266**(29), 19158-61.
- Morales, A. J., Swairjo, M. A. & Schimmel, P. (1999). Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J* **18**, 3475-83.
- Moulinier, L., Eiler, S., Eriani, G., Gangloff, J., Thierry, J. C., Gabriel, K., McClain, W. H. & Moras, D. (2001). The structure of an AspRS-tRNA(Asp) complex reveals a tRNA-dependent control mechanism. *Embo J* **20**(18), 5290-5301.
- Nagel, G. M. & Doolittle, R. F. (1995). Phylogenetic analysis of the aminoacyl-tRNA synthetases. *J Mol Evol* **40**(5), 487-498.
- Nakatsu, T., Kato, H. & Oda, J. (1998). Crystal structure of asparagine synthetase reveals a close evolutionary relationship to classII aminoacyl-tRNA synthetase. *nature structural biology* **5**(1), 15-9.
- Nathanson, L. & Deutscher, M. P. (2000). Active aminoacyl-tRNA synthetases are present in nuclei as a high molecular weight multienzyme complex. *J Biol Chem* **275**(41), 31559-62.
- Negrutskii, B. S. & Deutscher, M. P. (1991). Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo*. *Biochemistry* **88**, 4991-4995.
- Negrutskii, B. S., Shalak, V. F., Kerjan, P., El'skaya, A. V. & Mirande, M. (1999). Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1alpha in the complex with EF-1H. *J Biol Chem* **274**(8), 4545-50.
- Norcum, M. & Dignam, J. (1999). Immunoelectron microscopic localization of glutamyl-/prolyl-tRNA synthetase within the eukaryotic multisynthetase complex. *J Biol Chem* **274**, 12205-8.
- Norcum, M. T. & Warrington, J. A. (1998). Structural analysis of the multienzyme aminoacyl-tRNA synthetase complex: a three-domain model based on reversible chemical crosslinking. *Protein Sci* **7**, 79-87.
- Norcum, M. T. & Warrington, J. A. (2000). The cytokine portion of p43 occupies a central position within the eukaryotic multisynthetase complex. *J Biol Chem* **275**(24), 17921-4.
- Nureki, O., Vassylyev, D., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T., Schimmel, P. & Yokoyama, S. (1998). Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* **280**(578-582).
- Park, S., Jung, K., Lee, J., Jo, Y., Motegi, H., Kim, S. & Shiba, K. (1999). Precursor of proapoptotic cytokine modulates aminoacylation activity of tRNA synthetase. *J Biol Chem* **274**(24), 16673-6.
- Plateau, P. & Blanquet, S. (1994). Dinucleoside oligophosphates in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* **36**, 81-109.
- Prévost, G., Eriani, G., Kern, D., Dirheimer, G. & Gangloff, J. (1989). Study of the arrangement of the functional domains along the cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase. *Eur J Biochem* **180**, 351-358.

- Putzer, H., Gendron, N. & Grungerg-Manago, M. (1992). Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J.* **11**, 3117-3127.
- Quevillon, S., Agou, F., Robinson, J. C. & Mirande, M. (1997). The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J Biol Chem* **272**(51), 32573-9.
- Quevillon, S. & Mirande, M. (1996). The p18 component of the multisynthetase complex shares a protein motif with the beta and gamma subunits of eukaryotic elongation factor 1. *FEBS Lett* **395**(1), 63-67.
- Quevillon, S., Robinson, J. C., Berthonneau, E., Siatecka, M. & Mirande, M. (1999). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J Mol Biol* **285**, 183-195.
- Ramirez, M., Wek, R. C., Vazquez de Aldana, C. R., Jackson, B. M., Freeman, B. & Hinnebusch, A. G. (1992). Mutations activating the yeast eIF-2 alpha kinase GCN2: isolation of alleles altering the domain related to histidyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol* **12**(12), 5801-15.
- Rees, B., Webster, G., Delarue, M., Boeglin, M. & Moras, D. (2000). Aspartyl tRNA-synthetase from *Escherichia coli*: Flexibility and Adaptability to the Substrates. *J Mol Biol* **299**(5), 1157-1164.
