



HAL
open science

**Etude biochimique et structurale de deux enzymes de
thiolation des ARNt dépendantes d'un centre [4Fe-4S] :
la s2U54-ARNt thiolase TtuA et la s2U34-ARNt
thiolase NcsA**

Louise Bimai

► **To cite this version:**

Louise Bimai. Etude biochimique et structurale de deux enzymes de thiolation des ARNt dépendantes d'un centre [4Fe-4S] : la s2U54-ARNt thiolase TtuA et la s2U34-ARNt thiolase NcsA. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris sciences et lettres, 2018. Français. NNT : 2018PSLET045 . tel-03270824

HAL Id: tel-03270824

<https://theses.hal.science/tel-03270824>

Submitted on 25 Jun 2021

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.

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée au Collège de France

Etude biochimique et structurale de deux enzymes de thiolation des
ARNt dépendantes d'un centre [4Fe-4S] : la s²U₅₄-ARNt thiolase
(TtuA) et la s²U₃₄-ARNt thiolase (NcsA).

Ecole doctorale n°515

Complexité du vivant

Spécialité Biologie Cellulaire

**Soutenue par Ornella BIMAI
Le 20 novembre 2018**

Dirigée par Dr Béatrice
GOLINELLI-PIMPANEAU

Confidentiel jusqu'au 1 janvier 2021

COMPOSITION DU JURY :

Mme MAUREL Marie-Christine
Professeur à l'UPMC Curie, Présidente
du jury

**Mme OLLAGNIER DE CHOUDENS
Sandrine**
Directeur de recherche au CEA-
Grenoble, Rapporteur

M GRAILLE Marc
Directeur de recherche à l'Ecole
Polytechnique, Rapporteur

M ATTA Mohamed
Ingénieur chercheur au CEA-Grenoble,
Examineur

Mme TISNE Carine
Directeur de recherche à l'Institut de
Biologie physico-chimique, Examineur

M FONTECAVE Marc
Professeur au Collège de France,
Examineur

Mme GOLINELLI-PIMPANEAU
Directeur de recherche au Collège de
France, Examineur



Résumé

Les ARN de transfert (ARNt) sont des composants essentiels de la machinerie de traduction génétique. Pour être fonctionnels, ces ARNt subissent des modifications chimiques post-transcriptionnelles. Ces modifications permettent d'améliorer la reconnaissance entre l'ARNt et ses partenaires durant la traduction et assurent ainsi la fidélité et l'efficacité de la traduction. Le soufre est présent dans plusieurs nucléotides au sein de ces ARNt, comme dérivé de la thiouridine (s^4U_8 , s^2U_{34} , $m^5s^2U_{54}$), de la 2-thioadénosine ($ms^2i^6A_{37}$, $ms^2t^6A_{37}$) et la 2-thiocytidine (s^2C_{32}). Mon projet a consisté en l'étude structurale et fonctionnelle d'enzymes de la famille TtcA/TtuA, une superfamille dépendante d'un centre [FeS] impliquée dans la thiolation des ARNt.

La thiolation de la méthyl-uridine universellement conservée à la position 54, catalysée par l'enzyme TtuA, stabilise les ARNt de bactéries thermophiles et d'archées hyperthermophiles et est nécessaire pour la croissance à haute température de ces organismes. La thiolation de l'uridine en position 34 dans la boucle de l'anticodon, qui est nécessaire pour une croissance normale et la résistance aux stress chez la levure, est effectuée par deux systèmes complètement différents : la protéine MnmA qui a été bien étudiée et présente chez les bactéries et les mitochondries des organismes eucaryotes et les protéines Ncs6/NcsA/Ctu1 dans tous les autres organismes, dont le cytoplasme des eucaryotes. Des études spectroscopiques, cristallographique et des tests d'activité de TtuA et NcsA ont montré que: (i) le centre [4Fe-4S] est coordonné par seulement trois cystéines qui sont entièrement conservées, permettant au quatrième fer de fixer du sulfure exogène, qui agit probablement comme agent sulfurant ; (ii) le site de fixation de l'ATP est adjacent au centre [4Fe-4S]. Un nouveau mécanisme de sulfuration des ARNt a été proposé, dans lequel l'atome de fer non liant du centre [4Fe-4S] catalytique fonctionne comme transporteur de soufre, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives sur la fonction des centres [Fe-S] en biologie.

Abstract

Transfer RNAs are essential components of cellular translation machinery. To achieve their function they possess several post-transcriptional chemical modifications. These modifications improve recognition between tRNA and its partners during translation and thus ensure translation fidelity and efficiency. Sulfur is present in several of these modified nucleotides: as thiouridine and its derivatives (s^4U_8 , s^2U_{34} , $m^5s^2U_{54}$), 2-thioadenosine derivatives ($ms^2i^6A_{37}$, $ms^2t^6A_{37}$) and 2-thiocytidine (s^2C_{32}). My project consisted in the structural and functional study of enzymes of the TtcA/TtuA family a [4Fe-4S]-dependent superfamily, involved in the thiolation of transfer RNAs (tRNAs). My aim was to show that enzymes that catalyze the simple non-redox substitution of the C2-uridine carbonyl oxygen by sulfur at position 54 (TtuA) and 34 (Ncs6/Ctu1/NcsA) in tRNAs use an iron-sulfur cluster cofactor and elucidate the biochemical and structural mechanisms of the TtuA and NcsA reactions.

The thiolation of the universally conserved methyl-uridine at position 54, catalyzed by TtuA, stabilizes tRNAs from thermophilic bacteria and hyperthermophilic archaea and is required for growth at high temperature of these organisms. On the other hand, the thiolation of uridine 34 in the anticodon loop of tRNAs, which is required for normal growth and stress resistance in yeast, is carried out by two completely different systems: the well-studied MnmA protein (present in bacteria and in the eukaryotic mitochondrion) and the Nsc6/NcsA/Ctu1 proteins in all other organisms, including the eukaryotic cytoplasm. Spectroscopic and crystallographic analysis, together with activity tests enzymatic of TtuA and NcsA showed that: (i) the [4Fe-4S] cluster is ligated by three cysteines only that are fully conserved, allowing the fourth unique iron to bind an exogenous sulfide, which likely acts as the sulfurating agent; (ii) the ATP-binding site is adjacent to the cluster. A new mechanism for tRNA sulfuration was proposed, in which the unique iron of the catalytic [4Fe-4S] cluster functions as a sulfur carrier, opening new perspectives regarding functions of iron-sulfur cluster in biology.

Remerciements

Cette partie m'a pris beaucoup de temps à écrire non pas parce que je n'avais personne à remercier, car dans ma mémoire les personnes à remercier sont présentes, dans mon esprit le texte était prêt. Mais il me semblait plus facile de m'adresser directement à ces personnes. Cependant pour rester dans l'une des idées d'un manuscrit de thèse, je vais jouer le jeu en essayant de remercier au mieux les personnes qui m'ont permis de réaliser cette thèse, celles qui me sont chères et celles qui m'ont accompagnée dans ce voyage.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'être venus jusqu'à Paris pour juger ma soutenance de thèse.

Je tiens également à remercier le Dr Béatrice Golinelli-Pimpaneau, avec qui tout a commencé lorsqu'elle m'a pris sous son aile lors de mon stage de deuxième année de master au sein du laboratoire. Et par la suite m'a accompagnée et encadrée durant cette thèse. Merci pour toutes les discussions scientifiques très enrichissantes, qui ne pouvaient que me permettre de murir en tant que scientifique et personne. Mais aussi pour les discussions plus légères sur tout (la vie, les voyages...). Je reste tout aussi admirative de la rigueur et la précision mise dans tout ce que tu réalises et j'espère ressortir avec un peu de celles-ci. Merci d'avoir pris le temps d'apporter des corrections pertinentes au manuscrit.

Je remercie tout particulièrement le Pr Marc Fontecave, qui non seulement m'a accueillie dans son laboratoire, mais il m'a aussi permis d'évoluer dans un cadre professionnel idéal au sein du Collège de France. Votre disponibilité et vos conseils toujours pertinents, m'ont aiguillée sur le projet et permis de rester sur la bonne voie. Vous avez mis en place au sein du laboratoire un cadre propice pour apprendre et évoluer. Merci encore de m'avoir offert cette opportunité et bien d'autres. Et enfin, il est toujours agréable pour un étudiant de pouvoir parler avec son chef de tout et de rien et cela même quand il s'agit de son style musical préféré (RnB).

À toi Simon, merci de m'avoir formée, aiguillée et merci de suivre l'évolution de ton petit poulain, même de loin. J'espère ne pas avoir été l'étudiante la plus difficile que tu aies eu à encadrer, dans tous les cas j'imagine la patience que cela a pu te demander d'enseigner les secrets des FeS à une FeS-ignorante que j'étais et pour cela je t'en remercie. Et grâce à toi, je peux aujourd'hui me lancer vers d'autres horizons.

Merci à toutes les différentes personnes qui ont collaboré avec nous lors de ces trois années : Nadia Touati et Laurent Binet, Jean-Luc Ravanat, Mohamed Atta et Pierre Legrand. Mais aussi à Anthony et Lydia, les deux stagiaires qui m'ont permis d'avancer sur le sujet.

Un merci particulier pour Ahmid (Dr Mohamed Atta), qui a accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, tout en participant au projet. Et merci d'avoir suivi mes avancements même en étant à Grenoble.

Merci à tous les membres du laboratoire, qui ont toujours su se montrer disponibles pour d'éventuelles discussions.

Je vais devoir citer certaines personnes du labo, qui m'ont soutenue et accompagnée pendant toutes ces années dans les rires comme dans les pleurs (de rire bien souvent) : Ceci, Greg, Dilan, Dona, Nisha, Xia, Yfan, Cameroun, Giorgette, Pierrot.

Remerciements

Bruno (Bubu MacGyver), merci de ton aide et de ton amitié tout au long de ces trois années, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Tu as toujours su trouver des solutions aux différents problèmes que j'ai pu t'exposer et tu as toujours su rebondir même face aux situations les plus désespérées. Tu es le meilleur !

Jess, merci de ton aide et de ta grande disponibilité. Grâce à ton boulot d'experte, j'ai toujours pu avancer dans ma recherche. Et merci de tous ces bons moments de fou rire.

Il y a les uns et puis il y a eu : Johnny Boy et ses conneries, Thibs et son savoir et Charly et sa passion, que dire à part mes journées n'auraient pas été les mêmes sans vous. J'ai vécu avec certains et passé du temps (beaucoup) avec d'autres, mais au final vous êtes comme la famille. Merci d'avoir toujours répondu présent (même pour mes caprices). Charly et Thibs, je suis la dernière à partir, mais je me demande si je dois emmener Johnny Boy avec moi.

Je ne peux clore cette partie sans te remercier Mango (AKA Dr Gomez) pour ton amitié qui m'est très précieuse et de tes nombreux conseils.

Arnaud, je ne te remercierai jamais assez d'avoir été la première personne à avoir autant cru en moi et cela depuis mes années BTS. Tu m'as permis d'apprendre à tes côtés et m'as initiée à la cristallographie des protéines. Et cela même si en thèse, j'ai très rapidement dû apprendre que l'on ne peut pas toujours n'avoir que des protéines qui cristallisent. Tu n'as pas seulement été mon professeur mais aussi un mentor. Tes bons conseils m'ont permis de réaliser ma thèse dans le laboratoire de Marc et je t'en remercie.

Camille, Anaïs, Steph, Johnny, je vous mets en transition de cette partie car vous pourriez tout aussi bien être mis dans la seconde partie. Que dire de ces belles années passées à Nancy ou même bien après. Malgré la distance, je sais que je peux toujours compter sur nos discussions et surtout sur Camille pour tous nous réunir. Vous êtes mes précieux !

Cette partie s'adresse à ma chère famille et à mes amis.

Tout d'abord merci à mes parents, qui ont toujours cru en moi et pour leur soutien sans faille. Grâce à vous j'ai pu garder les pieds sur terre et toujours avancer la tête haute. Vous êtes mes piliers et mes modèles. Vous m'observez peut-être de loin, mais je sais que je reste près de votre cœur et je reste et resterais votre fille adorée.

À Yann et Éric mes frères bien-aimés, votre présence et votre bonne humeur constante apportent paix et équilibre dans ma vie. Merci pour vos leçons de vie quotidienne. Éric, je continuerai à suivre tes pas et Yann à tracer ton chemin.

Je remercie aussi toute ma famille éparpillée aux quatre coins du monde. Avoir une grande et belle famille est une richesse et chance dont je ne saurais me passer.

À mes boys, Arnaud, Alio et Hervé, que dire à part que chaque moment passé à vos côtés compte et ce n'est que le commencement d'une longue et belle aventure qui nous attend.

À mes girls Olivia, Vanessa, Charlène et Carole, votre rencontre a été une bouffée d'oxygène. Je continuerai d'évoluer sous vos ailes mes anges adorés.

À tous mes ami(e)s que je n'ai pas directement cités, je ne vous oublie pas et vous remercie également de m'avoir accompagnée.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
I) LES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT (ARNt).....	3
I-1) Caractéristiques structurales des ARNt	3
I-2) Fonction des ARNt	6
I-3) Biosynthèse des ARNt.....	8
II) LES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES DES ARN DE TRANSFERT ..	10
II-1) Diversité des modifications chimiques des nucléotides	10
II-2) Localisation et fréquence des nucléotides modifiés dans les ARNt.....	13
II-3) Rôles physiologiques des modifications post-transcriptionnelles	14
II-3-a) Rôle des nucléotides modifiés dans le repliement et la stabilité des ARNt	14
II-3-b) Fonction des modifications dans l'efficacité et la fidélité de la traduction.....	18
II-3-c) Fonction des modifications dans la reconnaissance des partenaires cellulaires.....	20
II-3-d) Les nucléotides modifiés et l'adaptation aux changements environnementaux	22
III) LE SOUFRE.....	22
III-A) Le soufre et son importance en biologie	22
III-B) La L-cystéine comme donneur de soufre	25
III-B-1) Cas de la L-cystéine désulfurase	25
III-B-2) Cas de la cystéine lyase et la cystéine désulfidase.....	26
III-B-3) Les centres [Fe-S]	28
III-B-4) Les transferts de soufre par persulfuration de cystéines dans la voie de biosynthèse des ARNt modifiés	29
III-B-4-a) Cas du relais de transfert de soufre Tus	30
III-B-4-b) Cas du relais de transfert de soufre de type ubiquitination.....	31
i. La voie de transfert de soufre de type ubiquitination dans le cytoplasme	31
ii. La voie des TtuABCD.....	32
III-C) Le soufre dans les thionucléotides.....	33
III-C-1) Les thionucléotides dans les ARNt.....	33
III-C-2) Les enzymes de thiolation des ARNt et leur mécanisme réactionnel	34
III-C-2-a) La simple substitution d'un atome d'oxygène par un soufre utilisant la chimie des persulfures	35
i. U34-ARNt 2-sulfurtransférase MnmA	36

ii. U8-ARNt 4-sulfuretransférase (ThiI).....	37
III-C-2-b) L'activation du nucléotide cible par les enzymes à radicale SAM : l'ARNt méthylthiotransférase	38
OBJECTIF DE THÈSE	40
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41
CHAPITRE I: BIOSYNTHESE DE LA 2-THIOCYTIDINE : C₃₂-ARNt-2-SULFURTRANSFERASE (TTCA)	55
A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	55
B. RESULTAT ET DISCUSSION.....	60
B-I) ANALYSE DE LA PROTÉOLYSE NATURELLE DE TTCA D'E. COLI.....	60
B-II) PRODUCTION ET PURIFICATION DES MUTANTS DE LA PROTÉINE TTCA D'E. COLI	62
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65
CHAPITRE II: BIOSYNTHESE DE LA 5-METHYL-2-THIOURIDINE: M⁵U₅₄-ARNt-2-SULFURTRANSFERASE (TTUA).....	67
A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	67
B. ETUDE DU MECANISME DE THIOLATION NON-REDOX DES ARN DE TRANSFERT PAR ACTIVATION VIA UN CENTRE [4FE-4S]	74
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83
CHAPITRE III : BIOSYNTHESE DE LA 2-THIOURIDINE: U₃₄-ARNt-2-SULFURTRANSFERASE.....	86
A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	86
A-1) Importance des modifications en U34, pour la reconnaissance du codon.....	86
A-2) Les modifications sur U34 permettent de réguler finement la traduction génétique	88
A-3) Absence de la modification sur U34 et maladies	89
A-4) Les enzymes responsables de la thiolation en position U34	89
B. UN CENTRE [4FE-4S] EST UTILISE POUR LA THIOLATION DE L'URIDINE 34 DANS LES ARNt CHEZ LES ARCHEES, UNE MODIFICATION IMPORTANTE POUR LE DECODAGE PRECIS DE L'INFORMATION GENETIQUE.....	95
B-I) EXPRESSION, PRODUCTION, PURIFICATION DE CTU1 ET/OU CTU2 HUMAINE.....	95

B-II) PRODUCTION, PURIFICATION ET RECONSTITUTION DU CENTRE [Fe-S] PRÉSENT DANS LA PROTÉINE NCSA DE <i>M. MARIPALUDIS</i> (MM NCSA)	96
B-III) STRUCTURE CRISTALLINE DE NCSA DE <i>METHANOCOCCUS MARIPALUDIS</i>	100
B-IV) TEST D'ACTIVITÉ <i>IN VITRO</i> DE NCSA DE <i>M. MARIPALUDIS</i>.....	102
B-V) ETAT DU CENTRE [4Fe-4S] AU COURS DE LA RÉACTION	103
C. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	105
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107
CONCLUSION GENERALE.....	112
MATERIELS ET METHODES.....	114
A. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	114
A-I) MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET MILIEUX DE CULTURE	114
Souches bactériennes utilisées.....	114
A-I-1-a) <i>E. coli</i> DH5 α (DE3)	114
A-I-1-b) <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	114
A-I-1-c) <i>E. coli</i> BL21 (DE3) star codon plus	114
A-I-2) Les vecteurs utilisés.....	115
A-I-2-a) pGEX-6p-2	115
A-I-2-b) pBG102 (Center for Structural Biology, Vanderbilt university).....	116
A-I-3) Milieux de culture	117
A-I-4) Solutions à usage courant	117
A-II) BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	117
A-II-1) Les vecteurs utilisés	117
A-II-2) Mutagenèse dirigée	118
B. METHODES BIOCHIMIQUES	120
B-I) PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTÉINES RECOMBINANTES	120
B-I-1) Production des protéines recombinantes	120
B-I-1-a) Production et purification de TtcA d' <i>E. coli</i> , ses mutants et de NcsA de <i>M. maripaludis</i>	120
i. Production de TtcA sauvage, TtcA 1-291 et TtcA 14-289 tronquée d' <i>E. coli</i>	120
ii. Production de NcsA de <i>M. maripaludis</i>	120

B-I-1-b) Lyse cellulaire	121
B-I-2) Purification des protéines recombinantes	121
B-I-2-a) Première étape de purification des protéines : chromatographie d'affinité	121
i. Chromatographie d'affinité à la glutathion-S-transférase (GSTRAP): purification de la protéine GST-TtcA sauvage et GST-TtcA 1-291	121
ii. Chromatographie d'affinité aux ions nickel (Ni-NTA) : $_{6\text{His-SUMO-TtcA}}$ 14-289 d'E. coli et $_{6\text{His-SUMO-NcsA}}$ de <i>M. maripaludis</i>	122
B-I-2-b) Clivage de la protéine de fusion GST ou $_{6\text{His-SUMO}}$ par la protéase 3C du rhinovirus humain (PreScision)	122
B-I-2-c) Deuxième étape de purification : chromatographie d'affinité inverse ou chromatographie d'échange de cations	123
i. Chromatographie d'affinité à la glutathion-S-transférase inverse: purification de la protéine TtcA sauvage et TtcA 1-291 (GSTRAP inverse)	123
ii. Chromatographie échangeuse de cations (MonoS): purification de la protéine TtcA 14-289 et NcsA	123
B-I-2-d) Troisième étape de purification : chromatographie d'exclusion stérique	124
B-I-3) Détermination de la concentration des protéines	124
B-II) RECONSTITUTION DU CENTRE [4Fe-4S] DES PROTÉINES EN BOÎTE À GANTS	124
B-II-1) Préparation de l'apoprotéine NcsA	125
B-II-2) Reconstitution du centre [FeS]	125
B-II-3) Quantification du centre [Fe-S]	126
B-II-3a) Dosage des atomes de Fer	126
B-II-3b) Dosage des atomes de soufre	127
B-III) PRODUCTION, EXTRACTION ET PURIFICATION D'ARN DE TRANSFERT SUBSTRAT DE <i>MMNCSA</i>	127
B-III-1) Extraction et purification des ARNt totaux de la souche <i>mmmA-</i> d'E. coli	127
B-III-2) Transcription in vitro et purification de l'ARNtlysUUU de <i>M. maribaludis</i>	128
B-IV) TEST D'ACTIVITÉ <i>IN VITRO</i> DE L'HOLO-NCSA	129
B-IV-1) Conditions expérimentales	129
B-IV-2) Visualisation des produits d'ARNt thiolés : gel retard d'APM en condition dénaturante	129
B-IV-3) Digestion des ARNt et analyse des nucléotides modifiés	130
B-V) CARACTÉRISATION SPECTROSCOPIQUE DU CENTRE [Fe-S]	130
B-VI) CRISTALLISATION, COLLECTE DES DONNÉES DE DIFFRACTION AUX RAYONS X ET DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE DES PROTÉINES	131
B-VI-1) Cristallogénèse des protéines	131
B-VI-1-a) Principe et technique de la cristallisation	131

i. Principe de la cristallisation.....	131
ii. Technique utilisée : diffusion en phase vapeur	133
B-VI-1-b) Recherche et amélioration des conditions de cristallisation.....	135
B-VI-1-c) Optimisation des cristaux de <i>MmNcsA</i>	135
B-VI-2) Congélation, enregistrement et traitement des données de diffraction aux rayons X	137
B-VI-2-a) Congélation des cristaux.....	137
B-VI-2-b) Enregistrement des données de diffraction.....	138
B-VI-2-c) Traitement des données de diffraction aux rayons X	139
i. Détermination des paramètres de maille ainsi que le réseau de Bravais	139
ii. Intégration des données et mise à l'échelle	141
iii. Contenu de l'unité asymétrique et coefficient de Matthews	
asymétrique et coefficient de Matthews	141
B-VI-3) Phasage et affinement de la structure de l'holo-NcsA.....	142
B-VI-3-a) Phasage par remplacement moléculaire.....	142
i. Le remplacement moléculaire	142
ii. La diffusion anormale.....	143
B-VI-3-b) Construction du modèle et affinement de la structure	143
i. Construction du modèle de l'holo-NcsA.....	143
ii. Affinement des facteurs de structure.....	144
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146
ANNEXES.....	148

INTRODUCTION GENERALE

Les organismes vivants sur terre forment trois domaines de vie nommés : (i) les procaryotes, (ii) les archées et (iii) les eucaryotes. Ces organismes ont des caractéristiques communes: (i) une membrane, constituée d'une double couche lipidique, qui sépare les espaces intracellulaire et extracellulaire ; (ii) des acides désoxyribonucléique (ADN) qui contiennent l'information génétique de la cellule ; (iii) des acides ribonucléique (ARN) qui sont impliqués dans différentes réactions dont la transcription et la traduction ; et enfin (iv) les protéines qui sont produites lors de l'étape de traduction et qui assurent une multitudes de fonctions biologiques (structure, fonction et régulation des organes et tissus cellulaires).

Comment la vie est apparue sur terre reste un mystère. La découverte d'ARN catalytiques (ribozymes) capables de synthétiser une nouvelle molécule d'ARN à partir d'un précurseur et d'une matrice d'ARN suggère que les premiers organismes vivants étaient capables autoréplication de l'ARN (Le monde des ARN) (Belfort, 1994; Lazcano and Miller, 1996). Les ARN seraient ainsi les précurseurs du monde du vivant tel que nous le connaissons aujourd'hui (le monde de l'ADN/Protéine). Cependant, même si ces ARN sont capables de catalyser différentes réactions cellulaires importantes, ces molécules possèdent des fonctions chimiques limitées et ne sont donc pas capables de faire face à certains défis cellulaires (Chen et al., 2007; Joyce, 2002). Lors de l'évolution, une étape importante conduisant aux organismes vivants de nos jours a été l'apparition de l'ADN et des protéines responsables de la majorité des fonctions catalytiques cellulaires (Chen et al., 2007; Joyce, 2002), mais il n'est pas clair si l'apparition des protéines précède ou suit celle de l'ADN. Il a été proposé que l'ADN ait été introduit comme porteur du matériel génétique pour pallier la faible stabilité des ARN et permettre la synthèse protéique (Joyce, 2002).

Tous les ARN (ARNm, ARNr, ARNt...) présentent de façon ubiquitaire des modifications post-transcriptionnelles de leurs nucléotides, ce qui augmente la diversité chimique de ces briques élémentaires du monde du vivant. Le premier nucléotide modifié a été identifié dans l'ADN en 1950, la 5-méthycytosine (Wyatt, 1950). Ensuite, d'autres modifications ont été décrites dans les ARNt et les ARNm (Björk and Kohli, 1990; Gilbert et al., 2016; Hoernes et al., 2016). Il existe à ce jour plus de 100 modifications répertoriées dans les ARNt, qui sont les ARN présentant la plus grande variété chimique de modifications (Boccaletto et al., 2018). Le rôle de ces modifications dans les ARNt a été très étudié ainsi que les enzymes responsables de ces modifications dont beaucoup ont été conservées au cours de l'évolution.

Parmi toutes les modifications chimiques répertoriées, je me suis focalisée durant ma thèse sur la thiolation des ARNt, catalysée par des thiolases. L'introduction de ma thèse traitera ainsi

dans un premier temps de la biosynthèse, la structure et la fonction des ARNt. Une seconde partie abordera le rôle cellulaire de ces modifications, puis les différents mécanismes de thiolation des ARNt et enfin des caractéristiques des thiolases dépendantes d'un centre [Fe-S].

I) LES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE TRANSFERT (ARNt)

Les ARNt sont de courtes séquences d'ARN non codant simple brin, qui jouent un rôle clé dans la traduction génétique en décodant les codons portés par l'ARNm en acides aminés suivant les règles du code génétique. Afin de remplir leur fonction, ils adoptent une structure très caractéristique.

I-1) Caractéristiques structurales des ARNt

Les ARNt sont des polymères de ribonucléotides, constitués d'une base (Purines : Adénine (A) et guanine (G) ou pyrimidine : cytosine (C) et uracile (U)) et d'un 2' OH-ribose. Les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiester impliquant l'oxygène 3' du ribose d'un nucléotide (n) et l'oxygène 5' du ribose du nucléotide suivant (n+1). L'enchaînement des nucléotides est spécifique à chaque ARNt et constitue sa structure primaire

Figure 1a. Les ARNt sont constitués de 70 à 98 nucléotides, le système de numérotation conventionnel utilisé pour répertorier les nucléotides dans la séquence, en partant de l'extrémité 5' (nucléotide 1) jusqu'au nucléotide situé à l'extrémité 3' (nucléotide 76) (Sprinzl et al., 1998).

Les ARNt se replient en adoptant une structure secondaire canonique en « feuille de trèfle » **Figure 1b**, définie par une série d'appariements Watson-Crick constitués de liaisons hydrogène entre bases complémentaires (A:U et G:C). Ces nucléotides peuvent aussi avoir des appariements non canoniques de type « wobble » (bancale comme G:U). On peut définir cinq régions dans la structure secondaire des ARNt : (i) la tige acceptrice, les tiges-boucles (ii) D et (iii) T, qui doivent leur nom à la présence des modifications dihydrouridine et ribothymidine, respectivement ; (iv) la boucle variable et enfin (v) la tige-boucle de l'anticodon.

- (i) La tige acceptrice composée généralement de 7 paires de bases, comporte à l'extrémité 3' la séquence CCA, dont l'adénosine peut lier un acide aminé spécifique, attachement réalisé par les aminoacyl-ARNt synthétases.
- (ii) La tige D est constituée de trois à quatre paires de bases et la boucle D possède une longueur variable de sept à onze nucléotides.
- (iii) La tige T forme 5 paires de bases et la boucle T comporte sept nucléotides.

- (iv) La boucle variable doit son nom à sa grande diversité de longueur. Les ARNt sont ainsi séparés en deux classes : (i.) la classe I qui est la plus abondante et possède une petite boucle variable de quatre à cinq nucléotides et (ii.) la classe II, qui possède une longue boucle variable de dix à vingt-quatre nucléotides.

Il est important de noter que certains ARNt comme les ARNt mitochondriaux (mtARNt) ou les ARNt portant la sélénocystéine (ARNt^{secCys}) ne possèdent pas cette structure secondaire en « feuille de trèfle » (Dirheimer, G., Keith, G., Dumas, P. & Westof, E., 1995; Florentz et al., 2003).

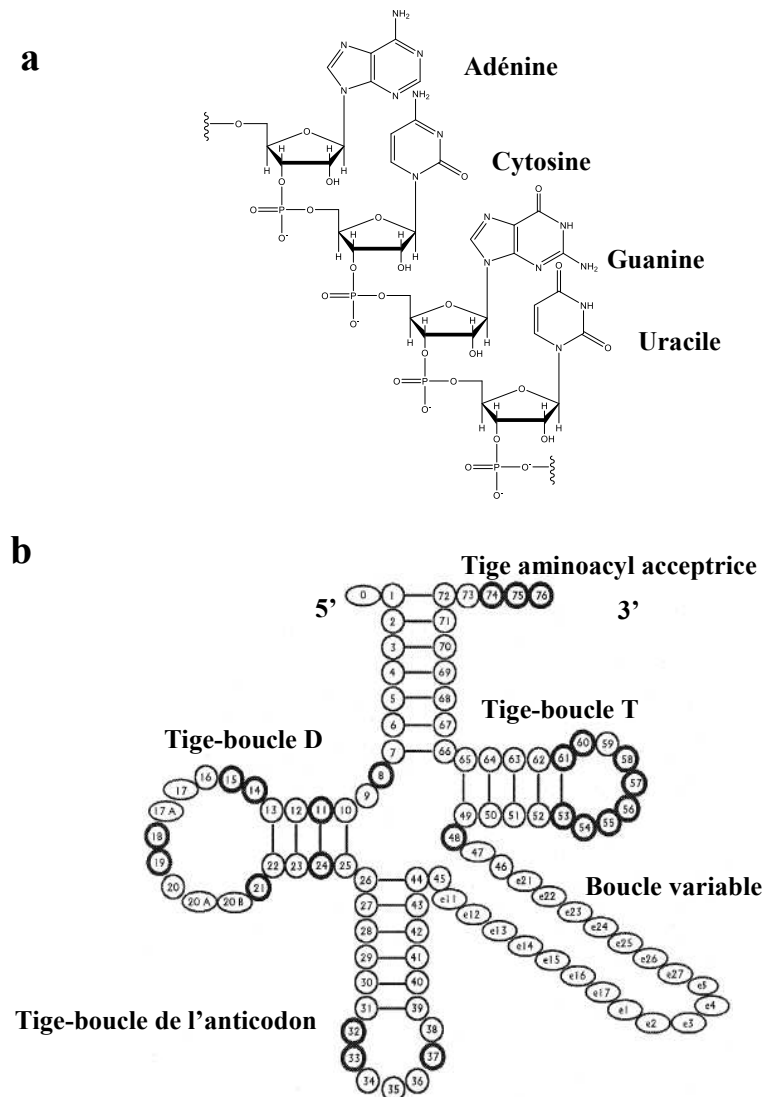


Figure 1: Structure d'un ARN de transfert. (a) Schéma de la structure primaire constituée d'enchaînements de nucléotides (A, C, G et U), (b) de la structure secondaire en « feuille de trèfle » d'un ARNt. D'après Sprinzl et al., 1998 et Machnicka et al., 2014 (Machnicka et al., 2014; Sprinzl et al., 1998).

L'ARNt^{Phe} de levure est l'ARNt dont la première structure a été résolue par diffraction des rayons X en 1974 (Kim et al., 1974). Depuis, l'ensemble des études structurales effectuées sur les ARNt, principalement d'eucaryotes et de bactéries (Bé纳斯 et al., 2000; Itoh et al., 2009), a permis de montrer l'existence d'une structure tertiaire conservée en forme de « L » dans les ARNt (Witz, 2003). Dans cette structure, les boucles D et T interagissent en formant un angle spécifique entre la tige acceptrice et la tige-boucle de l'anticodon **Figure 2a**.

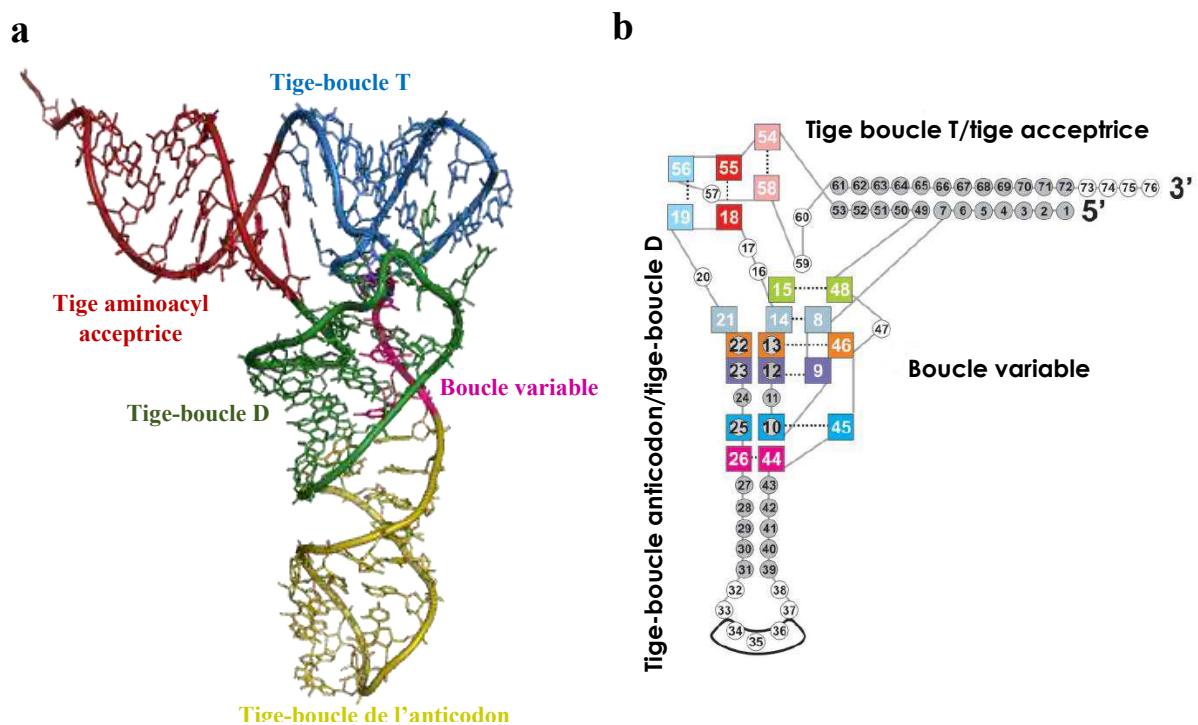


Figure 2: Organisation de la structure tertiaire des ARNt. (a) Structure cristallographique en forme de L de l'ARNt^{Phe} de levure (PDB code: 1EHZ). Les différentes régions sont colorées: la tige acceptrice (en rouge); les tiges-boucles D et T (en vert et bleu, respectivement); la région variable (en violet) et la tige-boucle de l'anticodon (en jaune). (b) Représentation schématique d'un ARNt en forme de L montrant les et des nucléotides (carrés colorés) impliqués dans les interactions tertiaires (en pointillés). Le triplet de l'anticodon est entouré (noir) (Chawla et al., 2014; Oliva, 2006).

Cette structure est stabilisée par des liaisons hydrogène du type Watson-Crick, des interactions entre nucléotides d'une même boucle (appariement du type Hoogsteen inverse ou « sucre »

entre la paire de bases 54 et 58 (Zagryadskaya, 2003)) ou de boucles différentes (appariement des paires de bases G19:C56 et G18:ψ55 entre les boucles D et T (Zagryadskaya et al., 2004)), mais aussi par des interactions entre la boucle D et la boucle variable (appariement du type Watson-Crick inverse, G15:C48) (Chawla et al., 2014) **Figure 2b**. Les différentes structures d'ARNt, seul ou en complexe, ont été résolues en présence de cations divalents (Mg^{2+}). La présence de ces ions est primordiale pour la stabilité des interactions Watson-Crick et donc pour le repliement correct des ARNt (Friederich and Hagerman, 1997; Xu et al., 2016a).

I-2) Fonction des ARNt

Durant la traduction des protéines, un ARNt porte un acide aminé (aa) spécifique sur son extrémité 3' (dernier nucléotide A 76 de la queue CCA). Cet acide aminé est lié de façon covalente à l'ARNt (ARNt-aa) grâce à la formation d'un ester entre l'hydroxyle en position C2' ou C3' du ribose de l'adénosine terminale et le groupement carboxylate de l'acide aminé catalysée par une aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) (Sprinzl and Cramer, 1975). La réaction fait intervenir une molécule d'ATP et un cation divalent (Mg^{2+}), pour activer l'acide aminé sous la forme aminoacyl-adénylate avant que celui-ci ne soit transféré à l'adénosine terminale. L'aa-ARNt va ensuite former un complexe avec des facteurs d'initiation ou d'élongation (EF-Tu, **Figure 3**) en présence d'une molécule de GTP, au sein du ribosome (Fislage et al., 2018; Giegé, 2006).

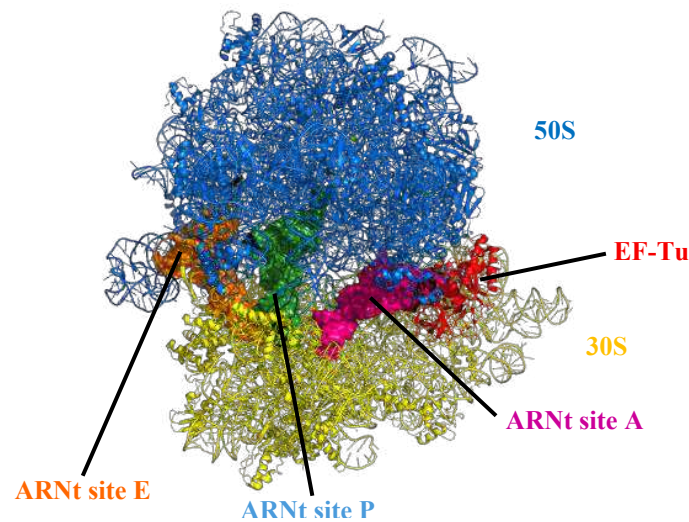


Figure 3 : Structure CryoEM à 3,4 Å du ribosome d'*E. coli* en complexe avec trois ARNt et le facteur d'élongation EF-Tu (rouge) (code PDB : 5WE6). La grande sous-unité 50S (en bleu), la petite sous-unité 30S (en jaune) ainsi que la surface des ARNt présents dans chacun des trois sites de liaison au ribosome sont représentées : (i) le site A (Aminoacyl) d'entrée de l'ARNt-aminoacylé (magenta), (ii) le site P (peptidyl) du transfert peptidique (en vert) et enfin (ii) le site E (Exit) de sortie du ribosome (en orange). Adapté de Fislage et al., NAR, 2018 (Fislage et al., 2018).

Les ARNt transitent dans trois sites du ribosome. Après son entrée dans le site A (site aminoacyl), l'ARNt aminoacylé (aa-ARNt) va avancer au site P (site peptidyl de translocation) où le transfert peptidique sera catalysé par une peptidyl-transférase. La dernière étape consiste en une translocation puis en la sortie par le site E (site d'exit) de l'ARNt déacylé (Giegé, 2006).

Les ARNt sont donc des molécules adaptatrices qui vont convertir l'information génétique contenue dans l'ARN messenger en séquence d'acides aminés de la protéine synthétisée dans le ribosome. Ce processus implique l'appariement des bases d'un anticodon d'un ARNt (position 34, 35 et 36) avec le codon d'un ARNm. 61 codons sens (dont le codon d'initiation AUG) et 3 codons nonsens (codons stop UAG, UGA et UAA) forment le code génétique et codent pour les 20 acides aminés naturels, alors que les organismes vivants contiennent habituellement 30 à 46 ARNt avec des anticodons différents. Cette dégénérescence du code génétique implique qu'un acide aminé peut être reconnu par plusieurs ARNt. Ainsi un même codon peut être lu par plusieurs ARNt dits isoaccepteurs. Dans ce cas, seuls les nucléotides en position 35 et 36 de l'anticodon sont strictement complémentaires à ceux du codon. La première base de

l'anticodon, en position 34 dite « bancale » ou « wobble » se lie moins fortement à la base correspondante du codon, ce qui permet la reconnaissance de plusieurs anticodons par un même codon (Crick, 1966).

Les ARNt sont aussi impliqués dans des contacts avec les ARNr et protéines ribosomiques. La boucle de l'anticodon interagit avec la petite sous-unité 30S dans laquelle se trouve l'ARNm tandis que la tige acceptrice au niveau de l'extrémité 3' interagit avec la partie peptidyl-transférase de la sous-unité 50S (Selmer, 2006). Ainsi, la flexibilité des ARNt et leur capacité à interagir avec différents partenaires à travers des changements conformationnels, tout en maintenant leur structure en « L », sont cruciales pour la fidélité et l'efficacité du processus de traduction des protéines.

Les ARNt aminoacylés (aaARNt) ou non peuvent également avoir des rôles biologiques autres que leur principal rôle lors du processus de traduction. Certains sont directement impliqués dans la régulation des opérons de gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse de leur acide aminé ou des protéines impliquées dans le transport de celui-ci. Ils peuvent aussi participer à la régulation de gènes codant pour d'autres aaARNt (Björk and Kohli, 1990). En effet, chez les bactéries à gram positif, les ARNt (aminoacylés ou non) sont capables d'interagir avec des ARN non codants (riboswitchs) pour réguler l'expression de gènes spécifiques codant pour des aaARNt ou de gènes impliqués dans la biosynthèse d'acides aminés (Green et al., 2010). De plus, chez les eucaryotes, il a été montré que l'interaction entre un ARNt et une protéine kinase (Gcn2) régule la synthèse protéique en condition de stress, en phosphorylant le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (Lageix et al., 2015).

Les cellules sont capables de réguler de manière fine le niveau d'ARNt dans la cellule pour assurer le processus de traduction. Ces ARNt participent aussi à diverses autres réactions enzymatiques. Pour assurer ces fonctions cellulaires, les ARNt doivent être transcrits, repliés et subir un processus de maturation post-transcriptionnel complexe faisant intervenir des enzymes bien spécifiques.

I-3) Biosynthèse des ARNt

La biosynthèse d'un ARNt est un processus complexe, qui implique plusieurs étapes (Phizicky and Hopper, 2010). Les ARNt sont synthétisés dans la cellule à partir de séquences codantes

de l'ADN sous forme de transcrits primaires (pré-ARNt), par une ARN polymérase. Ces précurseurs subissent ensuite une maturation importante, pour former l'ARNt fonctionnel. Lors de la maturation, l'extrémité 5' est clivée par la ribonucléase P (RNase P) et l'extrémité 3' par des endoribonucléases (RNase Z) ou des exonucléases universelle (Vogel et al., 2005; Walker and Engelke, 2006; Wellner et al., 2018). Puis dans le cas des eucaryotes et archées, la séquence CCA nécessaire à l'aminoacylation est ajoutée par une ARNt nucléotidyltransférase, qui utilise des molécules de CTP et ATP comme substrats (Xiong and Steitz, 2006).

La maturation des ARNt inclut aussi la modification chimique de bases ou du ribose et l'épissage d'introns dans certains ARNt d'eucaryotes ou d'archées (Marck, 2003; Yoshihisa et al., 2003). Sur 272 gènes d'ARNt chez la levure, 59 présentent des séquences introniques d'une taille comprise entre 14 et 60 nucléotides. Ces introns sont très souvent situés au niveau de la boucle de l'anticodon, entre les nucléotides 37 et 38, mais chez les archées, ils peuvent être aussi présents dans la boucle D. Leur excision est alors assurée par trois enzymes : une endoribonucléase, une ARNt ligase et une 2'phosphatase NAD-dépendante (Abelson et al., 1998). L'excision d'introns a lieu le plus souvent au niveau du noyau. Cependant, chez la levure, l'activité ARNt endonucléase a été détectée au niveau de la membrane externe des mitochondries, ce qui localiserait cette étape d'épissage dans le cytoplasme (Yoshihisa et al., 2007). Chez les eucaryotes, après la maturation des pré-ARNt dans le noyau, les ARNt matures sont transportés dans le cytoplasme ou la mitochondrie à travers les pores nucléaires pour intervenir dans la machinerie traductionnelle (Grosshans et al., 2000; Kapushoc et al., 2002). De plus, ils peuvent être réimportés dans le noyau. La fonction des ARNt nucléaires n'est pas bien comprise, mais il a été proposé qu'ils puissent être utilisés par la machinerie de traduction dans le noyau pour assurer le contrôle qualité de certains ARNm ou qu'ils servent de réservoir d'ARNt non acylés pour maintenir le rapport adéquat d'ARNt acylés/déacylés dans le cytoplasme. Une autre possibilité est que le va et vient entre le noyau et le cytoplasme permet de contrôler l'intégrité des ARNt, qui sont réparés ou dégradés après réimportation dans le noyau ou qu'il sert à relayer l'information concernant le niveau d'acylation des ARNt cytoplasmiques vers le noyau (Yoshihisa, 2006) **Figure 4.**

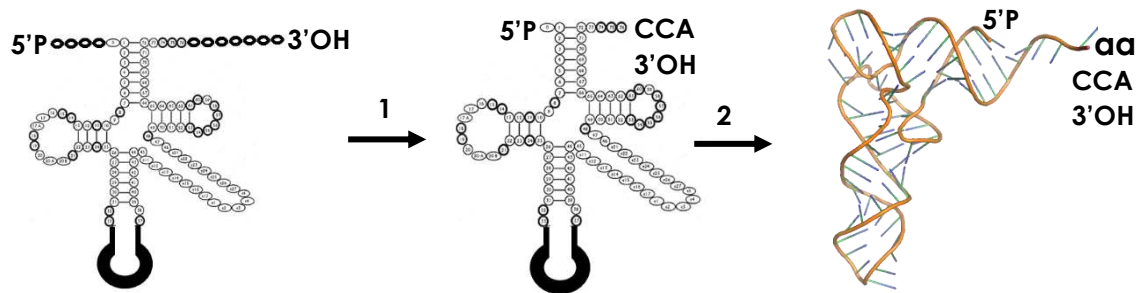


Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme de maturation post-transcriptionnelle des ARNt d'archées et eucaryotes. (1) Excision des extensions 5' et 3' et addition de la queue CCA. (2) Epissage des introns et aminoacylation.

Chez tous les organismes vivants, le processus de maturation des ARNt fait aussi intervenir la synthèse de nucléotides modifiés chimiquement. Ces modifications post-transcriptionnelles font intervenir des enzymes spécifiques, dites de modification.

II) LES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES DES ARN DE TRANSFERT

Les ARNt fonctionnels contiennent une grande variété de nucléotides modifiés de façon post-transcriptionnelle. La nature de ces modifications chimiques varie selon la complexité et la fréquence d'apparition sur un nucléotide d'un ARNt, dépend de l'organisme et de la position sur l'ARNt.

II-1) Diversité des modifications chimiques des nucléotides

Les modifications post-transcriptionnelles des ARNt ont été observées dans les trois domaines de vie. A ce jour, 163 nucléotides modifiés ont été identifiés dans les différents types d'ARN, dont plus de 100 dans les seuls ARNt, ce qui en fait le type d'ARNt présentant la plus forte

diversité de modifications. Certaines sont présentes dans les trois domaines de vie (Boccaletto et al., 2018; Carell et al., 2012; Grosjean, 2015; Grosjean et al., 1995; Jackman and Alfonzo, 2013; Machnicka et al., 2014) **Figure 5**. Les méthylations et pseudouridynations sont les modifications les plus fréquentes dans tous les types d'ARN.

Environ 17% et jusqu'à 25 % (chez les eucaryotes) de la séquence totale des ARNt est chimiquement modifiée au niveau de différents atomes des bases et/ou sur le ribose (très souvent sur l'hydroxyle 2'). Certaines modifications sont communes à tous les organismes, telles que les méthylations, D, ψ et s^2U , ce qui suggère l'existence de cette modification dans un ancêtre commun universel. D'autres modifications sont spécifiques seulement à certains organismes, telle que la wybutosine (yW) qui est spécifique des eucaryotes, mais dont un précurseur est présent chez les archées **Figure 5**. Le nombre de modifications diffère aussi selon la localisation de l'ARNt. Chez les eucaryotes, les ARNt cytoplasmiques sont beaucoup plus modifiés que les ARNt mitochondriaux (mtARNt) (Suzuki and Suzuki, 2014). De plus, le type et degré de modifications dépend également de l'état physiologique cellulaire (§II-3-d).

