

Résumé

ZHANG, WENHUA. *Les bases structurales de la modification N⁶-threonylcarbamoyladénosine des ARNt* (Direction: H. van Tilbeurgh et B. Collinet)

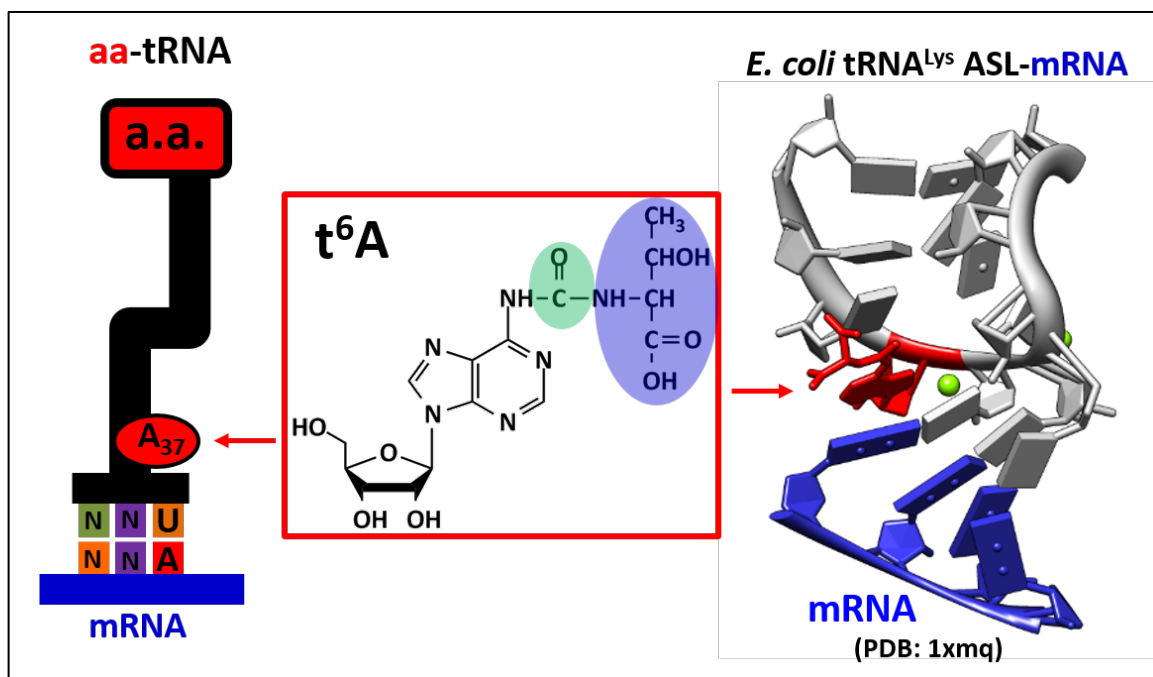


Fig. 1 Structure chimique de la modification threonylcarbamoyladénosine (t^6A) située sur l'adénine en position 37 des ARNt spécifiques des codons ANN.

La plupart des ARN de transfert (ARNt) subissent des modifications post-transcriptionnelles nécessaires à leur fonction. La modification t^6A (N^6 -threonylcarbamoyladénosine) présente en position 37 des ARNt spécifiques des codons ANN (Fig.1), joue un rôle primordial dans la fidélité de la traduction (appariement correct avec le codon AUG initiateur; prévention des décalages de phase de lecture etc.). La modification t^6A est catalysée en deux étapes par les protéines de la famille Sua5 /YrdC (aboutissant à la synthèse d'un intermédiaire TCA: threonylcarbamoyladénylate) puis transfert de l'entité carbamoylthreonine du TCA sur l'ARNt via les protéines du complexe KEOPS chez les eucaryotes et archaées ou des protéines YgjD, YeaZ et YjeE chez les bactéries ou encore de la protéine Qri7 dans les mitochondries de levures (Fig. 2). Le complexe KEOPS

comprend les 4 sous-unités suivantes: Kae1, Bud32, Cgi121 et Pcc1 auxquelles s'ajoutent une 5^{ème} sous-unité (Gon7) retrouvée uniquement chez la levure. Alors que YgjD est l'homologue bactérien de la protéine Kae1, YeaZ et YjeE n'ont pas d'homologue chez les eucaryotes ni les archées. Jusqu'à présent, les mécanismes moléculaires de la synthèse de l'intermédiaire TCA par Sua5/Yrdc restent à élucider. La structure de la sous-unité Gon7 du complexe KEOPS de levure ainsi que son implication dans l'architecture de la structure quaternaire n'est toujours pas connue. Enfin, l'étude structurale des protéines d'*E. coli* YgjD-YeaZ-YjeE pourrait également apporter des informations essentielles quant à la compréhension du mécanisme moléculaire de la modification t⁶A, notamment dans le transfert de l'intermédiaire TCA sur le substrat tRNA.