- Rho, S. B., Lee, J. S., Jeong, E. J., Kim, K. S., Kim, Y. G. & Kim, S. (1998). A multifunctional repeated motif is present in human bifunctional tRNA synthetase. *J Biol Chem* **273**(18), 11267-73.
- Rho, S. B., Lee, K. H., Kim, J. W., Shiba, K., Jo, Y. J. & Kim, S. (1996). Interaction between human tRNA synthetases involves repeated sequence elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19), 10128-33.
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Ehresmann, C., Ehresmann, B. & Moras, D. (1999). The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell* **1999 Apr 30;97(3):371-81** **97**, 371-381.
- Sarkar, S., Azad, A. K. & Hopper, A. K. (1999). Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in *saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25), 14366-71.
- Schimmel, P., Giege, R., Moras, D. & Yokoyama, S. (1993). An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8763-8.
- Schimmel, P. & Ribas De Pouplana, L. (2000). Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem Sci* **25**(5), 207-9.
- Shimada, N., Suzuki, T. & Watanabe, K. (2001). Dual mode recognition of two isoacceptor tRNAs by mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **27**, 27.
- Siatecka, M., Rozek, M., Barciszewski, J. & 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.
- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M. & Hurt, E. (1996). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *Embo J* **15**, 5437-5448.
- Sissler, M., Delorme, C., Bond, J., Ehrlich, S. D., Renault, P. & Francklyn, C. (1999). An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic role in histidine biosynthesis [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16), 8985-90.

- Sissler, M., Giegé, R. & Florentz, C. (1996). Arginine aminoacylation identity is context-dependent and ensured by alternate recognition sets in the anticodon loop of accepting tRNA transcripts. *Embo J* **15**(18), 5069-5076.
- Sprinzi, M. & Cramer, M. (1975). Site of aminoacylation of tRNAs from *Escherichia coli* with respect to the 2'- or 3'-hydroxyl group of the terminal adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3049-3053.
- Stapulionis, R. & Deutscher, M. P. (1995). A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16), 7158-61.
- Stathopoulos, C., Li, T., Longman, R., Vothknecht, U. C., Becker, H. D., Ibba, M. & Soll, D. (2000). One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science* **287**(5452), 479-82.
- Stehlin, C., Heacock, D. H. n., Liu, H. & Musier-Forsyth, K. (1997). Chemical modification and site-directed mutagenesis of the single cysteine in motif 3 of class II *Escherichia coli* prolyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **36**(10), 2932-2938.
- Swairjo, M. A., Morales, A. J., Wang, C. C., Ortiz, A. R. & Schimmel, P. (2000). Crystal structure of trbp111: a structure-specific tRNA-binding protein. *Embo J* **19**(23), 6287-98.
- Tumbula, D., Vothknecht, U. C., Kim, H., Ibba, M., Min, B., Li, T., Pelaschier, J., Stathopoulos, C., Becker, H. & Soll, D. (1999). Archaeal aminoacyl-tRNA synthesis. Diversity replaces dogma. *Genetics* **152**(4), 1269-76.
- Wakasugi, K. & Schimmel, P. (1999). Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **284**, 147-151.
- Weiner, A. M. (1999). Aminoacyl-tRNA synthetases on the loose. *Curr Biol* **9**(22), R842-R844.
- Wek, R. C., Jackson, B. M. & Hinnebusch, A. G. (1989). Juxtaposition of domains homologous to protein kinase and histidyl-tRNA synthetase in GCN2 protein suggests a mechanism of coupling GCN4 expression to amino acid availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4579-4583.
- Willison, J. C., Hartlein, M. & Leberman, R. (1995). Isolation and characterization of an *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase mutant with a large increase in Km for serine. *J Bacteriol* **177**(11), 3347-3350.
- Woese, C. R., Olsen, G. J., Ibba, M. & Soll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(1), 202-36.
- Wolf, Y. I., Aravind, L., Grishin, N. V. & Koonin, E. V. (1999). Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases--analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* **9**(8), 689-710.