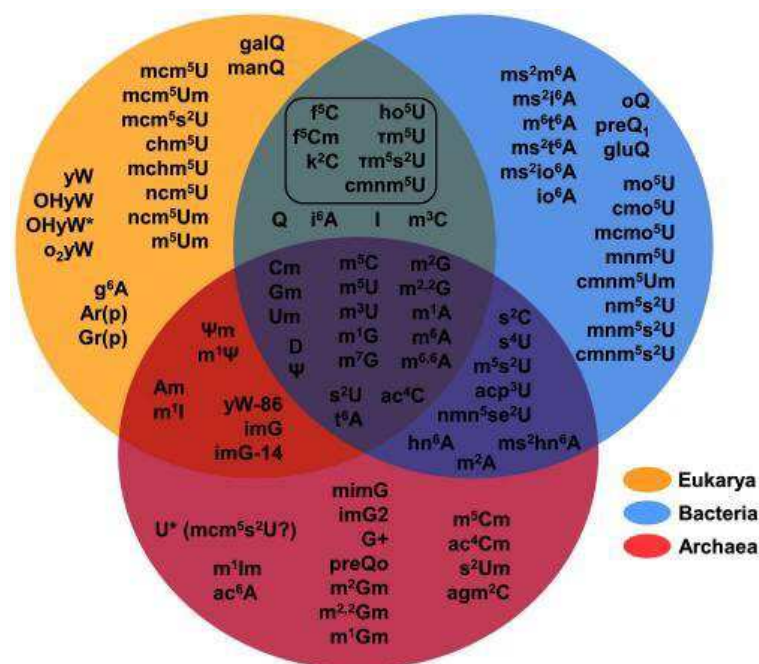


Figure 5 : Diversité des modifications chimiques au sein des ARNt dans les trois domaines de vie. Les modifications chimiques dans les ARNt sont indiquées par différentes couleurs, selon le domaine de vie. Les modifications retrouvées dans des bactéries et les organelles, d'eucaryotes sont encadrées. La nomenclature communément utilisée pour nommer les modifications est la suivante : m^b_nXr avec

m le type de modification chimique sur la base du nucléotide, exemple : m pour méthylation, **b** la position de la modification sur la base, **n** le nombre de modifications sur la base, X le nucléotide, **r** la modification sur le ribose du nucléotide. Il est à noter que certaines modifications sont notées par une lettre individuelle (I : inosine ou D : dihydrouridine) (Carell et al., 2012; Jackman and Alfonzo, 2013).

Ces nucléotides modifiés peuvent être classés en deux catégories suivant la nature chimique de la modification. D'une part, les modifications dites simples, qui sont les plus fréquentes, impliquent généralement l'action d'une seule enzyme pour leur synthèse **Figure 6a** : par exemple la pseudouridine (ψ) qui est la première modification à avoir été détectée, la méthylation de la base ou du ribose (s^2C ou Am), la thiolation de la cytosine ou encore la réduction de l'uridine (dihydrouridine) (Carell et al., 2012; Grosjean et al., 1995; Jackman and Alfonzo, 2013).

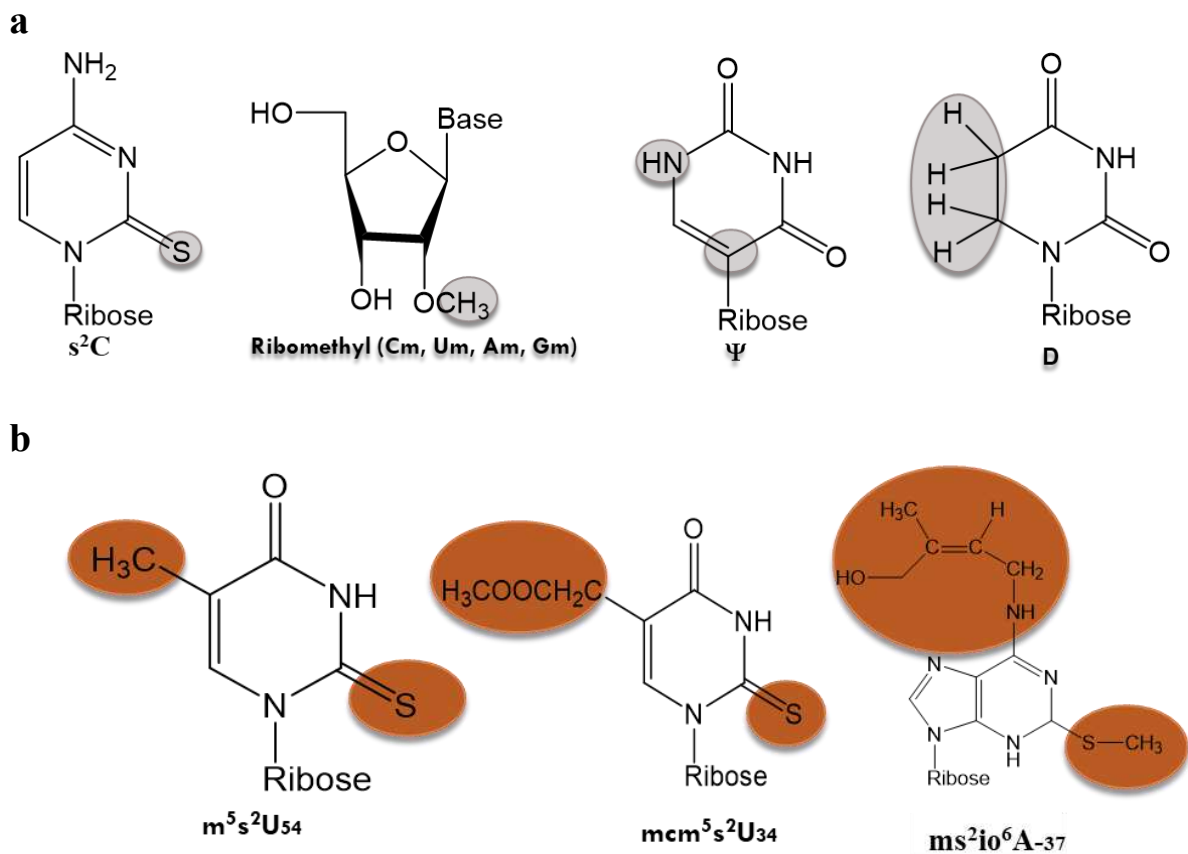


Figure 6: Exemples de modifications dites (a) simples ou (b) complexes. Les abréviations des noms sont indiquées en dessous du nucléotide modifié, et les groupements modifiés sont indiqués (modification simple en gris et complexe en marron).

D'autre part, les modifications plus complexes, caractérisées par des bases hypermodifiées sur un ou différents atomes d'un même nucléotide, impliquent l'action de plusieurs enzymes ou de complexes enzymatiques, qui interviennent de façon concertée ou dans un ordre spécifique. Ainsi, des groupements élaborés tels que l'isopentényle (i), le méthoxycarbonylméthyle (mcm), le carboxyméthylaminométhyle (cmnm), des acides aminés (2-lysidine k²C) ou des sucres (galactosyle/mannosyle-queuosine : galQ et manQ respectivement) peuvent être ajoutés sur certains nucléotides (Carell et al., 2012; Jackman and Alfonzo, 2013; Kasai et al., 1976)

Figure 6b. Le nombre de modifications chimiques de nucléotides est appelé à augmenter avec l'avènement de méthodes quantitatives de haute sensibilité (HPLC couplée à la spectrométrie de masse), exemple de l'agmatidine (Voorhees et al., 2013).

II-2) Localisation et fréquence des nucléotides modifiés dans les ARNt

Il est possible de produire des schémas montrant la distribution et la localisation des nucléotides modifiés dans les ARNt selon le domaine de vie (répertoriés dans la base de données MODOMICS) en utilisant le serveur tRNAmoDviz (Machnicka et al., 2014) **Figure 7.** Cette distribution est liée à la fonction et au rôle précis que ces modifications jouent au sein de ces ARNt.

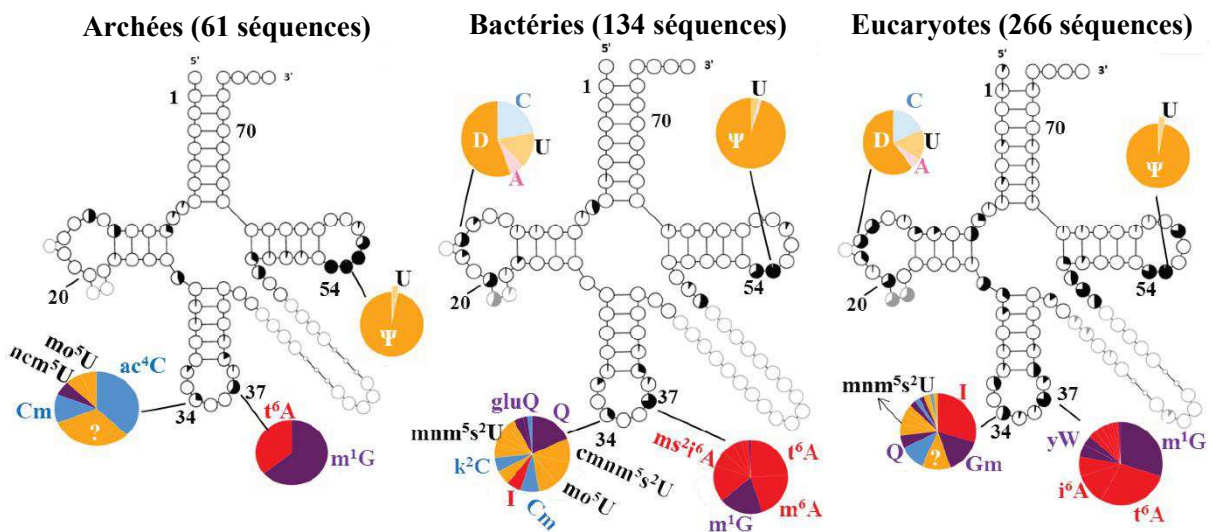


Figure 7 : Distribution et fréquence des nucléotides modifiés en fonction de leur nature chimique dans les ARNt provenant des trois domaines de vie. Pour les eucaryotes, seuls les ARNt cytosoliques sont pris en compte. Les données ont été générées avec le serveur tRNAmoDviz (Machnicka et al., 2014).

Ces différentes représentations (sous forme de camemberts) permettent de mettre en évidence que les modifications post-transcriptionnelles ont lieu, chez tous les organismes, principalement au niveau des boucles D et T et dans la boucle de l'anticodon. Les positions 34 (position wobble de l'anticodon) et 37 (position adjacente en 3' de l'anticodon) sont les deux positions présentant la plus grande diversité de modifications chimiques donc souvent des modifications complexes. Les modifications dites simples sont très souvent localisées dans les boucles D et T des ARNt (Grosjean et al., 1995), m^5U_{54} et ψ_{55} dans la boucle T et D (dihydrouridine) à différentes positions de la boucle D sont présentes dans presque tous les ARNt, ce qui a conduit à l'appellation de ces boucles.

Enfin, la distribution des nucléotides modifiés chez les archées et les eucaryotes est similaire.

II-3) Rôles physiologiques des modifications post-transcriptionnelles

Les modifications dites complexes, qui sont le plus présentes au niveau de la boucle de l'anticodon ont un rôle important dans la fidélité et l'efficacité de la traduction. La majorité des études sur les modifications dans les ARNt ont cherché à définir la fonction d'une seule modification. Cependant, il a été montré que l'absence d'une seule modification n'a généralement pas de conséquence visible et que l'apparition d'un phénotype advient seulement lors de la suppression de plusieurs modifications (Alexandrov et al., 2006; Björk, 1995).

II-3-a) Rôle des nucléotides modifiés dans le repliement et la stabilité des ARNt

Les modifications dites simples qui sont très souvent localisées au cœur de la structure des ARNt et principalement pour rôle de stabiliser le repliement et la structure des ARNt. Les ARNt participent à de multiples interactions avec leurs différents partenaires cellulaires lors de la biosynthèse des protéines (ARNr, aminoacyl-ARNt synthétases). Pour affiner ces interactions, les ARNt ont besoin de variation de leur structure tertiaire en forme de L pour leur apporter de la flexibilité et de la dynamique (Byrne et al., 2010; Derrick and Horowitz, 1993; Helm, 2006; Kowalak, 1994; Motorin and Helm, 2010).

La différence structurale entre un ARNt natif modifié et un ARNt non modifié (synthétisé *in vitro*) a été explorée en comparant leur stabilité thermique en présence ou non de cations divalents (Mg^{2+}). Pour cela, leur spectre d'absorption a été mesuré à différentes températures et leur profil de digestion par différentes nucléases clivant des ARNt simple et double brins a été examiné (Derrick and Horowitz, 1993). Il a été montré qu'un transcrit *in vitro* possède une température de fusion, plus faible que celle d'un ARNt natif et qu'il est plus sensible à des attaques par des nucléases, particulièrement au niveau des boucles D et T (Derrick and Horowitz, 1993). De plus, des études de dynamique et de stabilité structurale des ARNt par RMN et cristallographie ont montré que la structure globale des ARNt reste inchangée, mais que la dynamique et la flexibilité sont affectées de façon significative par la présence des modifications post-transcriptionnelles (Byrne et al., 2010; Helm, 2006; Vermeulen et al., 2005)

Figure 8.

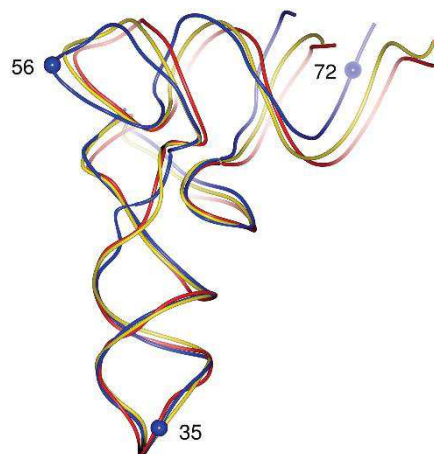


Figure 8: Différence conformationnelle entre un ARNt non modifié et modifié: superposition de la structure cristallographique de l'ARNt^{Phe} d'*E. coli* non modifié (bleu) et de deux structures d'ARNt^{Phe} natifs de levure (jaune PDB 1EHZ et rouge PDB 4TRA). Les ARNt possèdent 63% d'identité de séquence (Byrne et al., 2010).

Ces expériences ont aussi montré que la présence d'ions magnésium est cruciale pour le bon repliement des ARNt. En effet, le squelette phosphate, hautement négatif des ARNt nécessite la présence d'ions positifs pour compenser ces charges négatives (Chen et al., 1993; Nobles et al., 2002; Xu et al., 2016b).

Les ARNt modifiés ou non adoptent leur repliement en forme de L seulement en présence de Mg^{2+} . Cependant, un ARNt transcrit *in vitro* possède une affinité plus faible pour les ions magnésium qu'un ARNt natif et requiert donc une concentration plus élevée en Mg^{2+} pour être stable et bien replié (Nobles et al., 2002). Dans l'ARNt^{Phe} de levure, il a été montré que la modification m^5C_{40} permet une forte interaction de l'ARNt avec des ions magnésium, qui se fixent à un site distant de m^5C . Ainsi, les nucléotides modifiés peuvent être impliqués dans la coordination site-spécifique du Mg^{2+} au sein des ARNt (Chen et al., 1993).

De plus la coordination de molécules d'eau par le nucléotide modifié Ψ en position 38, 39 et 55 des ARNt, à travers la formation de liaisons hydrogène entre le N1 de la base et le phosphate en 5' suggère un rôle possible de la pseudouridylation dans la stabilisation de la structure des ARNt (Arnez and Steitz, 1994). Il a été proposé que, chez la levure, la fixation d'une molécule d'eau restreint la conformation du ribose de Ψ et réduit sa mobilité, ce qui a pour conséquence de rigidifier localement l'ARNt **Figure 9** (Arnez and Steitz, 1994; Lorenz et al., 2017).

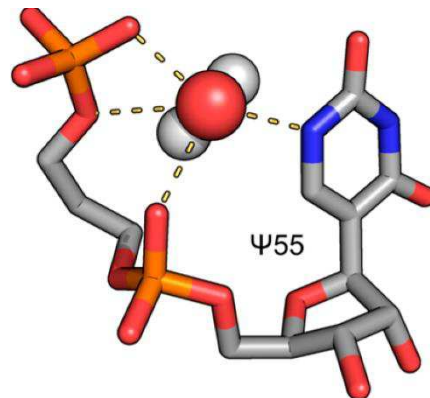


Figure 9 : Structure cristallographique de la pseudouridine en position 55 (Ψ_{55}) de l'ARNt^{Phe} de levure. Interaction entre l'atome N1 de Ψ , donneur d'hydrogène et le phosphate 5' adjacent via une molécule d'eau. Le ribose possède une conformation C3'-endo (Lorenz et al., 2017).

L'impact des modifications au niveau de la structure de la tige-boucle de l'anticodon (ASL), qui est très fortement modifiée, a aussi été étudié (Agris, 2008; Cantara et al., 2012; Helm, 2006; Vendeix et al., 2008). Des études de dénaturation thermique, dynamique moléculaire et des essais d'interaction avec le codon ont permis de montrer que ces modifications apportent

une certaine flexibilité à l'ASL (anticodon stem-loop) en modulant sa conformation (Cantara et al., 2012). Les modifications présentes dans l'ASL favorisent l'organisation de l'ASL en une boucle de 7 nucléotides avec formation d'un U dans la boucle de l'anticodon, en favorisant les interactions hydrophobes entre bases et en réduisant l'accessibilité des molécules d'eau. Ainsi, l'ASL modifiée adopte une conformation qui va promouvoir des interactions stables entre l'anticodon et le codon en réduisant la flexibilité structurale de la boucle de l'anticodon et en renforçant sa rigidité (Agris, 2008; Lorenz et al., 2017) **Figure 10**.

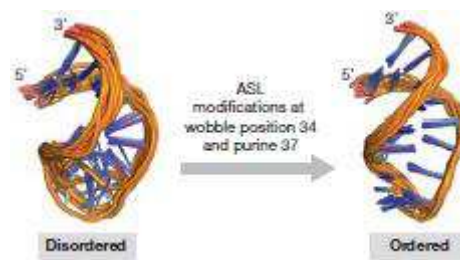


Figure 10 : Le repliement tertiaire d'ARNt cytoplasmiques. Les modifications de la tige-boucle de l'anticodon (ASL) et ses effets sur la dynamique de la boucle de l'anticodon. L'ARNt (à gauche) est non modifié et assez flexible, tandis que l'addition de modifications en position wobble et sur la purine 37 restreint la dynamique de la boucle de l'anticodon pour donner une conformation canonique (à droite) (Agris, 2008).

Cependant, certaines modifications ne stabilisent pas la structure de l'ARNt. Comme la dihydrouridine (D), qui est formée par la réduction de la double liaison entre les positions C5 et C6 de la pyrimidine de l'uridine. A cause de la saturation de la liaison C5-C6, D est le seul nucléotide non aromatique ayant été identifié dans les ARNt (Rohrer and Sundaralingam, 1970). La non planarité de la base du nucléotide a les conséquences suivantes: (i) D n'est plus capable d'interagir avec les bases environnantes via des interactions hydrophobes et (ii) D possède un groupement méthylène en position C6, qui crée un encombrement stérique et favorise la conformation C2'-endo du ribose, ce qui introduit une flexibilité locale importante dans l'ARNt (Suck and Saenger, 1971). Ceci est néanmoins en contradiction avec le fait que l'absence de D20a dans les ARNt^{Ser} d'*E. coli* diminue la température de fusion de cet ARNt, suggérant que la présence de cette modification contribue comme les autres à stabiliser l'ARNt (Nomura et al., 2016). Finalement, une étude de RMN de différentes tige-boucles D, modifiées ou non, a montré, qu'en l'absence de D, celles-ci adoptent plusieurs conformations non définies,

alors que la présence de D permet la formation d'une conformation « hairpin » possédant une tige stable (Dyubankova et al., 2015).

II-3-b) Fonction des modifications dans l'efficacité et la fidélité de la traduction

Les études menées sur les nucléotides modifiés au niveau de la boucle de l'anticodon chez différents organismes appartenant aux trois domaines de vie, ont permis de mieux comprendre les règles d'appariement codon-anticodon et la stratégie de décodage des codons synonymes (§I-2).

Le décodage du codon AUG₃ est réalisé par deux types d'ARNt, portant l'anticodon C₃₄AU: l'ARNt^{eMet} est utilisé pour incorporer la méthionine et l'ARNt^{iMet}, pour initier la traduction (Grosjean et al., 2010; Marck and Grosjean, 2002). Pour lire ce codon, le C₃₄ de l'anticodon est enzymatiquement modifié en différents dérivés C₃₄, selon l'organisme. Chez la bactérie, C₃₄ est modifié en N4-acétylcytosine (ac⁴C₃₄), alors que chez certains eucaryotes, il est modifié en 2'-O-méthylribose cytosine (C_{m34}) (Chimnaronk et al., 2009; Kumbhar et al., 2013). Il a été montré que, la modification ac⁴C₃₄ stabilise la conformation C3'-endo du ribose et renforce les interactions C₃₄-G₃, favorisant ainsi le décodage précis du codon AUG₃ (Met) en empêchant la mauvaise lecture du codon AUA (Ile). De façon intrigante, dans les mitochondries de vertébrés et d'insectes, le C₃₄ de l'anticodon de l'mtARNt^{Met} est modifié en 5-formylecytidine (f⁵C₃₄) (Takemoto et al., 2009). Mais cette modification permet le décodage en Met des deux codons AUG₃ et AUA₃.

Le décodage des codons Ile-AUU₃/AUC₃ dans les ARNt cytoplasmiques est réalisé par l'ARNt^{Ile} contenant C₃₄ chez les eubactéries et les archées ou I₃₄ (inosine 34) chez tous les eucaryotes (Boccaletto et al., 2018; Grosjean et al., 2010). De plus, pour pouvoir différencier le troisième codon Ile-AUA₃ du codon Met-AUG₃, différentes stratégies ont émergé durant l'évolution, selon les organismes. Chez les eucaryotes, un second ARNt^{Ile} (anticodon XAU) portant un nucléotide modifié en position 34 est utilisé. En plus de Ψ₃₄, il possède Ψ₃₆ (Szweykowska-Kulinska et al., 1994). Chez les bactéries, cet ARNt^{Ile}_{XAU} contient en position C₃₄ la modification lysidine (k²C₃₄) (Muramatsu et al., 1988; Yokoyama et al., 1989) et chez les archées, il contient la modification agmatidine (agm²C₃₄) (Voorhees et al., 2013) **Figure 11.**

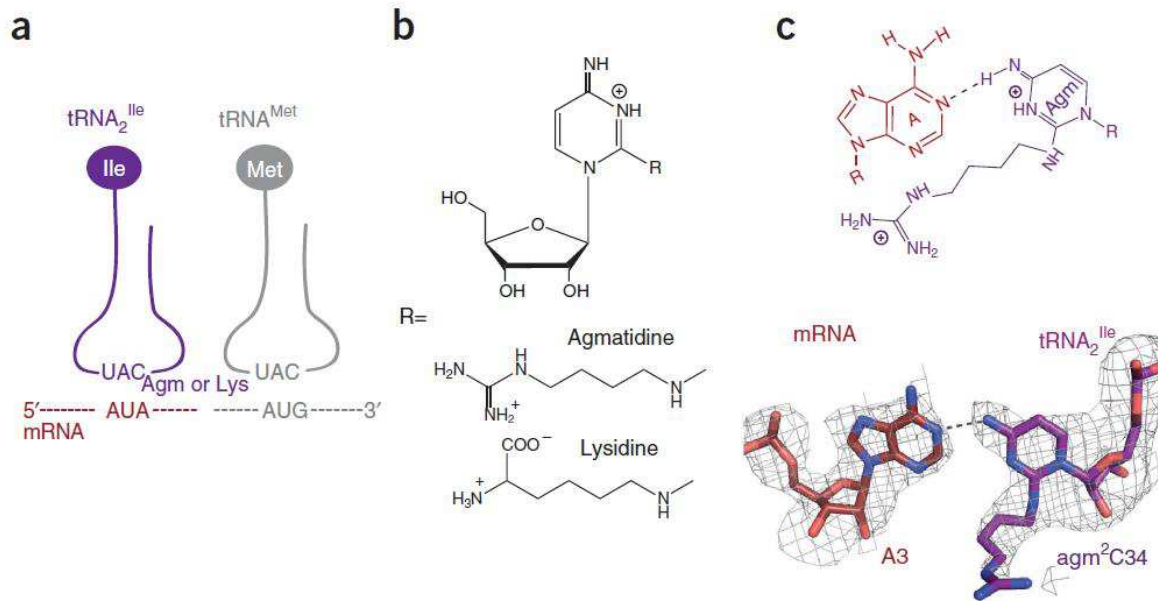


Figure 11 : Le décodage du codon isoleucine AUA chez les procaryotes. (a) Schéma des ARNt modifié en C₃₄ par la lysidine (k) ou l'agmatidine (agm), modification qui change la spécificité du codon de l'anticodon de l'ARNt^{Ile} de la méthionine à l'isoleucine. (b) Les groupements chimiques lysidine (bactérie) et agmatidine (archée) sont très similaires, ce qui suggère un même rôle dans le décodage du codon AUA. (c) La structure cristalline de l'ARNt^{Ile} d'archée lié au codon correspondant dans le ribosome, montrant la formation d'une liaison hydrogène entre A3 (rouge) et agm²C₃₄ (violet) (Voorhees et al., 2013).

Pour éviter un décalage du cadre de lecture, la position 37 est aussi hypermodifiée. Les modifications en position 37 telles que la wybutosine (yW), m¹G, ms²i⁶A (2-méthylthio-N⁶-isopentényladénosine) et t⁶A (thréonylcarbamoyladénosine), empêchent le décalage du cadre de lecture +1 et -1 dû à un glissement du peptidyl-ARNt au site P du ribosome (Björk et al., 1999; Urbonavicius, Qian, et al., 2001).

Les modifications telle que la ms²i⁶A (2-méthylthio-N⁶-isopentényladénosine) en position 37 augmentent aussi la vitesse d'association de l'ARNt au site A du ribosome. Le rôle structurale de cette modification a été visualisé très récemment grâce à la résolution de la structure cristallographique du ribosome (à 3,1 Å de résolution) en complexe avec un ARNm et un ARNt modifié (Jenner et al., 2010). Cette structure met en évidence des interactions d'empilement entre l'atome de soufre en position 2 de ms²i⁶A et la base du premier nucléotide du codon aux

sites A, P et E, ainsi que la liaison d'un ion Mg^{2+} par le soufre du nucléotide modifié pour l'ARNt dans le site P **Figure 12**.

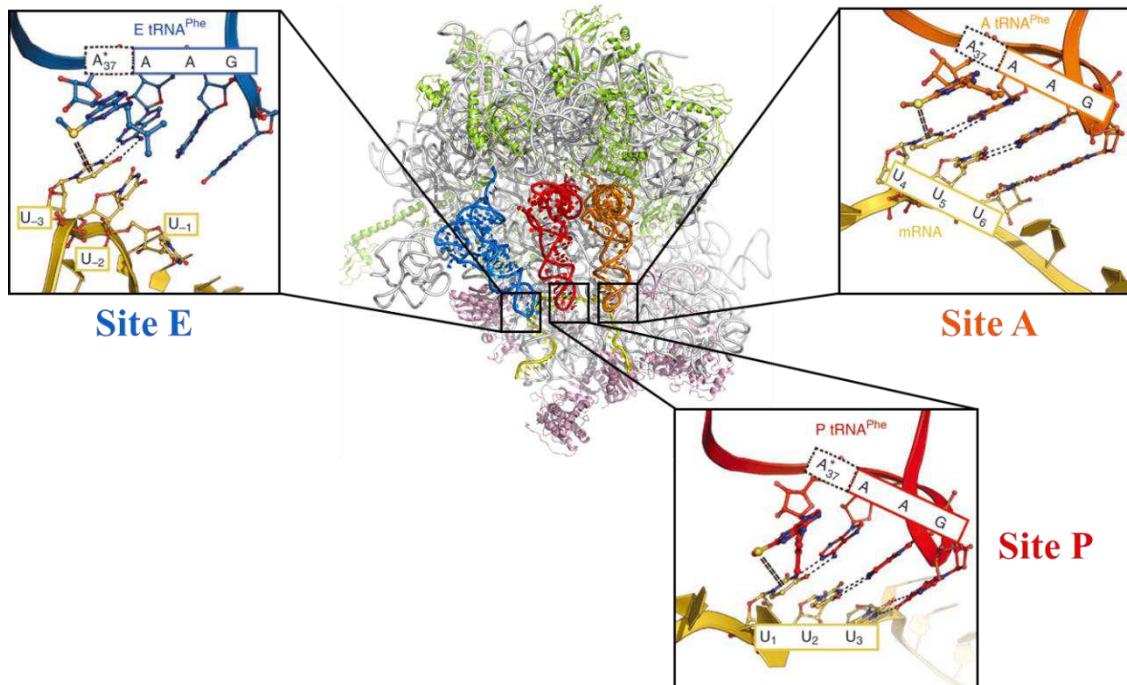


Figure 12 : Rôle des nucléotides modifiés dans l'ARNt : exemple du nucléotide modifié $ms^2i^6A_{37}$. Structure cristallographique (à 3,1Å de résolution) montrant la liaison de l'ARNt dans chacun des trois sites du ribosome. Des interactions ont lieu entre l'atome de soufre (en jaune) et la base du 1^{er} nucléotide du codon de l'ARNm (en jaune) (Jenner et al., 2010).

Les autres positions proches de l'anticodon (38, 39 et 40) contiennent des nucléotides modifiés (en pseudouridine), pour lesquels un moindre rôle a également été montré dans l'efficacité de la traduction : l'absence de Ψ en position 38 et/ou 39 et/ou 40 augmente la fréquence de décalage du cadre de lecture (Urbonavicius, Qian, et al., 2001).

II-3-c) Fonction des modifications dans la reconnaissance des partenaires cellulaires

Malgré leur structure tertiaire canonique, les ARNt sont reconnus spécifiquement par leurs partenaires cellulaires grâce aux nucléotides modifiés.

Pour qu'une aaRS (aminoacyl ARNt synthétase) reconnaisse de façon spécifique son ARNt cible, celui-ci doit présenter dans sa séquence des éléments d'identité qui lui sont propres. Généralement, ce sont les nucléotides de la boucle de l'anticodon (34, 35 et 36) ou le résidu en 5' de la queue CCA (discriminateur) (Giegé, 2006). Dans la grande majorité des cas, l'absence de nucléotides modifiés dans un ARNt n'empêche pas son aminoacylation. Mais dans certains cas, l'absence de certaines modifications peut influencer sur la reconnaissance spécifique de l'ARNt par l'aaRS, ainsi que sur l'efficacité d'aminoacylation (Giegé et al., 1993).

Nous avons vu que, la lysidine en position C₃₄ (k²C₃₄) des ARNt reconnaissant le codon AUA est un antidéterminant de la Met-RS (codon AUG) et un déterminant vis-à-vis de l'Ile-RS (codon AUA) (Muramatsu et al., 1988; Nureki et al., 1994; Yokoyama et al., 1989) **Figure 11**. Il a été montré que l'ARNt^{Asp} de levure est arginilé par l'Arg-RS, lorsqu'il n'est pas modifié et de même que la seule présence de la modification 1-méthylguanosine en position 37 (m¹G37) empêche cette réaction non spécifique (Pütz et al., 1994).

Chez certains eucaryotes, la discrimination entre l'ARNt^{iMet} et l'ARNt^{eMet} cytoplasmique se fait par la seule présence de la modification 2'-phosphoribosyl en position 64 des ARNt initiateurs. L'absence de cette modification entraîne une discrimination négative envers le facteur d'élongation eEF-1 α , ce qui empêche l'ARNt^{iMet} d'entrer en cycle d'élongation de la traduction (Föürster et al., 1993).

Chez le virus HIV, la transcription inverse de l'ARN viral utilise l'ARNt₃^{lys} comme amorce, et certains nucléotides modifiés portés par cet ARNt jouent un rôle important dans cette étape d'initiation de la transcription. Par exemple, la présence de s²U en position 34 de l'ARNt^{lys} augmente l'efficacité d'hybridation de l'ARN viral du HIV avec l'ARNt₃^{lys}, rendant l'initiation de la transcription inverse plus efficace (Tisné et al., 2000).

Enfin, l'activité de certaines enzymes de modification des ARNt dépend de la présence préalable d'autres modifications. Par exemple, la dihydrouridine synthase 2 de levure est 600 fois moins active sur un transcrit d'ARNt *in vitro* que sur un ARNt natif (Rider et al., 2009). De la même manière, la délétion du gène codant pour l'ARNt-m⁷G₄₆ méthyltransférase entraîne un défaut sévère de croissance à haute température, ainsi qu'une diminution des nucléotides modifiés Gm₁₈ et m¹G₃₇. Enfin, la délétion du gène de la m⁵U₅₄ méthyltransférase chez la bactérie thermophile *thermus thermophilus*, entraîne une diminution de la modification

m¹A₅₈ dans les ARNt, mais l'augmentation de la modification Gm₁₈ (Tomikawa et al., 2010; Yamagami et al., 2016). Cette notion de « réseau de modification » reste très peu caractérisée.

II-3-d) Les nucléotides modifiés et l'adaptation aux changements environnementaux

Même si les modifications de l'ARN ont été longtemps considérées comme étant constitutives, de nombreux travaux récents ont montré que le degré de modification des ARNt change en réponse aux différentes conditions environnementales (ARN épigénétique) (He, 2010). Le contrôle du processus de traduction des protéines lors d'un stress cellulaire entraîne la reprogrammation des modifications des ARNt (Chan et al., 2012).

Chez la levure, l'exposition au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) conduit à une augmentation de m⁵C₃₄ dans les ARNt, qui entraîne la traduction sélective d'ARNm provenant de gènes riches en codon TTG dont celui codant pour la protéine ribosomique RPL22A (Chan et al., 2012).

Chez *Arabidopsis thaliana* et d'autres plantes, des nucléotides modifiés (Am, Cm, m¹A et m⁷G) ont été identifiés comme réponse à des stress biotique (facteurs écologiques) et abiotique (facteurs physico-chimiques), tandis que d'autres (Gm, m⁵U et m⁵C) sont impliquées dans le développement de ces plantes (Wang et al., 2017).

Chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, la méthyltransférase TrmJ responsable de la formation de Cm, Um et Am en position 32, confère une résistance aux stress (Jaroensuk et al., 2016).

III) LE SOUFRE

III-A) Le soufre et son importance en biologie

Le soufre est l'un des éléments ubiquitaires parmi les plus abondants sous sa forme organique, c'est un constituant essentiel de la plupart des protéines (au travers des acides aminés méthionine, homocystéine, cystéine et taurine), de l'ARNt, de cofacteurs (biotine, thiamine) de

sucres ou d'antibiotiques (pénicilline) (Kessler, 2006). Il est aussi présent sous sa forme inorganique (centre fer-soufre). La présence de ces molécules soufrées dans différents métabolismes cellulaires laisse à penser que le soufre est arrivé très tôt dans la vie.

L'oxygène et le soufre possèdent des propriétés chimiques similaires, mais des réactivités différentes. Le soufre est moins électronégatif que l'oxygène et possède d'avantage d'états d'oxydation. Par exemple, les cystéines peuvent s'oxyder pour former des ponts disulfure alors que les sérines, qui diffèrent des cystéines par la substitution du soufre par l'oxygène, ne forment pas de pont disulfure. La différence provient du fait que les thiols sont de meilleurs nucléophiles que les alcools. La présence d'un soufre dans le cofacteur S-adenosylméthionine (SAM) produit un agent méthylant puissant, qui joue un rôle très important dans le transfert de groupement méthyle à différentes molécules biologiques (protéines, ARN, ADN...). Au sein des protéines, les ponts disulfure (RS-SR) ont certainement été favorisés au cours de l'évolution parce qu'ils sont plus stables que les liaisons peroxydes (RO-OR) (Brosnan and Brosnan, 2006; Palego et al., 2015).

Le métabolisme du soufre chez les procaryotes est complexe et comprend plus de 100 gènes impliqués dans la régulation de molécules contenant du soufre ou la synthèse de coenzymes. Différents intermédiaires oxydés du soufre existent (sulfite (SO_3^{2-}), thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), sulfinates ($\text{RSO}(\text{OH})$) ou sulfonates (RSO_3^-)). Des systèmes d'oxydo-réduction complexes permettent d'atteindre l'état réduit ultime du soufre, le sulfure d'hydrogène (H_2S).

En condition aérobie, chez certains organismes, l'incorporation du soufre (par exemple de sulfate (SO_4^{2-})) dans la cellule où le potentiel est fortement négatif (-70 mV), conduit à la réduction du soufre (Sekowska et al., 2000). La première étape consiste en l'assimilation de la molécule soufrée sous forme d'adénosine phosphosulfate (APS) par une ATP sulfurylase, puis l'APS devient un substrat de l'APS kinase dans une réaction qui forme la 3'phosphoadénosine phosphosulfate (PAPS). Le PAPS est ensuite réduit pour former du sulfite (SO_3^{2-}) par l'enzyme PAPS réductase, dépendante de la thioredoxine. Enfin, l'ion sulfite formé est à son tour réduit par la NADPH-sulfite réductase ([FeS] dépendante), pour former le sulfure ou sulfure d'hydrogène ($\text{S}^{2-}/\text{HS}^-$), qui est assez réactif et toxique pour la cellule à forte concentration (Sekowska et al., 2000). Dans les organismes vivants, la concentration en sulfure ($\text{S}^{2-}/\text{HS}^-$) est estimée entre 20 et 160 μM et peut varier jusqu'à 20 mM pour les organismes vivants dans un milieu riche en sulfure comme l'archée *Méthanococcus jannachii* (Theissen, 2003; Wang, 2002). Le sulfure peut servir de substrat aux enzymes O-acétylsérine sulfhydrases en présence

de O-acétyl sérine pour entrer dans la biosynthèse de la cystéine, puis de la méthionine, pour enfin former une molécule de SAM (Kessler, 2006; Sekowska et al., 2000) **Figure 13**.

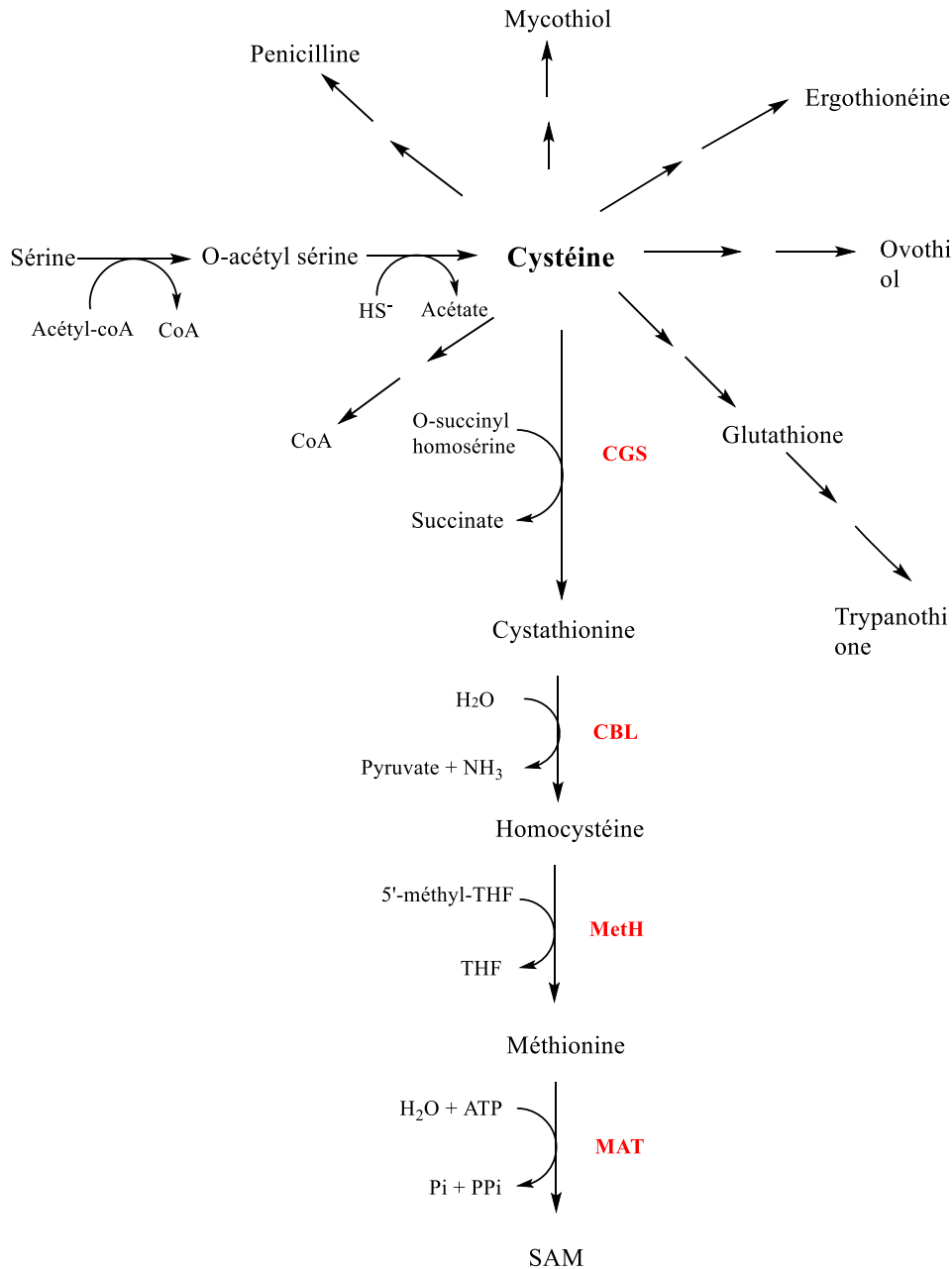


Figure 13 : Schéma simplifié du métabolisme de la cystéine. La synthèse de cystathionine est catalysée par la cystathionine γ synthase (CGS) à partir de cystéine et d'O-succinyl homosérine. Elle est ensuite transformée en homocystéine par la cystathionine β lyase (CBL), libérant du pyruvate et de l'ammoniaque. La méthionine synthase (MetH) catalyse ensuite la synthèse de méthionine en utilisant comme substrats une molécule d'homocystéine et une molécule de N⁵-méthyltétrahydrofolate (N⁵-méthyl THF). Enfin, la S-adénosylméthionine (SAM) qui est synthétisée par la méthionine adénosyle

transférase (MAT) à partir de méthionine et d'ATP, est une molécule soufrée particulièrement importante dans le métabolisme cellulaire (Kessler, 2006; Palego et al., 2015).

III-B) La L-cystéine comme donneur de soufre

III-B-1) Cas de la L-cystéine désulfurase

La L-cystéine est le donneur primaire de soufre pour certaines voies de biosynthèse de produits soufrés, c'est le substrat de certaines enzymes telles que la cystéine désulfurase, qui utilise comme cofacteur le pyridoxal 5'-phosphate (PLP) pour convertir la L-cystéine en L-alanine. La réaction conduit à la formation d'un persulfure sur une cystéine catalytique de l'enzyme. Les cystéines désulfurases sont présentes dans la majorité des organismes procaryotes et eucaryotes et, de manière sporadique, chez certaines archées (Black and Dos Santos, 2015; Kessler, 2006; Liu et al., 2010; Mueller, 2006). Elles apparaissent comme des acteurs centraux dans la biosynthèse des biomolécules soufrées **Figure 14**.

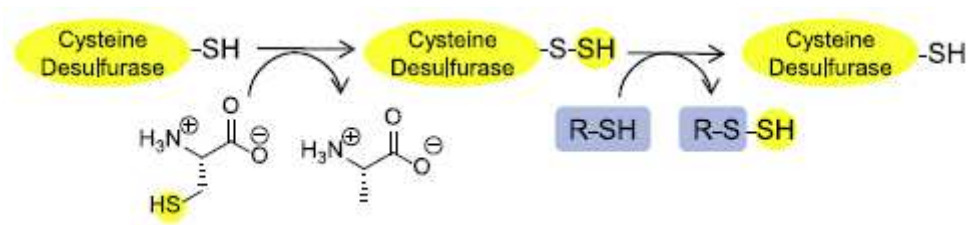


Figure 14 : Schéma simplifié du mécanisme réactionnel de la L-cystéine désulfurase. Mobilisation d'un soufre à partir de la L-cystéine libre catalysée par la cystéine désulfurase, pour former un persulfure sur une cystéine catalytique. Le soufre du groupement persulfure peut ensuite être cédé à la cystéine catalytique d'une autre protéine, agissant comme porteur de soufre (Black and Dos Santos, 2015).

Les cystéines désulfurases peuvent être regroupées en deux classes en fonction de leur réactivité et leur séquence en acides aminés: (i) la première classe, composée des enzymes de

la famille des IscS et NifS et (ii) la deuxième classe, composée des enzymes de la famille des SufS et CsdA (Hidese et al., 2011).

La structure cristalline de la protéine IscS provenant de différents organismes (*E. coli*, *Archaeoglobus fulgidus* et *Thermotoga maritima*) montre que la classe I contient une boucle flexible, longue de 12 résidus, située après la cystéine catalytique (Black and Dos Santos, 2015). Cette boucle flexible est proposée comme étant déterminante dans l'interaction de l'enzyme avec différents accepteurs de soufre. Par exemple, IscS d'*E. coli* est capable de transférer le soufre à au moins quatre protéines acceptrices : IscU (protéine d'échafaudage impliquée dans l'assemblage des centres [FeS]), MoaD/MoaB (protéines impliquées dans la biosynthèse de la molybdoptérine), TusA (impliquée dans le système de relais de transfert de soufre chez *E. coli* vers MnmA (protéine impliquée dans la formation de s^2U_{34} -ARNt) et ThiI (protéine impliquée dans la biosynthèse de s^4U_8 -ARNt) (Kambampati and Lauhon, 2003; Zhang et al., 2010). De plus, une structure des complexes IscS-IscU et IscS-TusA montre que IscU et TusA ne peuvent pas se lier en même temps à IscS, même si elles se lient en partie à la même surface d'IscS centrée sur la boucle flexible (Shi et al., 2010). D'autres membres de la classe I, tels que NifS d'*A. vinelandii* et NifZ de *B. subtilis* possèdent comme cible spécifique les protéines NifU (impliquée dans maturation des nitrogénases dépendantes d'un centre [FeS]) et ThiI, respectivement (Rajakovich et al., 2012; Yuvaniyama et al., 2000).

D'autre part, pour les membres de la classe II la boucle contenant la cystéine catalytique est plus courte. Les structures des SufS et CsdA d'*E. coli* ont permis de proposer que l'accepteur joue un rôle actif lors de l'étape de transfert du soufre. Les enzymes SufS et CsdA d'*E. coli* possèdent comme accepteur les protéines SufU et CsdE, respectivement, impliquées dans la biogénèse des centres [FeS] (Bühning et al., 2017; Loiseau et al., 2005; Outten et al., 2003).

III-B-2) Cas de la cystéine lyase et la cystéine désulfidase

L'étape d'initiation du transfert de soufre vers d'autres protéines par la L-cystéine désulfurase ne peut être universel car certaines bactéries et archées telles que les methanococcales (incluant les espèces methanococcus) et plusieurs archées non methanogènes (incluant *Pyrococcus horikoshii* et *Thermoplasma acidophilum*) ne possèdent pas de gène codant pour une cystéine désulfurase (Kotera et al., 2010; Liu et al., 2010; Tchong et al., 2005) **Annexe 2**. Il a été proposé

que les organismes vivants dans des milieux riches en soufre, tels que l'archée méthanogène *Méthanococcus jannaschii*, utiliseraient une voie d'initiation du transfert de soufre, qui ne nécessite pas la présence d'une cystéine désulfurase. Ces organismes pourraient utiliser donc du sulfure inorganique comme source physiologique de donneur de soufre vers des molécules acceptrices (Tchong et al., 2005). Cependant, la présence de L-cystathionine- γ -lyases ou de L-cystéine désulfidases (aussi appelées L-cystéine désulfhydrases) contribueraient à expliquer la concentrations importante en sulfure présente dans la cellule lors de la biosynthèse de molécules contenant du soufre dans certains organismes (Tchong et al., 2005).