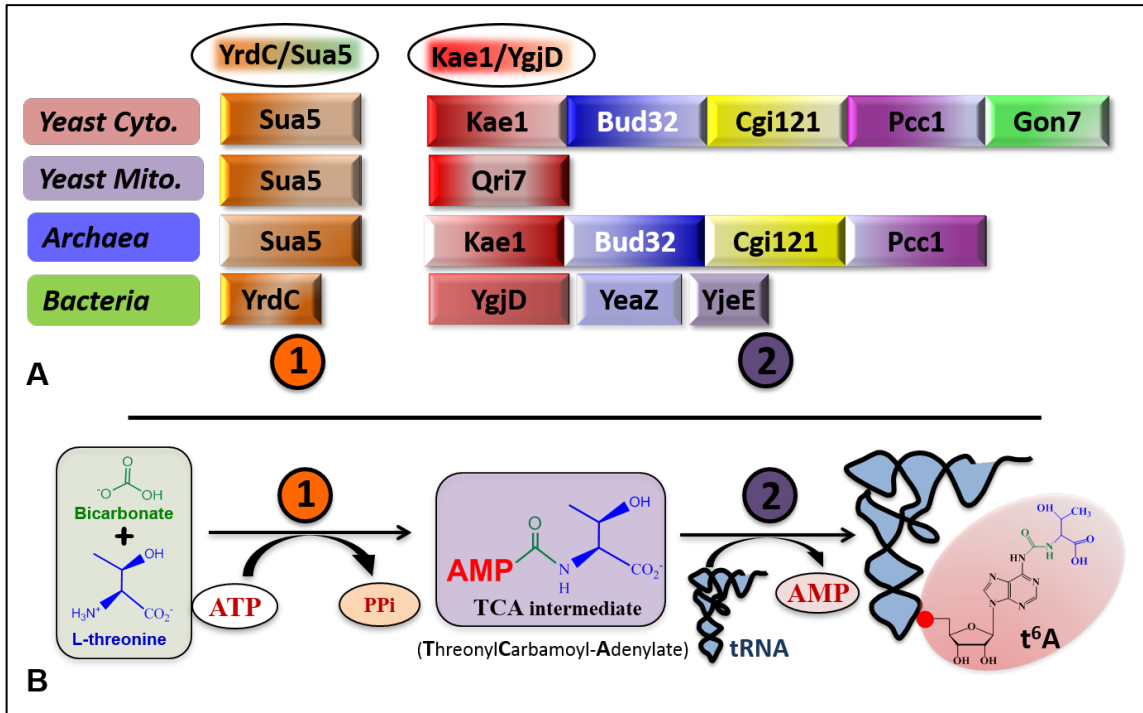


Fig. 2 biosynthèse de la modification t⁶A. A. Enzymes participant à la biosynthèse dans les 3 règnes du monde vivant : archées, eucaryotes (levure) et procaryotes (bactérie). B. voie de biosynthèse proposée à 2 étapes à partir des substrats ATP, bicarbonate, L-Thréonine et ARNt et faisant intervenir l'intermédiaire TCA.

Nous présentons dans cette thèse une série d'études structure-fonction de plusieurs protéines impliquées dans la biosynthèse de la modification t⁶A des

ARNt: Sua5 de *Pyrococcus abyssi* (Archées); les sous-complexes Bud32-Cgi121 et Gon7-Pcc1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Eucaryote) ainsi que le sous-complexe YgjD-YeaZ de *Escherichia coli* (Procaryote).