La production de sulfure à partir de cystéine est catalysée principalement par les enzymes L-cystathionine- β -lyase ou ses dérivés et L-cystathionine- γ -lyase (qui en présence de L-cystéine catalyse la formation de sulfure d'hydrogène, pyruvate et ammonium), des enzymes PLP-dépendantes (Kabil and Banerjee, 2010; Paul and Snyder, 2012). Une enzyme catalysant la même réaction *in vitro* appelée L-cystéine désulfidase a été isolée chez *M. jannaschii* et caractérisée. Contrairement aux autres enzymes, elle ne possède pas de cofacteur PLP mais un centre [4Fe-4S] qui servirait de transporteur du sulfure formé à partir de la L-cystéine (Tchong et al., 2005) **Figure 15**.

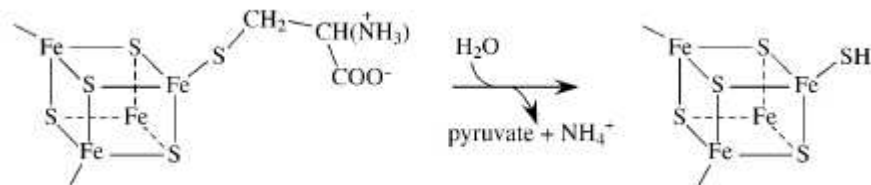


Figure 15 : Mécanisme proposé pour la L-cystéine désulfidase. Le fer libre du centre [4Fe-4S] lie d'abord le soufre du substrat cystéine, puis l'ion hydrogénosulfure produit de la réaction (Kessler, 2006; Tchong et al., 2005).

Il a été suggéré que le sulfure porté par le centre [4Fe-4S] pourrait être cédé à une protéine contenant un pont disulfure pour former un persulfure et permettre l'oxydation du soufre en soufre sulfane (S⁰, sulfhydratation) (Paul and Snyder, 2012; Toohey and Cooper, 2014). Bien que de nombreux composés soufrés aient été identifiés depuis de nombreuses années, leur biosynthèse reste encore mal comprise (Kessler, 2006). Dans ce contexte, l'étude des

mécanismes enzymatiques d'insertion de soufre en biologie reste un sujet de recherche fondamental.

III-B-3) Les centres [Fe-S]

Le soufre est un élément des centres [Fe-S], impliqués dans différents processus biologiques. Les centres [Fe-S] sont des cofacteurs enzymatiques versatiles présents chez tous les organismes vivants. Leur implication dans l'origine de la vie est suspectée, des centres [2Fe-2S] ou [4Fe-4S] potentiellement liés par des thiolates de proferredoxines pourraient avoir originellement catalysé l'oxydation de thiolates en disulfure (Russell et al., 1994). Ce sont des groupements prosthétiques présents dans les métalloprotéines telles que la NADH deshydrogénase, la xanthine deshydrogénase, la Coenzyme Q réductases, les enzymes du cycle de Krebs (aconitase et succinate deshydrogénase), les flavoprotéines, les ferredoxines, des protéines de synthèse et de réparation de l'ADN ou encore des enzymes de modification d'ARNt (Lill, 2009). Dans la plupart des protéines à centre [Fe-S], celui-ci a une fonction de transfert d'électrons. Les protéines à centre [Fe-S] participeraient aussi au contrôle de l'expression génique, à la détection d'oxygène/azote (senseurs), et à la réponse cellulaire au stress oxydatif (Brzóska et al., 2006; Mueller, 2005). La voie de biosynthèse des centres [FeS] implique des cystéines désulfurases appelées NifS, IscS, SufS ou Nfs1 (§III-B-1) et selon les conditions de croissance cellulaire et l'organisme, une machinerie NIF, ISC, SUF ou CIA. Le soufre terminal du persulfure de la désulfurase est transféré à différentes protéines « d'échafaudages » des centres [Fe-S] via l'intervention encore mal comprise de protéines annexes (fdx et ygdK) (Johnson et al., 2005; Loiseau et al., 2005). Le centre [Fe-S] peut être transféré à la protéine « d'échafaudage » vers une protéine acceptrice nécessitant un centre [Fe-S] pour sa fonction.

Les centres [Fe-S] les plus courants sont $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{0/1+/2+}$, $[3\text{Fe}-4\text{S}]^{2-/1-/0/+1}$ et le $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{0/1+/2+/3+/4+}$

Figure 16. Ces centres [Fe-S] dits « classiques » (par opposition à des structures plus complexes et plus rares) contiennent des atomes de fer coordonnés par quatre ligands, le plus souvent des cystéines appartenant à des motifs conservés (Fontecave, 2006). Certains ligands atypiques: molécules exogènes (molécule d'eau, la SAM dans le cas des enzymes à SAM radical ou le citrate dans le cas de l'aconitase) et/ou un acide aminé de la protéine (His, Ser, Tyr, Arg, Lys, Asp, Glu ou Gln) peuvent se coordonner à un site unique de Fe du centre [FeS]

et qui module généralement le potentiel redox, le transfert d'électrons, la fixation du substrat ou la catalyse (Fontecave, 2006).

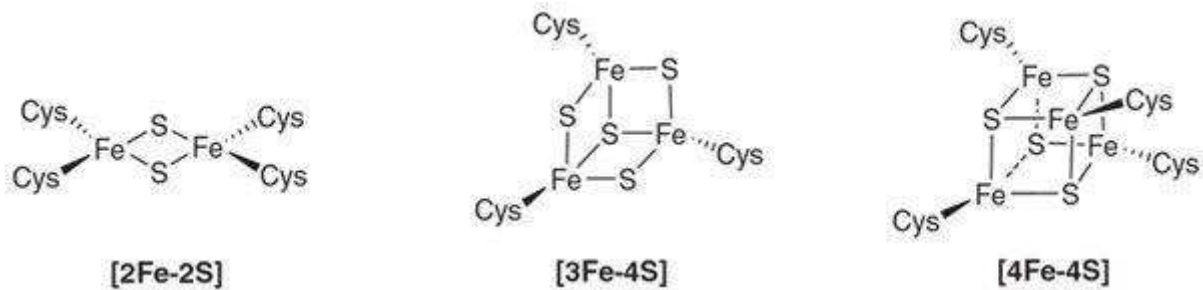


Figure 16 : Structure des centres [Fe-S] canoniques (Fontecave, 2006).

Dans certaines protéines contenant un centre [4Fe-4S] cubique, ces centres peuvent être convertis de façon réversible en un centre [3Fe-4S], par perte d'un atome de fer. Par exemple la forme inactive de l'aconitase a un centre [3Fe-4S] et cette forme est réactivée par addition de Fe^{2+} et d'agent réducteur pour former un centre [4Fe-4S] (Kennedy et al., 1983). Alors que les centres [2Fe-2S] et [3Fe-4S] servent majoritairement à des réactions de transferts d'électron (potentiel redox d'un centre [Fe-S] entre -500 et +300 mV), les centres [4Fe-4S] réalisent une chimie plus diversifiée, qui sera détaillée par la suite (§III-C-2-b).

III-B-4) Les transferts de soufre par persulfuration de cystéines dans la voie de biosynthèse des ARNt modifiés

La cystéine est en générale la source originelle de soufre contenu dans les nucléotides thiolés dans les ARNt. Le transfert de soufre du persulfure formé sur une cystéine désulfurase à l'enzyme de thiolation des ARNt peut être direct comme c'est le cas pour ThiI (Kambampati and Lauhon, 2000). Cependant, l'atome de soufre provenant de la cystéine est souvent relayé via différentes protéines porteuses avant son incorporation finale dans l'ARNt. Un tel relais enzymatique de transfert de soufre vers des nucléotides d'ARNt a lieu dans les voies de biosynthèse impliquant (i) la protéine MnmA d'*E. coli* ($s^2\text{U}$), (ii) certaines protéines TtuA ($s^2\text{T}$)

de bactéries thermophiles et d'archées, ainsi que (iii) les enzymes Ctu1 (Ncs6/NcsA/Ctu1 : s²U) chez les eucaryotes et certaines archées (Čavuzić and Liu, 2017; Nakai et al., 2017).

III-B-4-a) Cas du relais de transfert de soufre Tus

Le relais enzymatique des protéines TusBCDE permet de transférer le soufre de façon spécifique depuis la cystéine désulfurase à l'enzyme MnmA. Chez *E. coli*, l'interaction d'IscS avec la protéine TusA, stimule d'abord l'activité L-cystéine désulfurase de IscS (Ikeuchi et al., 2006). Après le transfert du soufre sous forme de persulfure d'IscS sur la protéine TusA, le transfert de soufre de TusA à TusD au sein du complexe TusBCD est stimulé par la fixation de TusE au complexe (Mueller, 2006) **Figure 17**.

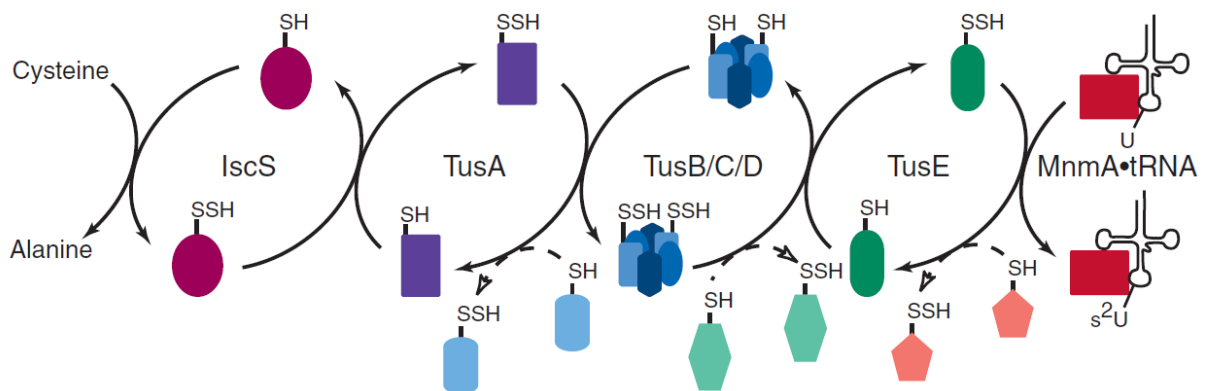


Figure 17 : Relais de transfert du soufre des protéines Tus dans la voie de biosynthèse de s²U₃₄ chez *E. coli*. Chaque protéine Tus peut potentiellement donner un soufre à des accepteurs multiples (Mueller, 2006).

Enfin, le transfert du soufre de TusD vers TusE puis de TusE vers le complexe MnmA-ARNt permet la formation de l'uridine thiolé en position 34 d'un ARNt. La voie de transfert du soufre mettant en jeu TusABCDE, utilisée par MnmA pour thiolé l'ARNt, semble se restreindre aux γ -protéobactéries, puisque la plupart des organismes ne possèdent pas ces protéines TusBCDE (Kotera et al., 2010).

III-B-4-b) Cas du relais de transfert de soufre de type ubiquitination

Les protéines de transport du soufre de type ubiquitine, impliquées dans la voie de biosynthèse des ARNt thiolés, ont été identifiées chez les eucaryotes, l'archée *Haloferax volcanii* et la bactérie *Thermus thermophilus* et prédits dans d'autres archées grâce à des analyses comparatives de génomes (Huang et al., 2008; Jüdes et al., 2015; Leidel et al., 2009; Makarova and Koonin, 2010; Miranda et al., 2011; Nakai et al., 2008; Noma et al., 2009). Il a été suggéré que le système de type ubiquitine de relais de transfert du soufre dans les ARNt chez les procaryotes, serait à l'origine du système d'ubiquitination qui contrôle une grande variété de processus physiologiques dans les cellules eucaryotes comme la liaison au protéasome ou le recrutement à la chromatine (Hochstrasser, 2009; Pedrioli et al., 2008).

i. La voie de transfert de soufre de type ubiquitination dans le cytoplasme

Dans le cas de certains nucléotides thiolés comme s^2U_{34} , une voie de relais de transfert du soufre mène à la formation d'un thiocarboxylate lié à la glycine C-terminale d'une protéine de type ubiquitine, qui est le donneur de soufre ultime pour la réaction de thiolation d'ARNt. Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae*, au début de la biosynthèse de s^2U_{34} -ARNt dans le cytoplasme, le soufre du persulfure porté par la L-cystéine désulfurase Nfs1p est transféré à la cystéine catalytique du domaine rhodanèse en C-terminal (RHD) de la protéine Tum1p (Jüdes et al., 2015; Leidel et al., 2009; Noma et al., 2009) **Figure 18**. Les RHD (domaine rhodanèse) sont des domaines à faible similarité de séquence, qui catalysent la formation de thiocyanate en transférant le soufre de ce composé vers la cystéine catalytique du RHD sous forme de persulfure (Bordo, 2002). Une fois persulfuré, Tum1 transfère le soufre au domaine RHD de l'enzyme Uba4. Après adénylation par Uba4 de la glycine en carboxy-terminal de la protéine de type ubiquitine Urm1, Uba4 lui transfère le soufre du persulfure pour générer un thiocarboxylate C-terminal. Ce dernier est finalement utilisé dans la réaction de formation de la 2-thiouridine, médiée par une enzyme de modification des ARNt **Figure 18**.

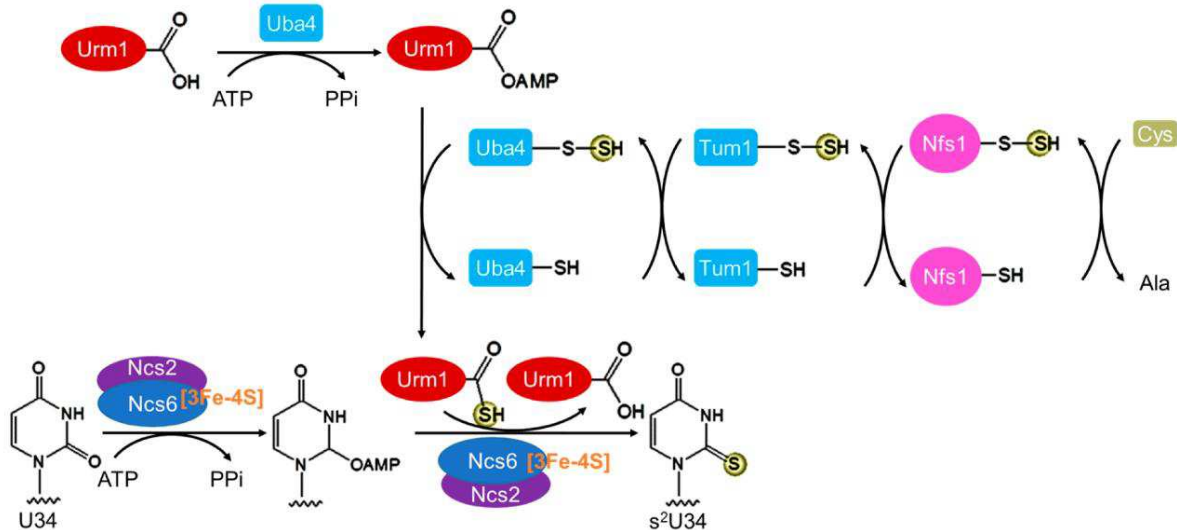


Figure 18 : Mécanisme de relais de soufre proposé lors de la thiolation d'U₃₄-ARNt dans le cytoplasme de levure (Shigi, 2014).

ii. La voie des TtuABCD

La voie de transfert de soufre vers un nucléotide thiolé la mieux étudiée est celle des protéines TtuABCD impliquées dans la thiolation d'U₅₄-ARNt chez la bactérie thermophile *T. thermophilus*. Les protéines TtuB et TtuC sont des protéines homologues d'Urm1p et Uba4p, respectivement (Shigi et al., 2006a, 2006b, 2008). Les gènes *ttuA*, *ttuB* et *ttuC* sont organisés en opéron chez *T. thermophilus*, mais pas le gène *ttuD*. Tout d'abord, TtuD augmente l'activité de la cystéine désulfurase (IscS ou SufS) et reçoit le soufre sous forme de persulfure de IscS-SSH (ou SufS-SSH) sur la cystéine catalytique d'un de ses RHD (Shigi et al., 2016). La glycine C-terminale de la protéine de type ubiquitine TtuB est activée par l'ATPase TtuC, ce qui mène à la formation de l'intermédiaire adénylé TtuB-Co-AMP (Shigi et al., 2008). La thiocarboxylation de cet intermédiaire est vraisemblablement réalisée par le persulfure de TtuC. Finalement, TtuA catalyse le transfert de l'atome de soufre de TtuB-CO-SH vers l'ARNt (Chen et al., 2017) **Figure 19**.

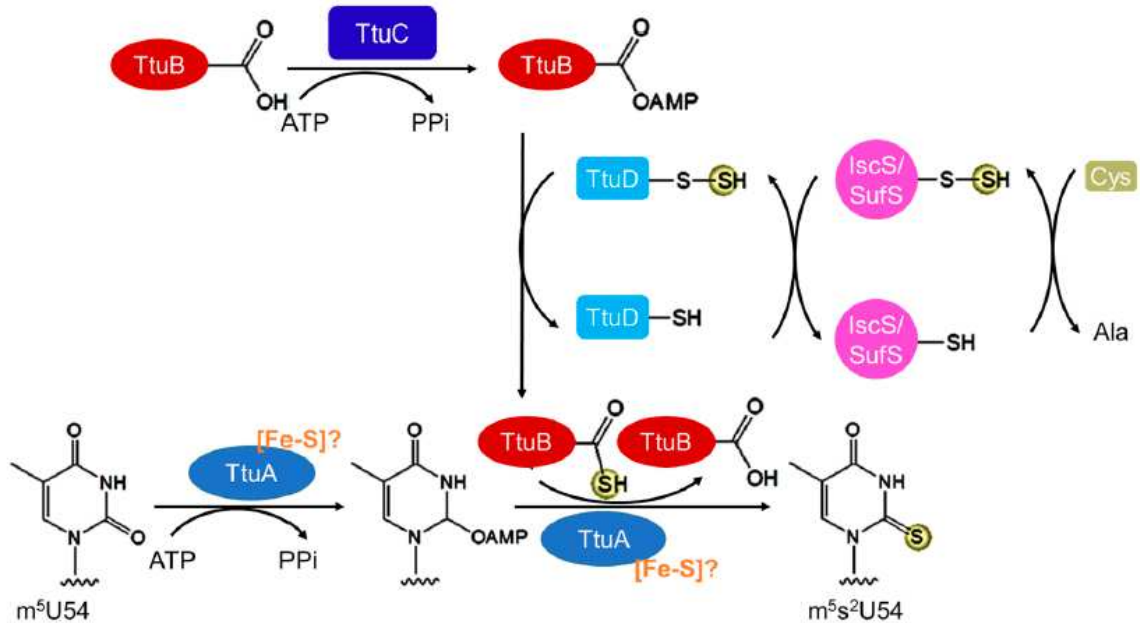


Figure 19 : Mécanisme de relais de soufre proposé lors de la thiolation d' U_{54} -ARNt chez la bactérie *T. thermophilus*. D'après Cavuzic *et al.*, Biomolecules, 2017 (Čavuzić and Liu, 2017).

III-C) Le soufre dans les thionucléotides

III-C-1) Les thionucléotides dans les ARNt

Comme expliqué (§II), dans tous les domaines de vie, la maturation des ARN inclut des modifications post-transcriptionnelles des nucléotides. Beaucoup de nucléotides contenant du soufre ont été identifiés dans les ARNt tels que les dérivés de la 2-thiouridine (s^2U en position 33, 34 et 54), la 4-thiouridine (s^4U en position 8 et 9), la 2-thiocytidine (s^2C en position 32) et la 2-méthyladénosine (ms^2A en position 37) (Čavuzić and Liu, 2017; Nakai *et al.*, 2017; Shigi, 2014). **Figure 20** Les thiomodifications sont principalement présentes au niveau de la boucle de l'anticodon ou dans la boucle T. Il a été montré que ces modifications sont importantes dans la reconnaissance du codon de l'ARNm et la stabilisation de la structure de l'ARNt et donc pour la fidélité et l'efficacité de la traduction.

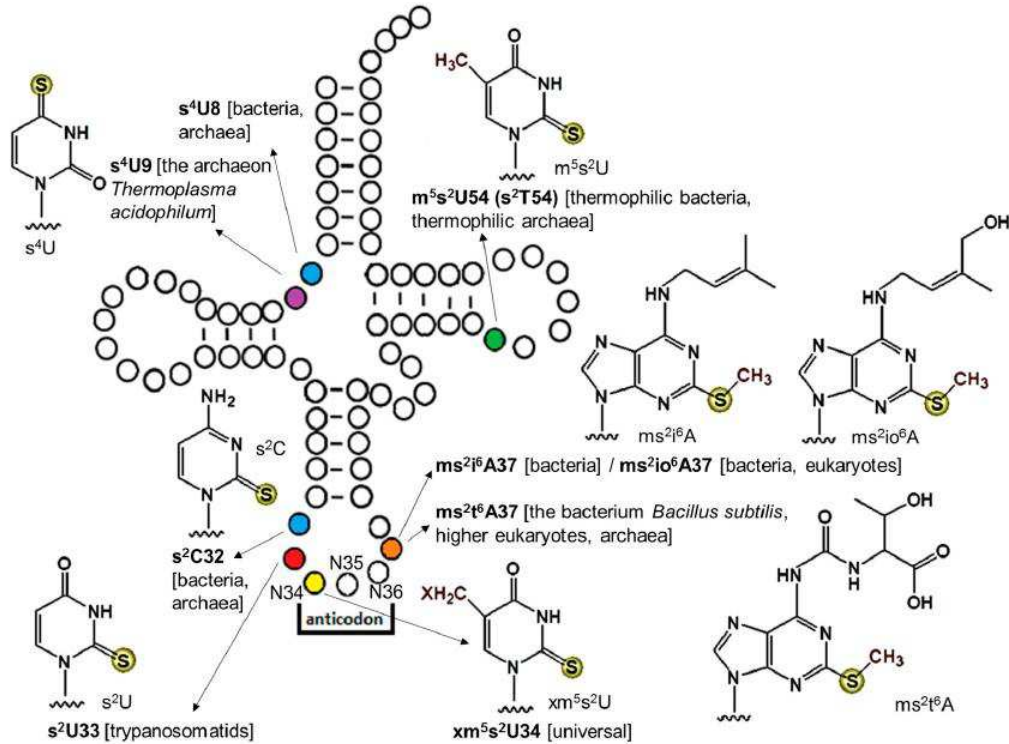


Figure 20: Localisation et structure des thionucléotides modifiés identifiés dans les trois domaines de vie. Les abréviations : s^4U (4-thiouridine), s^2C (2-thiocytidine), s^2U (2-thiouridine), m^5s^2U ou s^2T (5-méthyl-2-thiouridine ou 2-thioribothymidine), $ms^{2i6}A$ (2-méthylthio- N^6 -isopentényladénosine), $ms^{2io6}A$ (2-méthylthio- N^6 -hydroxyisopentényladénosine), $ms^{2t6}A$ (2-méthylthio- N^6 -thréonylcarbamoyladénosine). La xm^5s^2U correspond aux dérivés 5-méthyl-2-thiouridine : mm^5s^2U (5-méthylaminométhyl-2-thiouridine), cmm^5s^2U (5-carboxyméthylaminométhyl-2-thiouridine), mcm^5s^2U (5-méthoxycarbonylméthyl-2-thiouridine) et τm^5s^2U (5-taurinométhyl-2-thiouridine, dans la mitochondrie) (Čavuzić and Liu, 2017).

III-C-2) Les enzymes de thiolation des ARNt et leur mécanisme réactionnel

Des enzymes de modification spécifiques sont responsables de l'activation de l'ARNt cible et de l'incorporation de l'atome de soufre provenant du sulfure inorganique ou du soufre lié à une protéine de transport de soufre sous forme de persulfure ou de thiocarboxylate (Čavuzić and Liu, 2017; Nakai et al., 2017; Shigi, 2014). L'insertion du soufre dans les nucléotides des ARNt est catalysée par les enzymes ThiI, TtcA, MnmA, Ctu1/Tuc1/Ncs6/NcsA, MiaB/MtaB et TtuA,

qui agissent en position 8, 32, 34, 34, 37 et 54 respectivement (Björk et al., 2007; Dewez et al., 2008; Jäger et al., 2004; Kambampati and Lauhon, 2003; Mueller, 1998; Nakai et al., 2008; Noma et al., 2009). Alors que la réaction de méthylthiolation est catalysée par une enzyme radical SAM (§III-C-2-b), la substitution d'un atome d'oxygène par un soufre nécessite l'activation du nucléotide cible via l'adénylation par une molécule d'ATP (§III-C-2-a). Deux mécanismes ont été décrits impliquant des centres [Fe-S] ou non.

III-C-2-a) La simple substitution d'un atome d'oxygène par un soufre utilisant la chimie des persulfures

Le mécanisme de substitution d'un atome d'oxygène par un atome de soufre a été le mieux étudié pour les enzymes MnmA et ThiI qui ciblent l'atome C2 de l' U_{34} et l'atome C4 de l' U_8 d'ARNt, respectivement **Figure 22**. MnmA et ThiI d'*E. coli* partagent 17 % d'identité de séquence (Čavuzić and Liu, 2017) **Figure 21**.

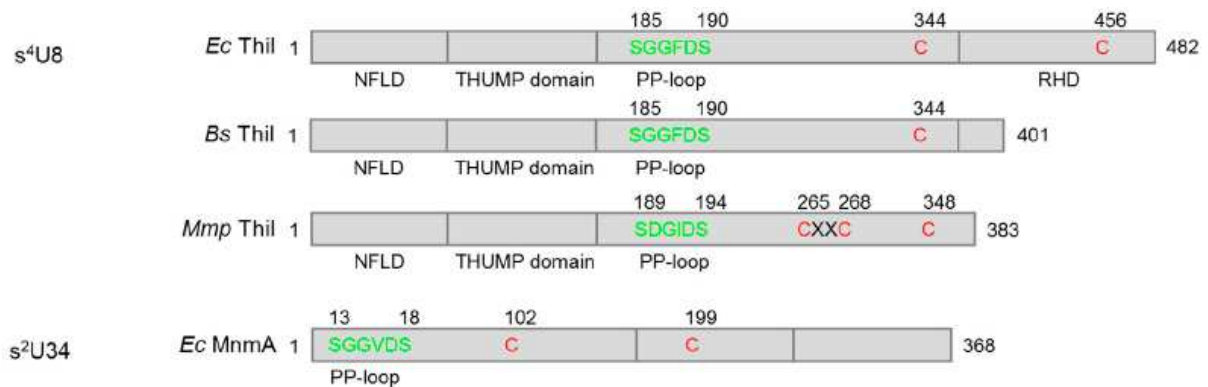


Figure 21 : Comparaison des domaines structuraux de la s^4U_8 synthétase ThiI de bactéries (*E. coli* et *B. subtilis*) et de l'archée *M. maripaludis* (Mmp) et de la s^2U_{34} synthétase MnmA d'*E. coli*. Le motif PP-loop (de fixation de l'ATP en vert) et les cystéines catalytiques (en rouge) sont représentés. Les domaines ont été identifiés grâce aux structures cristallographiques de ThiI de *B. anthracis* et MnmA d'*E. coli*. NFLD (N-terminal ferredoxin-like domain), THUMP (thiouridine synthases, méthylases et pseudouridine synthases), RHD (rhodanèse homology domain) (Čavuzić and Liu, 2017).

Les mécanismes de ThiI et MnmA ont été étudiés et leur structure déterminée en complexe avec un ARN substrat (un ARNt entier dans le cas de MnmA d'*E. coli* et un mini-ARN dans le cas de ThiI de *Termotoga maritima*) (Neumann et al., 2014; Numata et al., 2006).

i. U₃₄-ARNt 2-sulfurtransférase MnmA

Plusieurs structures de MnmA (tRNA 2-**m**ethylamino**m**ethylthiouridylase **A**) d'*E. coli* en complexe avec un ARNt^{Glu}_{UUC} ont été résolues, représentant l'étape initial de fixation de l'ARNt, l'état pré-réactionnel et l'état adénylé en présence d'ATP (Numata et al., 2006). De plus, des expériences *in vitro* de transfert de soufre en présence de [³⁵S]-Cys ont permis d'identifier les résidus Cys102 et Cys199 conservés comme étant importants pour la thiolation de U₃₄-ARNt (Numata et al., 2006). Ces résultats sont en accord avec un mécanisme dans lequel la Cys199 (Cys A) accepte le soufre sous forme de persulfure du système de relais de soufre TusBCD, alors que la Cys102 (Cys B) assiste la catalyse en formant une liaison covalente avec la Cys199 à la fin de chaque cycle catalytique **Figure 22**. L'orthologue de la protéine MnmA dans la mitochondrie chez les eucaryotes est appelée Trmu (**t**RNA-specific-**m**itochondrial 2-thiouridilase **1**) ou Mtu1 (Umeda et al., 2005).

Un nouveau nucléotide modifié s²U₃₃ a été découvert dans l'ARNt^{Trp} mitochondrial chez *trypanosomatida Leishmania* qui est le seul résidu thiolé dans cet ARNt (Crain et al., 2002). La protéine orthologue à MnmA d'*E. coli* dans cet organisme (28% d'identité de séquence) possède les cystéines catalytiques conservées. Il est probable que les s²U₃₃ synthétases mitochondriales aient un mécanisme catalytique similaire à MnmA d'*E. coli*.

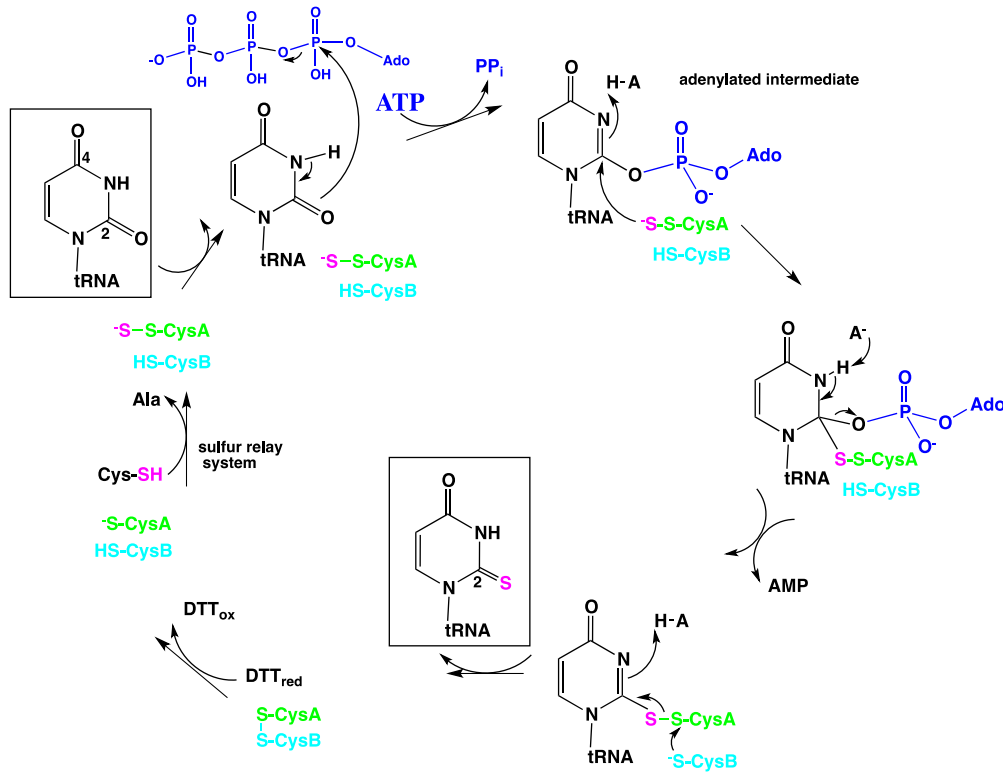


Figure 22 : Mécanisme proposé pour la réaction de thiolation catalysée par MnmA et ThiI d'*E. coli*. La formation de s²U (MnmA) est représentée, mais la formation de s⁴U (ThiI) procéderait de façon similaire. Tout d'abord, l'enzyme active l'atome C2 ou C4 d'U₃₄ ou U₈ par adénylation en utilisant une molécule d'ATP. Puis, le soufre du persulfure présent sur la cystéine catalytique (CysA), précédemment formé grâce au système de relais de soufre, pourrait directement attaquer l'atome C2 ou C4 de l'intermédiaire adénylé, menant à la libération d'une molécule d'AMP. Une seconde possibilité (non représentée ici) est que le soufre terminal du persulfure est libéré sous forme de sulfure d'hydrogène, qui sert de nucléophile pour déplacer l'oxygène activé de l'uridine. Dans les deux cas, le transfert du soufre est assisté par une seconde cystéine (CysB) pour réduire le pont disulfure entre CysA et l'ARN. Le pont disulfure formé entre les deux cystéines doit enfin être réduit pour compléter le cycle enzymatique (par le DTT, *in vitro*).

ii. U₈-ARNt 4-sulfuretransférase (ThiI)

Chez *E. coli* et *B. subtilis*, les cystéines désulfurases IscS ou NifZ transfèrent directement le soufre à ThiI sous forme de persulfure (Kambampati and Lauhon, 2000; Rajakovich et al., 2012). Chez *E. coli*, des expériences de mutagenèse dirigée, de marquage isotopique et de spectrométrie de masse ont permis de montrer que le domaine RHD présent dans ThiI accepte

le soufre de IscS sous forme de persulfure sur la Cys456 **Figure 21**. La cystéine persulfurée va réaliser une attaque nucléophile directe sur le nucléotide adénylé ou bien le soufre terminal du persulfure est libéré sous forme de sulfure d'hydrogène, et sert ensuite de nucléophile pour déplacer l'oxygène activé de l'uridine (Mueller et al., 2001). Dans les deux cas, une seconde cystéine (Cys344) est utilisée pour régénérer l'enzyme pour un nouveau cycle en formant un pont disulfure avec la cystéine catalytique. Le mécanisme proposé pour ThiI d'*E. coli* implique la formation d'un persulfure sur une cystéine du RHD. Cependant, toutes les protéines ThiI ne possèdent pas un RHD comme c'est le cas pour ThiI des bactéries *B. subtilis* et *Thermotoga maritima*. De plus, plusieurs ThiI ne possèdent qu'une seule cystéine conservée. Des structures de la protéine ThiI ne contenant pas de RHD, chez les bactéries *B. anthracis* et *T. maritima*, ont été déterminées en complexe avec une molécule d'AMP/ATP et/ou un mini-ARN (Neumann et al., 2014; Waterman et al., 2006).

III-C-2-b) L'activation du nucléotide cible par les enzymes à radicale SAM : l'ARNt méthylthiotransférase

La deuxième classe de réaction de thiolation des nucléotides d'ARNt consiste en l'insertion d'un atome de soufre dans une liaison C-H. Cette réaction chimique complexe est catalysée par les S-adénosyl-L-méthionine (SAM)-radical méthylthiotransférases appelées MiaB et MtaB pour la formation de ms²i⁶A37 et ms²t⁶A37, respectivement (Atta et al., 2012; Forouhar et al., 2013).

Toutes les enzymes radical-SAM catalysant des réactions de thiolation (incluant les enzymes biotine et lipoate synthase) contiennent deux centres fer-soufre (Fugate and Jarrett, 2012; Harmer et al., 2014). Un premier centre [4Fe-4S] est impliqué dans la réduction et le clivage d'une molécule de SAM, alors que l'autre [4Fe-4S] ou [2Fe-2S] joue le rôle soit de donneur de soufre ou de transporteur d'un ion hydrosulfure pour l'étape de thiolation (Booker et al., 2007; Mulliez et al., 2017). Cette question est très discutée dans la littérature actuellement (McCarthy and Booker, 2017). Le centre [Fe-S] additionnel de l'ARNt méthylthiotransférase n'apparaît pas être un donneur de soufre sacrificiel, car plusieurs cycles catalytiques peuvent être obtenus *in vitro* en présence d'un excès de sulfure exogène ou de sulfure de méthyle (Forouhar et al., 2013). La méthylthiolation des ARNt fait intervenir le clivage réductif d'une molécule de SAM par un centre [4Fe-4S] pour générer le radical adénosyl (Ado•), qui va arracher un atome

d'hydrogène du substrat **Figure 23**. Le deuxième centre [4Fe-4S] coordonné par seulement trois cystéines sert d'accepteur d'un hydrogènesulfure ou d'un groupe thiométhyl sur son site de coordination libre pour que celui-ci soit transféré au substrat activé. La nature du sulfure et de l'agent réducteur nécessaires pour régénérer l'enzyme *in vivo*, ne sont pas connus.

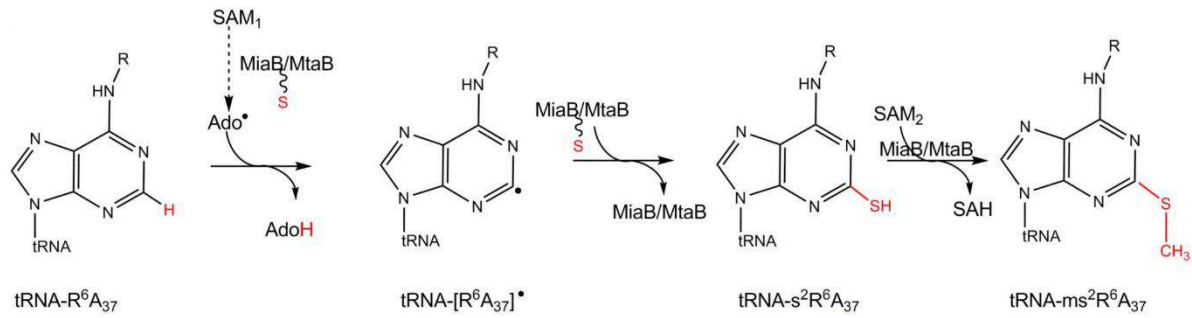


Figure 23 : Mécanisme catalytique proposé pour la méthylation par les enzymes radical-SAM MiaB/MtaB (ms²i⁶A₃₇). La réaction implique deux centres [4Fe-4S] : un premier centre [Fe-S] est responsable du clivage d'une molécule de SAM pour générer un radical adénosyl, qui va arracher un hydrogène du substrat et l'activer. La réaction de méthylation nécessite du sulfure et une seconde molécule de SAM et fait probablement intervenir la liaison d'un groupement thiométhyl ou d'un ion hydrogènesulfure, sur le site de coordination libre du second centre [Fe-S] (Atta et al., 2012)

OBJECTIF DE LA THESE

Les mécanismes d'insertion du soufre dans les nucléotides sont de type ionique (chimie des persulfures) ou de type radicalaire (radical SAM). La première classe qui consiste en la substitution d'un atome d'oxygène par un atome de soufre catalysée par une ARNt thiolase a la particularité d'avoir une première étape d'activation du nucléotide cible par une molécule d'ATP. Alors que des études fonctionnelles et structurales se sont intensifiées sur l'élucidation des mécanismes enzymatiques de formation des thionucléotides présents en position 8, 34 et 37 d'ARNt bactériens, très peu d'enzymes responsables des autres thiomodifications (positions 9, 32, 33, 54 et 34 chez d'autres organismes) n'avaient été étudiées.

C'est donc dans ce cadre que l'enzyme TtcA d'*E. coli* responsable, de la formation de la 2-thiocytidine (s^2C) en position 32 des ARNt avait été étudiée. Cette enzyme est caractérisée par la présence dans sa séquence protéique d'un motif PP-loop et d'un motif central CXXC, qui n'est pas présent dans les protéines ThiI et MnmA. Des expériences de mutagenèse dirigée ont confirmé que, dans TtcA d'*E. coli*, les deux cystéines du motif central CXXC ainsi qu'une troisième cystéine coordonnent un centre [4Fe-4S], qui est crucial pour l'activité *in vitro* de thiolation de C₃₂-ARNt. Un mécanisme différent des deux types de mécanisme de thiolation de nucléotides cités précédemment a été proposé, dans lequel une molécule d'ATP activerait la cytidine cible et un atome de soufre du persulfure de IscS-SSH serait transféré au site de coordination libre du centre [4Fe-4S], qui agirait comme transporteur de soufre. C'est dans ce contexte que durant ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'élucidation du mécanisme de substitution d'un oxygène par un soufre par d'autres ARNt thiolases, utilisant potentiellement un cofacteur [Fe-S] et l'obtention d'une structure cristallographique de ces enzymes.

Les prochains chapitres de cette thèse vont s'intéresser à cette troisième classe de thiolases nommée famille TtcA/TtuA. Cette famille d'enzymes contient les enzymes TtcA (s^2C_{32}) chez les bactéries, TtuA (s^2T_{54}) chez les bactéries et archées et NcsA/Ncs6/Ctu1 (selon les organismes, xms^2U_{34}) chez les archées et le cytoplasme des eucaryotes. Les connaissances actuelles sur ces enzymes vont être introduites dans chaque chapitre, suivies par les résultats obtenus ou article publié présentant nos découvertes récentes concernant à la caractérisation biochimique et structurale de cette famille d'enzymes. Cette thèse sera clôturée par une discussion et une conclusion générale sur le mécanisme réactionnel putatif de cette famille de thiolases TtcA/TtuA.

Références bibliographiques

- Abelson, J., Trotta, C.R., and Li, H. (1998). tRNA splicing. *J. Biol. Chem.* *273*, 12685–12688.
- Agris, P.F. (2008). Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO Reports* *9*, 629–635.
- Alexandrov, A., Chernyakov, I., Gu, W., Hiley, S.L., Hughes, T.R., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. (2006). Rapid tRNA Decay Can Result from Lack of Nonessential Modifications. *Molecular Cell* *21*, 87–96.
- Arnez, J.G., and Steitz, T.A. (1994). Crystal Structure of Unmodified tRNA^{G1} Complexed with Glutamyl-tRNA Synthetase and ATP Suggests a Possible Role for Pseudo-Uridines in Stabilization of RNA Structure. *33*, 7560–7567.
- Atta, M., Arragain, S., Fontecave, M., Mulliez, E., Hunt, J.F., Luff, J.D., and Forouhar, F. (2012). The methylthiolation reaction mediated by the Radical-SAM enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1824*, 1223–1230.
- Belfort, M. (1994). *The RNA world* Edited by Raymond F. Gesteland and John F. Atkins Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cell* *77*, 801–802.
- BéNas, P., Bec, G., Keith, G., Marquet, R., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Dumas, P. (2000). The crystal structure of HIV reverse-transcription primer tRNA(Lys,3) shows a canonical anticodon loop. *RNA* *6*, 1347–1355.
- Björk, G.R. (1995). Genetic Dissection of Synthesis and Function of Modified Nucleosides in Bacterial Transfer RNA. 263–338.
- Björk, G.R., and Kohli, J. (1990). Synthesis and Function of Modified Nucleosides in tRNA. In *Journal of Chromatography Library*, (Elsevier), pp. B13–B67.
- Björk, G.R., Lundgren, H.K., Nilsson, K., Chen, P., Qian, Q., and Urbonavicius, J. (1999). Transfer RNA modification: influence on translational frameshifting and metabolism. *FEBS Letters* *452*, 47–51.
- Björk, G.R., Huang, B., Persson, O.P., and Bystrom, A.S. (2007). A conserved modified wobble nucleoside (mcm5s2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *RNA* *13*, 1245–1255.

- Black, K.A., and Dos Santos, P.C. (2015). Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: Mechanism and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 1470–1480.
- Boccaletto, P., Machnicka, M.A., Purta, E., Piątkowski, P., Bagiński, B., Wirecki, T.K., de Crécy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P.A., Kotter, A., et al. (2018). MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research* 46, D303–D307.
- Booker, S.J., Cicchillo, R.M., and Grove, T.L. (2007). Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 543–552.
- Bordo, D. (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. *EMBO Reports* 3, 741–746.
- Brosnan, J.T., and Brosnan, M.E. (2006). The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The Journal of Nutrition* 136, 1636S-1640S.
- Brzóska, K., Męczyńska, S., and Kruszewski, M. (2006). Iron-sulfur cluster proteins: electron transfer and beyond. 53, 7.
- Bühning, M., Valleriani, A., and Leimkühler, S. (2017). The Role of SufS Is Restricted to Fe–S Cluster Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 56, 1987–2000.
- Byrne, R.T., Konevega, A.L., Rodnina, M.V., and Antson, A.A. (2010). The crystal structure of unmodified tRNA^{Phe} from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 38, 4154–4162.
- Cantara, W.A., Bilbille, Y., Kim, J., Kaiser, R., Leszczyńska, G., Malkiewicz, A., and Agris, P.F. (2012). Modifications modulate anticodon loop dynamics and codon recognition of *E. coli* tRNA(Arg1,2). *J. Mol. Biol.* 416, 579–597.
- Carell, T., Brandmayr, C., Hienzsch, A., Müller, M., Pearson, D., Reiter, V., Thoma, I., Thumbs, P., and Wagner, M. (2012). Structure and Function of Noncanonical Nucleobases. *Angewandte Chemie International Edition* 51, 7110–7131.
- Čavuzić, M., and Liu, Y. (2017). Biosynthesis of Sulfur-Containing tRNA Modifications: A Comparison of Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Pathways. *Biomolecules* 7, 27.
- Chan, C.T.Y., Pang, Y.L.J., Deng, W., Babu, I.R., Dyavaiah, M., Begley, T.J., and Dedon, P.C. (2012). Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nature Communications* 3.

- Chawla, M., Abdel-Azeim, S., Oliva, R., and Cavallo, L. (2014). Higher order structural effects stabilizing the reverse Watson-Crick Guanine-Cytosine base pair in functional RNAs. *Nucleic Acids Research* 42, 714–726.
- Chen, M., Asai, S., Narai, S., Nambu, S., Omura, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ikeda-Saito, M., Watanabe, K., Yao, M., et al. (2017). Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron-sulfur protein TtuA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 4954–4959.
- Chen, X., Li, N., and Ellington, A.D. (2007). Ribozyme Catalysis of Metabolism in the RNA World. *Chemistry & Biodiversity* 4, 633–655.
- Chen, Y., Sierzputowska-Gracz, H., Guenther, R., Everett, K., and Agris, J., P.F. (1993). 5-Methylcytidine Is Required for Cooperative Binding of Mg²⁺ and a Conformational Transition at the Anticodon Stem-Loop of Yeast Phenylalanine tRNA? *RNA* 32, 10249–10253.
- Chimnarong, S., Suzuki, T., Manita, T., Ikeuchi, Y., Yao, M., Suzuki, T., and Tanaka, I. (2009). RNA helicase module in an acetyltransferase that modifies a specific tRNA anticodon. *The EMBO Journal* 28, 1362–1373.
- Crain, P.F., Alfonzo, J.D., Rozenski, J., Kapushoc, S.T., McCloskey, J.A., and Simpson, L. (2002). Modification of the universally unmodified uridine-33 in a mitochondria-imported edited tRNA and the role of the anticodon arm structure on editing efficiency. *RNA* 8, 752–761.
- Crick, F.H. (1966). Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19, 548–555.
- Derrick, W.B., and Horowitz, J. (1993). Probing structural differences between native and *in vitro* transcribed *Escherichia coli* valine transfer RNA: evidence for stable base modification-dependent conformers. *Nucleic Acids Research* 21, 4948–4953.
- Dewez, M., Bauer, F., Dieu, M., Raes, M., Vandehaute, J., and Hermand, D. (2008). The conserved wobble uridine tRNA thiolase Ctu1–Ctu2 is required to maintain genome integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5459–5464.
- Dirheimer, G., Keith, G., Dumas, P. & Westof, E. (1995). Primary, secondary and tertiary structures of tRNAs. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. (ASM Press, Washington, DC, USA), pp. 93–126.

Dyubankova, N., Sochacka, E., Kraszewska, K., Nawrot, B., Herdewijn, P., and Lescrinier, E. (2015). Contribution of dihydrouridine in folding of the D-arm in tRNA. *Organic & Biomolecular Chemistry* 13, 4960–4966.

Fislage, M., Zhang, J., Brown, Z.P., Mandava, C.S., Sanyal, S., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2018). Cryo-EM shows stages of initial codon selection on the ribosome by aa-tRNA in ternary complex with GTP and the GTPase-deficient EF-TuH84A. *Nucleic Acids Research* 46, 5861–5874.

Florentz, C., Sohm, B., Tryoen-Toth, P., Pütz, J., and Sissler, M. (2003). Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60, 1356–1375.

Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature Chemical Biology* 2, 171–174.

Forouhar, F., Arragain, S., Atta, M., Gambarelli, S., Mouesca, J.-M., Hussain, M., Xiao, R., Kieffer-Jaquinod, S., Seetharaman, J., Acton, T.B., et al. (2013). Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. *Nature Chemical Biology* 9, 333–338.

Foürster, C., Chakraburty, K., and Sprinzl, M. (1993). Discrimination between initiation and elongation of protein biosynthesis in yeast: identity assured by a nucleotide modification in the initiator tRNA. *Nucleic Acids Research* 21, 5679–5683.

Friederich, M.W., and Hagerman, P.J. (1997). The Angle between the Anticodon and Aminoacyl Acceptor Stems of Yeast tRNAPhe Is Strongly Modulated by Magnesium Ions. *Biochemistry* 36, 6090–6099.