Protéine d'Archées : *Pyrococcus abyssi* Sua5

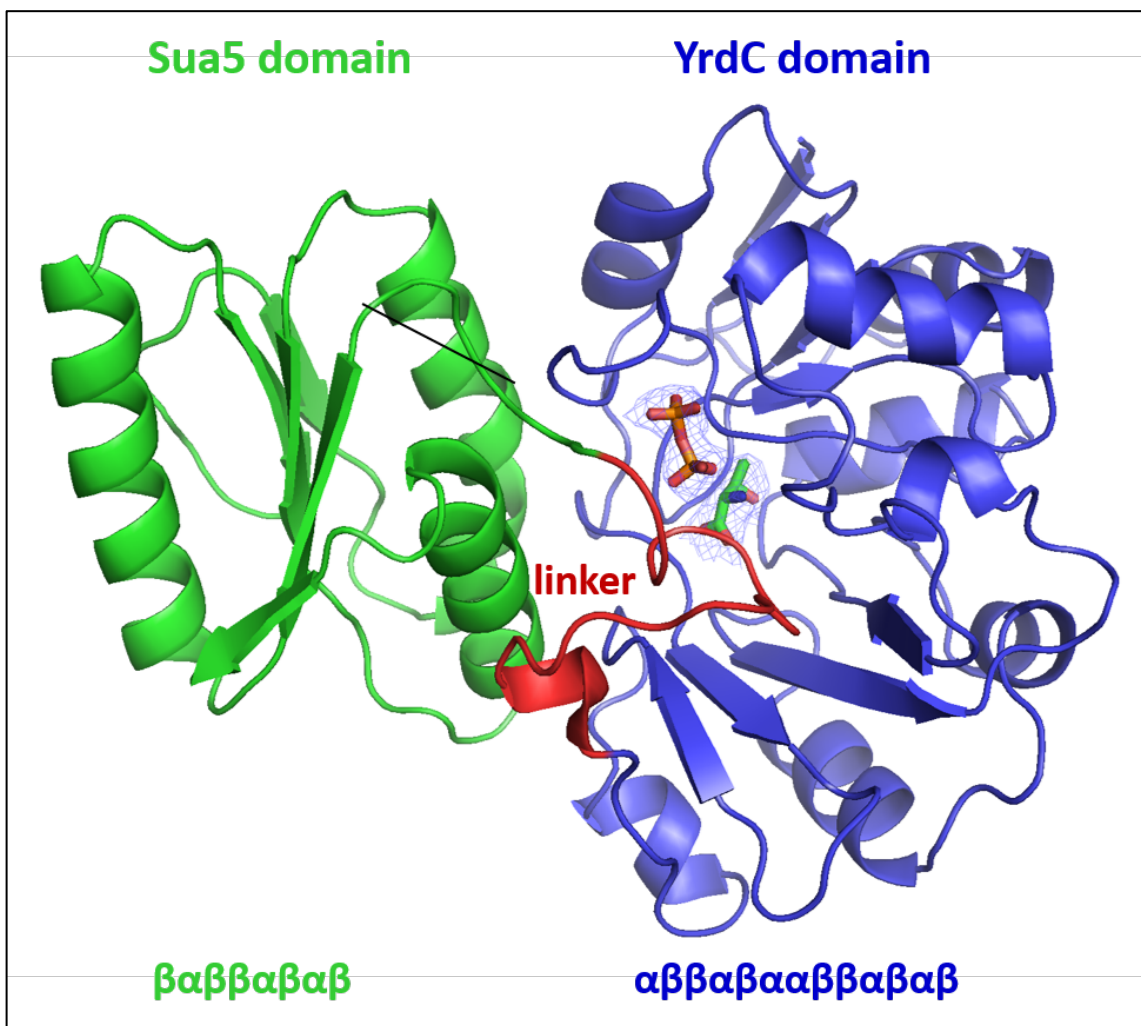


Fig. 3 Structure 3D de la protéine Sua5 de *P. abyssi* en complexe avec la *L*-thréonine et du pyrophosphate (densité électronique orange et verte, respectivement). La topologie des éléments de structure secondaire des domaines YrdC (N-terminal) et Sua5 (C-terminal) est montrée au bas de chacun des domaines. Le segment polypeptidique de 21 résidus reliant les domaines N- et C-terminaux est coloré en rouge. La densité électronique $2Fo-Fc$ est représentée pour les 2 ligands *L*-thréonine et pyrophosphate à 1.0σ .

Dans une étude collaborative précédente portant sur les protéines d'archée et de levure, nous avons montré que Sua5 et le complexe KEOPS de

P. abyssi ou de *S. cerevisiae* étaient nécessaires et suffisants pour permettre la synthèse de la modification t⁶A *in vitro*. Nous confirmons que Sua5/YrdC est capable de catalyser la synthèse de l'intermédiaire TCA en utilisant les substrats ATP, L-threonine et bicarbonate.

Nous montrons également que la protéine Sua5 possède une activité pyrophosphatase dépendant de l'ATP. Enfin nous avons résolu la structure tridimensionnelle de la protéine Sua5 de *P. abyssi* par radiocristallographie aux rayons X (Fig. 3). Cette structure de Sua5 en complexe avec une molécule de pyrophosphate fournit une base moléculaire pour la compréhension de son activité pyrophosphatase.

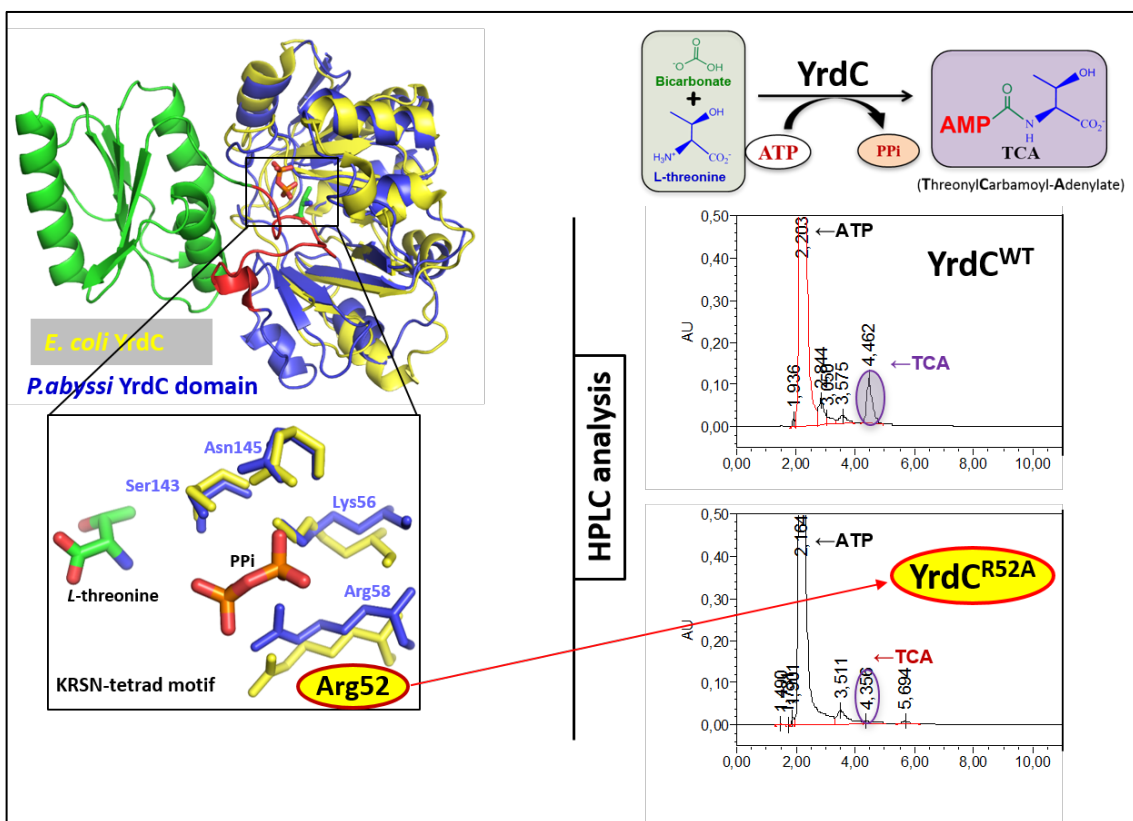


Fig. 4 La comparaison structurelle entre *P. abyssi* Sua5 et *E. coli* YrdC et TCA biosynthèse par YrdC.

Arg58 de *P. abyssi* Sua5 appartient au motif de tétrade KRSN qui est impliqué dans corodination de pyrophosphate. Basée sur la conservation structurelle de la tétrade motif KRSN entre *P. abyssi* Sua5 et *E. coli* YrdC, nous

muté Arg52 de *E. coli* et YrdC trouvé ce mutant ne est plus active dans la biosynthèse TCA (Fig. 4). nous concluons que la tétrade motif KRSN en protéines Sua5 / YrdC est directement impliqué dans la biosynthèse des TCA.

Protéines eucaryotes: *Saccharomyces cerevisiae*

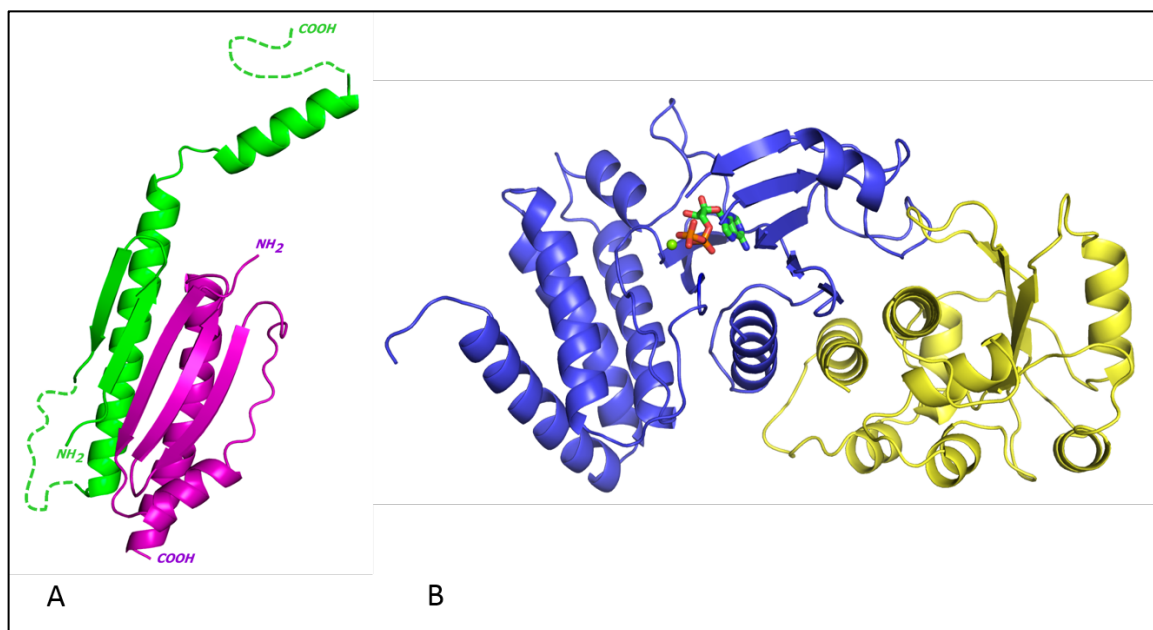


Fig. 5 Structures tri-dimensionnelles des 2 sous-complexes de levure Gon7-Pcc1 (A) et Bud32-Cgi121 (B)