Fugate, C.J., and Jarrett, J.T. (2012). Biotin synthase: Insights into radical-mediated carbon–sulfur bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824, 1213–1222.

Giegé, R. (2006). The early history of tRNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. *Journal of Biosciences* 31, 477–488.

Giegé, R., Puglisi, J.D., and Florentz, C. (1993). tRNA structure and aminoacylation efficiency. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 45, 129–206.

Gilbert, W.V., Bell, T.A., and Schaening, C. (2016). Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function. *Science* 352, 1408–1412.

Green, N.J., Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2010). The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. *FEBS Letters* 584, 318–324.

Grosjean, H. (2015). RNA modification: the Golden Period 1995–2015. *RNA* 21, 625–626.

- Grosjean, H., Sprinzl, M., and Steinberg, S. (1995). Posttranscriptionally modified nucleosides in transfer RNA: their locations and frequencies. *Biochimie* 77, 139–141.
- Grosjean, H., de Crécy-Lagard, V., and Marck, C. (2010). Deciphering synonymous codons in the three domains of life: Co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Letters* 584, 252–264.
- Grosshans, H., Hurt, E., and Simos, G. (2000). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *14*, 830–840.
- Harmer, J.E., Hiscox, M.J., Dinis, P.C., Fox, S.J., Iliopoulos, A., Hussey, J.E., Sandy, J., Van Beek, F.T., Essex, J.W., and Roach, P.L. (2014). Structures of lipoyl synthase reveal a compact active site for controlling sequential sulfur insertion reactions. *Biochemical Journal* 464, 123–133.
- He, C. (2010). Grand Challenge Commentary: RNA epigenetics? *Nature Chemical Biology* 6, 863–865.
- Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Research* 34, 721–733.
- Hidese, R., Mihara, H., and Esaki, N. (2011). Bacterial cysteine desulfurases: versatile key players in biosynthetic pathways of sulfur-containing biofactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 47–61.
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458, 422–429.
- Hoernes, T.P., Hüttenhofer, A., and Erlacher, M.D. (2016). mRNA modifications: Dynamic regulators of gene expression? *RNA Biology* 13, 760–765.
- Huang, B., Lu, J., and Bystrom, A.S. (2008). A genome-wide screen identifies genes required for formation of the wobble nucleoside 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 14, 2183–2194.
- Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., and Suzuki, T. (2006). Mechanistic Insights into Sulfur Relay by Multiple Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at tRNA Wobble Positions. *Molecular Cell* 21, 97–108.
- Itoh, Y., Chiba, S., Sekine, S., and Yokoyama, S. (2009). Crystal structure of human selenocysteine tRNA. *Nucleic Acids Research* 37, 6259–6268.
- Jackman, J.E., and Alfonzo, J.D. (2013). Transfer RNA modifications: nature’s combinatorial chemistry playground: Transfer RNA modifications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4, 35–48.

Jäger, G., Leipuviene, R., Pollard, M.G., Qian, Q., and Bjork, G.R. (2004). The Conserved Cys-X1-X2-Cys Motif Present in the TtcA Protein Is Required for the Thiolation of Cytidine in Position 32 of tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 186, 750–757.

Jaroensuk, J., Atichartpongkul, S., Chionh, Y.H., Wong, Y.H., Liew, C.W., McBee, M.E., Thongdee, N., Prestwich, E.G., DeMott, M.S., Mongkolsuk, S., et al. (2016). Methylation at position 32 of tRNA catalyzed by TrmJ alters oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research* 44, 10834–10848.

Jenner, L.B., Demeshkina, N., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 555–560.

Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005). Structure, function and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* 74, 247–281.

Joyce, G.F. (2002). The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* 418, 214–221.

Jüdes, A., Ebert, F., Bär, C., Thüring, K.L., Harrer, A., Klassen, R., Helm, M., Stark, M.J.R., and Schaffrath, R. (2015). Urmlylation and tRNA thiolation functions of ubiquitin-like Uba4·Urm1 systems are conserved from yeast to man. *FEBS Letters* 589, 904–909.

Kabil, O., and Banerjee, R. (2010). Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide. *Journal of Biological Chemistry* 285, 21903–21907.

Kambampati, R., and Lauhon, C.T. (2000). Evidence for the Transfer of Sulfane Sulfur from IscS to ThiI during the in Vitro Biosynthesis of 4-Thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10727–10730.

Kambampati, R., and Lauhon, C.T. (2003). MnmA and IscS Are Required for in Vitro 2-Thiouridine Biosynthesis in. *Biochemistry* 42, 1109–1117.

Kapushoc, S.T., Alfonzo, J.D., and Simpson, L. (2002). Differential localization of nuclear-encoded tRNAs between the cytosol and mitochondrion in *Leishmania tarentolae*. *RNA* 8, 57–68.

Kasai, H., Nakanishi, K., Macfarlane, R.D., Torgerson, D.F., Ohashi, Z., McCloskey, J.A., Gross, H.J., and Nishimura, S. (1976). The structure of Q* nucleoside isolated from rabbit liver transfer ribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* 98, 5044–5046.

Kennedy, M.C., Emptageg, M.H., Dreyerll, J.-L., and Beinert, H. (1983). The Role of Iron in the Activation-Inactivation of Aconitase. *The Journal of Biological Chemistry* 18, 11098–11105.

- Kessler, D. (2006). Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 825–840.
- Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H., Seeman, N.C., and Rich, A. (1974). Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* 185, 435–440.
- Kotera, M., Bayashi, T., Hattori, M., Tokimatsu, T., Goto, S., Mihara, H., and Kanehisa, M. (2010). Comprehensive genomic analysis of sulfur-relay pathway genes. In *Genome Informatics 2010: Genome Informatics Series Vol. 24*, (World Scientific), pp. 104–115.
- Kowalak, J.A. (1994). The Role of Posttranscriptional Modification in Stabilization of Transfer RNA from Hyperthermophiles. *Biochemistry* 33, 7869–7876.
- Kumbhar, B.V., Kamble, A.D., and Sonawane, K.D. (2013). Conformational Preferences of Modified Nucleoside N(4)-Acetylcytidine, ac4C Occur at “Wobble” 34th Position in the Anticodon Loop of tRNA. *Cell Biochemistry and Biophysics* 66, 797–816.
- Lageix, S., Zhang, J., Rothenburg, S., and Hinnebusch, A.G. (2015). Interaction between the tRNA-Binding and C-Terminal Domains of Yeast Gcn2 Regulates Kinase Activity In Vivo. *PLOS Genetics* 11.
- Lazcano, A., and Miller, S.L. (1996). The Origin and Early Evolution of Life: Prebiotic Chemistry, the Pre-RNA World, and Time. *Cell* 85, 793–798.
- Leidel, S., Pedrioli, P.G.A., Bucher, T., Brost, R., Costanzo, M., Schmidt, A., Aebersold, R., Boone, C., Hofmann, K., and Peter, M. (2009). Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature* 458, 228–232.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature* 460, 831–838.
- Liu, Y., Sieprawska-Lupa, M., Whitman, W.B., and White, R.H. (2010). Cysteine Is Not the Sulfur Source for Iron-Sulfur Cluster and Methionine Biosynthesis in the Methanogenic Archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 31923–31929.
- Loiseau, L., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Forest, E., Fontecave, M., and Barras, F. (2005). Analysis of the Heteromeric CsdA-CsdE Cysteine Desulfurase, Assisting Fe-S Cluster Biogenesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26760–26769.
- Lorenz, C., Lünse, C., and Mörl, M. (2017). tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation. *Biomolecules* 7, 35.

Machnicka, M.A., Olchowik, A., Grosjean, H., and Bujnicki, J.M. (2014). Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. *RNA Biology* *11*, 1619–1629.

Makarova, K.S., and Koonin, E.V. (2010). Archaeal Ubiquitin-Like Proteins: Functional Versatility and Putative Ancestral Involvement in tRNA Modification Revealed by Comparative Genomic Analysis. *Archaea* *2010*, 1–10.

Marck, C. (2003). Identification of BHB splicing motifs in intron-containing tRNAs from 18 archaea: evolutionary implications. *RNA* *9*, 1516–1531.

Marck, C., and Grosjean, H. (2002). tRNomics: Analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA* *8*, 1189–1232.

McCarthy, E.L., and Booker, S.J. (2017). Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. *Science* *358*, 373–377.

Miranda, H.V., Nembhard, N., Su, D., Hepowit, N., Krause, D.J., Pritz, J.R., Phillips, C., Soll, D., and Maupin-Furlow, J.A. (2011). E1- and ubiquitin-like proteins provide a direct link between protein conjugation and sulfur transfer in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 4417–4422.

Motorin, Y., and Helm, M. (2010). tRNA Stabilization by Modified Nucleotides. *Biochemistry* *49*, 4934–4944.

Mueller, E. (1998). Identification of a gene involved in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *Nucleic Acids Research* *26*, 2606–2610.

Mueller, E.G. (2006). Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nature Chemical Biology* *2*, 185–194.

Mueller, S. (2005). Iron regulatory protein 1 as a sensor of reactive oxygen species. *BioFactors* *24*, 171–181.

Mueller, E.G., Palenchar, P.M., and Buck, C.J. (2001). The Role of the Cysteine Residues of ThiI in the Generation of 4-Thiouridine in tRNA. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 33588–33595.

Mulliez, E., Duarte, V., Arragain, S., Fontecave, M., and Atta, M. (2017). On the Role of Additional [4Fe-4S] Clusters with a Free Coordination Site in Radical-SAM Enzymes. *Frontiers in Chemistry* *5*.

- Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T., and Yokoyama, S. (1988). Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature* 336, 179–181.
- Nakai, Y., Nakai, M., and Hayashi, H. (2008). Thio-modification of Yeast Cytosolic tRNA Requires a Ubiquitin-related System That Resembles Bacterial Sulfur Transfer Systems. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27469–27476.
- Nakai, Y., Nakai, M., and Yano, T. (2017). Sulfur Modifications of the Wobble U34 in tRNAs and their Intracellular Localization in Eukaryotic Cells. *Biomolecules* 7, 17.
- Neumann, P., Lakomek, K., Naumann, P.-T., Erwin, W.M., Lauhon, C.T., and Ficner, R. (2014). Crystal structure of a 4-thiouridine synthetase–RNA complex reveals specificity of tRNA U8 modification. *Nucleic Acids Research* 42, 6673–6685.
- Nobles, K.N., Yarian, C.S., Liu, G., Guenther, R.H., and Agris, P.F. (2002). Highly conserved modified nucleosides influence Mg²⁺-dependent tRNA folding. *30*, 4751–4760.
- Noma, A., Sakaguchi, Y., and Suzuki, T. (2009). Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Research* 37, 1335–1352.
- Nomura, Y., Ohno, S., Nishikawa, K., and Yokogawa, T. (2016). Correlation between the stability of tRNA tertiary structure and the catalytic efficiency of a tRNA-modifying enzyme, archaeal tRNA-guanine transglycosylase. *Genes to Cells* 21, 41–52.
- Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Suzuki, T., and Nureki, O. (2006). Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate. *Nature* 442, 419–424.
- Nureki, O., Niimi, T., Muramatsu, T., Kanno, H., Kohno, T., Florentz, C., Giegé, R., and Yokoyama, S. (1994). Molecular Recognition of the Identity-determinant Set of Isoleucine Transfer RNA from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 236, 710–724.
- Oliva, R. (2006). Accurate energies of hydrogen bonded nucleic acid base pairs and triplets in tRNA tertiary interactions. *Nucleic Acids Research* 34, 865–879.
- Outten, F.W., Wood, M.J., Muñoz, F.M., and Storz, G. (2003). The SufE Protein and the SufBCD Complex Enhance SufS Cysteine Desulfurase Activity as Part of a Sulfur Transfer Pathway for Fe-S Cluster Assembly in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 45713–45719.

Palego, L., Betti, L., and Giannaccini, G. (2015). Sulfur Metabolism and Sulfur-Containing Amino Acids: I- Molecular Effectors. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access* 04.

Paul, B.D., and Snyder, S.H. (2012). H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 499–507.

Pedrioli, P.G.A., Leidel, S., and Hofmann, K. (2008). Urm1 at the crossroad of modifications. ‘Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects’ Review Series. *EMBO Reports* 9, 1196–1202.

Phizicky, E.M., and Hopper, A.K. (2010). tRNA biology charges to the front. *Genes & Development* 24, 1832–1860.

Pütz, J., Florentz, C., Benseler, F., and Giegé, R. (1994). A single methyl group prevents the mischarging of a tRNA. *Nat. Struct. Biol.* 1, 580–582.

Rajakovich, L.J., Tomlinson, J., and Dos Santos, P.C. (2012). Functional Analysis of *Bacillus subtilis* Genes Involved in the Biosynthesis of 4-Thiouridine in tRNA. *Journal of Bacteriology* 194, 4933–4940.

Rider, L.W., Ottosen, M.B., Gattis, S.G., and Palfey, B.A. (2009). Mechanism of Dihydrouridine Synthase 2 from Yeast and the Importance of Modifications for Efficient tRNA Reduction. *Journal of Biological Chemistry* 284, 10324–10333.

Rohrer, D.C., and Sundaralingam, M. (1970). Stereochemistry of nucleic acids and their constituents. VI. The crystal structure and conformation of dihydrouracil: a minor base of transfer-ribonucleic acid. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 26, 546–553.

Russell, M.J., Daniel, R.M., Hall, A.J., and Sherringham, J.A. (1994). A hydrothermally precipitated catalytic iron sulphide membrane as a first step toward life. *Journal of Molecular Evolution* 39, 231–243.

Sekowska, A., Kung, H.F., and Danchin, A. (2000). Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 145–177.

Selmer, M. (2006). Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313, 1935–1942.

Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.-F., Matte, A., Armengod, M.E., and Cygler, M. (2010). Structural Basis for Fe–S Cluster Assembly and tRNA Thiolation Mediated by IscS Protein–Protein Interactions. *PLoS Biology* 8, e1000354.

Shigi, N. (2014). Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Frontiers in Genetics* 5.

- Shigi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., and Watanabe, K. (2006a). Identification of Two tRNA Thiolation Genes Required for Cell Growth at Extremely High Temperatures. *Journal of Biological Chemistry* 281, 14296–14306.
- Shigi, N., Suzuki, T., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Watanabe, K. (2006b). Temperature-dependent Biosynthesis of 2-Thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA. *Journal of Biological Chemistry* 281, 2104–2113.
- Shigi, N., Sakaguchi, Y., Asai, S., Suzuki, T., and Watanabe, K. (2008). Common thiolation mechanism in the biosynthesis of tRNA thiouridine and sulphur-containing cofactors. *The EMBO Journal* 27, 3267–3278.
- Shigi, N., Asai, S., and Watanabe, K. (2016). Identification of a rhodanese-like protein involved in thiouridine biosynthesis in *Thermus thermophilus* tRNA. *FEBS Letters* 590, 4628–4637.
- Sprinzi, M., and Cramer, F. (1975). Site of aminoacylation of tRNAs from *Escherichia coli* with respect to the 2'- or 3'-hydroxyl group of the terminal adenosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 3049–3053.
- Sprinzi, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A., and Steinberg, S. (1998). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 26, 148–153.
- Suck, D., and Saenger, W. (1971). Conformation of the tRNA minor constituent dihydrouridine. *FEBS Letters* 12, 257–259.
- Suzuki, T., and Suzuki, T. (2014). A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic Acids Research* 42, 7346–7357.
- Szweykowska-Kulinska, Z., Senger, B., Keith, G., Fasiolo, F., and Grosjean, H. (1994). Intron-dependent formation of pseudouridines in the anticodon of *Saccharomyces cerevisiae* minor tRNA^{Ile}. *13 19*, 4636–4644.
- Takemoto, C., Spremulli, L.L., Benkowski, L.A., Ueda, T., Yokogawa, T., and Watanabe, K. (2009). Unconventional decoding of the AUA codon as methionine by mitochondrial tRNA^{Met} with the anticodon f5 CAU as revealed with a mitochondrial in vitro translation system. *Nucleic Acids Research* 37, 1616–1627.
- Tchong, S.-I., Xu, H., and White, R.H. (2005). L-Cysteine Desulfidase: An [4Fe-4S] Enzyme Isolated from *Methanocaldococcus jannaschii* That Catalyzes the Breakdown of L-Cysteine into Pyruvate, Ammonia, and Sulfide. *Biochemistry* 44, 1659–1670.

Theissen, U. (2003). Single Eubacterial Origin of Eukaryotic Sulfide:Quinone Oxidoreductase, a Mitochondrial Enzyme Conserved from the Early Evolution of Eukaryotes During Anoxic and Sulfidic Times. *Molecular Biology and Evolution* 20, 1564–1574.

Tisné, C., Rigourd, M., Marquet, R., Ehresmann, C., and Dardel, F. (2000). NMR and biochemical characterization of recombinant human tRNA³ Lys expressed in *Escherichia coli*: Identification of posttranscriptional nucleotide modifications required for efficient initiation of HIV-1 reverse transcription. *RNA* 6, 1403–1412.

Tomikawa, C., Yokogawa, T., Kanai, T., and Hori, H. (2010). N 7-Methylguanine at position 46 (m7G46) in tRNA from *Thermus thermophilus* is required for cell viability at high temperatures through a tRNA modification network. *Nucleic Acids Research* 38, 942–957.

Toohey, J., and Cooper, A. (2014). Thiosulfoxide (Sulfane) Sulfur: New Chemistry and New Regulatory Roles in Biology. *Molecules* 19, 12789–12813.

Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., Watanabe, K., and Suzuki, T. (2005). Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *Journal of Biological Chemistry* 280, 1613–1624.

Urbonavicius, J.U., Qian, Q., Durand, J.M., Tord, G.H., and Björk, G.R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO Journal* 20, 4863–4873.

Vendeix, F.A.P., Dziergowska, A., Gustilo, E.M., Graham, W.D., Sproat, B., Malkiewicz, A., and Agris, P.F. (2008). Anticodon Domain Modifications Contribute Order to tRNA for Ribosome-Mediated Codon Binding. *Biochemistry* 47, 6117–6129.

Vermeulen, A., McCallum, S.A., and Pardi, A. (2005). Comparison of the Global Structure and Dynamics of Native and Unmodified tRNA^{Val}. *Biochemistry* 44, 6024–6033.

Vogel, A., Schilling, O., Späth, B., and Marchfelder, A. (2005). The tRNase Z family of proteins: physiological functions, substrate specificity and structural properties. *Biological Chemistry* 386.

Voorhees, R.M., Mandal, D., Neubauer, C., Köhrer, C., RajBhandary, U.L., and Ramakrishnan, V. (2013). The structural basis for specific decoding of AUA by isoleucine tRNA on the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 641–643.

Walker, S.C., and Engelke, D.R. (2006). Ribonuclease P: The Evolution of an Ancient RNA Enzyme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 41, 77–102.

Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal* 16, 1792–1798.

Wang, Y., Pang, C., Li, X., Hu, Z., Lv, Z., Zheng, B., and Chen, P. (2017). Identification of tRNA nucleoside modification genes critical for stress response and development in rice and Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 17.

Waterman, D.G., Ortiz-Lombardía, M., Fogg, M.J., Koonin, E.V., and Antson, A.A. (2006). Crystal Structure of Bacillus anthracis ThiI, a tRNA-modifying Enzyme Containing the Predicted RNA-binding THUMP Domain. *Journal of Molecular Biology* 356, 97–110.

Wellner, K., Czech, A., Ignatova, Z., Betat, H., and Mörl, M. (2018). Examining tRNA 3'-ends in *Escherichia coli*: teamwork between CCA-adding enzyme, RNase T, and RNase R. *RNA* 24, 361–370.

Witz, J. (2003). 1964: The first model for the shape of a transfer RNA molecule. An account of an unpublished small-angle X-ray scattering study. *Biochimie* 85, 1265–1268.

Wyatt, G.R. (1950). Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Nature* 166, 237–238.

Xiong, Y., and Steitz, T. (2006). A story with a good ending: tRNA 3'-end maturation by CCA-adding enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 16, 12–17.

Xu, Y., MacKerell, A.D., and Nilsson, L. (2016a). Structural effects of modified ribonucleotides and magnesium in transfer RNAs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24, 4826–4834.

Xu, Y., MacKerell, A.D., and Nilsson, L. (2016b). Structural effects of modified ribonucleotides and magnesium in transfer RNAs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24, 4826–4834.

Yamagami, R., Tomikawa, C., Shigi, N., Kazayama, A., Asai, S., Takuma, H., Hirata, A., Fourmy, D., Asahara, H., Watanabe, K., et al. (2016). Folate-/FAD-dependent tRNA methyltransferase from *Thermus thermophilus* regulates other modifications in tRNA at low temperatures. *Genes to Cells* 21, 740–754.

Yokoyama, S., Muramatsu, T., Horie, N., Nishikawa, K., Matsuda, A., Ueda, T., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Nishimura, S., and Miyazawa, T. (1989). A novel lysine-substituted nucleoside in the first position of the anticodon of minor isoleucine tRNA from *Escherichia coli*. *Pure and Applied Chemistry* 61, 573–576.

Yoshihisa, T. (2006). tRNA, new aspects in intracellular dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 1813–1818.

Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N., and Endo, T. (2003). Possibility of Cytoplasmic pre-tRNA Splicing: the Yeast tRNA Splicing Endonuclease Mainly Localizes on the Mitochondria. *Molecular Biology of the Cell* 14, 3266–3279.

Yoshihisa, T., Ohshima, C., Yunoki-Esaki, K., and Endo, T. (2007). Cytoplasmic splicing of tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* 12, 285–297.

Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2000). NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 599–604.

Zagryadskaya, E.I. (2003). Importance of the reverse Hoogsteen base pair 54-58 for tRNA function. *Nucleic Acids Research* 31, 3946–3953.

Zagryadskaya, E.I., Kotlova, N., and Steinberg, S.V. (2004). Key Elements in Maintenance of the tRNA L-shape. *Journal of Molecular Biology* 340, 435–444.

Zhang, W., Urban, A., Mihara, H., Leimkühler, S., Kurihara, T., and Esaki, N. (2010). IscS Functions as a Primary Sulfur-donating Enzyme by Interacting Specifically with MoeB and MoeD in the Biosynthesis of Molybdopterin in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 2302–2308.

CHAPITRE I

**BIOSYNTHESE DE LA 2-THIOCYTIDINE : C₃₂-ARNT-2-
SULFURTRANSFERASE (TTCA)**

A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Les modifications chimiques de la cytidine présentes en position 32 des ARNt ont été très étudiées ces dernières années (Um, Cm, Am, ψ U et s^2 C, du fait de sa proximité de l'anticodon (Jaroensuk et al., 2016; Wrzesinski et al., 1995); <http://modomics.genesilico.pl/modifications/>. La 2-thiocytidine a été identifiée pour la première fois en 1968 chez *E. coli* (Carbon et al., 1968). Sa présence a été observée dans seulement quatre ARNt (ARNt^{Arg}_{ICG}, ARNt^{Arg}_{CCG}, ARNt^{Arg}_{mmm}⁵_{UCU}, ARNt^{Ser}_{GCU}) chez les bactéries *E. coli* et *S. enterica* et chez certaines archées (*M. maripaludis*, *M. vannielli*, *M. igneus* et *M. thermolithotrophicus*) (Leipuviene et al., 2004; McCloskey, 2001; Sprinzl, 2005). Même si l'absence de s^2 C₃₂ n'influe pas sur le phénotype des organismes étudiés, elle optimise le processus de décodage (Jäger et al., 2004).

Un modèle du complexe ARNt_{siteP}-ARNt_{siteA}-ARNm basé sur la structure cristallographique d'ARNt et des distances mesurées entre la position dans le site A et P du ribosome de ces ARNt permet de positionner la modification s^2 C en position 32 de l'ARNt au site P du ribosome, à proximité de l'anticodon de l'ARNt au site A (Drew Smith and Michael Yarus, 1989). De plus, des expériences de gènes rapporteurs ont permis de déterminer la vitesse de sélection d'ARNt amino-acylé (aa-ARNt) au niveau du site A du ribosome, ainsi que des possibles décalages de cadre de lecture. Ces expériences montrent d'une part que la présence de s^2 C₃₂ dans l'ARNt^{Arg}_{nm}⁵_{UCU} au site P augmente la vitesse de sélection de l'aa-ARNt dans le site A du ribosome (Jäger et al., 2004). D'autre part, la présence de s^2 C₃₂ dans l'ARNt au site P interférerait avec le décodage au niveau du site A du ribosome en diminuant l'efficacité de décodage d'un ARNt suppresseur ou en augmentant la capacité du facteur de terminaison à décoder le codon UAG dans le site A (Jäger et al., 2004).

L'étude d'ASL (anticodon stem-loop) d'ARNt^{Arg} isoaccepteurs, possédant ou non la modification s^2 C₃₂, par dichroïsme circulaire et dénaturation thermique a montré que la présence de la modification réduit la stabilité thermique et décroît légèrement la structuration de la boucle par empilement de bases (Cantara et al., 2012). De plus, la détermination de la structure de ces ASL par RMN a montré que la modification s^2 C₃₂ induit une plus grande flexibilité de l'anticodon, limitant ainsi la formation de la conformation caractéristique de type U₃₃-turn présente dans les ASL ne possédant pas s^2 C₃₂. Des essais d'interaction de mini-ARN contenant l'ASL modifié ou non, avec différents codons au site A du ribosome, conduit à

l'utilisation du codon le plus efficace, en accord avec l'usage des codons d'*E. coli* : la présence de ^sC₃₂ diminue la vitesse de traduction du codon CGA et favorise le décodage des codons CGU et CGC (Baumann et al., 1985; Cantara et al., 2012; Jäger et al., 2004).

La délétion du gène *ttcA* (pour « two-thiocytidine ») chez la bactérie *S. enterica* a permis d'identifier la protéine TtcA comme étant responsable de la formation de ^sC₃₂ (Jäger et al., 2004). Des analyses bio-informatiques ont permis de répertorier la présence de l'enzyme TtcA dans les trois domaines de vie **Figure 24**. L'enzyme TtcA est présente chez de très nombreuses bactéries, à l'exception des actinobactéries et cyanobactéries. Chez les *Firmicutes* (bactéries à gram +), des homologues de la protéine TtcA sont essentiellement retrouvés dans le genre *clostridium*.

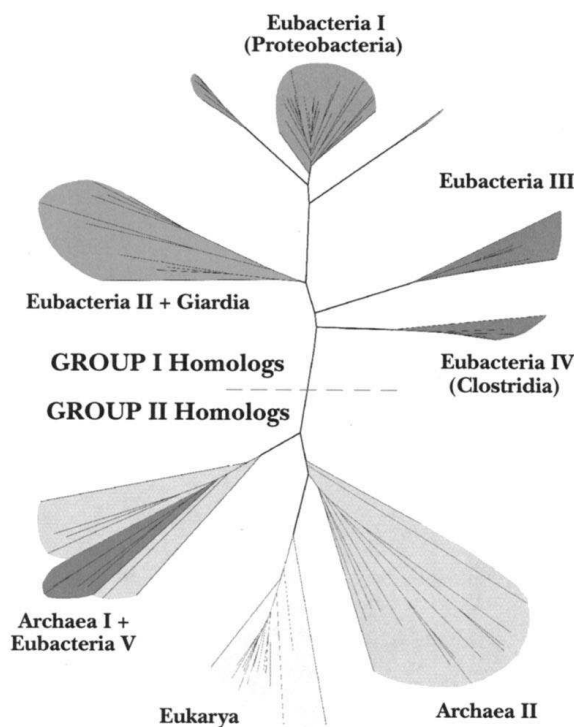
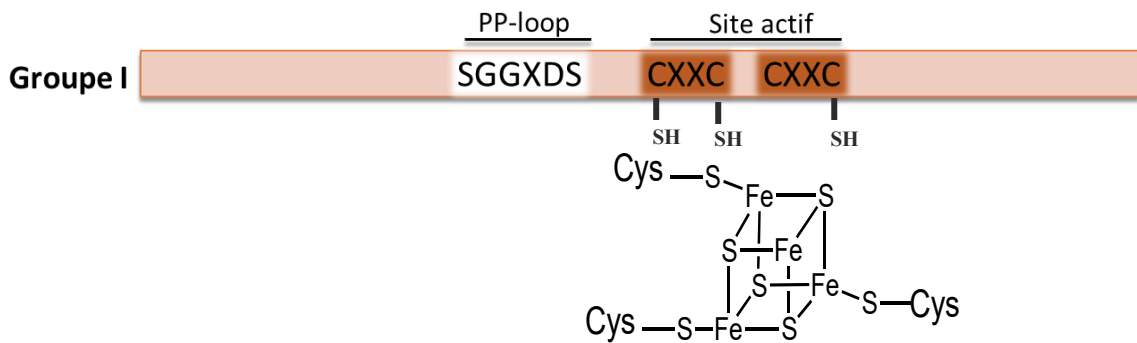


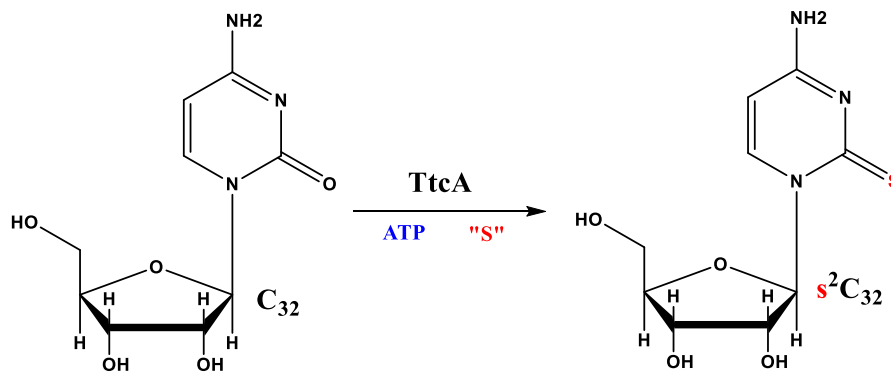
Figure 24: Arbre phylogénique montrant la relation entre les différentes familles de protéines TtcA. Les homologues du groupe I (en haut), contiennent différentes branches qui constituent le lignage des eubactéries et inclut aussi un représentant Eucaryote (*Giardia lamblia*). Le groupe II, en dessous se caractérise par trois groupes distincts : le cluster Archée I + Eubactérie V et le cluster archée II. Les représentants du cluster eucaryote sont apparentés aux bactéries et archées. (Jäger et al., 2004).

Des analyses de séquences de plus de 125 protéines similaires ont révélé que TtcA d'*E. coli* fait partie d'un premier sous-groupe de thiolases (du groupe I) caractérisées par la présence de deux motifs conservés CXXC (position 122 à 125 et 210 à 213) au centre de la séquence et un motif « SGGKDS » (position 47-52) caractéristique des domaines ATPases de la superfamille walker-loop ou PP-loop (motif de fixation de phosphate) **Figure 25**. L'analyse d'ARNt totaux d'une souche d' *E. coli* mutée du gène *ttcA* montre que la présence des deux cystéines du motif CXXC central (Cys 122 et Cys 125) est requise pour la formation de s²C₃₂ (Jäger et al., 2004).

a



b



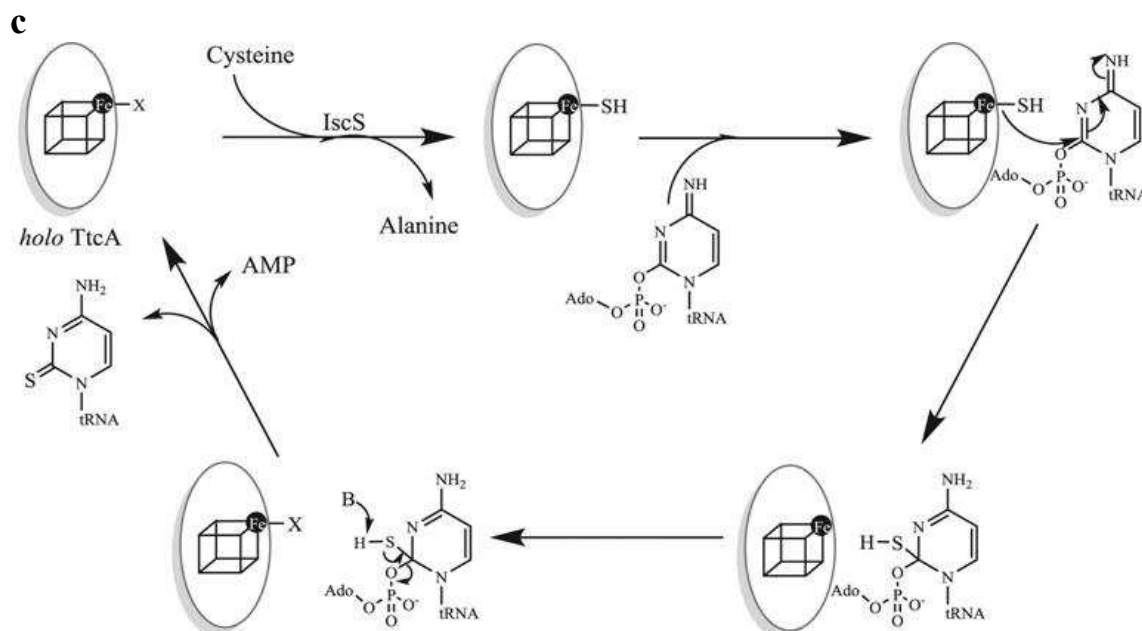


Figure 25: Relais de transfert de soufre lors de la biosynthèse de s²C₃₂-ARNt (Bouvier et al., 2014). (a) Représentation schématique de la séquence des enzymes du groupe I et localisation du motif PP-loop et des cystéines conservées. (b) Réaction catalysée par TtcA. (c) Mécanisme proposé de transfert de soufre lors de la réaction de formation de s²C₃₂-ARNt.

De plus, la diminution de la modification s²C₃₂ a été observée dans les ARNt d'une souche mutée des gènes *iscU*, *hscA* ou *fdX* codant pour des protéines impliquées dans l'assemblage des centres fer-soufre. Ceci a suggéré l'implication d'un centre fer-soufre dans la voie de biosynthèse de s²C₃₂, soit au sein de la protéine TtcA elle-même soit au niveau d'une protéine intermédiaire impliquée en amont de la voie de biosynthèse de la modification s²C₃₂ (Leipuviene et al., 2004).

Par la suite, des expériences *in vitro* de SEC-MALS et de reconstitution du centre [FeS] en anaérobie ont permis de montrer que l'enzyme TtcA d'*E. coli* est un dimère qui contient un centre fer-soufre (Bouvier et al., 2014). Des analyses spectroscopiques (RPE et Mössbauer) ont permis d'identifier la présence d'un centre [4Fe-4S] et des études de mutagenèse dirigée ont montré que trois des cystéines appartenant aux deux motifs CXXC (Cys 122, Cys 125 et Cys 213) sont responsables de la coordination du centre [4Fe-4S], qui est crucial pour l'activité *in vitro* de l'enzyme (Bouvier et al., 2014). Ces expériences ont conduit à proposer un mécanisme dans lequel l'atome de soufre provenant du persulfure porté par la protéine Isc-SSH est tout d'abord transféré au site de coordination libre du centre [4Fe-4S]. Après activation par une

Biosynthèse de la 2-thiocytidine : C₃₂-ARNt-2 sulfurtrnasférase (TtcA)

molécule d'adénosine triphosphate (ATP), la cytidine cible est adénylée. Le sulfure lié au centre fer-soufre réaliserait ensuite une attaque nucléophile sur l'intermédiaire adénylé formé, entraînant la libération de l'adénosine monophosphate (AMP) et la formation du produit d'ARNt thiolé en position 32 (s²C₃₂). Aucune structure de l'enzyme TtcA n'est connue à ce jour.

Afin d'élucider le mécanisme putatif par lequel TtcA d'*E. coli* réalise la modification de la cytidine en position 32 en thiocytidine, l'objectif était de produire, purifier et cristalliser la protéine TtcA d'*E. coli* et d'identifier des homologues présents chez d'autres organismes pouvant être utilisés pour des études cristallographiques.

B. RESULTAT ET DISCUSSION

B-I) Analyse de la protéolyse naturelle de TtcA d'*E. coli*

La séquence codante de TtcA sauvage d'*E. coli* avait été précédemment clonée au laboratoire dans le plasmide pGEX-6P-2 par la plateforme de clonage IMAGIF (Gif-sur-Yvette). Cette construction a permis d'exprimer la protéine de fusion avec une étiquette GST en N-terminal (Poids moléculaire théorique: 25 kDa).

La purification de la protéine sauvage privée de l'étiquette GST (Poids moléculaire théorique : 35 kDa) s'est faite en trois étapes chromatographiques : i) une colonne GSTrap qui retient les protéines étiquetées GST a permis d'éliminer la majorité des contaminants; ii) un clivage de l'étiquette par la protéase H3C, suivi d'une deuxième injection sur une colonne GSTRAP qui a permis de séparer l'étiquette GST clivée (retenue sur la colonne) de la protéine d'intérêt (éluee dans le lavage), mais également d'éliminer les contaminants retenus sur la colonne lors de la première étape ; et iii) une gel filtration permettant d'éliminer les agrégats de protéines ainsi que d'éventuels contaminants selon leur forme. Le profil électrophorétique obtenu sur gel 12 % SDS-PAGE montre la présence d'une bande contaminante en dessous de la bande majoritaire à 35 kDa correspondant à TtcA d'*E. coli* sauvage **Figure 26**. Afin de savoir si cette bande contient un contaminant ou un fragment de dégradation de TtcA, cette bande a été prélevée, digérée enzymatiquement et analysée par spectrométrie de masse LC-ESI-MS/MS par la plateforme SICaPS à Gif-sur-Yvette. Les spectres de masse révèlent une dégradation de TtcA d'*E. coli* en C-terminal après la position 292 **Figure 26**.

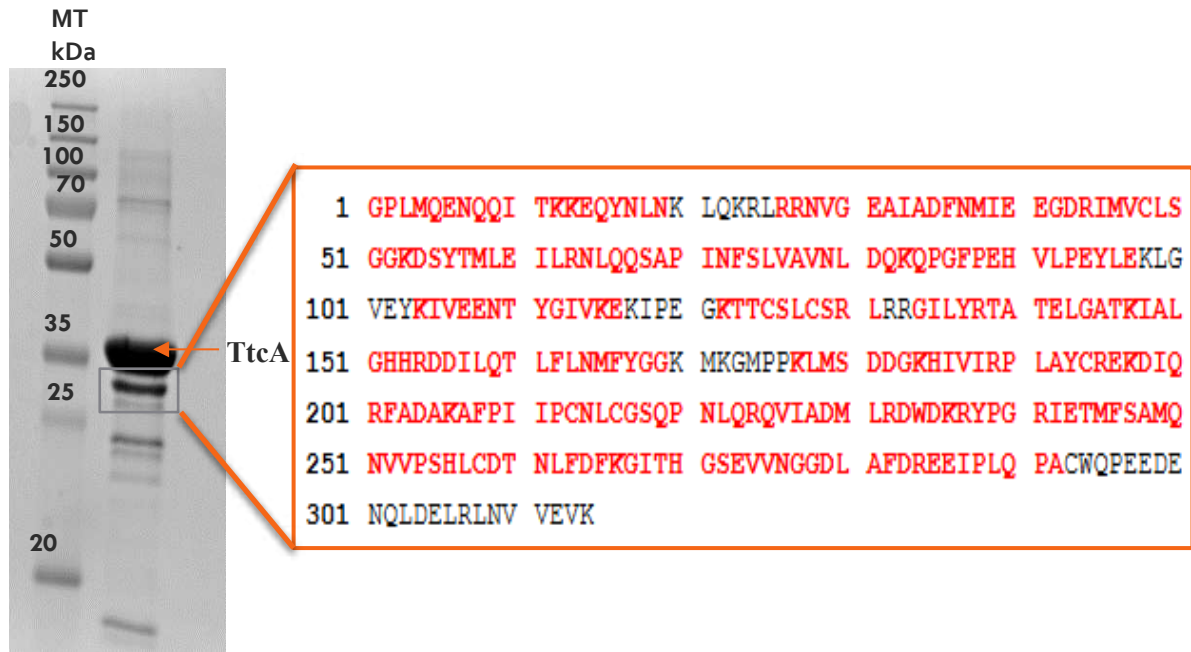


Figure 26: Le profil électrophorétique obtenu sur gel 12 % SDS-PAGE de la protéine TtcA sauvage d'*E. coli*, après gel filtration (Superdex S200 16/60). Analyse de la principale bande contaminante et recouvrement de la séquence protéique de TtcA d'*E. coli* par les peptides identifiés (en rouge) par spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS).

Cette région C-terminale apparaît donc sensible à la protéolyse. De plus, la prédiction d'éléments de structure secondaire par la méthode HCA (hydrophobic cluster analysis) de TtcA d'*E. coli* indique la présence en N-terminal (1-14) et C-terminal (289-311) de deux régions potentiellement peu structurées. Notre stratégie a donc été de réaliser deux constructions tronquées de TtcA d'*E. coli* : (i) une première construction tronquée en C-terminal appelée TtcA1-291 et (ii) une seconde construction tronquée en N-terminal et C-terminal appelée TtcA 14-289 **Figure 27.**

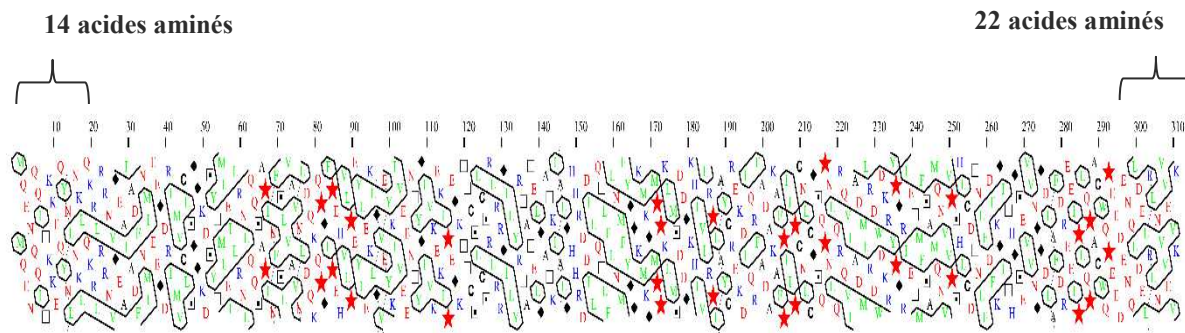


Figure 27: Analyse HCA (hydrophobic cluster analysis) de la structure secondaire de TtcA d'*E. coli*. La séquence est écrite sur une hélice α et affichée avec 3,6 résidus par tour sur un cylindre. Celui-ci est coupé le long de l'axe horizontal, déroulé et répété pour recréer l'environnement complet de chaque acide aminé. Cette représentation permet d'identifier les régions globulaires (en vert) et leur structure secondaire. Les symboles sont utilisés pour représenter les acides aminés avec des propriétés structurales particulières (les étoiles pour les prolines, diamant noir pour les glycines, carrés et carrés pointillés pour les thréonines et sérines respectivement, pouvant être enfuies ou exposés).

B-II) Production et purification des mutants de la protéine TtcA d'*E. coli*

La construction de la forme tronquée TtcA 1-291 a été réalisée par mutagenèse dirigée en introduisant un codon stop dans le gène après le codon correspondant au résidu en position 291 de la séquence de TtcA. La protéine tronquée TtcA 1-291 a été purifiée selon le même protocole que la protéine sauvage et des tests de cristallisation effectués. Le profil électrophorétique montre une bande correspondant à la protéine TtcA1-291 (poids moléculaire théorique : 33,4 kDa) **Figure 28a**. Aucun cristal n'a été obtenu. En parallèle, une seconde construction tronquée en N-terminal et C-terminal appelée TtcA 14-189 a été réalisée par la plateforme de clonage I2BC à Gif-sur-Yvette. Le gène a été cloné dans un plasmide pBG102 qui permet de surexprimer une protéine TtcA 14-189 contenant une étiquette His-SUMO clivable à la protéase preScission en N-terminal. Cette étiquette permet de solubiliser et purifier la protéine en quatre étapes. La protéine sur gel 12% SDS-PAGE montre un dédoublement de la bande correspondante à TtcA 14-289 (Poids moléculaire théorique 31,2 kDa) **Figure 28b**. Il semblerait que cette forme tronquée en N-terminal et C-terminal soit peu stable, ce qui entraîne de nouveau une protéolyse naturelle de la protéine.

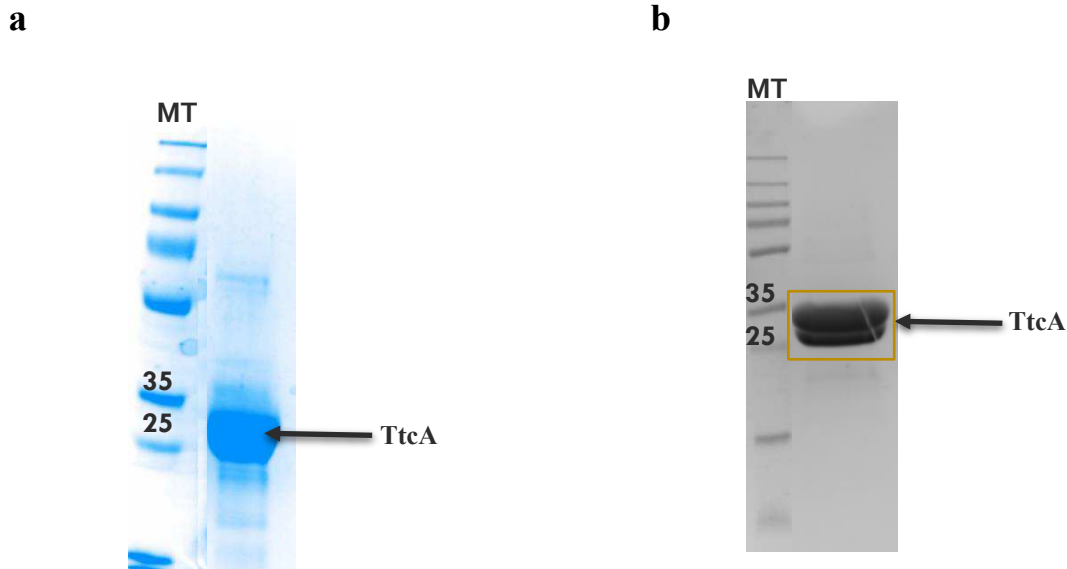


Figure 28: Gel 12% SDS-PAGE des protéines TtcA d'*E. coli* tronquées en N-terminal et/ou C-terminal après gel filtration Superdex S200 16/60: (a) TtcA1-291 poids moléculaire théorique 33kDa et (b) TtcA 14-189 à environ 31 kDa.

Toutes les tentatives d'obtention de cristaux de la forme sauvage et des deux formes tronquées en N-terminal et/ou C-terminal de l'enzyme TtcA d'*E. coli* ayant échoué, nous avons recherché dans les bases de données génomiques des protéines orthologues à TtcA. Des études phylogéniques de la famille d'enzymes dont fait partie TtcA font état de la présence d'une protéine orthologue à TtcA chez l'eucaryote *G. lamblia* (Jäger et al., 2004). Ce candidat potentiel GL50803_7368, possède 28% d'identité de séquence avec TtcA d'*E. coli* et possède dans sa séquence protéique les motifs PP-loop ainsi que les trois cystéines appartenant aux deux motifs CXXC caractéristiques des protéines du sous-groupe d'enzymes TtcA **Figure 29**.

D'autres recherches de protéines orthologues dans des organismes thermophiles grâce au programme Blast (NCBI) ont permis aussi d'identifier un autre candidat Thewi_1477 chez *Thermoanaerobacter wiegeli*. Les deux protéines possèdent des séquences plus courtes en C-terminal par comparaison à TtcA d'*E. coli*. Thewi_1477 a aussi une séquence plus courte en N-terminal et possède aussi des boucles plus courtes en comparaison à la séquence de TtcA d'*E. coli* ou de *G. lamblia*. Il apparaît donc comme le meilleur candidat pour une future étude structurale **Figure 29**.