Concernant les protéines de levure, nous avons résolu la structure tridimensionnelle par radiocristallographie aux rayons X des 2 sous-complexes de KEOPS: Gon7-Pcc1 et Bud32-Cgi121 (Fig. 5). Ces 2 structures nous ont permis de proposer un modèle du complexe KEOPS de levure dans son ensemble dans lequel Gon7 s'associe à la sous-unité Pcc1 en adoptant une topologie structurale similaire à cette dernière et en empêchant la protéine Pcc1 de dimériser et donc empêchant par là même la dimérisation du complexe entier (ce qui est le cas pour le complexe KEOPS de *P. abyssi* comme indiqué sur la Fig. 6).

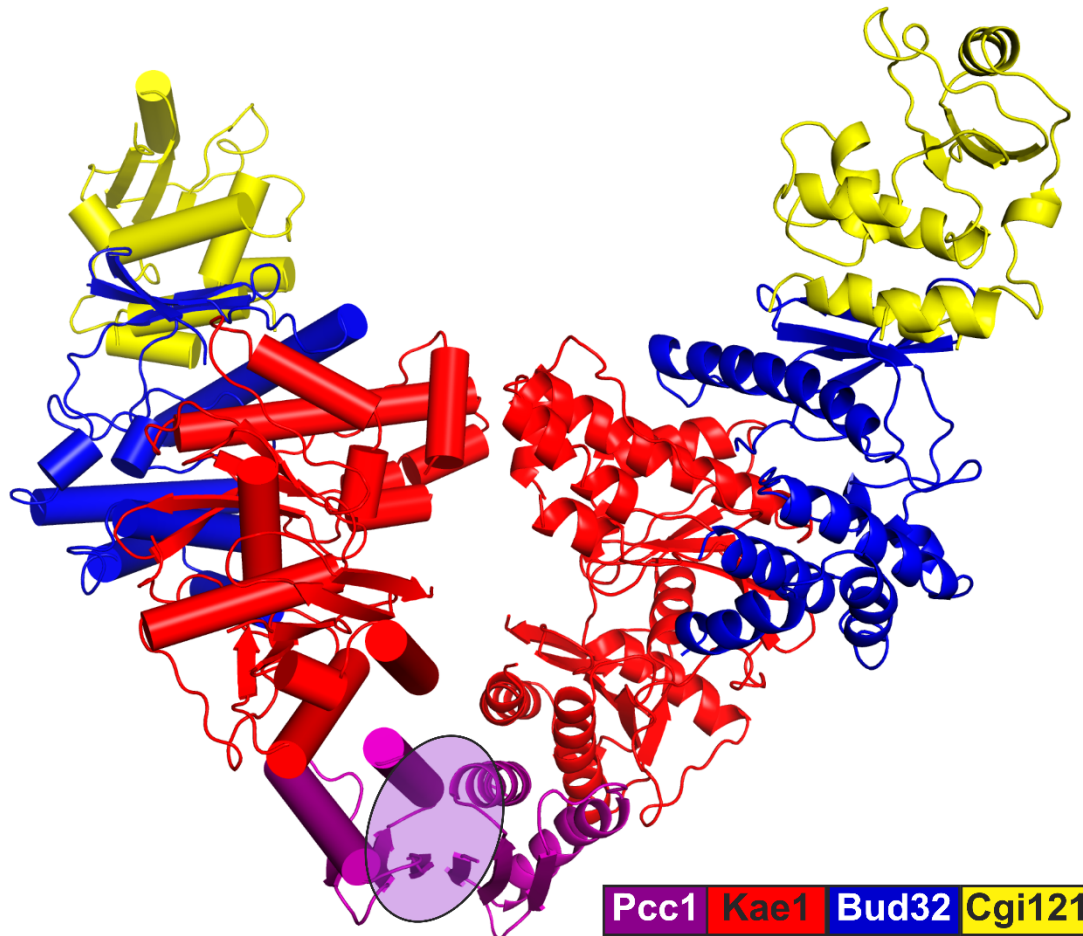


Fig. 6 Modèle structural du complexe KEOPS dimérique d'archées (selon Mao, D. Y. et al., 2008). Les 4 sous-unités Kae1 (rouge), Bud32 (bleu), Cgi121 (jaune) et Pcc1 (violet) sont positionnées selon un arrangement linéaire. Le complexe existe sous forme d'un dimère de tétramère se formant grâce à la sous-unité Pcc1 qui joue ici le rôle de plate-forme de dimérisation.