Biosynthèse de la 2-thiocytidine : C₃₂-ARNt-2 sulfurtrnsférase (TtcA)

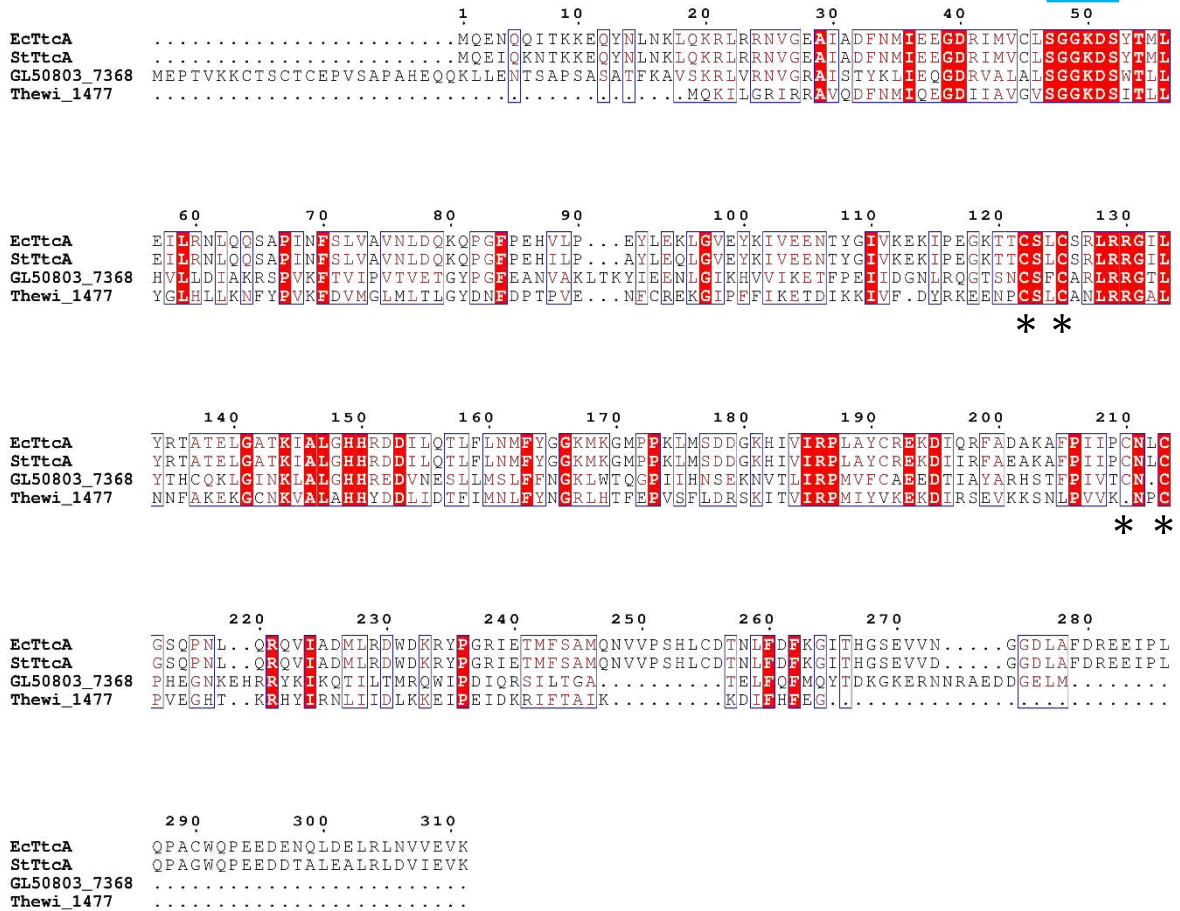


Figure 29 : Alignement de séquences de protéines TtcA chez différents organismes (Ec : *E. coli* ; St: *S. enterica typhimurium* ; GL : *G. lamblia* ; Thewi : *T. wieselii*). L'alignement a été réalisé avec le programme ClustalW omega et représenté avec ESript. Les résidus strictement conservés sont surlignés en rouge. Le motif PP-loop et les cystéines conservées sont indiqués par un trait en bleu et par des astérisques, respectivement.

Dans un futur proche, il serait donc intéressant de cloner, produire et purifier les deux candidats, Thewi_1477 et GL50803_7368. Il faudrait confirmer la présence d'un centre fer-soufre dans ces protéines et confirmer leur fonction de thiolation d'une cytosine. L'obtention d'une structure de l'une de ces deux protéines permettrait d'élucider le mécanisme par lequel l'enzyme TtcA catalyse la réaction de thiolation en position 32 des ARN de transfert.

Références bibliographiques

Baumann, U., Fischer, W., and Sprinzl, M. (1985). Analysis of modification-dependent structural alterations in the anticodon loop of *Escherichia coli* tRNA^{Arg} and their effects on the translation of MS2 RNA. *European Journal of Biochemistry* 152, 645–649.

Bouvier, D., Labessan, N., Clémancey, M., Latour, J.-M., Ravanat, J.-L., Fontecave, M., and Atta, M. (2014). TtcA a new tRNA-thioltransferase with an Fe-S cluster. *Nucleic Acids Research* 42, 7960–7970.

Cantara, W.A., Bilbille, Y., Kim, J., Kaiser, R., Leszczyńska, G., Malkiewicz, A., and Agris, P.F. (2012). Modifications modulate anticodon loop dynamics and codon recognition of *E. coli* tRNA(Arg1,2). *J. Mol. Biol.* 416, 579–597.

Carbon, J., David, H., and Studier, M.H. (1968). Thiobases in *Escherichia coli* Transfer RNA: 2-Thiocytosine and 5-Methylaminomethyl-2-thiouracil. *Science* 161, 1146–1147.

Drew Smith, and Michael Yarus (1989). tRNA-tRNA Interactions within Cellular Ribosomes. *Biochemistry* 86, 4397–4401.

Jäger, G., Leipuviene, R., Pollard, M.G., Qian, Q., and Bjork, G.R. (2004). The Conserved Cys-X1-X2-Cys Motif Present in the TtcA Protein Is Required for the Thiolation of Cytidine in Position 32 of tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 186, 750–757.

Jaroensuk, J., Atichartpongkul, S., Chionh, Y.H., Wong, Y.H., Liew, C.W., McBee, M.E., Thongdee, N., Prestwich, E.G., DeMott, M.S., Mongkolsuk, S., et al. (2016). Methylation at position 32 of tRNA catalyzed by TrmJ alters oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research* 44, 10834–10848.

Leipuviene, R., Qian, Q., and Bjork, G.R. (2004). Formation of Thiolated Nucleosides Present in tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Occurs in Two Principally Distinct Pathways. *Journal of Bacteriology* 186, 758–766.

McCloskey, J.A. (2001). Post-transcriptional modification in archaeal tRNAs: identities and phylogenetic relations of nucleotides from mesophilic and hyperthermophilic Methanococcales. *Nucleic Acids Research* 29, 4699–4706.

Sprinzl, M. (2005). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Research* 33, D139-40.

Wrzesinski, J., Nurse, K., Bakin, A., Lane, B.G., and Ofengang, J. (1995). A dual-specificity pseudouridine synthase: an *Escherichia coli* synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA(phe). *RNA* 4, 437–448.

CHAPITRE II

BIOSYNTHESE DE LA 5 METHYL-2-THIOURIDINE:

m⁵U₅₄-ARNT-2-SULFURTRANSFERASE (TTUA)

A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

En 1974, des ARNt ont été isolés chez la bactérie thermophile *T. thermophilus* (Watanabe and Oshima, 1974). Des expériences de digestion enzymatique et de mesures d'absorption UV-visible des fragments d'ARNt ont permis d'identifier pour la première fois la 2-thioribothymidine (s²rT). Cette thiomodification est identifiée bien plus tard chez l'archée *P. furiosus* par des analyses par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse de nucléosides d'ARNt totaux après digestion (Kowalak, 1994). Chez les organismes thermophiles, cette thioribothymidine (s²rT) est thiolée sur le C2 et méthylée sur le C5 de l'uridine en position 54 des ARNt (Kowalak, 1994; Yokoyama, 1987). Ces modifications présentes à la jonction entre la boucle T et D des ARNt, permettent de maintenir la structure en L des ARN de transfert (Yokoyama, 1987). La modification s²T₅₄ permet à ces organismes thermophiles d'adapter leur machinerie cellulaire de traduction des protéines à des environnements thermiques spécifiques. En effet, des mesures de la température de fusion (T_m) d'ARNt de *Thermus thermophilus* et d'*E. coli* par dichroïsme circulaire ont permis d'observer une thermostabilité des ARNt plus importante chez *T. thermophilus* (de 5-10°C) (Watanabe et al., 1976; Yokoyama, 1987). De plus, chez *T. thermophilus* et *Pyrococcus furiosus*, pour une température de croissance supérieure ou égale à 80 °C, plus de la moitié des ARNt contiennent la thiomodification s²T₅₄, tandis qu'à 50°C, seule une faible proportion de ces ARNts sont thiolés à cette position (Watanabe et al., 1976).

Des analyses par RMN de ces mêmes nucléotides (T et s²T) ont permis d'expliquer le mécanisme par lequel la présence de s²T₅₄ améliore la stabilité thermique des ARNt (Yokoyama, 1987). L'encombrement stérique entre les groupements 2-thiocarbonyl et 2'-hydroxyl conduit s²T à adopter une conformation C3'endo, différente de la conformation standard C2'endo d'une thymidine **Figure 30**. Cette différence structurale procure au nucléotide s²T une rigidité supplémentaire, ayant pour effet d'augmenter la température de fusion (T_m) des ARNt qui contiennent cette thiomodification en position 54 (s²rT₅₄) (Shigi, 2014; Yokoyama, 1987).

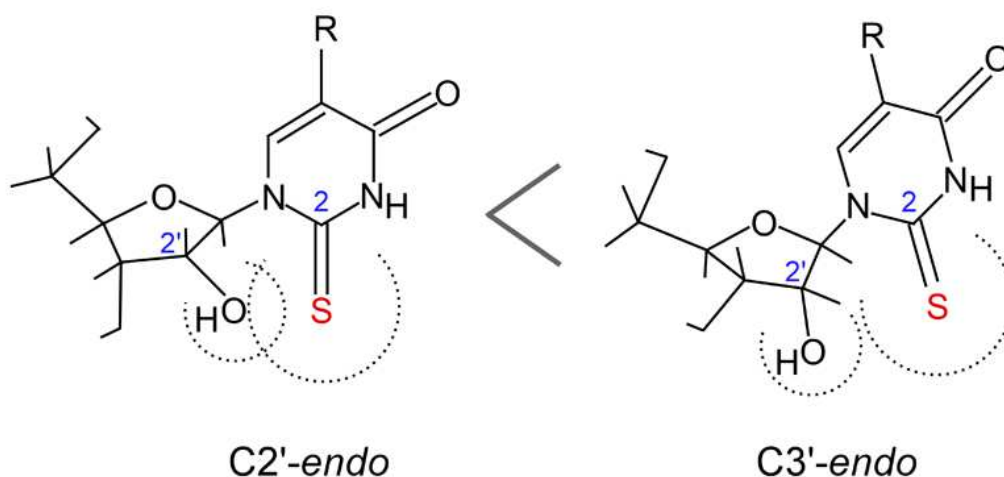


Figure 30: Les formes C2'-endo et C3'-endo de s²T. La conformation de C3'-endo de xm⁵s²U est préférentielle du fait de l'encombrement stérique des groupements 2-thio et OH des conformations C2'-endo. D'après Shigi et *al.*, 2014 (Shigi, 2014)

Bien que la fonction de s²T₅₄ ait été largement explorée, le mécanisme de biosynthèse de s²T₅₄ a été jusqu'ici peu étudié. Des expériences préliminaires de culture *in vivo* en présence de [³⁵S]-L-cystéine et de [³⁵S] sulfate de sodium radiomarqués ont permis d'identifier le donneur de soufre lors de la thiomodification s²T dans les ARNt chez *T. thermophilus* (Shigi et al., 2006a). L'analyse des ARNt totaux extraits des cellules, sur un gel en condition dénaturante, a permis d'observer l'incorporation d'atomes de soufre radiomarqués. De plus, des tests d'activité *in vitro*, utilisant des ARNt transcrits mutés (U₅₄-A) ou non en position 54, ainsi que le séquençage des produits séparés sur gel APM ont montré que l'incorporation du soufre a bien lieu en position 54 (Shigi et al., 2006a).

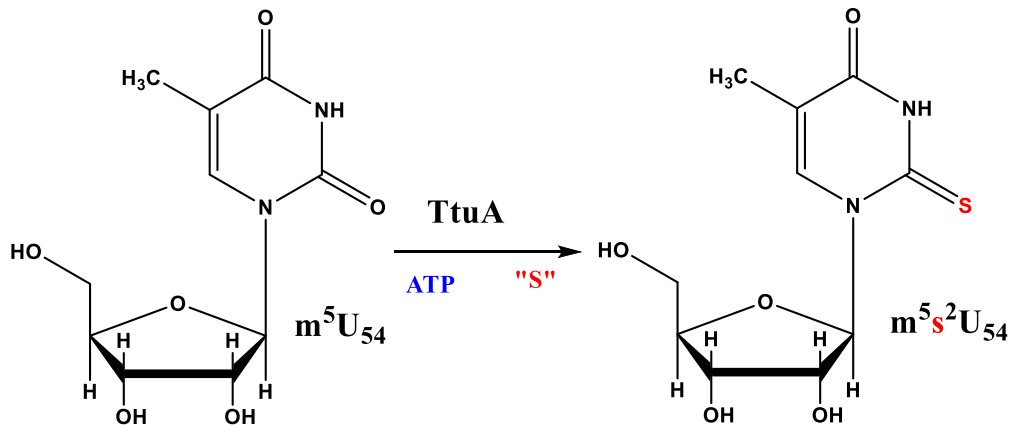
En 2006, l'immobilisation d'ARNt sur une résine streptavidine-sépharose, suivie de la purification par affinité des protéines le liant et de l'analyse de celui-ci par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/ESI-MS), ont permis d'identifier la protéine TtuA comme essentielle lors de la synthèse de la 2-thiothymidine (s²T) en position 54 des ARN de transfert chez *T. thermophilus* et par extension chez d'autres organismes thermophiles **Figure 31c** (Jäger et al., 2004; Shigi et al., 2006b).

La protéine TtuA appartient au second sous-groupe (groupe II) de la famille d'enzymes de thiolation des ARNt dont fait partie TtcA d'*E. coli* et *S. enterica* (groupe I) (Jäger et al., 2004). Le sous-groupe II contient le motif PP-loop et le motif central CXXC caractéristique de cette famille. La différence entre les deux sous-groupes est que le sous-groupe II comprend, en plus,

Biosynthèse de la 5-méthyl-2thiouridine : m^5U_{54} -ARNt-sulfurtransférase (TtuA)

deux motifs CXXC/H, en N- et C-terminal, qui correspondent à de motifs de liaison d'un atome de zinc **Figure 31b-c** (Shigi et al., 2006b).

a



b



C

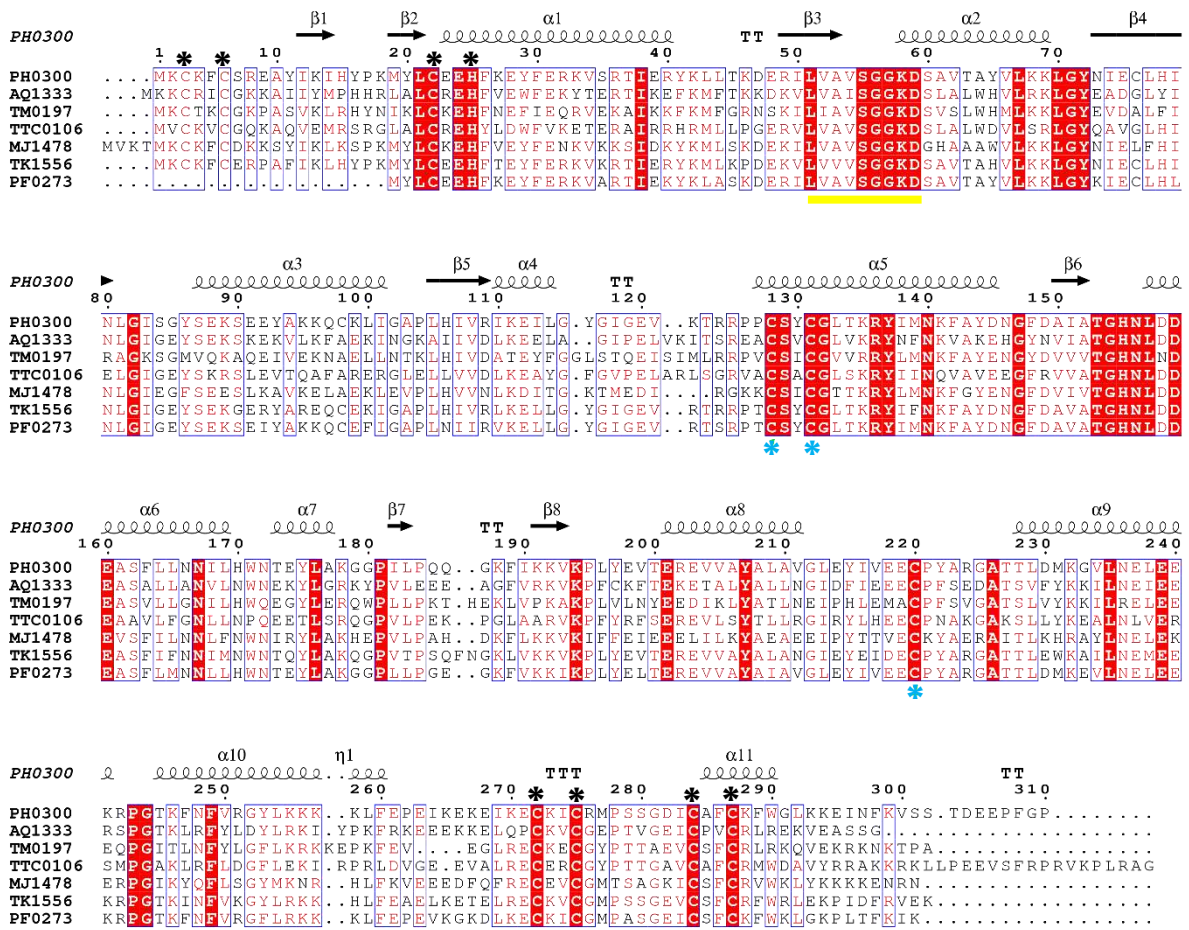
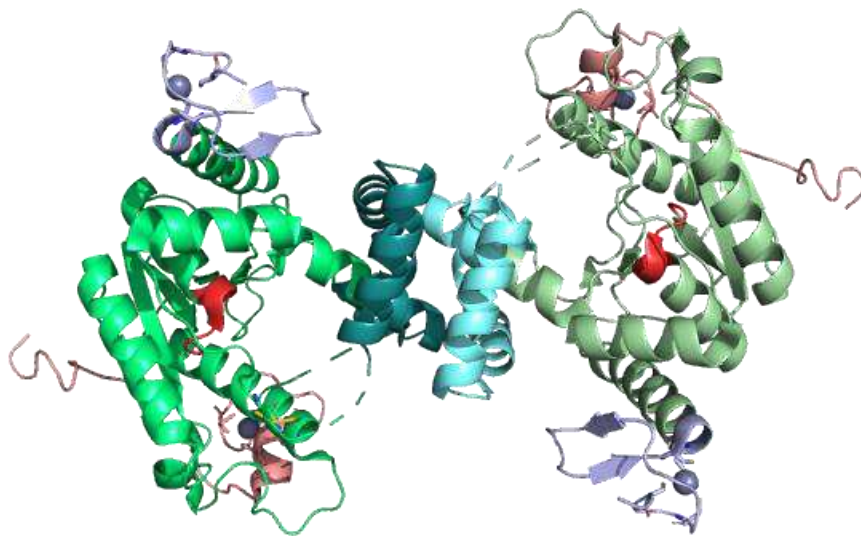


Figure 31: (a) Réaction catalysée par TtuA. (b) Représentation schématique de la localisation du motif PP-loop et des cystéines conservées au sein de la séquence des enzymes du sous-groupe II de la famille TtcA/TtuA. (c) Alignement de séquences de protéines TtuA répertoriées dans la littérature. La séquence en acide aminés de PhTtuA (PH0300) et sa structure secondaire sont alignées avec les autres protéines TtuA de différents organismes : *Aquifex aeolicus* (AQ1333), *T. maritima* (TM0197), *T. thermophilus* (TTC0106), *M. jannaschii* (MJ1478), *T. kodakarensis* (TK1556), *P. furiosus* (PF0273). Les résidus complètement conservés sont surlignés en rouge, le motif PP-loop est indiqué d'un trait jaune, les trois résidus cystéiniques catalytiques sont indiqués par des astérisques bleus et les autres résidus cystéiniques impliqués dans la coordination d'un atome de Zn sont indiqués par des astérisques noirs.

La protéine TtuA de l'archée thermophile *P. horikoshii* a été caractérisée biochimiquement *in vivo* et la structure cristallographique de l'apoprotéine a été résolue à 2,1 Å de résolution (Nakagawa et al., 2013). L'apo-PhTtuA forme un homodimère (70,6 kDa) **Figure 32a** et chacun des monomères contient un domaine catalytique dans lequel est présent le motif PP-

loop **Figure 32b**. Comme les enzymes de modification des ARNt MnmA, ThiI et TilS, TtuA activerait le nucléotide cible par adénylation grâce à une molécule d'ATP (Kambampati and Lauhon, 2003; Mueller and Palenchar, 2008; Soma et al., 2003). En effet, des analyses de titration calorimétrique isotherme (ITC) de l'apo-PhTtuA ont montré que la protéine TtuA a une affinité pour l'ATP de l'ordre du micromolaire (Nakagawa et al., 2013). Le motif PP-loop fixerait donc une molécule d'ATP pour former un intermédiaire adénylé de l'uridine. Les deux motifs CXXC/H en N-terminal (résidus Cys3, Cys6, Cys22, His25) et C-terminal (Cys272, Cys275, Cys284, Cys287), caractéristiques du sous-groupe II, serviraient à fixer un métal, très probablement un atome de zinc et sont appelés doigt de zinc **Figure 32b**.

a



b

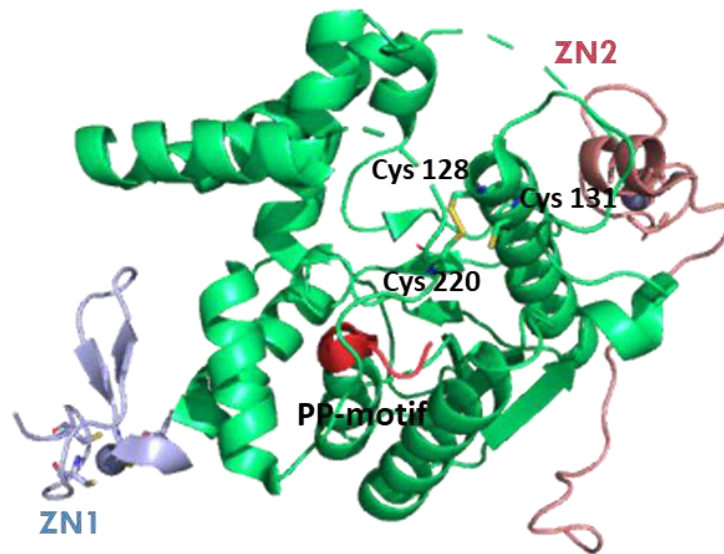


Figure 32: Structure cristallographique de l'apoPhTtuA résolue à 2,1 Å de résolution. (a) représentation du dimère de l'apo-PhTtuA avec l'interface de dimérisation en bleu. (b) Les trois domaines de la protéine sont colorés : le domaine catalytique (en vert), qui contient le motif PP-loop (en rouge) et les trois résidus cystéine catalytiques (représentation bâton) et les domaines doigts de zinc en N- et C-terminal représentés en violet et rose, respectivement. Adapté de Nakagawa *et al.*, 2013 et Shigi *et al.*, 2014 (Nakagawa *et al.*, 2013; Shigi, 2014).

Des mutants de TtuA chez la bactérie thermophile *T. thermophilus* ont permis de compléter une souche délétée du gène *ttuA*, pour la formation de s²T dans les ARNt. Des tests d'activité *in vivo*, basés sur l'analyse par HPLC des nucléotides après hydrolyse des ARNt produits ont montré que les trois résidus cystéines (Cys130, Cys133, Cys222) et les résidus responsables de la fixation de l'ATP dans le site catalytique sont cruciaux pour l'activité de thiolation (Nakagawa *et al.*, 2013).

La structure cristallographique de l'apo PhTtuA montre la présence d'un pont disulfure formé entre les deux cystéines catalytiques (Cys128 et Cys220) **Figure 32b**. Dans la structure de MnmA liée à un ARNt (à l'état pré-réactionnel), deux cystéines catalytiques forment aussi un pont disulfure. Dans l'état adénylé, le pont disulfure est réduit et une des cystéines est à proximité de l'uridine 34 (Numata *et al.*, 2006). Il a été suggéré que la structure de l'apo-PhTtuA correspondrait à un état pré-réactionnel de l'enzyme, comme dans le cas de MnmA. Le pont

Biosynthèse de la 5-méthyl-2thiouridine : m⁵U₅₄-ARNt-sulfurtransférase (TtuA)

disulfure formé serait réduit en présence du thiocarboxylate porté par l'extrémité C-terminale de TtuB (protéine ubiquitine-like et partenaire de TtuA). Il a ainsi été proposé que, lors de la formation du complexe TtuA/TtuB, une des cystéines catalytiques de TtuA recevrait un soufre du groupement thiocarboxylate sous la forme d'un persulfure qui serait ensuite transféré à l'ARNt (Nakagawa et al., 2013), mais ce mécanisme putatif demande à être conforté par des expériences biochimiques.

L'enzyme TtcA, qui représente le sous-groupe I de cette grande famille de thiolases, catalyse la formation de s²C₃₂ dans les ARNt. Il a été montré que les résidus cystéine du motif central CXXC de TtcA (s²C₃₂) coordonnent un centre [4Fe-4S] indispensable pour la réaction de thiolation (Bouvier et al., 2014). Cependant, le rôle exact de ce centre fer-soufre n'avait pas encore été bien défini. Notre hypothèse était que le motif central CXXC aurait la même fonction dans toute la grande famille d'enzymes de thiolation TtcA/TtuA, à savoir la coordination d'un centre [4Fe-4S].

B. ETUDE DU MECANISME DE THIOLATION NON-REDOX DES ARN DE TRANSFERT PAR ACTIVATION VIA UN CENTRE [4Fe-4S]

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans laquelle je suis co-premier auteur.

Simon Arragain, Ornella Bimai, Pierre Legrand, Sylvain Caillat, Jean-Luc Ravanat, Nadia Touati, Laurent Binet, Mohamed Atta, Marc Fontecave, Béatrice Golinelli-Pimpaneau. Non redox thiolation in transfer RNA occurring via sulfur activation by a [4Fe-4S] cluster.

Cette étude visait à caractériser biochimiquement et structuralement les enzymes TtuA de la bactérie thermophile *T. maritima* (TmTtuA) et de l'archée *P. horikoshii* (PhTtuA). L'objectif était d'élucider le mécanisme catalytique par lequel TtuA transfère un atome de soufre en position 54 des ARN de transfert chez les organismes thermophiles.

Durant ma première année de thèse, nous avons d'abord produit et purifié les protéines TtuA de la bactérie thermophile *T. maritima* et de l'archée *P. horikoshii*. La protéine TmTtuA, purifiée en aérobie (« as-purified ») présente une coloration « rougeâtre » et le spectre UV-visible montre des bandes d'absorption entre 300 et 700 nm caractéristiques de la présence d'un centre [2Fe-2S] (Agar et al., 2000). La quantification des atomes de fer par la méthode de Fish indique 0,5 nmol de fer par nmol de protéine. Ainsi, la protéine TmTtuA purifiée en présence d'oxygène contient une faible quantité de centre fer-soufre. Ceci s'explique par le fait que les centres [FeS] sont facilement détruits par l'oxygène (Khoroshilova et al., 1997). Pour faire une reconstitution complète du centre fer-soufre de TmTtuA, l'apoprotéine a été incubée, en absence d'oxygène (en boîte à gants), en présence de DTT, de fer ferreux (Fe(II)), de L-cystéine et de cystéine désulfurase d'*E. coli* (CsdA), précédemment purifiée au laboratoire.

Après purification sur une colonne de filtration sur gel en condition anaérobie, l'holo-TmTtuA se présente sous forme de dimère et a une coloration marron. Les analyses du contenu métallique par ICP (spectrométrie à plasma à couplage inductif) ou par des méthodes colorimétriques (Beinert, 1983; Fish, 1988) ont permis de quantifier 1,6±0,1 Zn, 3,1±0,2 Fe et 2,6±0,3 S soit environ un centre [4Fe-4S] et deux ions Zn²⁺ par monomère. Le centre [4Fe-4S]²⁺ possède une bande d'absorption caractéristique à 410 nm, qui disparaît lors de la réduction par le dithionite pour former un centre réduit [4Fe-4S]⁺ (Agar et al., 2000). Nous avons montré que ce centre [4Fe-4S]⁺ à l'état réduit possède un signal RPE rhombique centré à g=1,93 et

correspond à environ 60% de la protéine. Ainsi, les quantifications métalliques (atomes de fer, soufre et zinc) et les spectroscopies UV-visible et RPE montrent qu'un monomère de TmTtuA lie deux atomes de zinc et un centre [4Fe-4S]²⁺.

L'activité de thiolation de TmTtuA a été testée sur des ARNt totaux d'une souche d'*E. coli* délétée du gène *ttcA* (responsable de la thiolation en position C₃₂), qui ne possède ni s²C₃₂ ni s²T₅₄ en présence de sulfure de sodium comme source de soufre, d'ATP et d'ions Mg²⁺. Pour mesurer l'activité catalytique des échantillons, les nucléotides sont analysés après digestions enzymatiques des produits ARNt totaux par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). L'holo-TmTtuA catalyse la formation de m⁵s²U dans l'ARNt (0,23 nmol de m⁵s²U.min⁻¹ par nmol de protéine). Aucune formation de m⁵s²U n'a été observée en présence de l'apo-TmTtuA ou en absence d'ATP, de Mg²⁺ ou de sulfure. De plus, l'état du centre [4Fe-4S] a été suivi par spectroscopie UV-visible durant le test enzymatique. La présence, après la réaction, de la bande d'absorption à 410 nm, caractéristique des protéines contenant un centre [4Fe-4S], montre que le centre [4Fe-4S], bien qu'essentiel à l'activité de thiolation, n'est pas lui-même la source du soufre inséré dans l'ARN de transfert.

Puisque nous avons échoué à cristalliser TmTtuA, nous avons cherché à cristalliser l'holoTtuA de *P. horikoshii*. Pour cela, nous avons produit, purifié et cristallisé PhTtuA comme décrit précédemment (Nakagawa et al., 2013). Le même protocole de reconstitution du centre [4Fe-4S] que pour TmTtuA a été utilisé. La présence du centre [4Fe-4S] a été confirmée par spectroscopie UV-visible et quantification des atomes de Fe et de S. L'essai enzymatique à 85 °C, montre que l'enzyme est active (0,02 nmol de m⁵s²U.min⁻¹ par nmol de protéine), soit 10 fois moins que TmTtuA. La structure de l'holo-PhTtuA a été résolue par remplacement moléculaire à partir du modèle de l'apo-PhTtuA déjà publiée (Nakagawa et al., 2013).

Nous avons résolu deux structures cristallines de PhTtuA, contenant le centre [4Fe-4S] ou l'AMP. Celles-ci sont similaires à l'apoprotéine à l'exception du site actif. Ces structures montrent que le centre [4Fe-4S] est coordonné par seulement trois cystéines (Cys128, Cys131, Cys220). La nature du centre [4Fe-4S] a été confirmée par une collecte à la longueur d'onde anormale de l'atome de fer. Une densité électronique supplémentaire sur le quatrième atome de fer, non lié à la protéine, peut être attribuée à un sulfure labile. Elle nous montre la tendance qu'a le quatrième atome de fer à lier une petite molécule ou une molécule d'eau.

La seconde structure contient un centre [2Fe-2S] et une molécule d'AMP, qui a été co-purifiée avec la protéine. Le centre [2Fe-2S] serait une forme dégradée du centre [4Fe-4S]. En effet, un

Biosynthèse de la 5-méthyl-2thiouridine : m⁵U₅₄-ARNt-sulfurtransférase (TtuA)

centre [2Fe-2S] est un intermédiaire lors de la biosynthèse des centres [4Fe-4S] (Agar et al., 2000). La superposition des deux structures (en complexe avec l'AMP et le centre [2Fe-2S] ou en complexe avec un centre [4Fe-4S]) montre que le centre [4Fe-4S] se situe à proximité du site de fixation de l'ATP dans le site catalytique. Ceci nous a amené à proposer TtuA comme modèle d'une nouvelle classe d'enzymes de thiolation non redox, dans laquelle le centre [4Fe-4S] catalytique servirait au transport d'un ion hydrogénosulfure labile lors de la catalyse.

Il a été rapporté que la thiolation en position 54 des ARN de transfert chez *T. thermophilus* nécessite au moins deux protéines : TtuA et une protéine de transport de soufre similaire aux protéines de type ubiquitine appelée TtuB (Shigi et al., 2006b). En parallèle de nos travaux, la caractérisation biochimique et structurale de TtTtuA a été rapportée. Les spectres UV-visible et RPE, ainsi que la quantification du Fe indiquent la présence d'un centre [4Fe-4S]. De plus, des mesures d'activité *in vitro* de formation de s²T en position 54 d'un transcrite d'ARNt^{Phe} par l'holo-TtTtuA en présence de 0,1 mM de Na₂S ont montré une activité de 0,27 nmol de s²T. min⁻¹ par nmol de TtTtuA. En présence des protéines impliquées dans le système relais du transfert de soufre vers TtuA (SufS, TtuBCD), cette activité augmente à 0,71 min⁻¹, ce qui montre que l'holo-TtTtuA est capable d'utiliser à la fois du sulfure inorganique et TtTtuB-COSH pour former s²T₅₄. De façon intéressante, l'ajout à la fois de Na₂S et des protéines TtuBCD présente une activité 4 fois plus importante qu'en absence des protéines TtuBCD (1 min⁻¹), ce qui peut s'expliquer par l'utilisation d'une forme déjà thiocarboxylée de la protéine TtuB (TtuB-COSH) dans le test d'activité (Chen et al., 2017).

De plus, plusieurs structures de l'holoTtuA de la bactérie thermophile *T. thermophilus* ont également été résolues, contenant ou pas un analogue d'ATP (AMPPNP). Ces structures confirment que le centre [4Fe-4S] est coordonné par seulement trois cystéines conservées, situées dans le site catalytique, près du site de fixation de l'ATP occupé par l'analogue AMPPNP (Arragain et al., 2017; Chen et al., 2017) **Figure 33**.

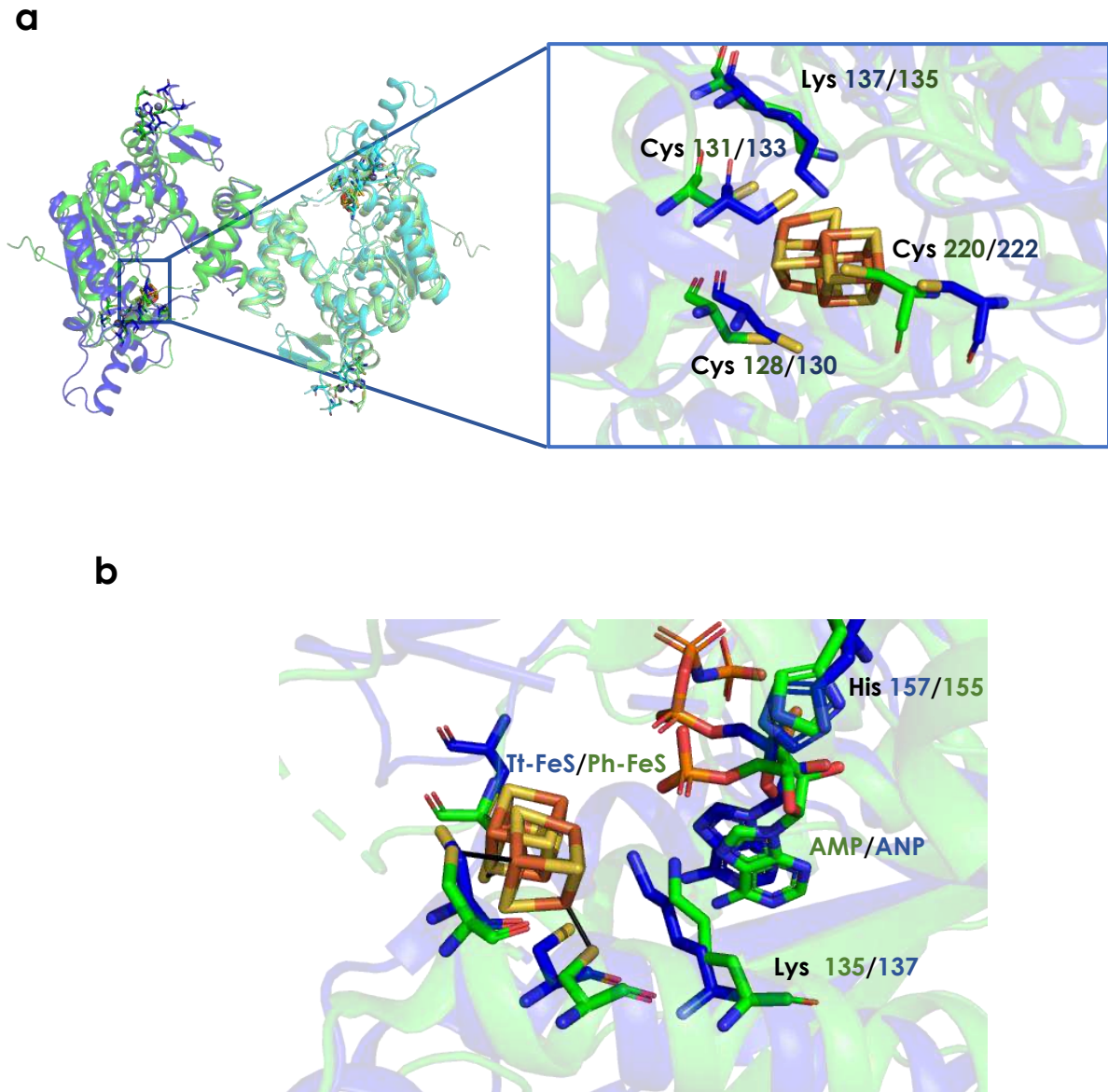


Figure 33: Comparaison des structures cristallographiques de l'holo-PhTtuA et l'holo-TtTtuA en vert et bleu respectivement. (a) Superposition des résidus 2-305 de l'holo-PhTtuA (vert) et l'holo-TtTtuA (en bleu, PDB : 5B4F ; rmsd 3,2 Å) et zoom sur le centre [4Fe-4S] coordonné par trois résidus cystéines (PhTtuA : Cys 128, 131 et 220 et TtTtuA : Cys130, 133 et 222). (b) Zoom sur la superposition des domaines ATPases (résidus 51-72, rmsd 3,2 Å) contenant la molécule d'AMP pour l'holo-PhTtuA (en vert) ou l'analogue d'ATP (AMPPNP) pour l'holo-TtTtuA (en bleu). Les acides aminés proches du site catalytique sont représentés et annotés.

Comme la structure de PhTtuA, la structure de TtTtuA possède une densité additionnelle sur le quatrième fer du centre [4Fe-4S] non lié à l'enzyme. Cette densité peut aussi être attribuée à une molécule d'eau ou un hydrosulfure et elle indique la propension de l'atome de fer non liant du centre [Fe-S] dans la protéine TtuA à lier une petite molécule **Figure 34**.

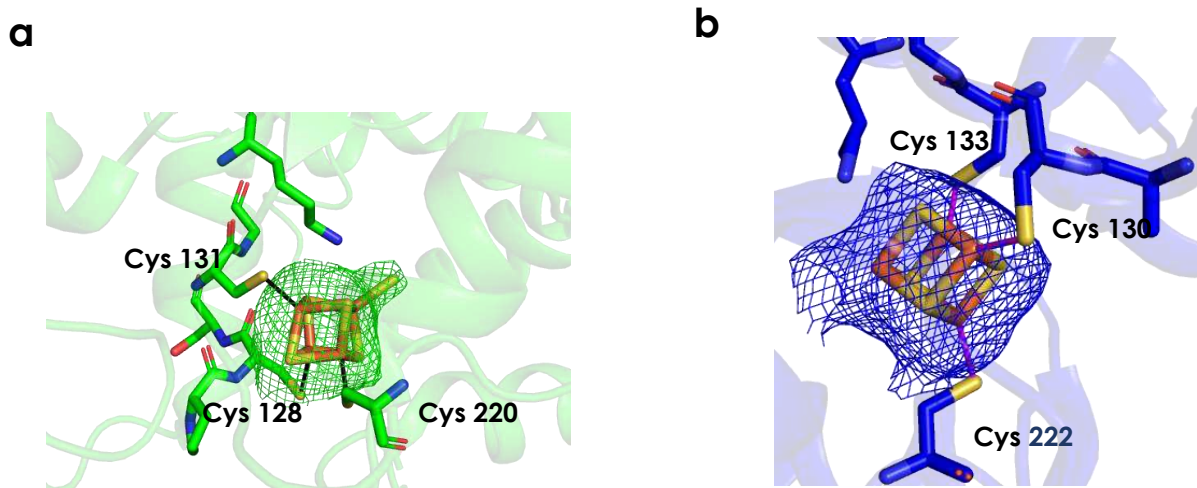


Figure 34: Les cartes Fo-Fc de densité électronique différentielle calculée en omettant le centre [4Fe-4S] de l'holo-PhTtuA et l'holo-TtTtuA en vert et bleu respectivement. (a) La carte omit de la structure de l'holo-PhTtuA (vert) contournée à 2 σ et zoomée sur le centre [4Fe-4S] (en orange). (b) La carte omit de la structure de l'holo-TtTtuA (en bleu) contournée à 3 σ et zoomée sur le centre [4Fe-4S] (en orange).

De plus, la structure de l'apo-TtTtuA a été déterminée en complexe avec un mutant de TtTtuB, protéine qui transporte et fournit l'atome de soufre à TtuA **Figure 35**. Dans ce mutant, le résidu glycine en C-terminal a été remplacé par un résidu cystéine, afin d'essayer de mimer le thiocarboxylate C-terminal (Chen et al., 2016). Cependant, cette partie C-terminale de TtuB n'est pas visualisée dans la structure du complexe ; elle est donc mobile. Lors de la fixation de TtuB, la boucle contenant le résidu Cys222, l'une des trois cystéines cordonnant le centre [Fe-S], est réorganisé de façon à recouvrir le site actif de TtTtuA et le connecter à l'extérieur par un canal **Figure 35**.

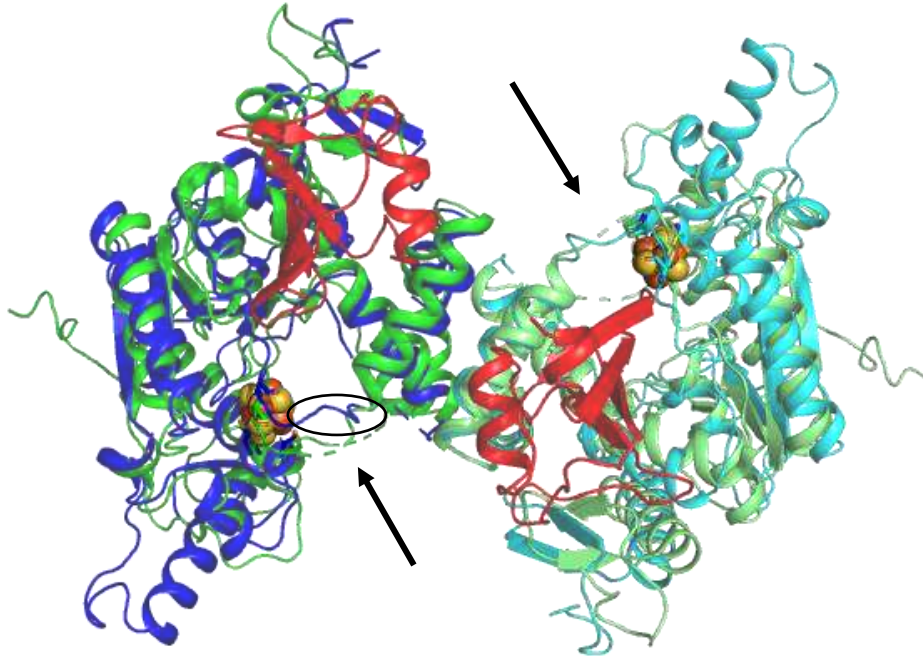


Figure 35: Structure cristallographique du complexe TtuA-TtuB, Modèle de l'holo-TtTtuA (bleu) et holo-PhTtuA (vert) contenant dans leur site catalytique le centre [4Fe-4S] en complexe avec TtTtuB (deux monomère en rouge) PDB : 5GHA. Les flèches noires correspondent au site putatif de fixation d'un ARNt substrat et le cercle noir montre la boucle flexible, qui contient le résidu Cys222.

Une extrémité du canal est liée à TtuB, alors que l'autre extrémité du canal qui se trouve être fortement chargée positivement doit probablement correspondre au site de fixation de l'ARN de transfert **Figure 36**.

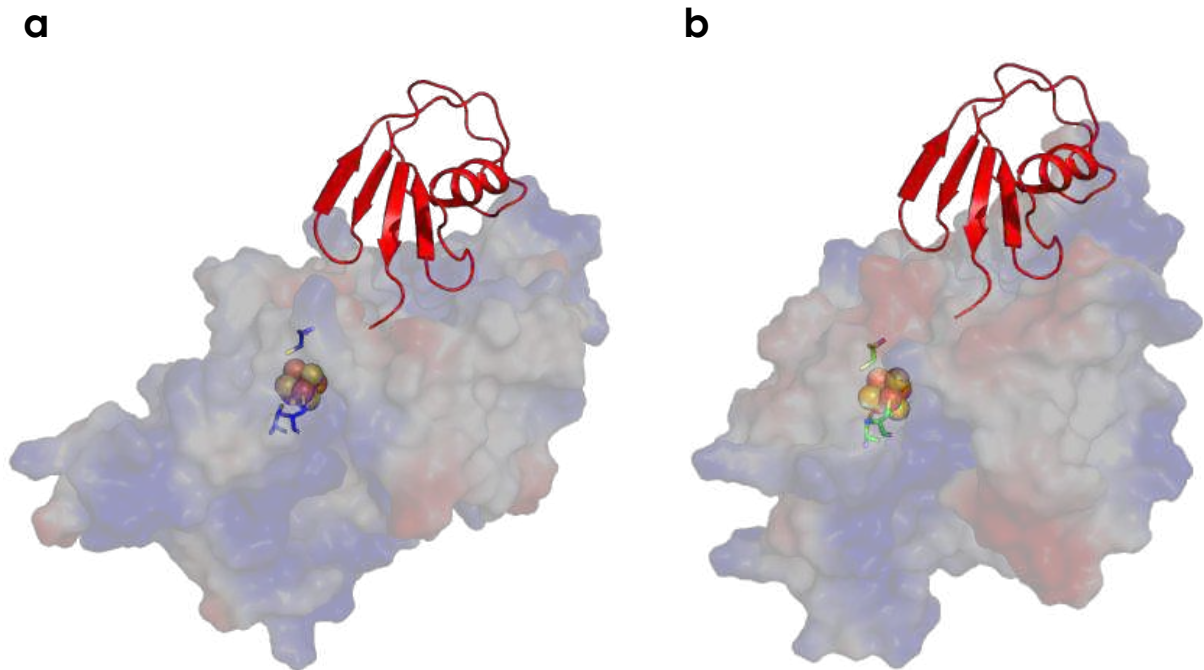


Figure 36: Représentation de la surface électrostatique d'un monomère de TtuA. (a) Modèle de l'holo-TtTtuA en complexe avec TtTtuB (en rouge) et (b) Modèle de l'holo-PhTtuA en complexe avec TtTtuB (en rouge). Les zones chargées positivement et négativement sont représentées en bleu et rouge, respectivement.

La structure du complexe TtuA-TtuB indique que TtuB et l'ARNt pourraient accéder simultanément au site actif de TtuA. Malgré l'absence des deux résidus en C-terminal de TtuB, cette structure montre la façon dont TtuB pourrait insérer son thiocarboxylate C-terminal à travers un des canaux du site actif, en le positionnant directement en face du site de coordination libre du centre [4Fe-4S]. Cette géométrie suggère que le centre [Fe-S] de l'holo-TtTtuA possède un rôle enzymatique et peut agir comme accepteur d'un atome de soufre transporté par la protéine TtuB, pour le délivrer à l'ARN de transfert **Figure 37**. Même s'il existe une possibilité que le centre [4Fe-4S] de TtuA puisse servir à simplement fixer l'orientation de TtuB-COSH dans le site actif de TtuA (Chen et al., 2017), l'hypothèse de l'implication directe du centre [Fe-S] dans la coordination d'un sulfure d'hydrogène est privilégiée. De plus, la superposition suggère qu'il en est de même pour PhTtuA.