En effet, contrairement au complexe d'archée qui forme un dimère de tétramère, KEOPS de levure, de part la présence de sa 5^{ème} sous-unité Gon5, ne dimérise pas et forme un hétéro-pentamère en solution constitué d'une succession linéaire de 5 sous-unités (Fig. 7). De plus la structure de Bud32-Cgi121 en complexe avec une molécule d'ADP permet de mieux envisager le double rôle « Kinase » et « phosphatase » de la protéine Bud32. Le modèle pentamérique du complexe KEOPS de levure permet également de proposer un

site de fixation du substrat tRNA pouvant accommoder le transfert de l'intermédiaire TCA (Fig. 7).

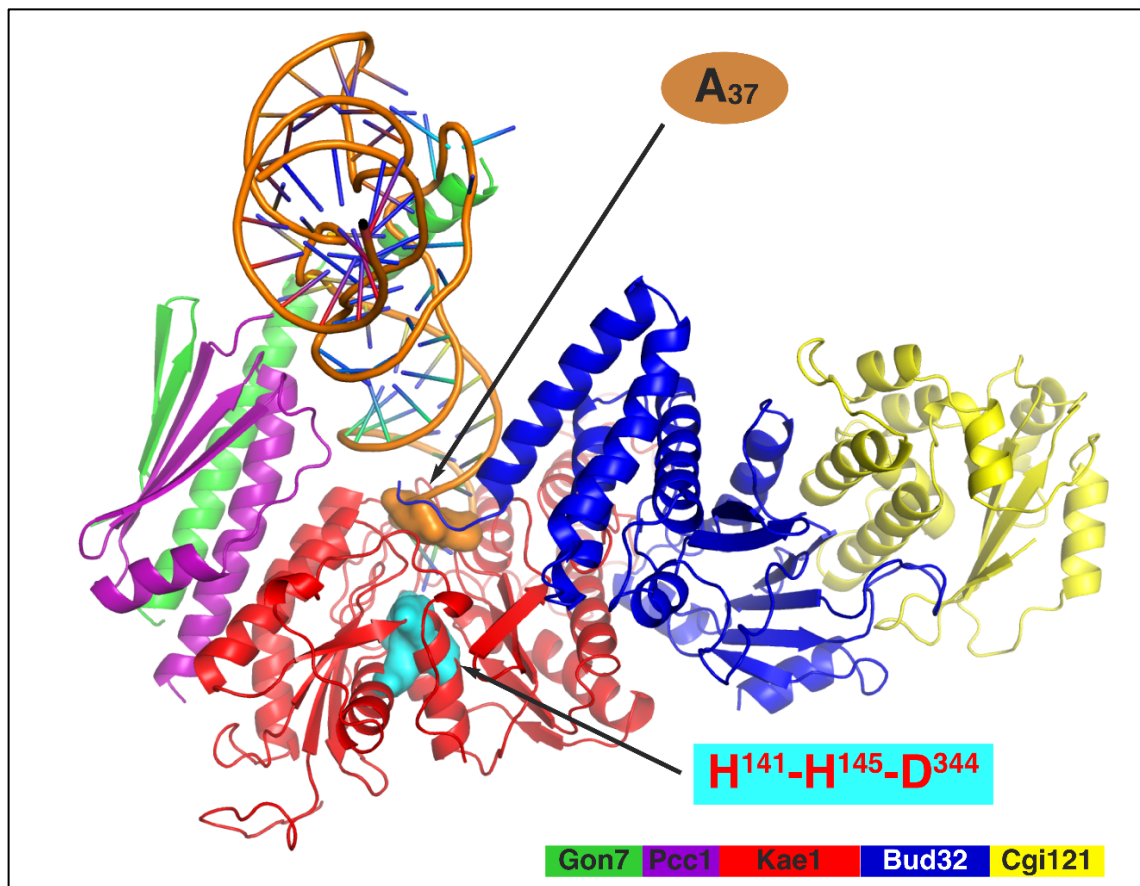


Fig. 7 Modèle proposé pour la structure du complexe KEOPS de levure en association avec le substrat de tRNA. Le complexe à été construit en utilisant les structures cristallographique des sous-complexe Bud32-Cgi121 et Gon7-Pcc1 de la figure 4 et une modélisation de la sous-unité Kae1 de levure avec la protéine Kae1 de *P. abyssi*. Dans ce modèle, Gon7 « mime » l'interface de dimerisation de Pcc1 (figure 5) et empêche la dimerisation des 5 sous-unités de levure qui ne peuvent pas s'associer en décimère. Le complexe KEOPS de levure s'organise donc linéairement en solution en un simple hétéro-pentamère.

Protéines Procaryotes: *Escherichia coli*

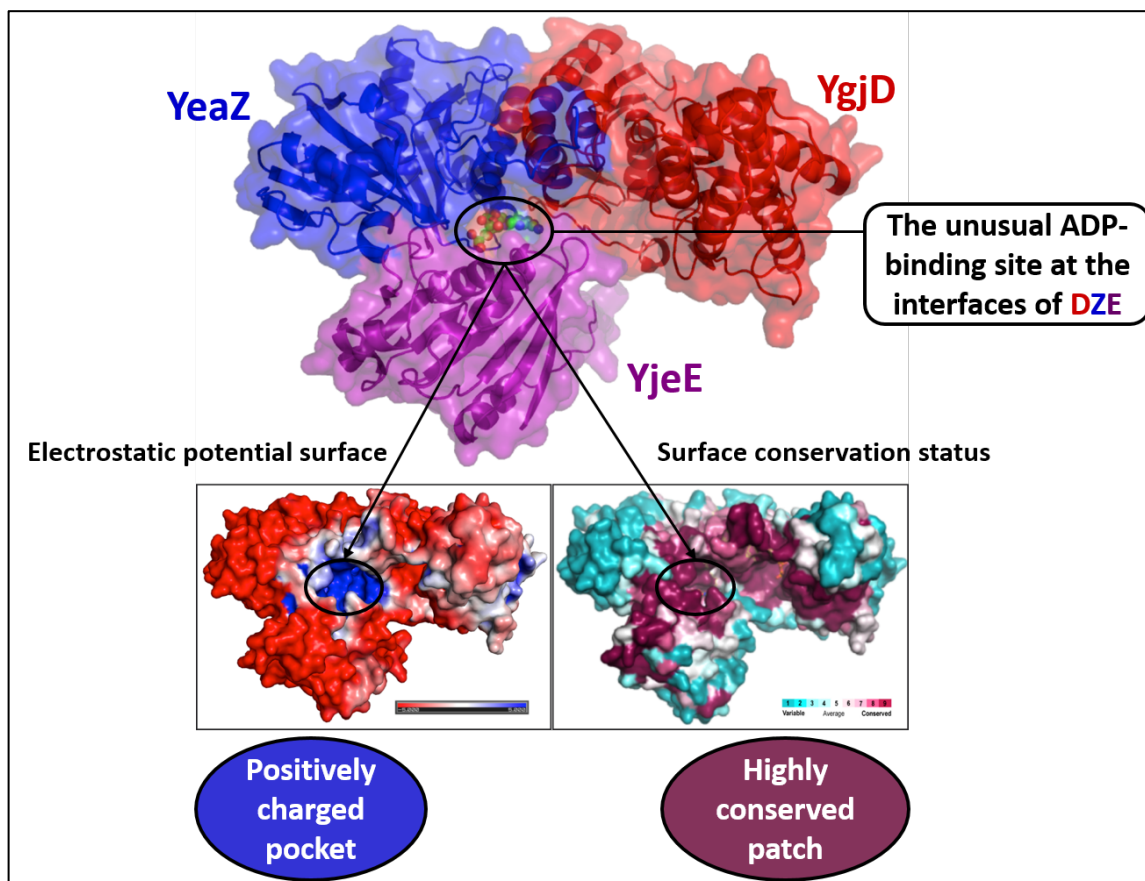


Fig. 8 Modèle proposé pour la structure du complexe trimérique YgjD-YeaZ-YjeE de *E. coli*. La structure cristallographique du sous-complexe YgjD-YeaZ laisse apparaître un site de fixation « inhabituel » d'une molécule d'ATP à la surface de YeaZ. Cette position a été utilisée pour ancrer la sous-unité YjeE en superposant son site de fixation de l'ATP sur le site « inhabituel » de fixation de la molécule d'ADP sur YeaZ. Le modèle résultant s'avère tout à fait compatible avec l'enveloppe générée par les données de SAXS couplé à une chromatographie d'exclusion sur laquelle a été déposé le complexe trimérique.

Une troisième partie de cette thèse est consacrée aux protéines bactériennes. Nous avons résolu la structure tridimensionnelle du sous-complexe hétérodimérique YgjD et YeaZ d'*E. coli* dans lequel un site de fixation

« inhabituel » d'une molécule d'ADP a pu être mis en évidence à la surface de YeaZ. Nous avons également étudié l'activité ATPase de YjeE et montré que cette activité était stimulée par l'interaction de YjeE au sous-complexe YgjD-YeaZ. YjeE peut donc interagir avec YgjD-YeaZ uniquement en présence d'ATP, cette interaction étant médiée par la formation du complexe YgjD-YeaZ et la fixation d'ATP à YjeE. Nous avons donc construit un modèle moléculaire du complexe ternaire YgjD-YeaZ-YjeE en faisant coïncider le site de fixation « inhabituel » de la molécule d'ADP sur YeaZ avec celui de la fixation d'ATP de YjeE (Fig. 8). Ce modèle est tout à fait compatible avec les données de SAXS couplé à une chromatographie d'exclusion obtenues sur un mélange des 3 protéines en présence d'ATP. Des études de mutagenèse dirigée ont ensuite montré que l'activité de transfert de l'intermédiaire TCA était due essentiellement à la sous-unité YgjD mais que le complexe ternaire YgjD-YeaZ-YjeE était essentiel à la modification t⁶A dans les bactéries, l'activité ATPase de YjeE n'étant pas strictement nécessaire.