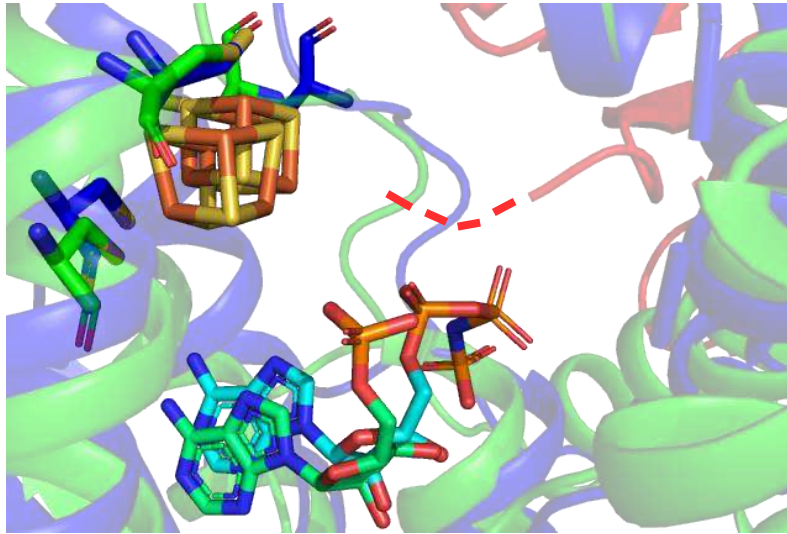


Figure 37: Zoom sur la superposition des sites catalytiques de PhTtuA et TtTtuA contenant les centres [Fe-S] et les molécules d'AMP (PhTtuA en vert) et d'analogue d'ATP (TtTtuA en bleu). La structure de TtTtuB (telle que liée à TtTtuA) est indiquée en rouge avec les deux résidus désordonnés en position C-terminale indiqués en pointillés rouges.

Il est intéressant de noter que ce mécanisme non redox de thiolation des ARN de transfert, dans lequel le [4Fe-4S] possède un rôle de transporteur de soufre **Figure 38**, est très similaire à celui proposé pour le mécanisme des méthylthiotransférases à mécanisme radical-SAM ou de la cystéine désulfidase (une enzyme à centre [4Fe-4S] qui décompose la L-cystéine en sulfure d'hydrogène, ammoniac et pyruvate chez *M. jannaschii*) (Forouhar et al., 2013; Tchong et al., 2005). Par contre, certains organismes dépourvus d'homologues des protéines TtuB/TtuC tels que *T. maritima* (Shigi et al., 2006b) doivent vraisemblablement utiliser du sulfure inorganique libre comme agent de thiolation.

Biosynthèse de la 5-méthyl-2thiouridine : m⁵U₅₄-ARNt-sulfurtransférase (TtuA)

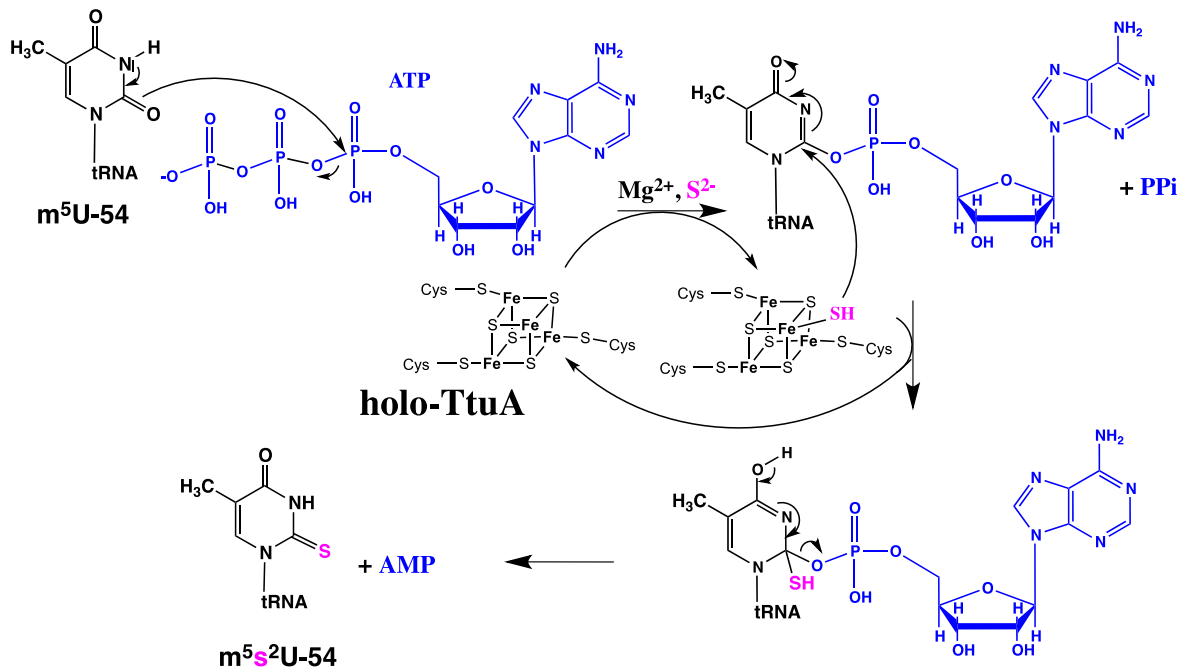


Figure 38: Mécanisme de thiolation proposé pour TtuA. Le nucléotide cible m⁵U₅₄ de l'ARN de transfert, se fixerait au niveau du site catalytique contenant l'ATP et le centre [4Fe-4S], coordonné par l'hydrogénosulfure (SH). Après adénylation au niveau du C2, la substitution nucléophile de l'OAMP par le groupement SH générerait le produit final m⁵s²U₅₄.

Dans ce travail, les séquences codantes pour les protéines ont été clonées, produites, purifiées et les tests d'activités ont été réalisés par le Dr Simon Arragain et moi-même. L'analyse des produits de réaction a été réalisée par le Dr S. Arragain et le Dr Jean-luc Ravanat. La caractérisation spectroscopique des protéines a été réalisée par le Dr S. Arragain et moi-même en collaboration avec le Dr Laurent Binet et Nadia Touati (ENSCP, Chimie Paristech) pour la RPE. La cristallisation des protéines a été réalisée par le Dr S. Arragain et moi-même et les structures cristallines ont été résolues et affinées par les Dr S. Arragain, Béatrice Golinelli-Pimpaneau et Pierre Legrand (local contact au Synchrotron SOLEIL (Saint Aubin)).

Références bibliographiques

Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000). IscU as a Scaffold for Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis: Sequential Assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Clusters in IscU[†]. *Biochemistry* 39, 7856–7862.

Arragain, S., Bimai, O., Legrand, P., Caillat, S., Ravanat, J.-L., Touati, N., Binet, L., Atta, M., Fontecave, M., and Golinelli-Pimpaneau, B. (2017). Nonredox thiolation in tRNA occurring via sulfur activation by a [4Fe-4S] cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 7355–7360.

Beinert, H. (1983). Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Analytical Biochemistry* 131, 373–378.

Bouvier, D., Labessan, N., Clémancey, M., Latour, J.-M., Ravanat, J.-L., Fontecave, M., and Atta, M. (2014). TtcA a new tRNA-thioltransferase with an Fe-S cluster. *Nucleic Acids Research* 42, 7960–7970.

Chen, M., Narai, S., Omura, N., Shigi, N., Chimnaronk, S., Tanaka, Y., and Yao, M. (2016). Crystallographic study of the 2-thioribothymidine-synthetic complex TtuA–TtuB from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 72, 777–781.

Chen, M., Asai, S., Narai, S., Nambu, S., Omura, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ikeda-Saito, M., Watanabe, K., Yao, M., et al. (2017). Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron-sulfur protein TtuA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 4954–4959.

Fish, W.W. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 357–364.

Forouhar, F., Arragain, S., Atta, M., Gambarelli, S., Mouesca, J.-M., Hussain, M., Xiao, R., Kieffer-Jaquinod, S., Seetharaman, J., Acton, T.B., et al. (2013). Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. *Nature Chemical Biology* 9, 333–338.

Jäger, G., Leipuviene, R., Pollard, M.G., Qian, Q., and Bjork, G.R. (2004). The Conserved Cys-X1-X2-Cys Motif Present in the TtcA Protein Is Required for the Thiolation of Cytidine in Position 32 of tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 186, 750–757.

Kambampati, R., and Lauhon, C.T. (2003). MnmA and IscS Are Required for in Vitro 2-Thiouridine Biosynthesis in. *Biochemistry* 42, 1109–1117.

- Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., and Kiley, P.J. (1997). Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂:[4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *94*, 6087–6092.
- Kowalak, J.A. (1994). The Role of Posttranscriptional Modification in Stabilization of Transfer RNA from Hyperthermophiles. *Biochemistry* *33*, 7869–7876.
- Mueller, E.G., and Palenchar, P.M. (2008). Using genomic information to investigate the function of ThiI, an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis. *Protein Science* *8*, 2424–2427.
- Nakagawa, H., Kuratani, M., Goto-Ito, S., Ito, T., Katsura, K., Terada, T., Shirouzu, M., Sekine, S., Shigi, N., and Yokoyama, S. (2013). Crystallographic and mutational studies on the tRNA thiouridine synthetase TtuA: Structure of tRNA Uridine 2-Thiolation Enzyme. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* *81*, 1232–1244.
- Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Suzuki, T., and Nureki, O. (2006). Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate. *Nature* *442*, 419–424.
- Shigi, N. (2014). Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Frontiers in Genetics* *5*.
- Shigi, N., Suzuki, T., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Watanabe, K. (2006a). Temperature-dependent Biosynthesis of 2-Thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 2104–2113.
- Shigi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., and Watanabe, K. (2006b). Identification of Two tRNA Thiolation Genes Required for Cell Growth at Extremely High Temperatures. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 14296–14306.
- Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., and Suzuki, T. (2003). An RNA-Modifying Enzyme that Governs Both the Codon and Amino Acid Specificities of Isoleucine tRNA. *Molecular Cell* *12*, 689–698.
- Tchong, S.-I., Xu, H., and White, R.H. (2005). L-Cysteine Desulfidase: An [4Fe-4S] Enzyme Isolated from *Methanocaldococcus jannaschii* That Catalyzes the Breakdown of L-Cysteine into Pyruvate, Ammonia, and Sulfide. *Biochemistry* *44*, 1659–1670.
- Watanabe, K., and Oshima, T. (1974). Replacement of ribothymidine by 5-methyl-2-thiouridine in sequence GT ψ C in tRNA of an extreme thermophile. *FEBS LETTERS* *43*, 5.

Références bibliographiques

Watanabe, K., Shinma, M., Oshima, T., and Nishimura, S. (1976). Heat-induced stability of tRNA from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 72, 1137–1144.

Yokoyama, S. (1987). Dynamic structures and functions of transfer ribonucleic acids from extreme thermophiles. *Advances in Biophysics* 23, 115–147.



Nonredox thiolation in tRNA occurring via sulfur activation by a [4Fe-4S] cluster

Simon Arragain^{a,1}, Ornella Bimai^{a,1}, Pierre Legrand^b, Sylvain Caillat^c, Jean-Luc Ravanat^c, Nadia Touati^d, Laurent Binet^{d,e}, Mohamed Atta^f, Marc Fontecave^{a,2}, and Béatrice Golinelli-Pimpneau^{a,2}

^aLaboratoire de Chimie des Processus Biologiques, Unité Mixte de Recherche 8229 CNRS, Collège de France, Université Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France; ^bSOLEIL Synchrotron, L'Orme des Merisiers, 91198 Gif-sur-Yvette, France; ^cUniversity of Grenoble Alpes, Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut Nanosciences et Cryogénie, Systèmes Moléculaires et Nanomatériaux pour l'Énergie et la Santé, F-38054 Grenoble, France; ^dCNRS Institut de Recherche Renard, Chimie-ParisTech, 75005 Paris, France; ^eParis Sciences et Lettres Research University, Chimie-ParisTech, Institut de Recherche de Chimie-Paris, 75005 Paris, France; and ^fUniversity of Grenoble Alpes, Commissariat à l'Énergie Atomique, Direction de Recherche Fondamentale, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux, Unité Mixte de Recherche 5249, F-38000 Grenoble, France

Edited by Wolfgang Buckel, Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Germany, and accepted by Editorial Board Member Stephen J. Benkovic June 5, 2017 (received for review January 20, 2017)

Sulfur is present in several nucleosides within tRNAs. In particular, thiolation of the universally conserved methyl-uridine at position 54 stabilizes tRNAs from thermophilic bacteria and hyperthermophilic archaea and is required for growth at high temperature. The simple nonredox substitution of the C2-uridine carbonyl oxygen by sulfur is catalyzed by tRNA thiouridine synthetases called TtuA. Spectroscopic, enzymatic, and structural studies indicate that TtuA carries a catalytically essential [4Fe-4S] cluster and requires ATP for activity. A series of crystal structures shows that (i) the cluster is ligated by only three cysteines that are fully conserved, allowing the fourth unique iron to bind a small ligand, such as exogenous sulfide, and (ii) the ATP binding site, localized thanks to a protein-bound AMP molecule, a reaction product, is adjacent to the cluster. A mechanism for tRNA sulfuration is suggested, in which the unique iron of the catalytic cluster serves to bind exogenous sulfide, thus acting as a sulfur carrier.

tRNA modification | thiolation | [Fe-S] cluster | thiouridine synthetase | U54-tRNA

The cellular translation machinery contains essential components such as tRNAs. To achieve their function, they feature a great variety of well-conserved posttranscriptional chemical modifications. Sulfur is present in several of these modified nucleosides: thiouridine and derivatives (s^4U8 , s^2U34 , and m^5s^2U54), 2-thioadenosine derivatives (ms^2t^6A37 and ms^4t^6A37), and 2-thiocytidine (s^2C32). However, mechanisms of sulfur insertion into tRNAs are largely unknown, and the enzymes responsible for these reactions are incompletely characterized. Whereas redox conversion of a C-H to a C-S bond (synthesis of ms^2t^6A37 and ms^4t^6A37) depends on redox enzymes from the Radical-S-adenosyl-L-methionine iron-sulfur enzyme family, simple nonredox conversion of C=O to C=S group (synthesis of s^2U34 and s^4U8) is not expected to require such redox clusters. Intriguingly, we recently discovered that the ATP-dependent formation of s^2C32 in some tRNAs is catalyzed by an iron-sulfur enzyme, TtcA (1). However, the role of its cluster has not been defined. In the same superfamily, TtuA enzymes catalyze the C2-thiolation of uridine 54 in the T loop of thermophilic tRNAs (Fig. 1A), allowing stabilization of tRNAs at high temperature in thermophilic microorganisms. Sequences analysis shows that they share conserved cysteines and ATP binding motif (Fig. S1). Here, we report a detailed biochemical and structural characterization of TtuA that shows the presence of a [4Fe-4S] cluster essential for activity. The crystal structures of *Pyrococcus horikoshii* TtuA (PhTtuA) show that the cluster, chelated by only three cysteines, is adjacent to the ATP binding site. The presence of electron density near the fourth iron, nonbonded to the protein, indicates that the cluster can bind an exogenous substrate. We propose that thiolation occurs via sulfur binding to the cluster and transfer to the tRNA substrate. The fact that the catalytic [4Fe-4S] cluster serves as a

sulfur carrier during a nonredox thiolation reaction illustrates an unknown function in iron-sulfur enzymology.

Results

m^5s^2U but Not s^2C Is Present in tRNAs from *Thermotoga maritima*. In the *Thermotoga maritima* genome, only one homolog of the *ttuA* gene was detected (2). It was earlier suggested that TtuA could perform thiolation of both C32 and m^5U54 in this organism (2), because both s^2C and m^5s^2U were detected in bulk tRNAs (3). However, our results show that, although 10.7 m^5s^2U modifications per 1,000 uridines were detected, both m^5U and s^2C were under the threshold of detection (below one modification per million normal nucleosides) (Fig. S2).

***T. maritima* TtuA Binds an [Fe-S] Cluster.** Recombinant *T. maritima* TtuA (TmTtuA) was purified as an apoprotein, apo-TmTtuA (Fig. 2A and Fig. S3A), then anaerobically treated with ferrous iron and L-cysteine in the presence of a cysteine desulfurase, and finally, purified (Fig. S3B) in the form of a homogeneous dimeric brownish protein, named holo-TmTtuA. Metal analysis (1.6 ± 0.1 Zn, 3.1 ± 0.2 Fe, and 2.6 ± 0.3 S per monomer) and UV-visible as well as EPR spectroscopy (Fig. 2) show that one TmTtuA monomer binds

Significance

Posttranscriptional modifications of tRNA are essential for translational fidelity. More specifically, mechanisms of selective sulfuration of tRNAs are still largely unknown, and the enzymes responsible for these reactions are incompletely investigated. Therefore, characterizing such systems at the molecular level is greatly valuable to our understanding of a whole class of tRNA modification reactions. We study TtuA, a representative member of a tRNA modification enzyme superfamily, and show that it intriguingly catalyzes a nonredox sulfur insertion within tRNA using a catalytically essential [4Fe-4S] cluster. This report opens perspectives regarding functions of iron-sulfur proteins in biology as well as chemical reactions catalyzed by iron-sulfur clusters.

Author contributions: M.F. and B.G.-P. designed research; S.A., O.B., P.L., S.C., J.-L.R., N.T., L.B., M.A., and B.G.-P. performed research; S.A., O.B., P.L., J.-L.R., L.B., M.F., and B.G.-P. analyzed data; and S.A., M.F., and B.G.-P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission. W.B. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Data deposition: The coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID codes 5MKO, 5MKP, and 5MKQ for the AMP, FeS, and FeS-ano structures, respectively).

¹S.A. and O.B. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: marc.fontecave@cea.fr or beatrice.golinelli@college-de-france.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1700902114/-DCSupplemental.

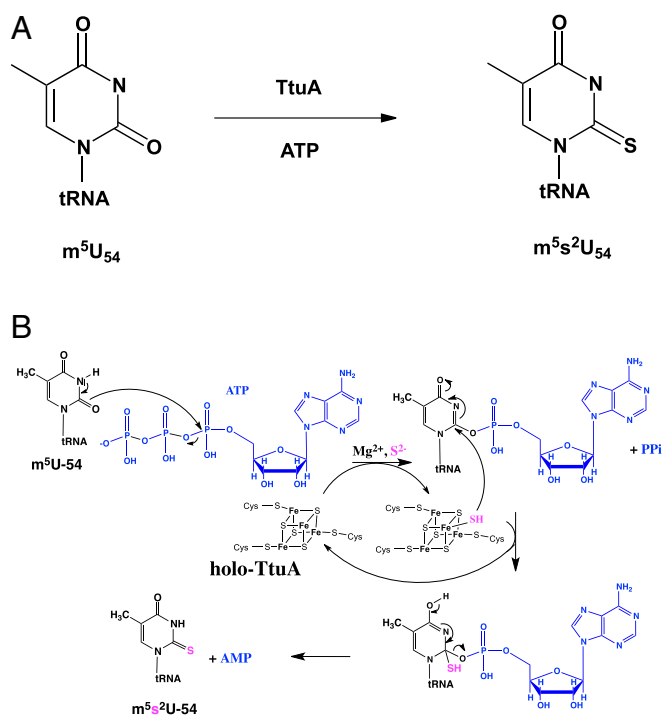


Fig. 1. (A) Thiolation reaction catalyzed by TtuA. (B) Proposed thiolation mechanism of TtuA with the [4Fe-4S] cluster playing the role of sulfur carrier, allowing multiple catalytic cycles. In the TtuA-tRNA complex, m^5U_{54} would bind in the site containing ATP and the cluster, coordinated by the sulfur (SH) cosubstrate. After adenylation at O^2 , nucleophilic substitution of O -adenosyl monophosphate by SH would generate the final product $m^5s^2U_{54}$.

two Zn atoms and one redox-active [4Fe-4S] cluster. Oxidized holo-TtuA is in an $S = 0$ EPR-silent [4Fe-4S] $^{2+}$ state, with an absorption band at 400 nm that disappears on reduction by dithionite (Fig. 2A), whereas reduced holo-TtuA is in an $S = 1/2$ [4Fe-4S] $^{+}$ state as shown by the rhombic EPR signal centered at $g = 1.93$ (0.63 ± 0.05 spin per monomer) (Fig. 2B).

The [4Fe-4S] Cluster Is Required for m^5U_{54} Thiolation. The thiolation activity of TmTtuA ($1 \mu\text{M}$) was assayed at 65°C using 1 mM sodium sulfide as the sulfur source in the presence of ATP and Mg^{2+} . Bulk tRNA ($10 \mu\text{M}$) from the *ttcA* $^-$ *Escherichia coli* strain, lacking s^2C and m^5s^2U , was used as the substrate. Both substrate (m^5U) and product (m^5s^2U) were monitored by HPLC after tRNA digestion (Fig. 3). Holo-TtuA was unambiguously shown to be active for converting m^5U into m^5s^2U ($0.22 \text{ nmol } m^5s^2U \text{ min}^{-1}$ per 1 nmol protein) (Fig. 3B and C and Fig. S3C and D). The reaction stopped after 30 min (after seven turnovers), likely as a consequence of enzyme inactivation. This inactivation was not caused by degradation of the cluster, because the UV-visible spectrum of the enzyme after reaction still displayed the band at 400 nm, characteristic of the [4Fe-4S] cubane (Fig. S3E). Furthermore, addition of thermostable pyrophosphatase did not increase the number of turnovers, indicating that pyrophosphate is not an enzyme inhibitor. No s^2C formation was detected, and no formation of m^5s^2U could be observed when (i) holo-TtuA was replaced by apo-TtuA (Fig. S3C and D) or (ii) Mg^{2+} , ATP, or sulfide was excluded from the assay mixture (Fig. S3C and D). The enzyme reduced with dithionite had an activity comparable with that of nonreduced holo-TmTtuA (Fig. S3C). Altogether, these experiments showed that, although the [4Fe-4S] cluster is essential for activity, it is not itself the source of sulfur atoms. To further confirm that the sulfur atom incorporated in the tRNA comes from the exogenous source, we carried out the TtuA

activity assay in the presence of ^{35}S -sulfide generated by cysteine desulfurase in the presence of ^{35}S -L-cysteine. The results show that labeled sulfur is incorporated in the tRNA, showing that TtuA uses the added sulfur source as substrate (Fig. S3F).

Because we failed to crystallize TmTtuA, we also purified PhTtuA as reported elsewhere (4) (Fig. S4A and B) and used the same [Fe-S] cluster reconstitution protocol as for TmTtuA. The presence of a [4Fe-4S] cluster was confirmed by UV-visible spectroscopy (Fig. S4C), and the enzyme, assayed at 85°C (because of the high-growth temperature of *P. horikoshii*), proved to be enzymatically active but less than holo-TmTtuA (0.02 min^{-1}) (Fig. S4D).

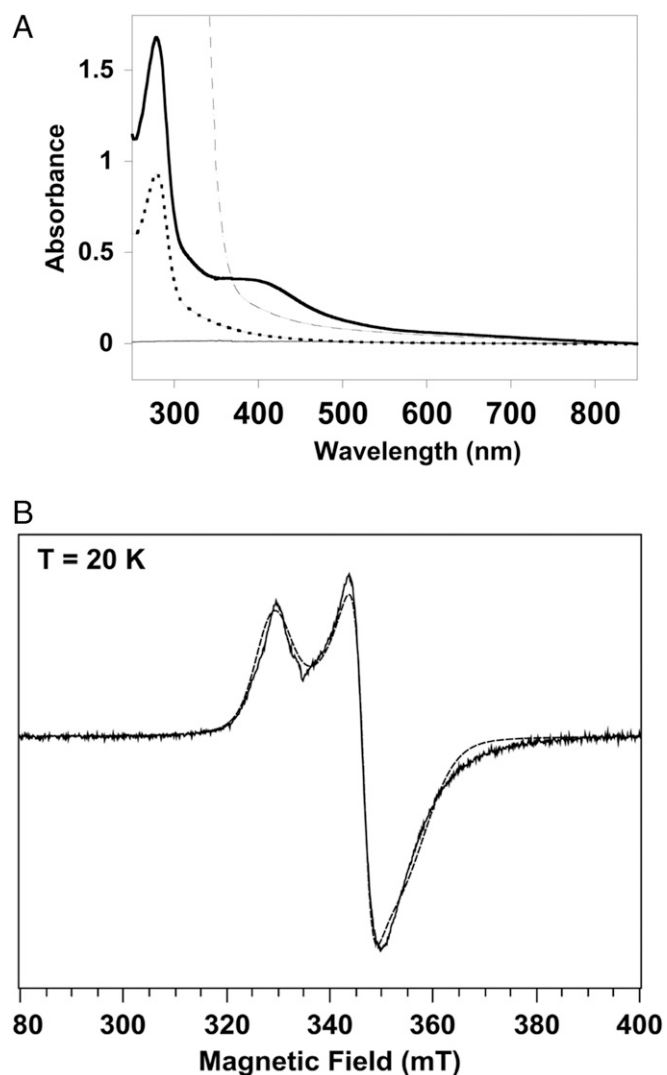


Fig. 2. Spectroscopic characterization of TmTtuA. (A) UV-visible spectra of apo-TmTtuA (dotted line), holo-TmTtuA (thick line), and reduced holo-TmTtuA after 1 min of incubation with 1 mM dithionite (dashed line). The spectra were recorded with $40 \mu\text{M}$ protein in Tris-HCl, pH 8, and 200 mM NaCl. (B) X-band EPR spectrum of reduced holo-TmTtuA at 20 K . The experimental (solid line) and simulated (dashed line) spectra are superimposed. A large background signal was removed from the experimental spectrum by polynomial interpolation. In the simulation, a g matrix with three distinct principal values, $g_x = 1.890$, $g_y = 1.935$, and $g_z = 2.040$, was used as well as a Lorentzian shape with 2 mT width for the individual transitions. In addition, anisotropic Gaussian broadenings with full-widths at half-height $\Delta B_x = 11 \text{ mT}$, $\Delta B_y = 2 \text{ mT}$, and $\Delta B_z = 6 \text{ mT}$ were introduced.

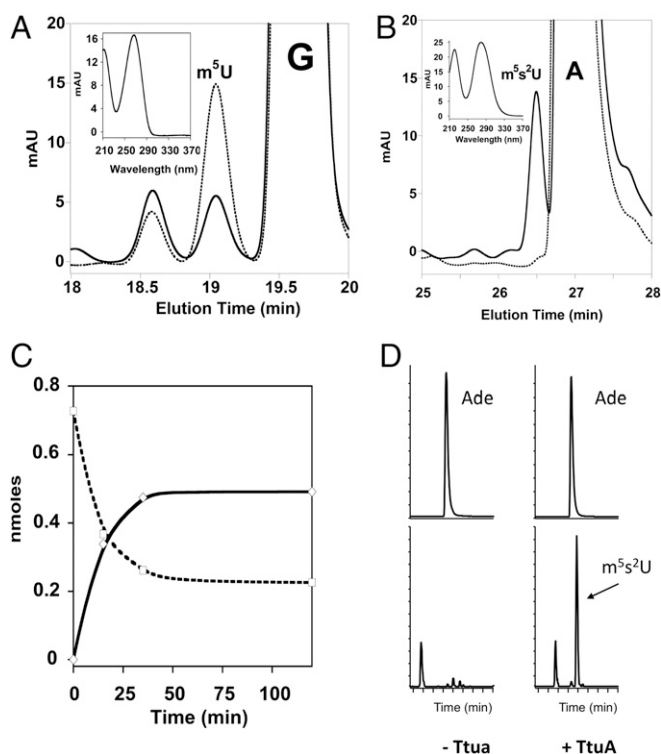


Fig. 3. In vitro thiolation activity of TmTtuA. The thiolation activity of TmTtuA was tested using *ttaA*[−] *E. coli* bulk tRNA as substrate. After digestion of the tRNA product, the modified nucleosides were analyzed by HPLC by following absorption at 260 nm. Elution profiles on an SB-C18 column between 18–20 (A) and 25–28 min (B) at *t* = 0 (dotted line) and *t* = 120 min (solid line) of reaction. m⁵U eluates at 19.5 min (A) and m⁵s²U at 26.6 min (B). The UV-visible spectrum characteristic of each modified nucleoside is shown in *Insets*. (C) Time course of m⁵U consumption (dashed line) and m⁵s²U synthesis (solid line). (D) HPLC-MS/MS detection of m⁵s²U in tRNA. (*Upper*) Analysis of adenosine (Ade) as an internal control. (*Lower*) Analysis of m⁵s²U using the transition *m/z* 275→143. (*Left*) Untreated tRNA. (*Right*) tRNA treated with TmTtuA in the presence of sulfide.

In *P. horikoshii* Holo-TtuA, a [4Fe-4S] Cluster Is Chelated by Three Conserved Cysteines, with the Fourth Unique Iron Being Able to Bind Sulfide. Here, we report three different crystal structures of PhTtuA: one in space group *P*_{4₃2} with one molecule in the asymmetric unit and two in space group *P*_{2₁2₁2₁} with two molecules in the asymmetric unit (Fig. 4 and Table S1). Their overall structure is identical to that of the apoprotein (4). Monomers are superimposable, and all contain two Zn atoms at the N and C termini bound by conserved cysteines and one histidine (Fig. 4). The dimer is formed between either two molecules in the asymmetric unit or two symmetric molecules, with the interface provided by hydrophobic residues (Fig. S5).

The “FeS” holoenzyme structure, solved at 2.5-Å resolution, contains the [4Fe-4S] cluster, which is chelated by only three conserved cysteines, Cys128, Cys131, and Cys220, and surrounded by hydrophobic residues (Leu81, Ile83, and Ile118) (Fig. 5A and Fig. S6A). In the apoprotein, Cys128 and Cys220 were linked by a disulfide bond (Fig. 5A) (4). The nature of the cluster was confirmed by the “FeS-ano” structure collected at the iron K edge, for which the anomalous difference map displays clear electron density corresponding to a [4Fe-4S] cluster close to the three central conserved cysteines (Fig. S7A). In the FeS structure, an extra electron density is present near the fourth iron atom of the cluster (nonprotein bonded) (Fig. 5B and Fig. S8). This density can be equally well-fitted by a hydroxide or a hydrosulfide ion. However, this site, in a mostly hydrophobic environment at a distance of 2.4 Å

from the unique iron atom and 3.2 Å from the positively charged amino group of Lys135, is appropriate to accommodate a hydro-sulfide ligand. Interestingly, the conformation of Lys135 is different in holo- and apo-PhTtuA (Fig. 5A). A lysine or arginine is always present at this position in the TtuA superfamily (Fig. S1), suggesting an important function for this residue.

AMP Is Bound to PhTtuA at the ATP Binding Site, Which Is Located Close to the [Fe-S] Cluster Site. The third “AMP” structure contains an AMP molecule, which seems to have copurified with the protein (Fig. 5C and Fig. S6B). The [4Fe-4S] cluster in the two molecules of the asymmetric unit seems to be degraded to [2Fe-2S] clusters (Fig. S7B). Superposition of the three structures shows that AMP and the cluster are 4.3 Å away from each other with Lys135 in between (Figs. 4 and 5D). In all structures, residues 222–225 near catalytic Cys220 are disordered, like in apo-PhTtuA (4) (Fig. 4). These residues would likely get ordered in the presence of the tRNA substrate. The residues involved in AMP binding belong to the PP-loop motif characteristic of ATPases (Fig. 5C and Fig. S1) (5), indicating that the essential ATP cofactor binds at the same site.

TtuA Displays a High Structural Similarity with Lysidine Synthetase. Interestingly, TtuA shows the highest structural similarity with lysidine synthetase (TilS) (6), an *N*-type ATP pyrophosphatase (*Z* score = 10.7 as determined by the European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Secondary Structure Matching server). The structure of TilS has been determined in complex with either ATP (7) or the tRNA substrate (6). The superposition of the ATP binding sites of TilS and TtuA indicates how ATP and Mg²⁺ are likely accommodated in the TtuA active site (Fig. S9 A and B). Arg113 and His133 in TilS interact with the β- and γ-phosphate groups of ATP (7). The corresponding residues in TtuA, Lys135 and His155, likely have the same function. Superposition with the structure of tRNA–TilS complex shows that the anticodon stem loop occupies the cavity created by the assembly of two TtuA monomers without

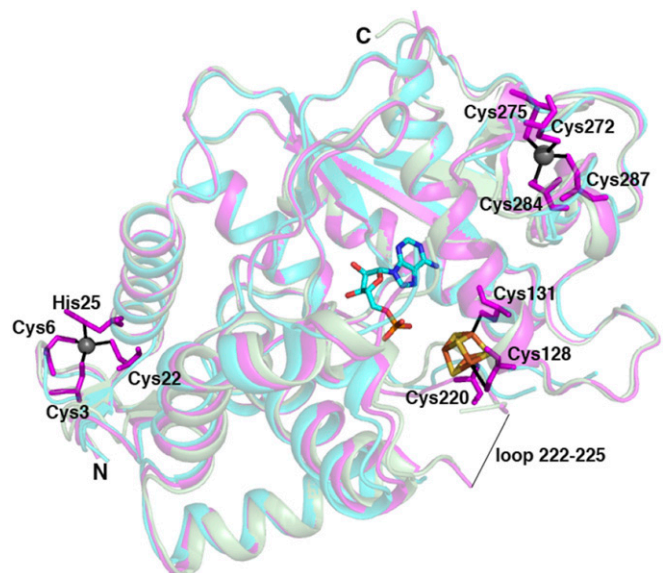


Fig. 4. Superposition of the three PhTtuA structures. One monomer of the AMP or FeS-ano structures (colored cyan and magenta, respectively) was superimposed with the FeS structure in pale green (rmsd of 0.30 Å for 238 atoms and 0.50 Å for 257 Cαs, respectively). AMP is shown in cyan. The zinc atoms are shown as gray spheres, and cysteines involved in [Fe-S] or Zn binding as well as the [4Fe-4S] of the FeS structure are shown as sticks. The N and C termini are indicated as N and C, respectively, and the position of unstructured loop 222–225 is shown as a thin black line.

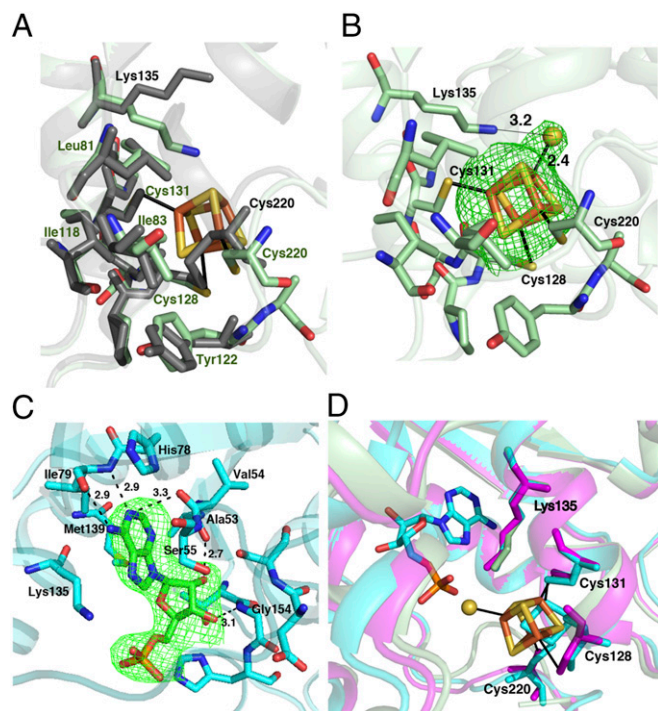


Fig. 5. The [Fe-S] cluster and AMP ligands occupy close positions within the TtuA active site. (A) Superposition of the FeS structure (pale green) on apo-PhTtuA (PDB ID code 3VRH; gray). In apo-PhTtuA, Cys220 and Cys128 form an intramolecular disulfide bond. (B) Fo-Fc difference map omitting the [4Fe-5S] cluster contoured at 2σ (green) superimposed on the [Fe-S] site of the FeS structure. The occupancies of the coordinating sulfur atom and the unique iron have been estimated to be 0.7. (C) Active site of the AMP structure. An Fo-Fc electron density map omitting the AMP ligand (green) contoured at 3σ is superimposed on the active site. The adenine ring is stacked between the side chains of Lys135 and Ser55, and the H bonds between the hydroxyl group of Ser55 and the NH groups of Gly56 and Gly57 within the PP-loop motif create a sharp turn that likely plays a structural role (32). (D) Superposition of the active site of three structures. The [2Fe-2S] cluster of the AMP structure is shown in cyan.

creating any clashes and that the flipped C34 target base of TtiS is adjusted finely to the TtuA active site pocket (Fig. S9 C and D). This superposition suggests the formation of a flipped adenylated uridine intermediate at the target position during TtuA catalysis. Because TtiS does not target the T-stem loop but C34 in the anticodon loop, the tRNA is obviously not expected to bind to TtuA, as shown in Fig. S9C, but we anticipate the T-stem loop to be bound to TtuA in a similar manner. Superposition of TtuA and TtiS also suggests that two tRNA molecules are likely bound on each side of one TtuA dimer and that the two zinc finger domains belonging to different polypeptide chains of TtuA may be used to clamp the T-stem loop on opposite sides. Such a positioning of tRNA relative to the TtuA dimer is in agreement with the complementary electrostatic surface between the highly positively charged putative tRNA binding site (Fig. S9E) and the negatively charged tRNA substrate.

Discussion

Several intriguing questions can be addressed on the basis of the crystal structures reported here. The first one regards the source of sulfur atoms. A well-established thiolation mechanism, occurring in the case of s^2U34 (MnmA) and s^4U8 (ThiI) formation in tRNAs, involves a persulfide carried by an active site cysteine as the sulfuring agent (8–10). The 3D structure of TtuA allows us to exclude such a mechanism, because no free cysteine, as a potential site for a catalytic persulfide, can be observed in the active site (Fig. 4). Indeed, the conserved cysteines in TtuA enzymes are bound to either

the [Fe-S] cluster or the Zn ions (Fig. 4 and Fig. S1). In a second mechanism, the sulfur comes from the C-terminal thiocarboxylated enzyme as in the case of molybdopterin (11) and thiazole (12) biosynthesis. It is excluded that the sulfur that is inserted into the nucleoside comes from the C-terminal carboxylate of TtuA, because it is far away from the active site (Fig. 4). We here show that free sulfide sustains thiolation of uridine under *in vitro* conditions. It is tempting to suggest that it is also the sulfur source *in vivo*. Free sulfide has been shown to be present at relatively high concentrations within thermophilic archaea (13) and participate in [Fe-S] cluster assembly as well as biosynthesis of methionine (14), thiamin thiazole (15), and U8-tRNA thiolation (16).

The second question is the role of the [Fe-S] cluster in TtuA and also, TtcA, which catalyzes formation of s^2C32 in some tRNAs (1). In Fig. 1B, we propose a reaction mechanism based on the following facts. First, because TtuA is not functional in the absence of sulfide, sulfur atoms from the cluster itself cannot be used as the substrate. Second, labeling experiments indicated that ^{35}S -sulfur is incorporated into tRNA when the TtuA reaction is run in the presence of ^{35}S -sulfide generated by cysteine desulfurase. Third, the cluster of TtuA is ligated by only three cysteines and thus, has a free coordination site on the fourth iron, which can be occupied by a hydrosulfide ligand. Precedents for exogenous sulfur species bound to an iron site of a [4Fe-4S] cluster have been reported: a comparable [4Fe-5S] cluster has been observed in HydG, an enzyme involved in maturation of hydrogenases (17), as well as 2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase (18). Moreover, in the structure of the methylthiotransferase RimO, a polysulfide terminal ligand to a [4Fe-4S] cluster has been observed (19).

Fourth, the cluster is adjacent to the ATP binding site, and the structural similarity with TtiS indicates that the target uridine can be positioned in close proximity to the ATP-cluster active site.

We propose that the active site serves to bring the adenylated m^5U -tRNA substrate close to a reactive hydrosulfide attached to the cluster. Adenylation of uridine seems to be a general mechanism for activation (9, 20), and would facilitate a nucleophilic attack of the hydrosulfide to C2 of m^5U (Fig. 1B). Furthermore, such similar addition of an Fe-SH nucleophile to a carbonyl group has been shown to occur during thiazole formation catalyzed by Fe-dependent archaeal thiazole synthases (21). Elimination of AMP then generates the final m^3s^2U -tRNA product. We open the possibility that this mechanism applies to other members of the TtcA/TtuA thiolase enzyme superfamily, sharing the three conserved cysteine ligands (Fig. S1), such as Ncs6/Ctu1 enzymes targeting uridine-34 and some archaeal ThiI enzymes targeting uridine-8 in tRNAs (22).

Material and Methods

Cloning of the *ttuA* Genes. The *T. maritima* gene coding for the TM0197 protein was amplified by PCR from genomic *T. maritima* MS8 DNA by the pfu DNA polymerase using the following primers: 5'-AAAGGAGGGAACA-TATGAAGGTACCAAG-3' (NdeI site bolded and ATG codon underlined) and 5'-AAAATGATCCCAAGCTTATGCGGGGGTTT-3' (HindIII site bolded) hybridized to the coding strand at the TGA stop codon. The amplified product was cloned into the pT7-7 plasmid, giving the pT7-7-*ttuA* plasmid. The gene encoding the PH0300 TtuA protein from *P. horikoshii* was synthesized by GenScript with codon optimization for *E. coli* and subcloned into the pBG102 plasmid (pET27 derivative) between the BamHI and EcoRI restriction sites to produce a 6His-SUMO-TtuA protein construct.

Overexpression of TmTtuA. The plasmid containing the *ttuA* gene was transformed into *E. coli* BL21(DE3) star codon⁺-competent cells. One colony was used to inoculate 100 mL of Luria Broth medium supplemented with ampicillin (100 μ g/mL) and chloramphenicol (30 μ g/mL); 50 mL of this pre-culture grown overnight at 37 °C was used to inoculate 10 L of Luria Broth medium supplemented with the same antibiotics. Cultures were grown at 37 °C to an OD₆₀₀ of 0.6, and expression was induced at 30 °C by addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM. After 10 h, cells were collected by centrifugation; resuspended in 20 mM Tris-HCl, pH 8, and 200 mM NaCl; and stored at -80 °C.

Purification of TmTtuA. Cells were resuspended in 20 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and disrupted by sonication. Cells debris was removed by ultracentrifugation at 200,000 × *g* for 20 min at 4 °C, and the supernatant was heated at 75 °C for 15 min to precipitate the *E. coli* proteins. After centrifugation at 30,000 × *g* for 30 min at 4 °C and addition of ammonium sulfate (1.5 M final concentration), the supernatant was loaded on a 20-mL prepacked hydrophobic interaction chromatography resin (Butyl Sepharose fast flow; GE Healthcare). The column was washed with four column volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl, and 1.5 M ammonium sulfate and eluted with a linear gradient of 1.5–0 M ammonium sulfate. Fractions containing the TmTtuA protein were then loaded on a Superdex 200 10/300 column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl, and 5 mM DTT. The protein was concentrated to 30 mg/mL using Amicon concentrators (30-kDa cutoff; Millipore), aliquoted, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C.

Overexpression and Purification of PhTtuA. The plasmid containing the *ttuA* gene was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3). Cells (6 L) were grown at 37 °C in Luria Broth medium supplemented with kanamycin (50 µg/mL) to an OD₆₀₀ of 1.2. Protein expression was then induced with 1 mM IPTG, and incubation was extended overnight at 20 °C. After centrifugation, pellets were resuspended in 10 mL of 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.5, 500 mM NaCl, 40 mM imidazole with RNase A (2 µg/mL), and benzonase and disrupted by sonication. Cells debris was removed by ultracentrifugation at 210,000 × *g* for 1 h at 4 °C. The supernatant was then loaded on an immobilized metal affinity Ni-NTA column (HisTrap 5 mL; GE Healthcare) equilibrated in 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.5, 500 mM NaCl, and 40 mM imidazole and eluted with a linear gradient of 0–1 M imidazole. The protein was collected; dialyzed overnight against 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 150 mM NaCl in the presence of the PreScission Protease (150 µM); centrifuged at 4 °C for 10 min; and then, loaded on a MonoS cation exchange column (GE Healthcare) using an AKTA system at 1 mL min^{–1}. Elution was performed with a linear gradient of 0.02–1 M NaCl in the same buffer for 20 min. Fractions containing the TtuA protein were concentrated and loaded on a gel filtration column (Hiloal 16/60 Superdex S200; GE Healthcare) in 25 mM Hepes, pH 7.5, 200 mM NaCl, and 5 mM DTT. The purified protein was concentrated to 15 mg/mL with an Amicon Ultra filter device (30-kDa cutoff; Millipore), frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C. The GST–3C-protease (PreScission) was expressed using pGEX-2T recombinant plasmids. After induction at 25 °C with 0.1 mM IPTG for 20 h, the protein was purified using glutathione–Sepharose chromatography.

[Fe-S] Cluster Reconstitution and Purification of Holo-TtuA Proteins. The reconstitution of the [4Fe-4S] cluster and purification of holo-TmTtuA and holo-PhTtuA were performed under strict anaerobic conditions in an Mbraun glove box containing less than 0.5 ppm O₂. TtuA was treated with 5 mM DTT for 10 min and then incubated overnight with a fivefold molar excess of ferrous ammonium sulfate and L-cysteine in the presence of 2 µM *E. coli* cysteine desulfurase CsdA. The holo-TtuA was then loaded onto a Superdex 200 10/300 gel filtration column (GL Sciences) equilibrated in 20 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, and 5 mM DTT. The peak containing the TtuA dimer was then concentrated to 15–25 mg/mL on a Vivaspinn concentrator (30-kDa cutoff).

Quantification Methods. The Pierce BCA assay was used to quantify the protein (23). Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Shimadzu ICP 9000 instrument with mini plasma torch in axial reading mode) was used to detect and quantify zinc and iron in TmTtuA. Standard solutions of zinc and ytterbium for atomic absorption spectroscopy (Sigma-Aldrich) were used for quantification [calibration curve between 10 and 500 µg/L with 1% HNO₃ (Fluka)]. Ytterbium was used as an internal standard to prevent calibration drift and fluidic perturbation. The Fish (24) and Beinert (25) methods were routinely used to quantify iron and sulfide, respectively, after cluster reconstitution.

Preparation of Bulk tRNA. Bulk tRNA was purified from either MS8 *T. maritima* or GRB 105 *ttcA*[–] *E. coli* cells as described (26).

In Vitro Enzymes Assay. The reaction mixture contained in 100 µL 25 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 10 µM *E. coli ttcA*[–] bulk tRNA, 1 mM Na₂S, and 1 µM TtuA. After 1 h of incubation at 65 °C (TmTtuA) or 85 °C (PhTtuA) under anaerobic conditions, the tRNA products were digested and analyzed by HPLC. Thermostable inorganic pyrophosphatase from *Thermococcus litoralis* was bought from New England Biolabs (M0296L). For the labeling experiment, ³⁵S-sulfide was first formed by incubating 500 µM L-cysteine in the presence of 10, 25, or 50 µCi of ³⁵S-L-cysteine in 50 µL of solution containing 25 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM 1,4-DTT, and 4 µM *E. coli* cysteine desulfurase CsdA. After 2 h of reaction at 37 °C under nitrogen

atmosphere, the thiolation activity of TmTtuA (1 µM) was assayed by incubating the ³⁵S-sulfide-containing mixture with 50 µL of solution containing *ttcA*[–] *E. coli* bulk tRNA (10 µM), ATP (500 µM), and Mg²⁺ (5 mM) for 1 h at 65 °C under nitrogen atmosphere. Finally, RNA was separated by PAGE on a 12% (wt/vol) gel containing 7 M urea. The gel was stained with 0.025% (wt/vol) toluidine blue, then dried, and visualized by phosphor imaging with a Typhoon apparatus (GE Healthcare).

tRNA digestion and quantification of modified nucleosides. For tRNA digestion, 10 µM tRNA was digested overnight in 100 µL of 25 mM Tris-HCl, pH 8, 200 mM NaCl, and 0.1 mM ZnSO₄ at 37 °C by nuclease P1 (2 U; Sigma-Aldrich) followed by the addition of alkaline phosphatase during 2 h at 37 °C (2 U; Sigma-Aldrich). After an initial unambiguous identification of the elution position of the modified nucleosides by HPLC-MS/MS, quantification of the modified nucleosides was routinely performed as follows. The nucleosides products were injected on an SB-C18 HPLC column (Agilent Technologies) mounted with an SB-C18 precolumn connected to a binary HPLC system (1260 Infinity; Agilent Technologies). The Gehrke and Kuo (27) gradient was used to separate the different nucleosides and quantify m⁵U and m⁵s²U.

HPLC-MS/MS analysis of modified nucleosides. HPLC–tandem MS analyses were performed with an Accela chromatographic system coupled with a Quantum ultratriple quadrupole apparatus (Thermo Electron SAS) equipped with an HESI electrospray source used in the positive ionization mode. HPLC separation was carried out with a 2 × 150-mm octadecylsilyl silica gel (3-mm particle size) column (Uptisphere) and a 0–15% linear gradient of acetonitrile in 2 mM ammonium formate over 20 min as the mobile phase. MS detection was carried out in multiple reactions monitoring mode to obtain high sensitivity and specificity with settings optimized to favor loss of ribose on collision-induced fragmentation. The transitions used to detect the nucleosides were *m/z* 244→112 for cytidine, 260→128 for s²C, 259→127 for s²U, and 275→143 for m⁵s²U. Elution occurs at 6.0, 8.0, 10.2, and 14.8 min for cytidine, s²C, s²U, and m⁵s²U, respectively. Quantification was performed by external calibration.

[Fe-S] Cluster Characterization by UV-Visible Spectroscopy and EPR. UV-visible absorption spectra were recorded in quartz cuvettes (1-cm optic path) under anaerobic conditions in a glove box on a XL-100 Uvikon spectrophotometer equipped with optical fibers. TmTtuA was treated with 1 mM dithionite before recording the EPR spectrum. EPR spectra of TmTtuA were recorded in 707-SQ-250M tubes in 25 mM Tris-HCl, pH 8, and 200 mM NaCl on a Bruker ELEXSYS-E500 continuous-wave EPR spectrometer operating at 20 K with an SHQE cavity and an Oxford Instruments ESR900 helium flow cryostat under nonsaturating conditions using a microwave power of 4 mW, a microwave frequency of 9.3934 GHz, a modulation amplitude of 0.6 mT, a modulation frequency of 100 kHz, and an accumulation of 10 scans. For the determination of the number of unpaired spins, a Cu-EDTA (400 µM) standard sample was used. The simulation of the EPR spectrum was performed with the Easyspin software (www.easyspin.org).

Crystallization, Data Collection, and Structure Determination. Crystals of holo-PhTtuA were obtained under anaerobic conditions with the same crystallization conditions as for the apoprotein (4). The AMP dataset corresponds to one minor lattice of some twinned crystals grown under the same anaerobic conditions. This lattice contained AMP, which had not been added in the crystallization solution, and a degraded form of the cluster. X-ray data were collected on a single crystal at 100 K at the SOLEIL synchrotron (Saint Aubin, France) on the Proxima1 and Proxima2 beamlines. Data were indexed, processed, and scaled with XDS (28). For the FeS and FeS-ano structures, noticeable anisotropy in the diffraction was taken into account and corrected by the programs DEBYE and STARANISO as accessible by the server staraniso.globalphasing.org/cgi-bin/staraniso.cgi. The apo-PhTtuA model [Protein Data Bank (PDB) ID code 3VRH] was used to solve the structures by molecular replacement with PHASER (29). BUSTER (30) was used for refinement, and COOT (31) was used for model reconstruction. Omit maps were calculated by omitting the ligand and using the MapOnly option in BUSTER. The presence of an extra electron density near the [4Fe-4S] cluster in the FeS structure was examined with datasets containing different numbers of images to take into account possible radiation damage. Weak extra electron density blobs present in the active site cavity could not be modeled with molecules present in the crystallization solution. Data collection and refinement statistics are given in Table S1. In all models, no residue has backbone dihedral angles in the forbidden region of the Ramachandran plot, and 97.02, 96.98, and 98.65% of the residues are in the favored region for the AMP, FeS-ano, and FeS structures, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Glen Björk for providing the *ttcA*[–] *E. coli* GRB105 strain; Stéphane Moulleron for providing the plasmid encoding the GST–3C-protease; Dr. J. Pérard for quantification of zinc by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; Martin Savko for assistance in using

beamline Proxima 2; Ludovic Pecqueur for maintenance of the glove boxes and advice in data treatment; Thibaut Fogeron and Xavier Itturioz for help in the labeling experiment with ³⁵S-L-Cysteine; Céline Brochier for performing genomic analysis; the Vanderbilt Center for Structural Biology for providing the pBG102 plasmid; the Collège de France for the Maître de Conférences

Associé position (S.A.); the French EPR CNRS Facility, Infrastructure de Recherche Renard, Formation de Recherche en Evolution 3443 for the EPR experiments; and the SOLEIL synchrotron for provision of synchrotron radiation facilities. This work was supported by French State Program "Investissements d'Avenir" Grants "LABEX DYNAMO" and ANR-11-LABX-0011.

1. Bouvier D, et al. (2014) TtcA a new tRNA-thioltransferase with an Fe-S cluster. *Nucleic Acids Res* 42:7960–7970.
2. Shigi N, Sakaguchi Y, Suzuki T, Watanabe K (2006) Identification of two tRNA thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures. *J Biol Chem* 281:14296–14306.
3. Edmonds CG, et al. (1991) Posttranscriptional modification of tRNA in thermophilic archaea (Archaeobacteria). *J Bacteriol* 173:3138–3148.
4. Nakagawa H, et al. (2013) Crystallographic and mutational studies on the tRNA thiouridine synthetase TtuA. *Proteins* 81:1232–1244.
5. Schmelz S, Naismith JH (2009) Adenylate-forming enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 19: 666–671.
6. Nakanishi K, et al. (2009) Structural basis for translational fidelity ensured by transfer RNA lysidine synthetase. *Nature* 461:1144–1148.
7. Kuratani M, et al. (2007) Structural basis of the initial binding of tRNA(Ile) lysidine synthetase TlIS with ATP and L-lysine. *Structure* 15:1642–1653.
8. Mueller EG, Palenchar PM, Buck CJ (2001) The role of the cysteine residues of Thil in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *J Biol Chem* 276:33588–33595.
9. Numata T, Ikeuchi Y, Fukai S, Suzuki T, Nureki O (2006) Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate. *Nature* 442:419–424.
10. Mueller EG (2006) Trafficking in persulfides: Delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nat Chem Biol* 2:185–194.
11. Wuebbens MM, Rajagopalan KV (2003) Mechanistic and mutational studies of *Escherichia coli* molybdopterin synthase clarify the final step of molybdopterin biosynthesis. *J Biol Chem* 278:14523–14532.
12. Jurgenson CT, Begley TP, Ealick SE (2009) The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 78:569–603.
13. Jack Jones W, Paynter MJB, Gupta R (1983) Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. *Arch Microbiol* 135:91–97.
14. Liu Y, Sieprawka-Lupa M, Whitman WB, White RH (2010) Cysteine is not the sulfur source for iron-sulfur cluster and methionine biosynthesis in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J Biol Chem* 285:31923–31929.
15. Eser BE, Zhang X, Chanani PK, Begley TP, Ealick SE (2016) From suicide enzyme to catalyst: The iron-dependent sulfide transfer in *Methanococcus jannaschii* thiamin thiazole biosynthesis. *J Am Chem Soc* 138:3639–3642.
16. Liu Y, et al. (2012) Biosynthesis of 4-thiouridine in tRNA in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J Biol Chem* 287:36683–36692.
17. Dinis P, et al. (2015) X-ray crystallographic and EPR spectroscopic analysis of HydG, a maturase in [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 1362–1367.
18. Knauer SH, Buckel W, Dobbek H (2011) Structural basis for reductive radical formation and electron recycling in (R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase. *J Am Chem Soc* 133:4342–4347.
19. Forouhar F, et al. (2013) Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthioltransferases. *Nat Chem Biol* 9:333–338.
20. You D, Xu T, Yao F, Zhou X, Deng Z (2008) Direct evidence that Thil is an ATP pyrophosphatase for the adenylation of uridine in 4-thiouridine biosynthesis. *ChemBioChem* 9:1879–1882.
21. Cicchillo RM, Booker SJ (2005) Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: Both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *J Am Chem Soc* 127:2860–2861.
22. Liu Y, et al. (2016) A [3Fe-4S] cluster is required for tRNA thiolation in archaea and eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:12703–12708.
23. Smith PK, et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85.
24. Fish WW (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* 158:357–364.
25. Beinert H (1983) Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem* 131:373–378.
26. Buck M, Ames BN (1984) A modified nucleotide in tRNA as a possible regulator of aerobiosis: Synthesis of cis-2-methyl-thioribosylzeatin in the tRNA of *Salmonella*. *Cell* 36:523–531.
27. Gehrke CW, Kuo KC (1989) Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 471:3–36.
28. Kabsch W (2010) Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:125–132.
29. McCoy AJ, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40:658–674.
30. Bricogne G, et al. (2016) BUSTER (Global Phasing Ltd., Cambridge, UK), Version 2.10.2.
31. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:486–501.
32. Nakanishi K, et al. (2005) Structural basis for lysidine formation by ATP pyrophosphatase accompanied by a lysine-specific loop and a tRNA-recognition domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7487–7492.
33. Chavarria NE, et al. (2014) Archaeal Tuc1/Ncs6 homolog required for wobble uridine tRNA thiolation is associated with ubiquitin-proteasome, translation, and RNA processing system homologs. *PLoS One* 9:e99104.
34. Liu Y, Long F, Wang L, Söll D, Whitman WB (2014) The putative tRNA 2-thiouridine synthetase Ncs6 is an essential sulfur carrier in *Methanococcus maripaludis*. *FEBS Lett* 588:873–877.
35. Noma A, Sakaguchi Y, Suzuki T (2009) Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res* 37:1335–1352.
36. Chowdhury MM, Dosche C, Lohmannsroben HG, Leimkuhler S (2012) Dual role of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MOCS3 in tRNA thiolation and molybdenum cofactor biosynthesis in humans. *J Biol Chem* 287:17297–17307.
37. Sievers F, et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
38. Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15(4):305–308.
39. Krissinel E (2010) Crystal contacts as nature's docking solutions. *J Comput Chem* 31: 133–143.

Supporting Information

Arragain et al. 10.1073/pnas.1700902114

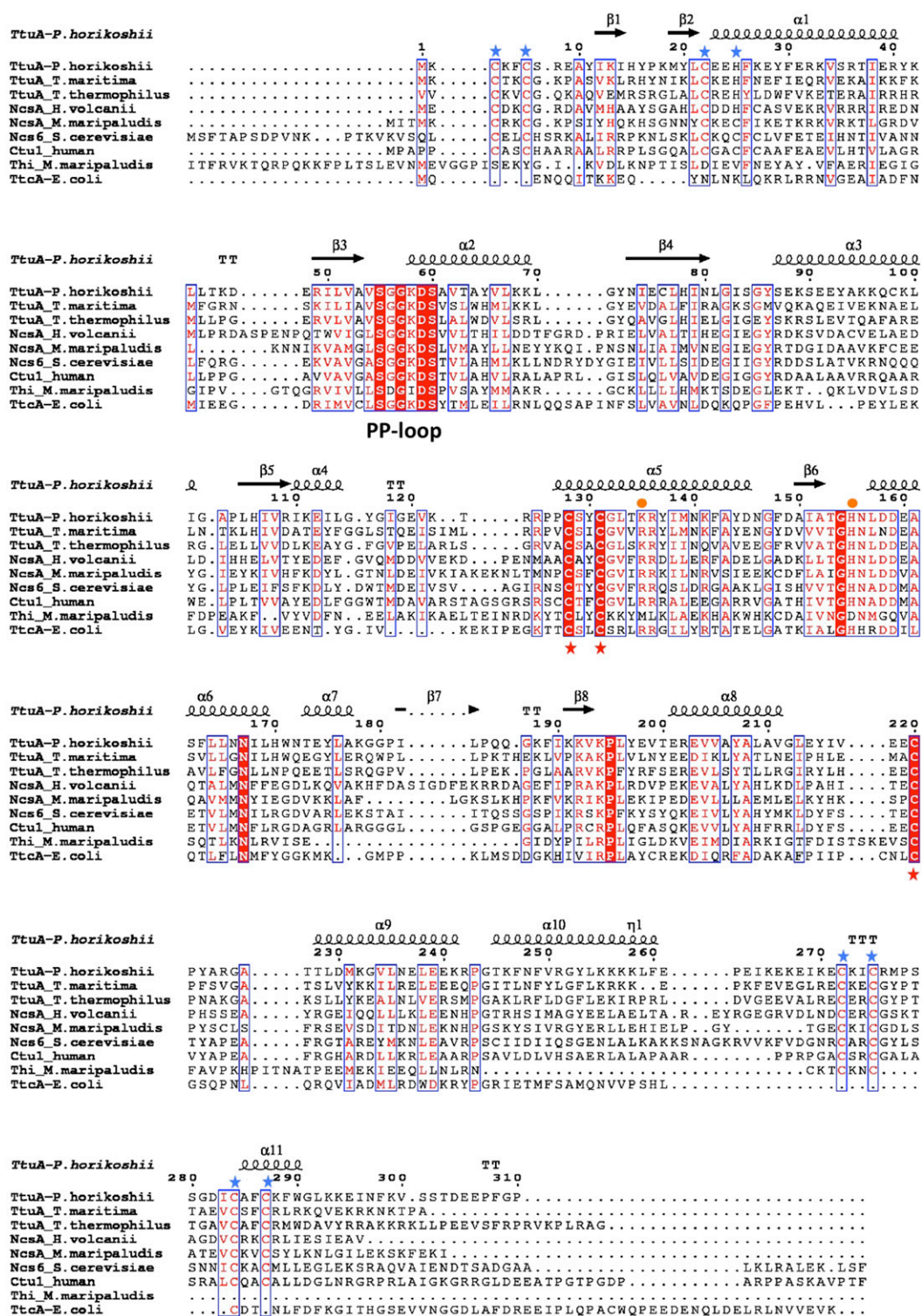


Fig. S1. Amino acid sequence alignment of several members of the TtcA/TtuA superfamily. Alignment of protein sequences of the TtcA/TtuA superfamily: TtuA [from *Pyrococcus horikoshii* (PH0300) (4)], *Thermotoga maritima* (TM0197), and *Thermus thermophilus* (TT_CO106) (4)], *Ncs6* [from *Haloferax volcanii* (HVO_0580) (33)], *Methanococcus maripaludis* (Mmp1356) (34), *Saccharomyces cerevisiae* (35), and human (36)], and *Escherichia coli* TtcA (1) were performed with Clustal Omega (37) and rendered with ESPrnt (38). ThiI from *M. maripaludis* is also indicated as an example of archaeal s^4U8 tRNA thiolase (22), but its 108 N-terminal residues have been omitted. The secondary structure elements of PhTtuA are shown above the alignment. All enzymes contain three conserved cysteines (indicated by red stars) that ligate the [4Fe-4S] cluster in TtcA and TtuA. The TtuA and Ncs6 subfamilies also contain two zinc finger motifs at the N and C termini that are highlighted by blue stars. The likely catalytic residues Lys135 and His155 are indicated as orange circles. It should be noted that the cysteines that coordinate the [Fe-S] cluster in TtuA are Cys122, Cys125, and Cys213, which are different from the previous incorrect numbering (1).

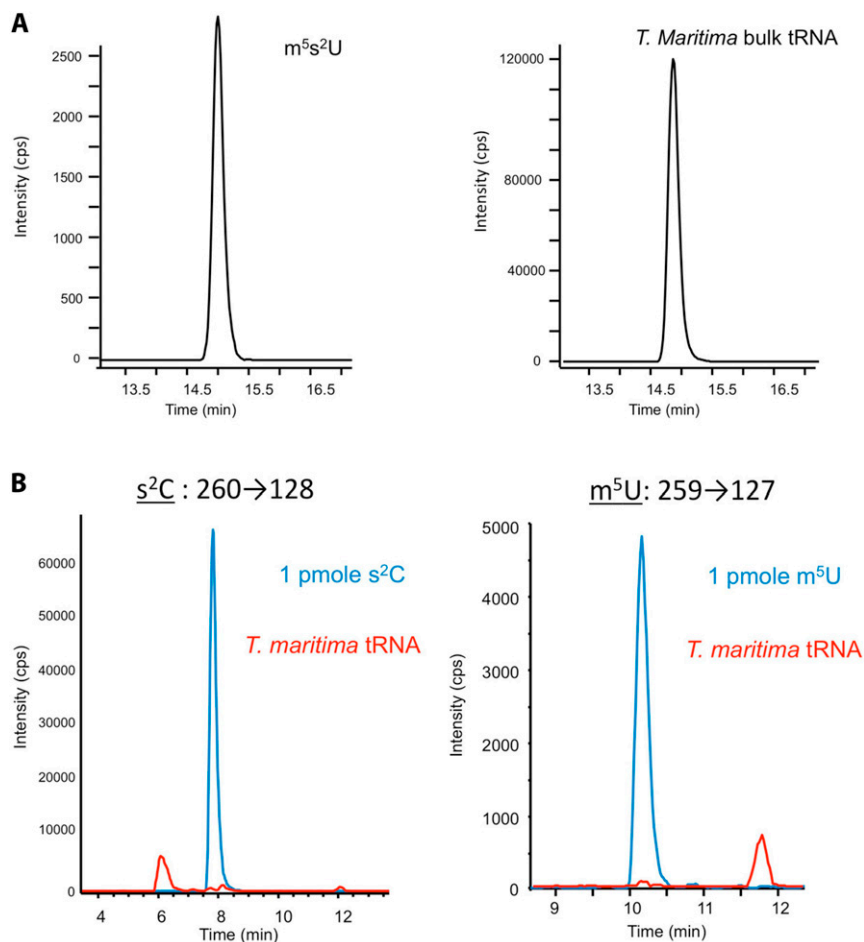


Fig. S2. Analysis of the presence of m^5s^2U , s^2C , and m^5U in tRNA within cells. (A) Detection of m^5s^2U in *T. maritima* bulk tRNA by HPLC on an octadecylsilyl silica gel column. (Left) Analysis of 1 pmol m^5s^2U standard, showing the transition m/z 275 \rightarrow 143 (loss of ribose). (Right) Analysis of an enzymatic digest of 13 μ g bulk tRNA (13.9 nmol cytosine) from *T. maritima*. (B) HPLC chromatograms showing the absence of both s^2C (Left) and m^5U (Right) in *T. maritima* bulk tRNA. Standards (blue) of s^2C (eluted at 8 min) and m^5U (eluted at 10.2 min), detected using transitions m/z 260 \rightarrow 128 and m/z 259 \rightarrow 127, respectively, were undetectable in hydrolyzed *T. maritima* bulk tRNA (red).

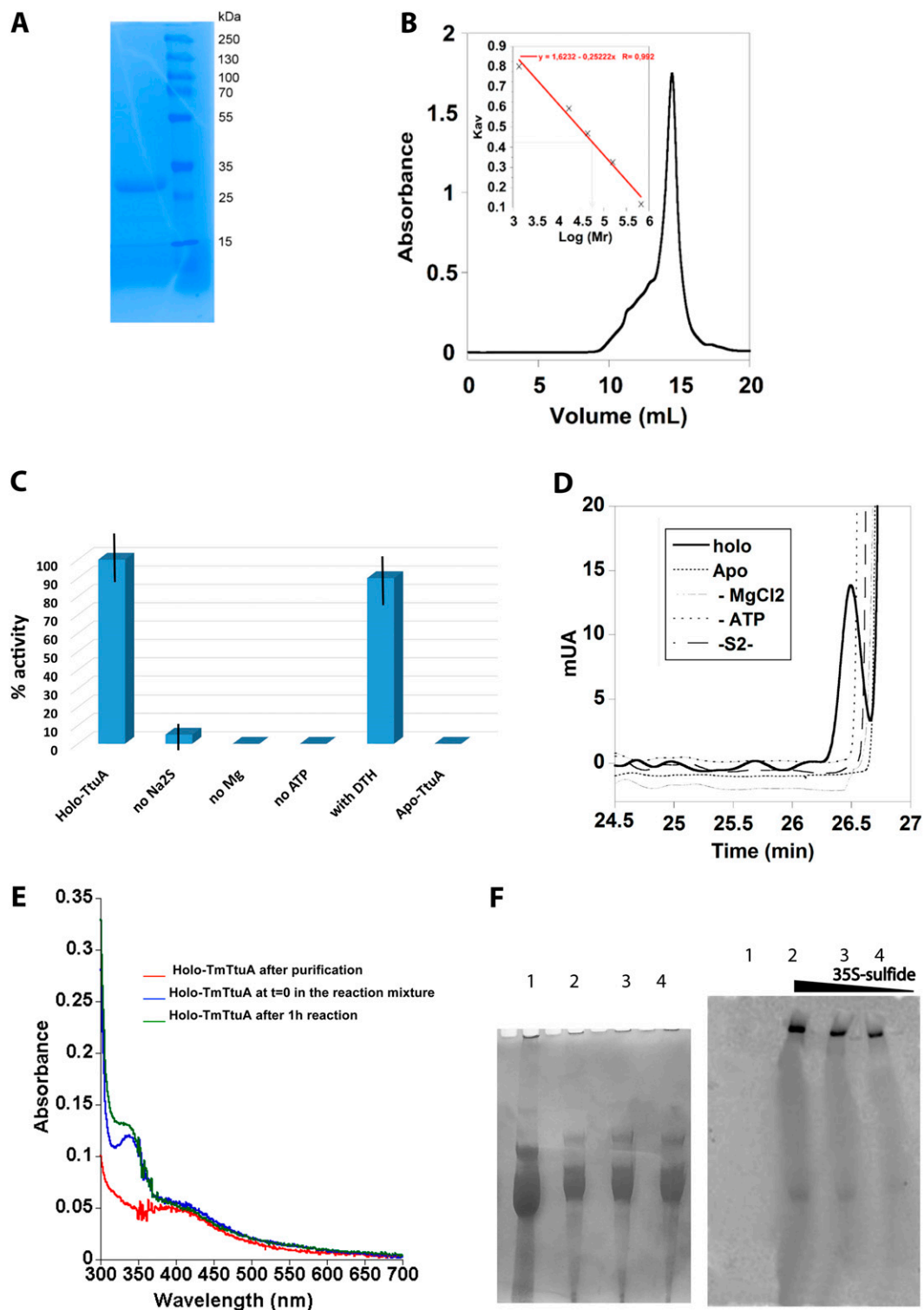


Fig. S3. Purification and activity of TmTtuA. (A) A 12% SDS/PAGE gel analysis of TmTtuA. (B) Purification of holo-TmTtuA on a Superdex 200 10/300 gel filtration column calibrated with commercial standards (BioRad no. 151–1901): Tyroglobulin (670 kDa), γ -globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa), and Vitamin B12 (1.36 kDa). The calibration of the column (*Inset*) gave a mass of 58,277 Da for this protein, consistent with a dimeric state (theoretical mass: 69,868 Da). (C) tRNA thiolation control assays; 1 μ M holo-TmTtuA was assayed under standard conditions (holo-TtuA); in the absence of sodium sulfide (no Na₂S), Mg²⁺ (no Mg), ATP (no ATP); or after reduction with dithionite (DTH; with DTH). Also, 10 μ M apo-TmTtuA was assayed under standard conditions as control (apo-TtuA). The data shown are mean values based on three to four different experiments. (D) HPLC chromatograms monitoring the U54 thiolase activity of TmTtuA using *E. coli* *ttcA*⁻ bulk tRNA as the substrate. After digestion of the tRNA product, the modified nucleosides were analyzed by HPLC. The data unambiguously show the absolute requirement for ATP, sulfide, MgCl₂, and the cluster. (E) UV-visible absorption spectrum of TmTtuA before and after reaction showing that the absorption band at 400 nm characteristic of the [4Fe-4S] cluster is not modified during the assay: 5 μ M holo-TmTtuA (red); just after adding 5 μ M *E. coli* *ttcA*⁻ bulk tRNA, 500 μ M ATP, 500 μ M Na₂S, and 2.5 mM MgCl₂ (blue); and after 1 h of incubation at 65 °C (green). (F) Activity of TmTtuA in the presence of ³⁵S-sulfide generated by cysteine desulfurase in the presence of various quantities of [³⁵S]cysteine. After reaction, the tRNA was separated on a 7 M urea gel and analyzed by staining with toluidine blue (*Left*) and autoradiography on a Phosphorimager plate (*Right*). The radioactivity present in the wells corresponds to the proteins from the incubation mixture that do not migrate in the gel. Lane 1, control (bulk tRNA alone); lane 2, 50 μ Ci ³⁵S-Cys; lane 3, 25 μ Ci ³⁵S-Cys; lane 4, 10 μ Ci ³⁵S-Cys.

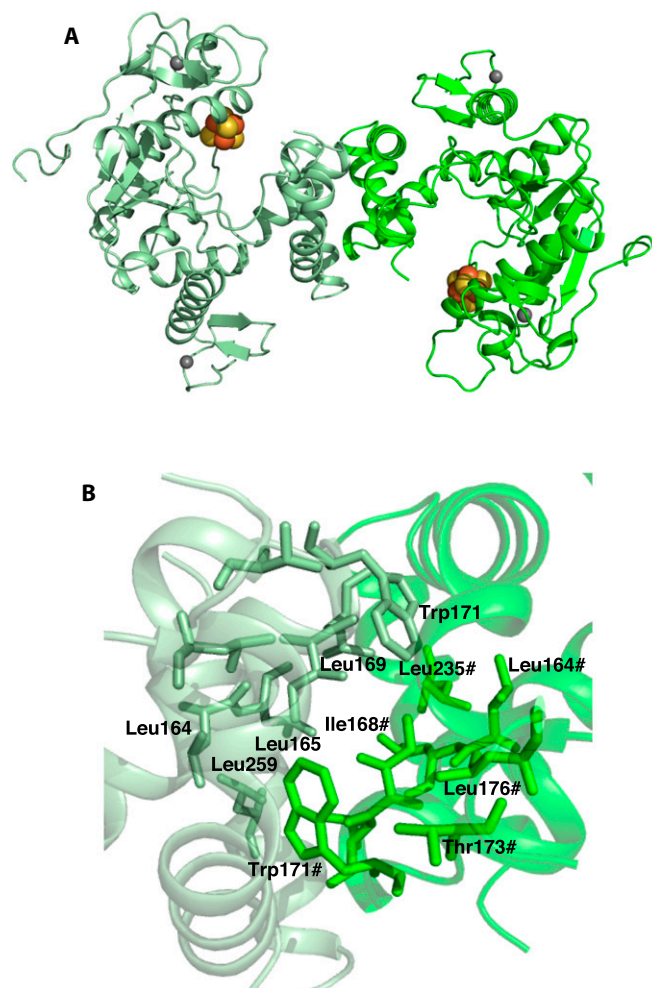


Fig. 55. Structure of the crystallographic dimer of the FeS structure. (A) Overall view. (B) Details of the interactions within the dimer. The crystallographic interface probably corresponds to the biological dimer, because the buried surface area is $4,300 \text{ \AA}^2$ according to PISA (39).

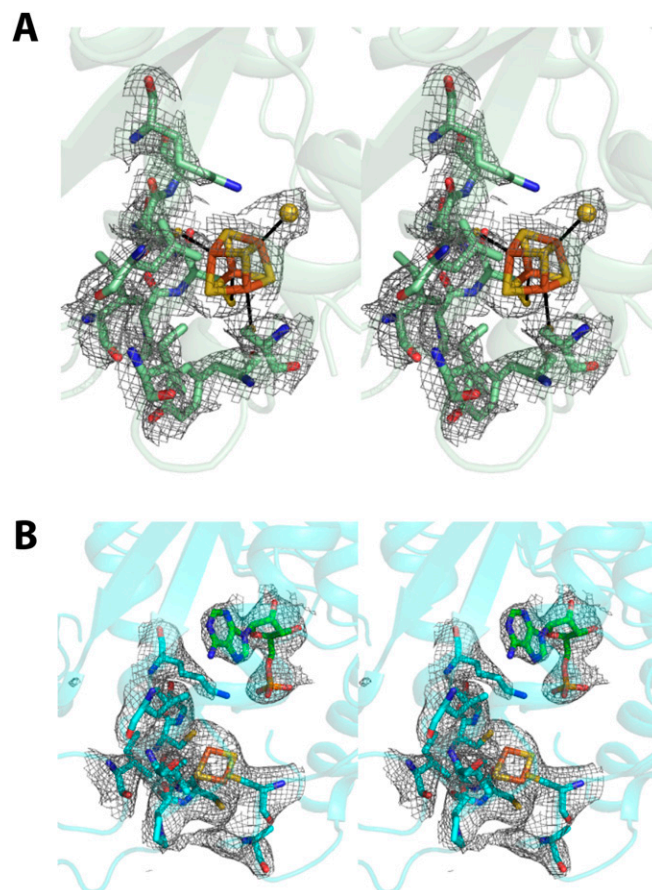


Fig. 56. Stereo views of the active site of PhTtuA. A 2Fo-Fc electron density map contoured at the level of 1σ (gray) is superimposed on the active site. (A) FeS structure. (B) AMP structure.

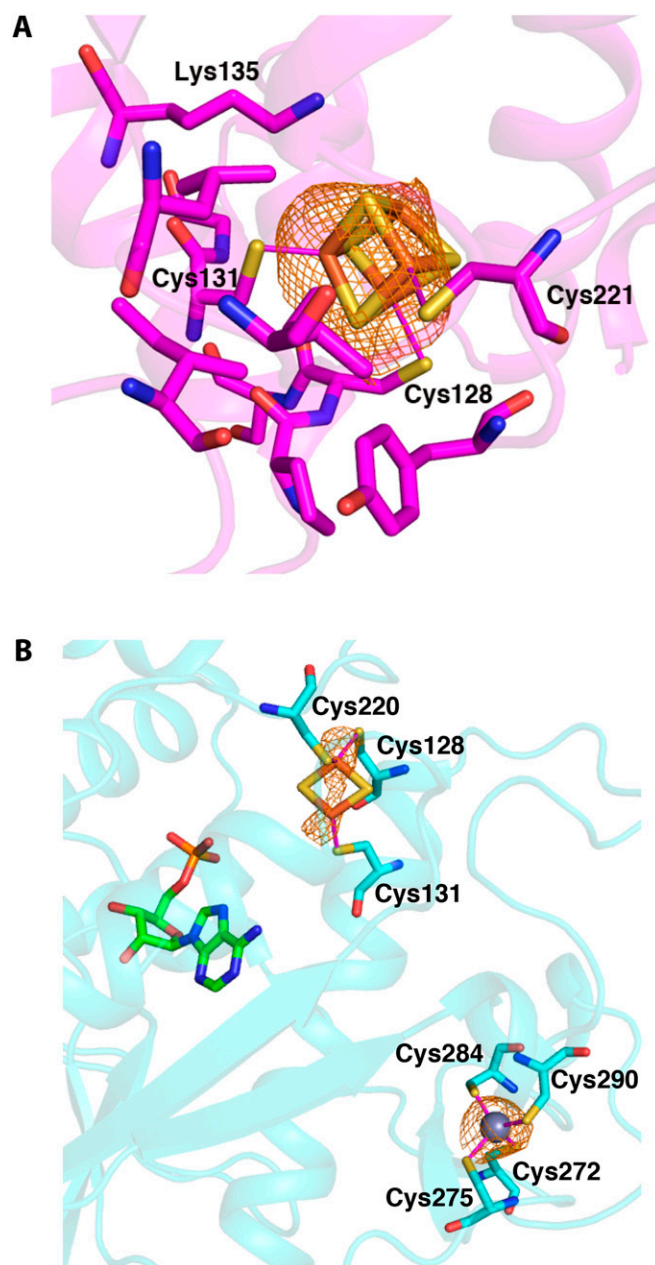


Fig. S7. Anomalous difference maps. (A) Anomalous difference map contoured at 3.5σ centered on the [4Fe-4S] cluster (orange) superimposed on the [Fe-S] site of molecule B of the FeS-ano structure. (B) Anomalous difference map calculated at the wavelength of 0.9793 Å contoured at 3σ (orange) in the region of the Zn²⁺ zinc ion and the [2Fe-2S] cluster in molecule A of the AMP structure.

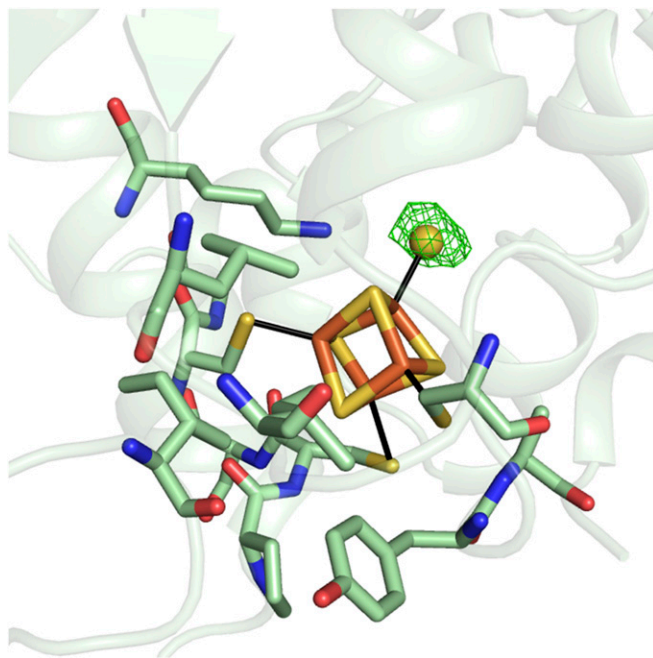


Fig. S8. Fo-Fc difference map omitting the labile hydrosulfide contoured at 2σ (green) superimposed on the [Fe-S] site of the FeS structure.

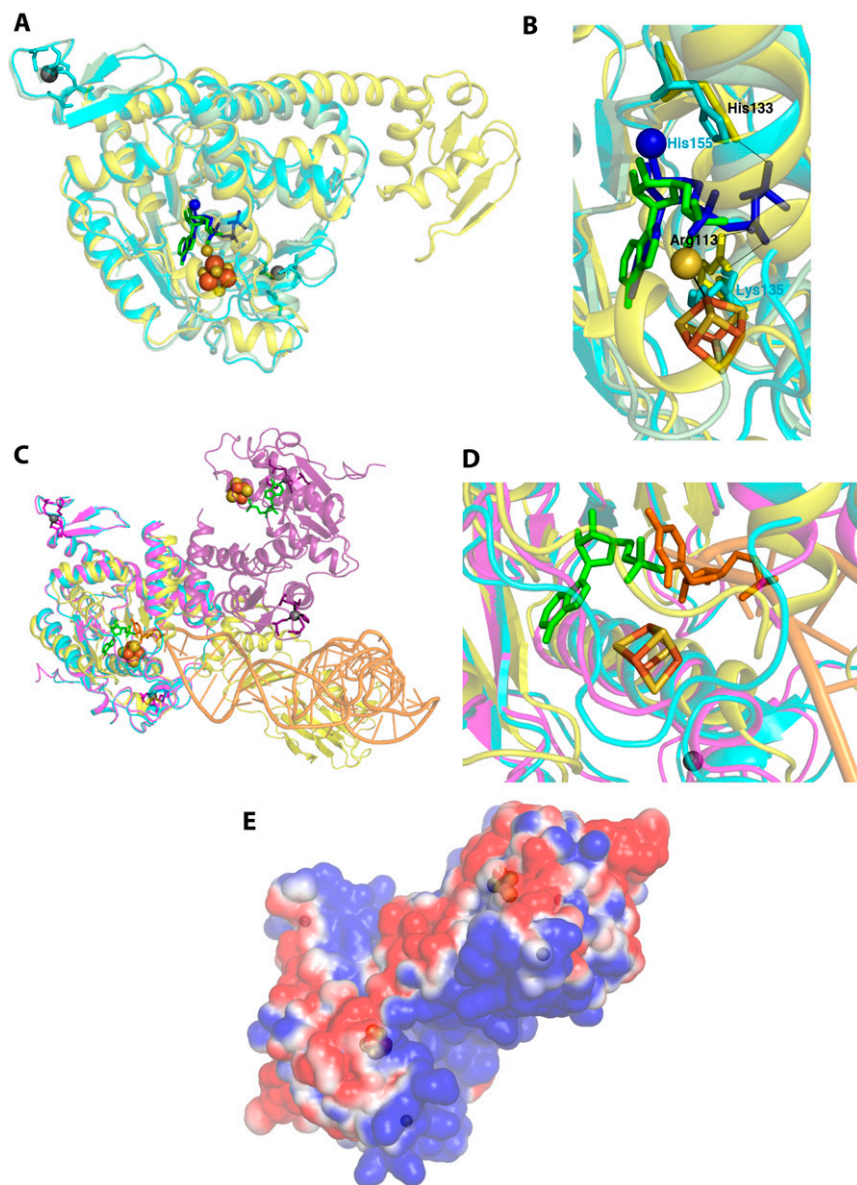


Fig. S9. Superposition of the ATP binding sites of TtuA and TtIS. Residues 49–70 (corresponding to the conserved ATP binding site) from PhTtuA were superimposed onto the corresponding residues of TtIS (rmsd of 0.62 Å for 22 atoms). (A) Monomer C of *Aquifex aeolicus* TtIS (yellow) in complex with ATP and Mg²⁺ (PDB ID code 2E89) was superimposed on monomer A of the PhTtuA AMP (cyan) and the FeS structure (pale green). AMP is shown in green, the [4Fe-5S] cluster is shown as spheres, and ATP and Mg²⁺ (from TtIS) are in blue. (B) Enlarged view of the active site showing His133 and Arg113 involved in ATP binding in TtIS (shown as sticks). Zn²⁺ and Mg²⁺ are shown as gray and blue sphere, respectively. (C) *Geobacillus kaustophilus* TtIS (yellow) in complex with tRNA (orange; PDB ID code 3A2K) was superimposed on monomers A of the PhTtuA AMP (cyan) and FeS-ano (purple) structures (rmsd of 1.60 Å for 113 atoms). The two monomers of the TtuA FeS-ano structure are shown in magenta and purple ribbons. The flipped C34 target base is represented as sticks. (D) Enlarged view of C to show the flipped cytidine 34 of tRNA bound to TtIS and the PhTtuA active site pocket. (E) Electrostatic surface of the PhTtuA dimer (oriented as in C) calculated with PYMOL/APBS colored by the electrostatic potential from red (negative) to blue (positive) that shows a highly positive surface at the putative tRNA binding site.

Table S1. Data collection and refinement statistics

Crystallographic parameter	FeS (PDB ID code 5MKP)	FeS-ano (PDB ID code 5MKQ)	AMP (PDB ID code 5MKO)
Data collection			
Beamline	SOLEIL Proxima-2	SOLEIL Proxima-1	SOLEIL Proxima-1
Wavelength (Å)	0.9793	1.7389	0.9793
Space group	$P4_32_12$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	70.0, 70.0, 127.7	69.6, 72.3, 128.2	68.9, 72.3, 128.4
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)*	50–2.50 (2.65–2.50)	50–2.9 (2.98–2.9)	50–2.65 (2.72–2.65)
R_{merge} *	0.125 (2.77)	0.116 (3.09)	0.096 (4.76)
R_{pim} *	0.034 (0.876)	0.031 (0.66)	0.030 (1.44)
$I/\sigma(I)$ *	16.1 (1.0)	15.1 (1.0)	13.2 (0.9)
$CC_{1/2}$ *	1.00 (0.29)	0.998 (0.602)	0.986 (0.463)
Completeness (%)*	100 (99.7)	99.6 (98.8)	99.8 (99.7)
Redundancy*	14.3 (13.9)	18.6 (19.8)	12.1 (12.7)
<i>B</i> Wilson (Å ²)	79.8	104.1	91.9
Refinement			
Resolution (Å)	48–2.5	45–2.9	45–2.65
No. of reflections	11,624	13,036	17,292
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.1926/0.2447	0.2070/0.2445	0.2113/0.2394
No. of atoms			
Protein	2,471	4,896	4,927
Zn, Fe, S	2, 4, 5	2 × (2, 4, 4)	2 × (2, 2, 2)
AMP	—	—	46
Water	92	29	57
<i>B</i> factors (Å ²)			
Protein	78.5	92.3	89.5
Zn/FeS	76.7/131.9	121.2/169.1	100.7/112.8
AMP	—	—	77.6
Water	73.8	72.4	77.5
rmsds			
Bond lengths (Å)	0.09	0.08	0.08
Bond angles (°)	1.00	0.96	1.00

One crystal for each structure.

*Values in parentheses are for the highest resolution shell.

CHAPITRE III

**BIOSYNTHESE DE LA 2-THIOURIDINE : U34-ARNT-2-
SULFURTRANSFERASE**

A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A-1) Importance des modifications en U₃₄, pour la reconnaissance du codon

Lorsqu'un ARNt possède une uridine en position 34 « wobble », celle-ci est pratiquement toujours modifiée sur le carbone 5. Les modifications présentes en position wobble peuvent être regroupées en trois grandes catégories : (i) celles qui possèdent en plus une thiolation sur le carbone C2 ; (ii) celles qui contiennent en plus une méthylation sur le 2'OH du ribose et (iii) celles qui ne contiennent qu'une modification sur le carbone 5 (Björk et al., 2007) **Figure 39**.

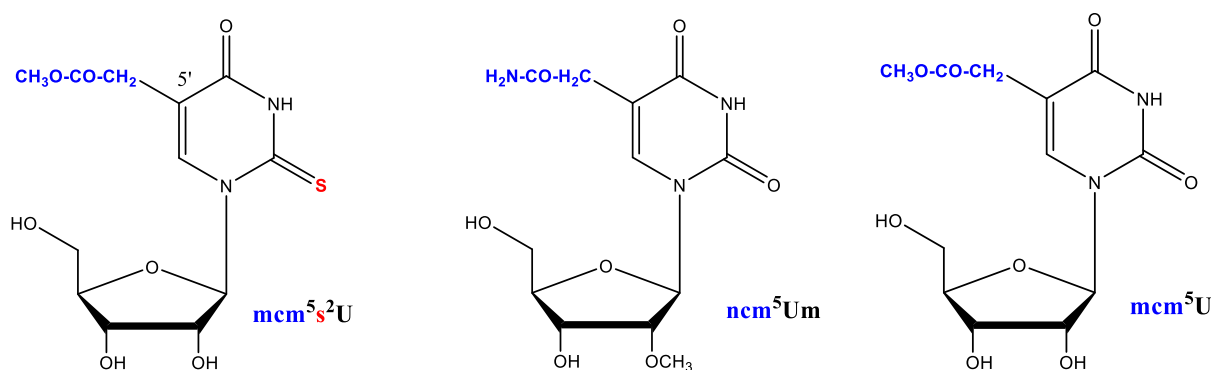


Figure 39: Uridine « wobble » modifiée dans les ARNt chez la levure. 5-méthoxycarbonylméthyl-2-thiouridine (mcm^5s^2U), 5-carbamoylméthyl-2'-O-méthyluridine (ncm^5Um) et 5-méthoxycarbonylméthyl-uridine (mcm^5U) (Björk et al., 2007).

Tous les ARNt de tous les organismes et organelles (sauf *Mycoplasma*) sont concernés par la première catégorie (contenant des dérivés 2-thiolés (xm^5s^2U)). La modification en U₃₄ permet la reconnaissance spécifique de ces acides aminés alors que ces ARNt appartiennent aux boîtes de codons partagées codant pour His/Gln, Asn/Lys et Asp/Glu. Ces modifications apportent donc une réponse à la dégénérescence du code génétique. Ces ARNt contiennent U₃₄-U₃₅ dans leurs anticodons, reconnaissant les codons se terminant par A- ou G- codants pour les acides aminés glutamine (Gln), lysine (Lys) et glutamate (Glu) (Björk et al., 2007).

La base wobble des ARNt^{Glu}_{UUC}, ARNt^{Gln}_{UUG} et ARNt^{Lys}_{UUU} est modifiée de façon universelle en dérivés 5-méthyl-2-thiouridine (xm^5s^2U) tels que: la 5-aminométhyl-2-thiouridine (nm^5s^2U),

la 5-méthylaminométhyl-2-thiouridine ($\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$) et la 5-carboxyméthylaminométhyl-2-thiouridine ($\text{cmm}^5\text{s}^2\text{U}$), dans les ARNt de bactéries et la 5-taurinométhyl-2-thiouridine ($\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$), dans les ARNt mitochondriaux. Chez les archées comme pour la bactérie, seule la thiolation 5-méthylaminométhyl-2-thiouridine ($\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$) a été identifiée (Gupta, 1984; McCloskey, 2001). Dans les ARNt cytoplasmiques eucaryotes, le carbone C5 de l'uridine est modifié par le groupement 5-méthoxycarbonylméthyl (mcm^5) (Björk et al., 2007).

Parmi ces trois ARNt isoaccepteurs, les modifications dans l'ARNt^{lys}_{UUU} chez les bactéries ou dans les organelles, capable de décoder les codons AAA et AAG ont été le plus étudiées. (Agris et al., 2017; Björk and Kohli, 1990). Des études de stabilité thermodynamique de la conformation des nucléotides modifiés $\text{xm}^5\text{s}^2\text{U}$ par RMN ont permis de montrer que, c'est la présence de la thiolation sur le carbone C2 et non celle des modifications sur le C5 de l'uridine 34 qui favorise la conformation C3'endo du sucre, plus stable en comparaison à une uridine non modifiée, qui adopte préférentiellement une conformation C2'endo (Agris et al., 1992). Les structures RMN et cristallographique de la tige-boucle de l'anticodon de l'ARNt^{lys}_{UUU} humain lié à ses codons partenaires (AAA et AAG) ont été obtenues en trappant des cristaux de la petite sous-unité du ribosome avec les tiges-boucles anticodon et les nucléotides ARNm. Les structures ont montré que l'appariement de base $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}_{34} : \text{A}_3$ présente une géométrie Watson-Crick conventionnelle alors que, pour les appariements de la forme énol de $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}_{34} : \text{G}_3$, c'est $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}_{34}$ qui lui permet de faire un appariement de type Watson-Crick **Figure 40** (Vendeix et al., 2012).

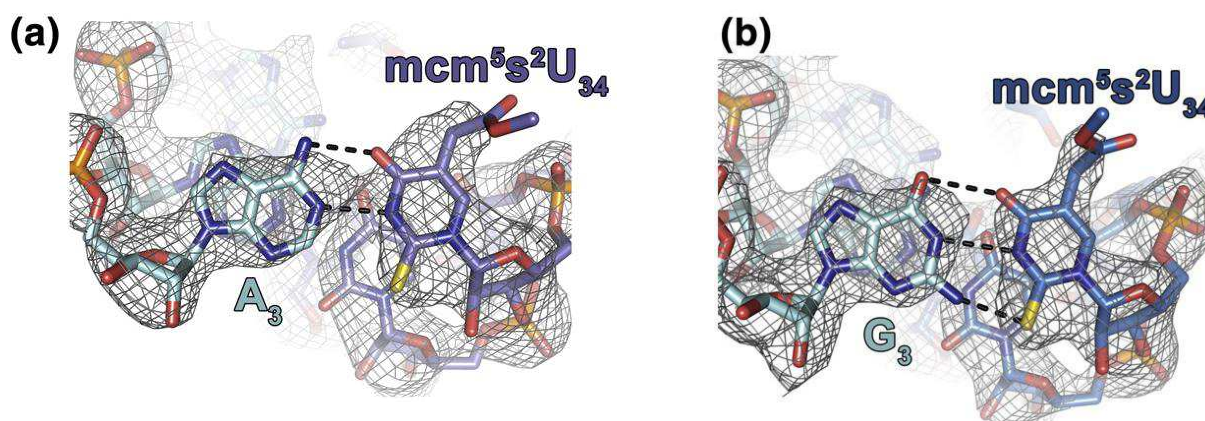


Figure 40 : Appariement de bases entre la position wobble modifiée ($\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$) de la tige-boucle de l'anticodon l'ARNt^{lys}_{UUU} humain (hASL^{Lys}_{UUU}) et la base du codon correspondant. (a) $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}_{34}$ hASL^{Lys}_{UUU} lié à un codon AAA dans le site-A du ribosome dans une géométrie Watson-Crick canonique.

(b) $mcm^5s^2U_{34}$ hASL^{Lys_{uuu}} lié à un codon AAG dans le site-A du ribosome dans une géométrie qui requiert la forme énol de $mcm^5s^2U_{34}$ (Vendeix et al., 2012).

Ainsi, la présence de la thiolation du C2 en position wobble est importante pour restreindre l'appariement wobble avec A et G. De plus, la seule présence de la thiolation augmente les interactions d'empilement de bases, et rigidifie la structure de l'anticodon (Agris et al., 1992; Björk and Kohli, 1990; Rezgui et al., 2013).

A-2) Les modifications sur U₃₄ permettent de réguler finement la traduction génétique

Des variations du degré de modification de l'U₃₄ dans les ARNt peuvent conduire à réguler la traduction protéique et altérer la composition du protéome (Damon et al., 2015). En effet, chez la levure, des expériences de profilage ribosomique sur des souches mutées des gènes *ncs2* et *elp6* impliqués dans la biosynthèse de s^2U_{34} et/ou mcm^5U_{34} , respectivement, ont montré une augmentation de la densité ribosomique au niveau des codons correspondants (codons AAA, CAA et GAA, qui s'apparient aux ARNt^{Lys_{UUU}}, ARNt^{Gln_{UUG}} et ARNt^{Glu_{UUC}}), ce qui suggère un ralentissement dans la traduction de ces ARNt incorrectement modifiés (Nedialkova and Leidel, 2015; Rezgui et al., 2013; Zinshteyn and Gilbert, 2013). De plus, des analyses de cinétique en temps réel ont montré que ce ralentissement est dû à une perturbation au niveau de la formation du complexe ribosome-EF-Tu-GDP-Pi-ARNt (Ranjan and Rodnina, 2017; Tükenmez et al., 2015), qui entraîne une pause du ribosome durant la traduction. Ceci conduit à l'agrégation et à un déséquilibre homéostatique de protéines ayant une fonction cellulaire essentielle (Nedialkova and Leidel, 2015).