L'ensemble des études structurales abordées dans cette thèse permet donc de mieux comprendre et de proposer un mécanisme catalytique de la modification t⁶A essentielle et ubiquitaire dans les 3 royaumes de la vie.

Comme le montre la Fig. 9, la modification t⁶A peut être découplée en 2 sous réactions : la première concerne les protéines de la famille YrdC/Sua5 dont l'activité pyrophosphatase conduit à la formation de l'intermédiaire TCA (ThreonylCarbamoylAdelynate) en greffant un résidu Carbamo-threonyl sur un molécule d'ATP et libérant une molécule de Pyrophosphate (PPi). Cet intermédiaire est ensuite pris en charge par les protéines de la famille du complexe KEOPS (ou YgjD-YeaZ-YjeE chez *E. coli*) sans qu'une interaction suffisamment stable entre YrdC/Sua5 et KEOPS n'ait pu être observée à ce jour. Le transfert du résidu carbamoyl-threonyl sur l'adenine en position 37 du ARNt est ensuite effectué par la sous-unité Kae1 du complexe KEOPS avec consommation d'une molécule d'ATP et libération d'une molécule d'AMP. La sous-unité YjeE se positionne à l'interface du dimère YgjD-YeaZ et maintient en

cohésion le complexe sous sa forme hétéro-trimérique prépondérante pour l'activité de Kae1. En revanche, l'activité ATPasique de YjeE ne semble pas indispensable pour la synthèse de la modification t⁶A mais jouerait vraisemblablement un rôle de dissociation du complexe et/ou de libération des produits (Fig. 9).

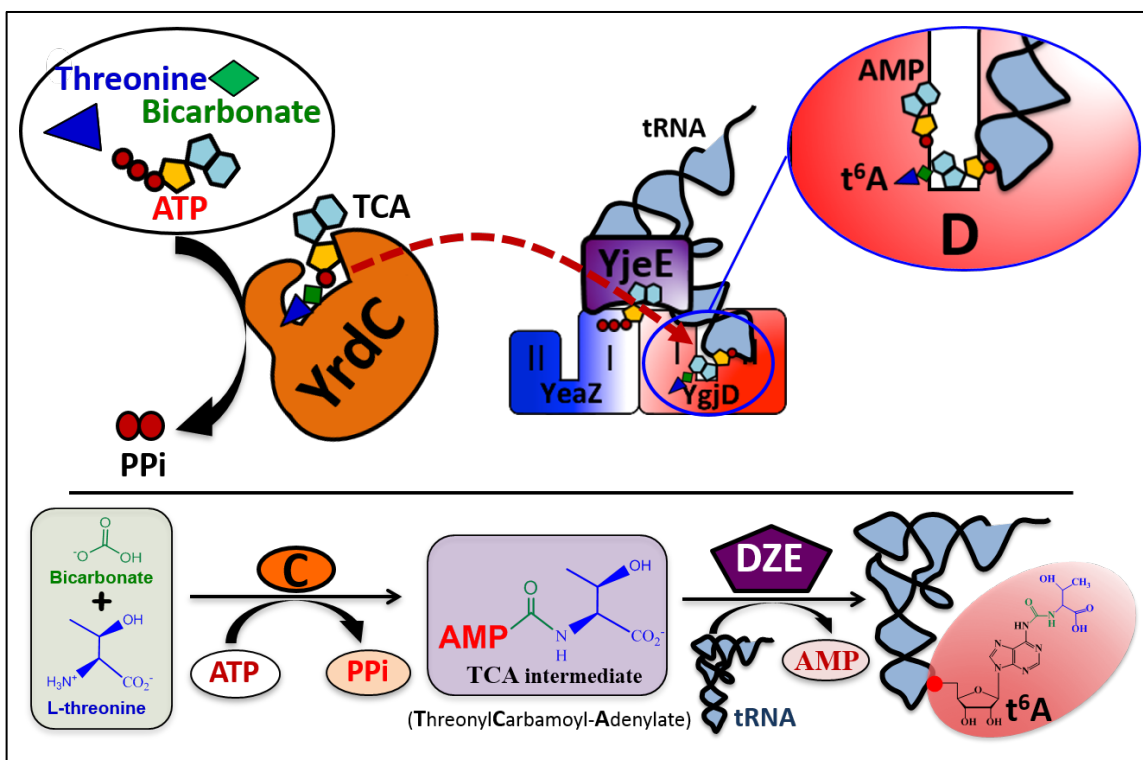


Fig. 9 Mécanisme réactionnel proposé chez *E. coli*, rendant compte de la synthèse de la modification t⁶A à partir des substrats ATP, bicarbonate, L-thrénine et ARNt.