Différents phénotypes apparaissent suite à l'altération de la composition du protéome cellulaire. Chez la levure et l'archée *Haloferax volcanii*, l'analyse des nucléotides modifiés dans les ARNt par spectrométrie de masse a montré que l'exposition, à une température excédant 30°C (levure) ou 42°C (*H. volcanii*), réduit la quantité de s^2U_{34} présent dans les cellules, ce qui s'explique par une diminution ou une absence de protéines impliquées dans la biosynthèse de s^2U_{34} dans les ARNt (Ncs2 et/ou Ncs6) (Alings et al., 2015; Chavarria et al., 2014; Tyagi and Pedrioli, 2015). Il a été également observé, dans ces cellules, qu'une exposition à de hautes températures entraîne, d'une part, la sur-régulation de protéines HSP (Heat Shock Proteins), responsables de la resolubilisation de protéines agrégées. D'autre part, l'hypo-régulation de la phosphorylation

oxydative, entraînerait la réduction de source intracellulaire de radicaux libres et contribuerait à l'acquisition d'une résistance à des stress oxydatifs (Tyagi and Pedrioli, 2015).

A-3) Absence de la modification sur U₃₄ et maladies

Chez les eucaryotes, l'absence de modification sur l'U₃₄ des ARNt est associée à différentes maladies. Chez le nematode *Caenorhabditis elegans* et la plante *Arabidopsis thaliana*, des problèmes de développement sont directement associés à l'absence de mcm⁵s²U₃₄ due à la présence de mutations dans les protéines cytoplasmiques responsables de la biosynthèse de mcm⁵U et s²U (Chen et al., 2009; Philipp et al., 2014). Chez l'homme, l'absence de la modification $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}_{34}$ dans les ARNt^{lys}_{UUU} mitochondriaux est associée à des maladies telles que les maladies infantiles aiguës du foie, la cécité due à la mutation de l'ARNr 12S et des maladies mitochondriales (MERRF : myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers) (Torres et al., 2014). Des études *in vivo* récentes chez l'homme ont permis de mettre en évidence un lien entre les enzymes de modification de U₃₄, le développement de cellules cancéreuses et la résistance aux médicaments (Rapino et al., 2018). En effet, il a été montré que les enzymes de thiolation de l'uridine en position 34 des ARNt sont essentielles pour la survie et la résistance à la thérapie des cellules de mélanome, en augmentant la traduction de la protéine HIF1 α (hypoxia -induced factor 1 α), impliquée dans la glycolyse. Un traitement thérapeutique ciblant les enzymes de modifications U₃₄-ARNt pourrait affaiblir la résistance des cellules de mélanomes aux traitements actuels et même agir contre d'autres types de cancer.

A-4) Les enzymes responsables de la thiolation en position U₃₄

Comme expliqué (§III-C-2-a)), le mécanisme par lequel un atome de soufre est incorporé en position 34 d'une uridine cible dans les ARNt cytoplasmiques d'eucaryotes et d'archées diffère grandement de celui des bactéries. Ce mécanisme implique un système de relais du soufre mettant en jeu des protéines de type ubiquitine, qui vont former un thiocarboxylate terminal sur une protéine acceptrice dont le soufre va être transféré aux enzymes de thiolation d'ARNt (Liu, 2017; Nakai et al., 2017).

U₃₄-ARNt thiolase a été étudiée pour la première fois chez la levure et sa présence a par la suite été reconnue chez d'autres eucaryotes (humain, nématode, plante). La protéine de levure Ygl211p renommée par la suite Tuc1 ou Ctu1 (**T**hiolation of **U**ridine in **C**ytoplasmic tRNA) a été identifiée grâce à des alignements de séquences avec son homologue bactérien TtcA

(thiolase de la position s^2C_{32}) qui appartient aux enzymes du groupe I de la grande famille de thiolases TtcA/TtuA (Björk et al., 2007; Jäger et al., 2004). La séquence protéique de Ctu1 indique que s^2U_{34} -ARNt thiolase appartient aux enzymes du sous-groupe II dont fait partie TtuA (Shigi, 2014) et des expériences de délétion et complémentation de gènes ont permis de montrer l'implication de Ctu1 dans la thiolation de s^2U_{34} (Björk et al., 2007). Chez le nématode *C. elegans*, un criblage génétique a permis d'identifier la protéine Ctu1. Des expériences de coimmunoprécipitation couplées à la spectrométrie de masse de la protéine Ctu1 chez la levure à fission *S. pombe* ont permis d'identifier la protéine Ctu2 conservée qui forme un complexe avec Ctu1 (Dewez et al., 2008). La délétion d'un des deux gènes a permis de mettre en évidence leur implication dans la formation de s^2U_{34} ainsi que leur rôle dans la thermosensibilité et la viabilité de *C. elegans*. De plus, un test d'activité *in vitro* sur un transcrit d'ARNt^{lys}_{UUU} en présence de cystéine, des protéines Nfs1 (cystéine désulfurase) et des protéines Ctu1-Ctu2 coimmunoprécipitées de la levure à fission *S. pombe* a permis de montrer une faible activité de thiolation du complexe Ctu1-Ctu2, suggérant que des composants essentiels à la réaction manquent dans ce test. Deux cystéines (Cys 142 et Cys 145) identifiées par mutagenèse dirigée sont impliquées dans l'activité catalytique (Dewez et al., 2008).

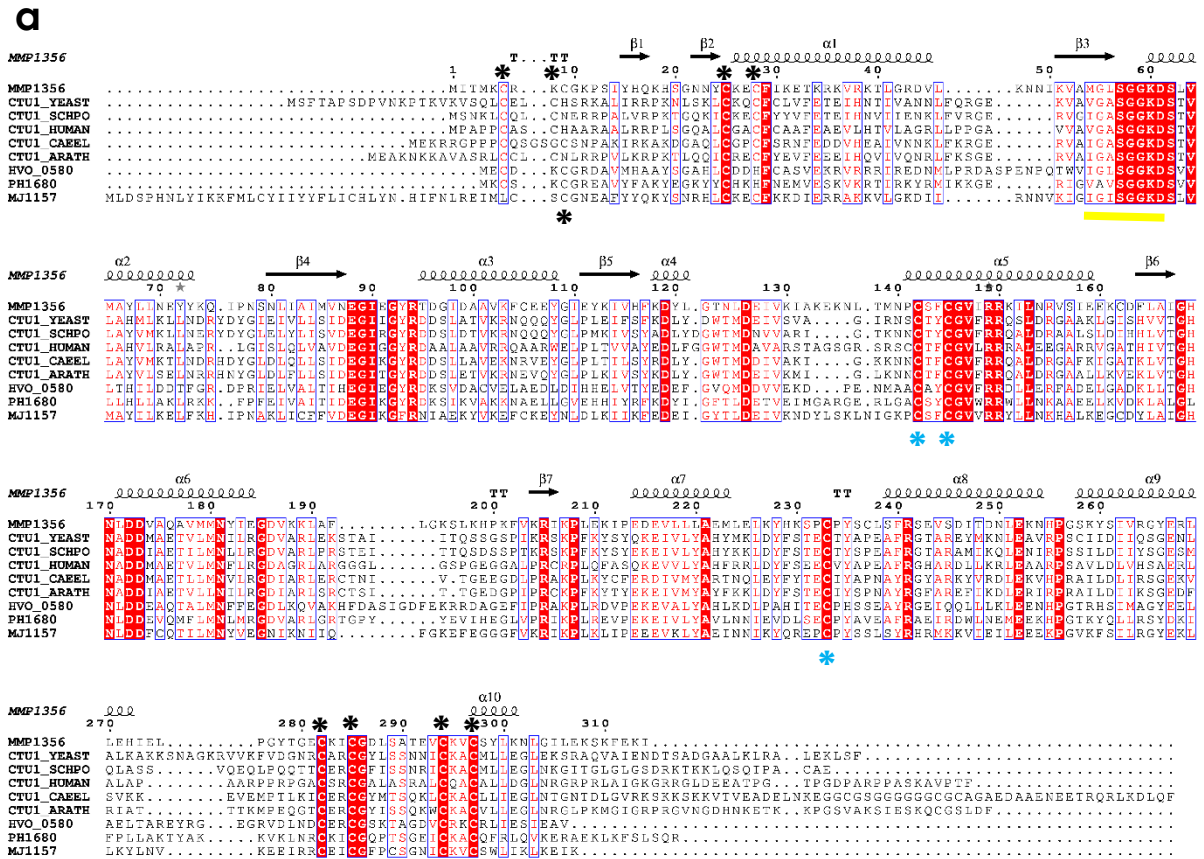
Par la suite, un second test d'activité *in vitro* a été réalisé chez la levure *S. cerevisiae* sur un ARNt^{lys} isolé d'une souche délétée du gène Urm1 (protéine de type ubiquitine) en présence des protéines impliquées dans le relais de soufre (Nfs1, Tum1, Uba4 et Urm1, purifiées *in vitro*) et de la protéine orthologue Ncs6 de *S. cerevisiae* obtenue par immunoprécipitation. Ce test a aussi permis de reconstituer de façon partielle l'activité de thiolation de s^2U_{34} (Huang et al., 2008; Noma et al., 2009). Chez l'homme, le complexe de protéines ATPBD3/UPF432, orthologue à Ctu1/Ctu2 ou Ncs6/Ncs2 a été aussi identifié grâce à des expériences d'immunoprécipitation (Schlieker et al., 2008).

En parallèle, la délétion chez la levure du gène codant pour la cystéine désulfurase Nfs1, impliquée dans la biosynthèse de s^2U_{34} et de celles des centres [Fe-S] a permis de montrer que la voie de formation de s^2U_{34} dans les ARNt cytoplasmiques est une voie dépendante des protéines Fe/S (CIA : Cytosolic Iron-sulfur cluster Assambly) (Nakai et al., 2007).

Les U_{34} thiolases d'ARNt cytoplasmiques (Ctu1/Ncs6) eucaryotes ont été peu étudiées *in vitro* en raison des problèmes d'expression de ces protéines. De nouvelles études se sont concentrées sur les protéines homologues d'archée appelées NcsA (Chavarria et al., 2014; Liu et al., 2014). La première enzyme d'archée identifiée et étudiée a été NcsA d'*Haloferax volcanii*. Cette protéine a été purifiée par coimmunoprécipitation en complexe avec une protéine ubiquitine-

Biosynthèse de la 2-thiouridine : U34-ARNt-2-sulfurtransférase

like SAMP2 (homologue d'Urm1) et UbaA (homologue d'Uba4). Aucun homologue de Ctu2/Ncs2 n'ayant été identifié, les U₃₄-ARNt thiolases dans ces organismes ne semblent posséder qu'une seule sous-unité. Au même moment, des études phylogéniques ont permis de montrer la présence de NcsA dans d'autres archées de type méthanococcales (*Methanococcus jannaschii* et *Methanococcus maripaludis*) (Liu et al., 2014) **Figure 41a**.



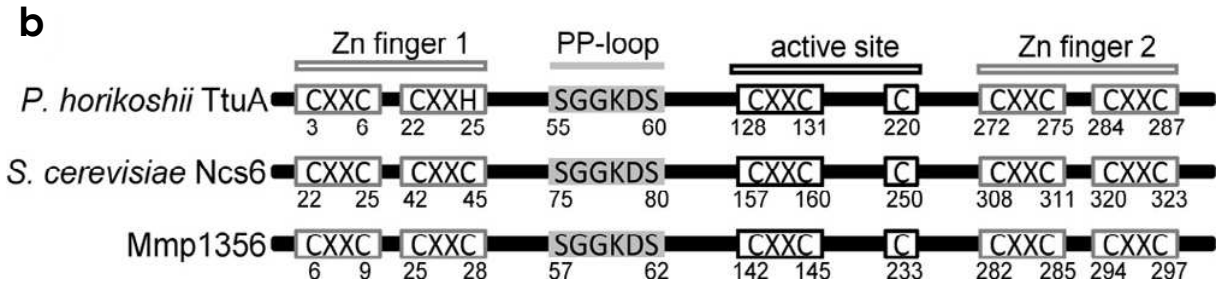


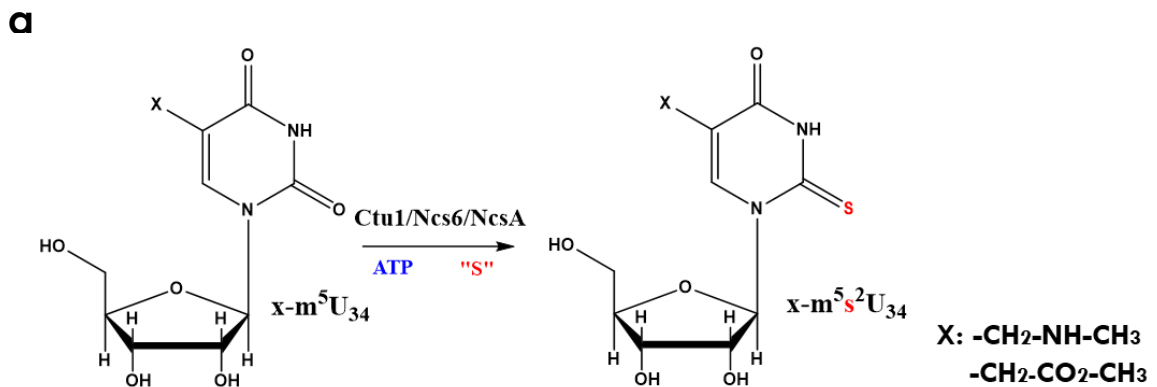
Figure 41: Alignement de séquences des s^2U_{34} -ARNt thiolases et schéma représentant les domaines conservés dans les (s^2U_{34} thiolases) du sous-groupe II de la famille TtcA/TtuA. (a) Alignement des séquences de protéines Ctul répertoriées dans la littérature. La séquence en acides aminés de MmNcsA (Mmp1356 : NcsA de *M. maripaludis*) et structure secondaire sont alignées aux autres protéines homologues chez différents organismes : *S. cerevisiae* (CTU1-Yeast), *S. Pombe* (CTU1-SCHPO), *Humain* (CTU1-HUMAN), *C. elegans* (CTU1-CAEEL), *A. thaliana* (CTU1-ARATH), *H. volcanii* (HVO80580), *P. horikoshii* (PH1680), *M. jannaschii* (MJ1151). Les résidus complètement conservés sont surlignés en rouge, le motif PP-loop est indiqué d'un trait jaune, les trois résidus cystéines catalytiques sont indiqués par des astérisques bleus et les autres résidus cystéines impliqués dans la coordination d'un atome de Zn sont indiqués par des astérisques noirs. (b) Les quatre motifs CXXC/H impliqués dans la fixation d'un atome de zinc (doigt de zinc) et les trois cystéines centrales localisées dans le site actif sont indiqués. Les numéros représentent la position des acides aminés de TtuA de *P. horikoshii* (PH300), Ncs6 de *S. cerevisiae* et NcsA de *M. maripaludis* (Mmp1357) (Liu et al., 2014).

NcsA de *M. maripaludis* partage 30 % d'identité de séquence avec Ncs6 de *S. cerevisiae* et 27% avec Ctul *humain*. Les protéines Ncs6/Ctul/NcsA appartiennent au sous-groupe II de la grande famille de thiolases TtcA/TtuA, qui possède cinq motifs conservés CXXC et un motif PP-loop (Liu et al., 2014; Shigi, 2014) **Figure 41b**.

La protéine NcsA de *M. maripaludis* MmNcsA a été purifiée dans des conditions anaérobies et analysée par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS). La présence de ponts disulfure et trisulfure a été identifiée entre les cystéines Cys₁₄₂XXCys₁₄₅. Des expériences *in vitro* de transfère de soufre de [³⁵S] Cys vers des mutants de MmNcsA en présence d'IscS d'*E. coli*, ont permis d'identifier trois cystéines catalytiques (Cys₁₄₂, Cys₁₄₅ et Cys₂₃₃) dans MmNcsA (Liu et al., 2014). De plus, des expériences de pull down ont permis d'identifier une protéine partenaire à NcsA, SAMP2 (Mmp1357) qui est une protéine homologue d'Urm1. Les expériences ont permis de proposer que tout comme ThiI et

MnmA, MmNcsA utiliserait la chimie des persulfures pour catalyser la thiolation de U₃₄ **Figure 42a** (Liu et al., 2014).

Plus tard, des études spectroscopiques (UV-visible, RPE ou Mössbauer) des protéines Ctu1 de l'humaine et NcsA de *Methanococcus maripaludis* (MmNcsA), purifiées dans des conditions anoxiques, ont indiqué que ces enzymes possèdent un centre [3Fe-4S]. Par homologie avec ThiI de *M. maripaludis*, il a été proposé que ce centre [3Fe-4S] soit essentiel à l'activité de thiolation (Liu et al., 2016). Trois rôles possibles de ce centre [3Fe-4S] ont été proposés : soit (i) le centre [FeS] est requis pour la fixation de l'ARNt substrat, de la molécule d'ATP ou de l'intermédiaire adénylé, soit (ii) le centre [FeS] est sacrificiel et agit comme donneur de soufre direct, ce qui entrainerait la destruction du centre à chaque cycle comme c'est le cas pour le centre [FeS] de la biotine synthase (BioB) et celui de la lipoate synthase (LipA) ou encore (iii) le centre [FeS] serait responsable du transfert de soufre, comme c'est le cas dans le mécanisme de formation de ms²i⁶A₃₇ par l'enzyme MiaB (Forouhar et al., 2013; Fugate and Jarrett, 2012; Liu et al., 2016) (§III-C-2-b) **Figure 42b**.



b

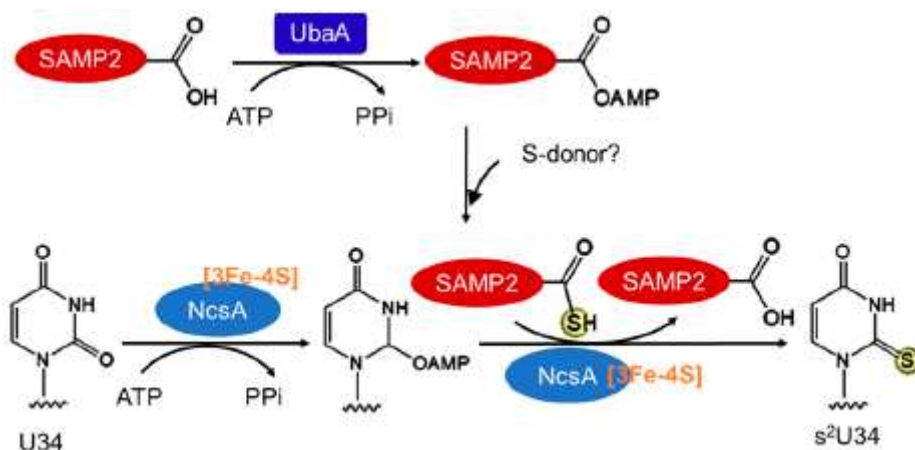


Figure 42: (a) Réaction catalysée par l'enzyme Ctu1/Ncs6/NcsA. (b) Mécanisme du relais du soufre proposé pour la thiolation d'U₃₄-ARNt chez les archées (Čavuzić and Liu, 2017).

L'objectif de ma thèse dans cette partie était donc de montrer que tout comme TtcA et TtuA, le motif central CXXC présent dans les protéines Ncs6/Ctu1/NcsA coordonne un centre [4Fe-4S] et possède le même mécanisme de thiolation pour l'U₃₄ que celui proposé par (Arragain et al., 2017).

B. UN CENTRE [4Fe-4S] EST UTILISÉ POUR LA THIOLATION DE L'URIDINE 34 DANS LES ARNT CHEZ LES ARCHEES, UNE MODIFICATION IMPORTANTE POUR LE DECODAGE PRÉCIS DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE.

Comme expliqué précédemment, chez la levure et l'homme, l'enzyme Ncs6/Ctu1 est associée à la protéine Ncs2/Ctu2 de fonction inconnue, contrairement à son orthologue chez l'archée, la protéine NcsA. Aucune étude *in vitro* de ces protéines n'avait été rapportée jusqu'ici. C'est pourquoi nous voulions étudier le mécanisme catalytique du complexe des enzymes Ctu1/Ctu2 humain et de NcsA de *M. maripaludis* (MmNcsA), dont l'expression avait déjà été décrite (Liu et al., 2014).

B-1) Expression, production, purification de Ctu1 et/ou Ctu2 humaine

La synthèse des gènes *ctu1* et *ctu2* a été réalisée par la plateforme Eurofins Genomics et les séquences correspondantes ont été clonées dans le vecteur pBG102 (His₆-SUMO-Ctu1) et dans le vecteur pGEX6-P2 (GST-Ctu2), qui permettent d'ajouter une étiquette His₆-SUMO (15 kDa) ou GST (25 kDa) clivable à la protéase du rhinovirus 3C, respectivement. Et les séquences codantes pour le complexe Ctu1/Ctu2 humain ont été clonées dans le vecteur pETDuet par la plateforme de clonage IMAGIF (Gif-sur-Yvette). Cette construction permet de coexprimer la protéine Ctu1 avec une étiquette non clivable ₆His en N-terminal et la protéine Ctu2.

Parmi les trois constructions protéiques (His₆-SUMO-Ctu1, GST-Ctu2 et le complexe His₆-Ctu1/Ctu2), seule la protéine His₆-SUMO-Ctu1 (poids moléculaire théorique : 50 kDa) est soluble. Cependant, le clivage de l'étiquette His₆-SUMO entraîne la précipitation irréversible de la protéine Ctu1, c'est pourquoi la forme His₆-SUMO-Ctu1 a été purifiée en aérobic sur une colonne de Ni-NTA. La protéine His₆-SUMO-Ctu1 présente une coloration marron foncée et le spectre UV-visible montre la présence de bandes d'absorption entre 300 et 700 nm, caractéristiques d'une protéine contenant un centre [Fe-S] dégradé par la présence d'oxygène **Figure 43** (Khoroshilova et al., 1997).

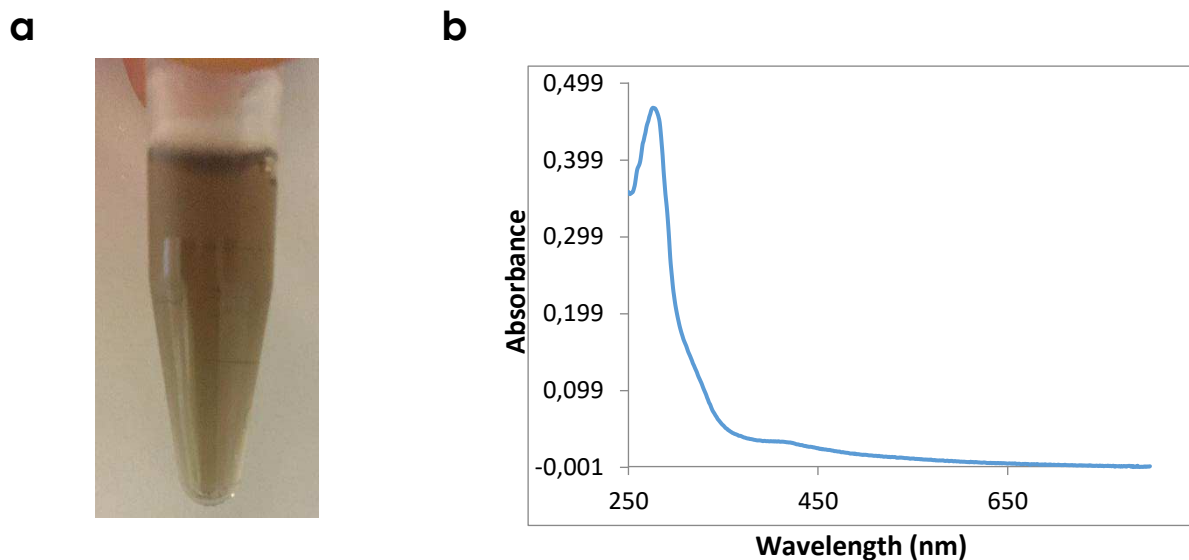


Figure 43: Protéine His₆-SUMO-Ctu1 purifiée en aérobie. (a) Protéine His₆-SUMO-Ctu1 après une colonne d'affinité de type de Ni-NTA et (b) spectre UV-visible de la protéine « as-purified ».

La forme His₆-SUMO-Ctu1 a été incubée en absence d'oxygène (en boîte à gants), en présence de DTT, de fer ferreux (Fe(II)), de L-cystéine et de cystéine désulfurase d'*E. coli* (CsdA). Lors de la purification une colonne de gel filtration analytique en condition anaérobie, la protéine His₆-SUMO-Ctu1 reconstituée est éluée dans le volume mort de la colonne. Ce qui indique que la forme His₆-SUMO-Ctu1 forme des agrégats.

N'ayant pas réussi à exprimer Ctu1 et/ou Ctu2, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation fonctionnelle et structurale de MmNcsA (Mmp1357). L'objectif était de reconstituer le centre [Fe-S] présent dans la protéine et de déterminer sa nature ([3Fe-4S] ou [4Fe-4S]) et de caractériser l'holo-MmNcsA grâce à des méthodes spectroscopiques et la cristallographie des rayons X.

B-II) Production, purification et reconstitution du centre [Fe-S] présent dans la protéine NcsA de *M. maripaludis* (Mm NcsA)

Le gène *mmp1356* a été synthétisé par la plateforme Eurofins Genomics et cloné dans un vecteur permettant d'ajouter une étiquette 6His-SUMO clivable en N-terminal. La purification de la protéine MmNcsA (poids moléculaire théorique : 36 kDa) a été réalisée en quatre étapes

chromatographiques : i) une colonne Ni-NTA qui retient les protéines étiquetées 6His et a permis d'éliminer la majorité des contaminants; ii) le clivage de l'étiquette par la protéase H3C en même temps qu'une étape de dialyse qui permet de changer et diminuer la force ionique du tampon pour l'étape suivante; (iii) suivi d'une étape chromatographie échangeuse de cations (MonoS) qui permet de séparer l'étiquette clivée et d'éventuels contaminant de la protéine d'intérêt; et iv) une gel filtration permettant d'éliminer les agrégats de protéines ainsi que d'éventuels contaminants selon leur forme. Le profil électrophorétique obtenu sur gel 12 % SDS-PAGE montre la présence de MmNcsA (36 kDa) pure **Figure 44 a-b**.

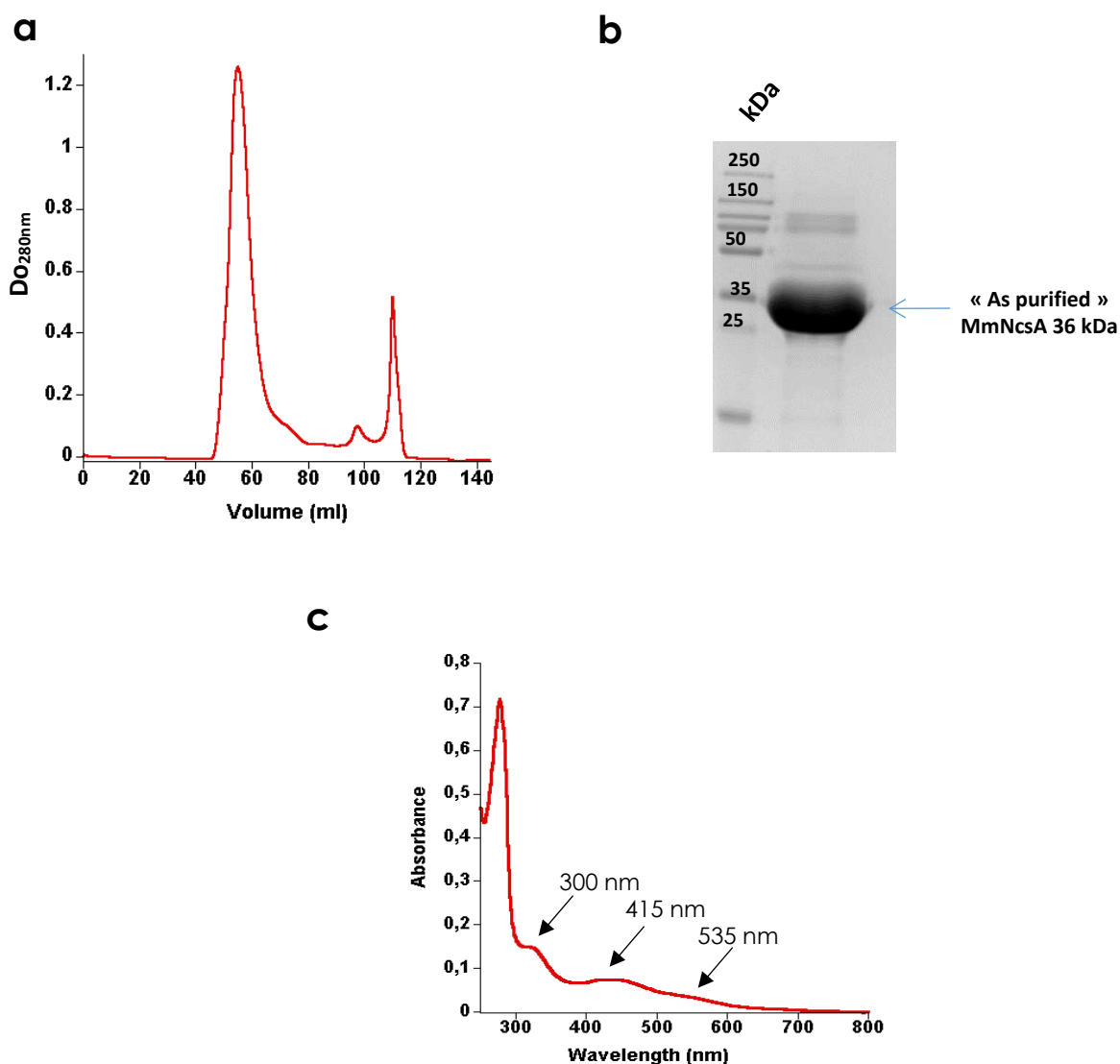


Figure 44: Purification et caractérisation par spectroscopie UV-visible de « as purified » MmNcsA. (a) Chromatogramme de la gel filtration sur une colonne de type Superdex 16/60 S75 dans un tampon contenant 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT. (b) Analyse de MmNcsA

(Poids moléculaire théorique : 36,1 kDa) après gel filtration sur gel 15% SDS-PAGE. (c) Spectre UV-visible de MmNcsA après purification en aérobie.

Après gel filtration, l'enzyme purifiée en aérobie présente une coloration rougeâtre et le spectre UV-visible de MmNcsA « as purified » montre des bandes d'absorptions à 300, 415 et 535 nm caractéristiques de la présence d'un centre [2Fe-2S] **Figure 44c** (Agar et al., 2000).

La reconstitution du centre [FeS] a été réalisée en incubant l'apoprotéine en absence d'oxygène (en boîte à gants), en présence de DTT, de fer ferreux (Fe(II)), de L-cystéine et de cystéine désulfurase d'*E. coli* (CsdA). Après purification sur une colonne de gel filtration en condition anaérobie, l'holo-MmNcsA se présente sous forme de dimère avec une coloration marron. Le spectre UV-visible de l'holo-MmNcsA après reconstitution montre la présence d'une bande d'absorption caractéristique à 410 nm d'une holo-enzyme contenant un centre [4Fe-4S] **Figure 45 a-c** (Agar et al., 2000). La quantification du fer et soufre labiles par la méthode de Fish et Beinert (Beinert, 1983; Fish, 1988) présents dans les protéines « as purified » et « holo » indique que l'« as-purified » MmNcsA contient 0,5 nmol de Fe/nmol NcsA tandis que l'holo-MmNcsA contient 3,1Fe/4,8S \pm 0,2 par monomère. Ainsi, l'« as purified » MmNcsA contient environ 25 % de centre [2Fe-2S] et après reconstitution du centre [FeS], l'holo-MmNcsA contient 77,5% de centre [4Fe-4S].

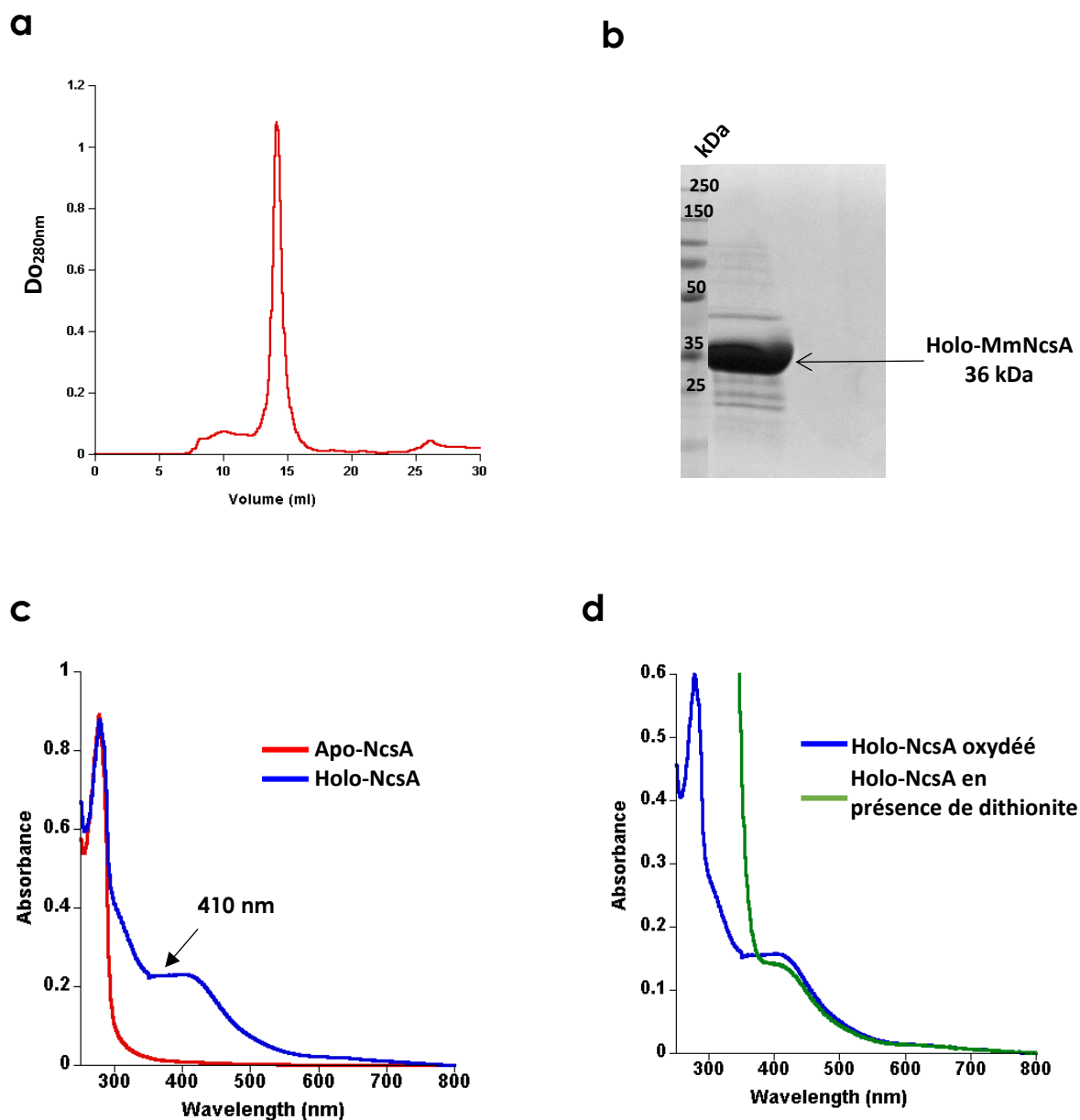


Figure 45: Purification et caractérisation par spectroscopie UV-visible de l'holo-MmNcsA. (a) Chromatogramme de l'étape de gel filtration sur une colonne de type Superdex 10/300 S200 analytique dans un tampon 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT. (b) Analyse de l'holo-MmNcsA sur gel 15% SDS-PAGE après gel filtration de l'holo-MmNcsA (36,1 kDa). (c) Spectre UV-visible de l'apo-MmNcsA et de l'holo-MmNcsA après purification en anaérobie. (d) Essai de réduction du centre $[4Fe-4S]^{2+}$ présent dans l'holo-MmNcsA (40 μ M) en présence de 1 mM de dithionite.

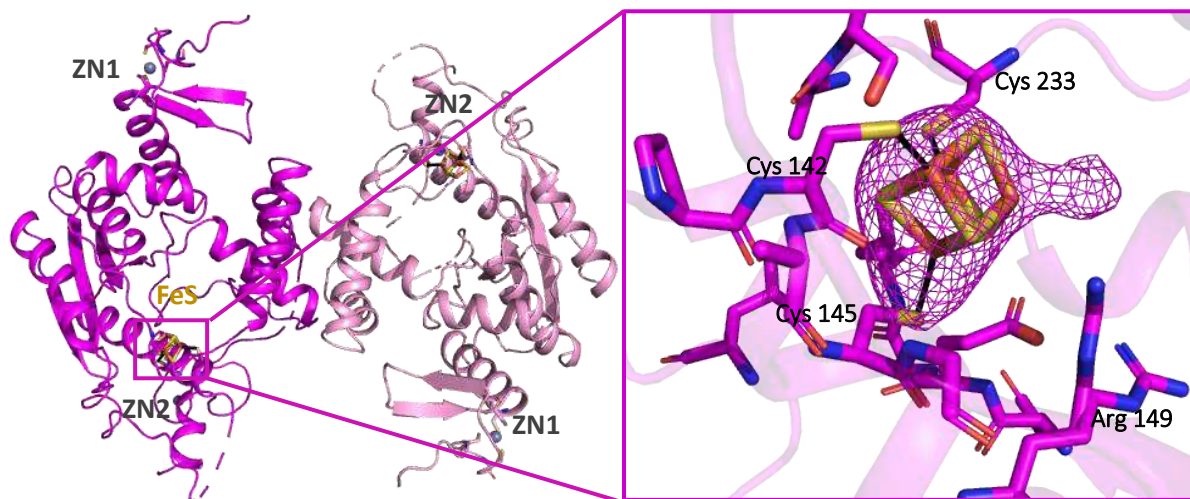
La résonance paramagnétique électronique (RPE) permet l'étude des espèces paramagnétiques, c'est-à-dire possédant un ou plusieurs électrons célibataires non appariés. Cette technique utilisée sur la forme réduite du centre $[4Fe-4S]^+$ (spin= 1/2) est une méthode spectroscopique

permettant de déterminer la nature $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (spin= 0) du centre de l'holoenzyme. Cependant, les tentatives de réduction en présence de dithionite n'ont pas réussi **Figure 45d**. Cette absence de réduction du centre $[\text{Fe-S}]$ peut être due au faible potentiel du centre $[\text{Fe-S}]$ (plus faible que celui du dithionite environ -0,66 V à pH 7). Le réducteur borohydrure de sodium (-1,2 V) a été testé dans un second temps, mais celui-ci libère de l'hydrogène lors de la réaction, ce qui peut endommager la protéine. Une autre possibilité est que le dithionite n'a pas accès au centre $[\text{Fe-S}]$ car celui-ci est trop enfoui dans le site catalytique, il aurait donc été intéressant d'essayer un médiateur d'électron tels que le méthyl viologène en présence de dithionite. Une autre technique spectroscopique le Mössbauer, qui repose sur la détection des différents états de spin du ^{57}Fe et permet de caractériser le type de centre $[\text{FeS}]$ présent dans l'holoenzyme, aurait pu être utilisée. Mais l'obtention de la structure de l'holo-MmNcsA (§B-III)) ayant montré la présence du centre $[4\text{Fe-4S}]$, la caractérisation spectroscopique n'était plus nécessaire.

B-III) Structure cristalline de NcsA de *Methanococcus maripaludis*

Des tests de cristallisation de l'enzyme apo-MmNcsA ont été réalisés en aérobie. Une condition (contenant 0,1 M HEPES pH 7,5, 0,2 M sulfate d'ammonium, 18% PEG 4000 et 10% d'isopropanol) a permis d'obtenir des cristaux, qui ont été testés par diffractions aux rayons X au synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin). Cependant ceux-ci diffractaient à 7 Å de résolution ce qui n'était pas suffisant pour résoudre la structure de l'enzyme. Nous avons cristallisé l'holo-MmNcsA en anaérobie, dans la même condition. Un jeu de données a été collecté sur la ligne PX2 à SOLEIL (Saint-Aubin) à 2,8 Å de résolution. La structure de l'holo-MmNcsA a été résolue par remplacement moléculaire en se servant du modèle cristallographique de l'apo-Ph-TtuA (30% d'identité de séquence PDB code : 3VRH). Comme TtuA, MmNcsA forme un dimère qui présente dans son site catalytique un centre $[4\text{Fe-4S}]$ coordonné par seulement trois cystéines (Cys142, Cys145 et Cys233) **Figure 46a**.

a



b

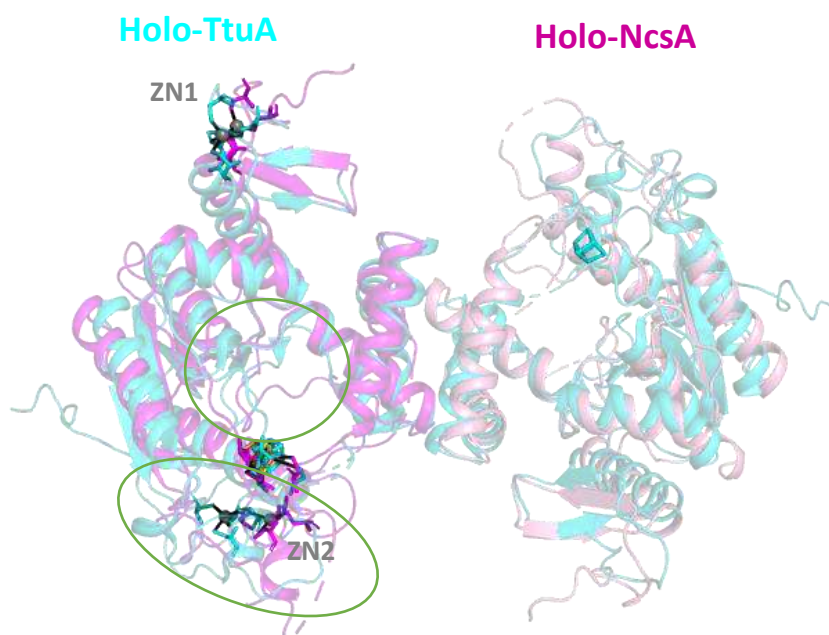


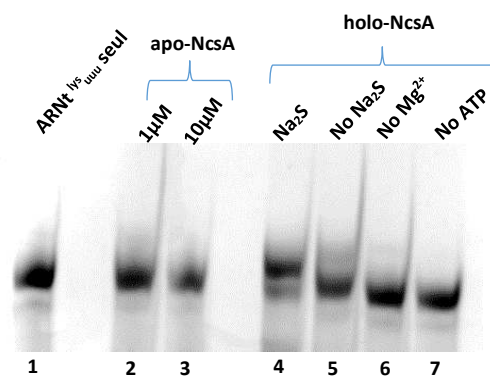
Figure 46: Structure cristallographique de l'holo-MmNcsA à 2,8 Å de résolution. (a) Localisation du centre [4Fe-4S] dans le dimère et zoom sur le site catalytique de l'holo-MmNcsA contenant un centre [4Fe-4S] coordonné par trois cystéines (Cys 142, Cys 145 et Cys 233), qui est proche du site de fixation présumé de l'ATP. (b) Superposition (NcsA résidus 3-305 et TtuA résidus 1-308 ; rmsd : 3, 17Å) des structures cristallographiques de l'holo-MmNcsA (en rose et rose clair) et l'holo-PhTtuA (en cyan). Les zones divergentes entre les deux structures sont entourées (cercle vert).

La superposition des structures cristallographiques de l'holo-MmNcsA avec l'holo-PhTtuA montre que les deux protéines possèdent le même repliement. Il n'y a pas d'importantes différences, à l'exception de certaines régions du domaine à zinc (ZN2) en C-terminal qui ne sont pas bien structurées dans MmNcsA **Figure 46b**. Comme dans la structure de l'holo-PhTtuA, on retrouve la présence d'une densité additionnelle sur le quatrième atome de fer libre qui peut être attribuée à un hydrosulfure labile **Figure 46a**.

B-IV) Test d'activité *in vitro* de NcsA de *M. maripaludis*

Comme expliqué dans l'introduction bibliographique de ce chapitre, un papier récent a montré que les protéines NcsA de *M. maripaludis* et Ctu1 *humain*, purifiées dans des conditions d'anoxie, contiennent un centre [3Fe-4S] (Liu et al., 2016). Cependant, aucune activité *in vitro* de ces protéines n'a été reportée. Après reconstitution de l'holo-MmNcsA en conditions anaérobies, des tests d'activité en présence d'un transcrit d'ARNt^{Lys}_{UUU} substrat ont été réalisés et les produits ARNt thiolés ont été visualisés sur un gel APM ((N-acryloylamino)phenyl]mercuric chloride). Les tests d'activité montrent que l'holo-MmNcsA contenant un centre [4Fe-4S] accepte un transcrit ARNt^{Lys}_{UUU} non modifié comme substrat **Figure 47a**. Une faible quantité de sulfure de sodium (250 µM) est suffisante comme source de soufre pour la réaction. L'enzyme est inactive après 30 min de réaction et aucune formation de produits thiolés n'est observée lorsque l'holo-MmNcsA est remplacée par l'apo-MmNcsA ou lorsque les ions Mg²⁺, l'ATP ou le sulfure sont exclus du mélange **Figure 47a-b**.

a



b

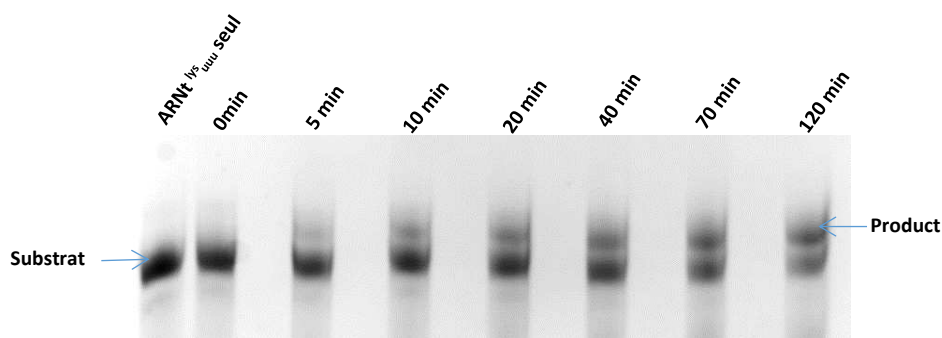


Figure 47 : Test d'activité *in vitro* de MmNcsA sur un transcrite d'ARNt^{lys}_{UUU} visualisé sur un gel APM. (a) la réaction consiste en l'incubation de 15 μM ARNt^{lys}_{UUU} (puits 1) en présence de 1 mM ATP, 5 mM Mg²⁺, 1 mM Na₂S et l'apo-MmNcsA (1 ou 10 μM ; puits 2-3) ou l'holo-MmNcsA (1 μM ; puits 4). La réaction de l'holo-MmNcsA a été testée aussi en absence de Na₂S (puits 5), des ions Mg²⁺ (puits 6) ou de l'ATP (puits 7). (b) la cinétique de réaction de l'holo-MmNcsA a été réalisée dans les mêmes conditions que celle de l'expérience (a) (puits 4) et la réaction a été stoppée à différents temps par ajout d'acide formique (0 min ; 5 min ; 10 min ; 20 min ; 40 min, 70 min et 120 min).

B-V) Etat du centre [4Fe-4S] au cours de la réaction

La signature du centre [Fe-S] a été suivie par spectroscopie UV-visible pendant le test d'activité. Après 30 min de réaction, en présence ou en absence du sulfure de sodium, la signature du centre [Fe-S] à 410 nm est toujours présente. Donc, le centre [Fe-S] n'est pas dégradé, ce qui suggère que le soufre inséré dans l'uridine en position 34 par l'enzyme NcsA provient du sulfure additionnel présent en solution et non pas du centre [Fe-S] lui-même **Figure 48**. Nous pouvons donc proposer pour MmNcsA le même mécanisme que celui proposé pour PhTtuA dans lequel le centre [4Fe-4S] agit comme transporteur de soufre pendant la réaction de thiolation (Arragain et al., 2017).

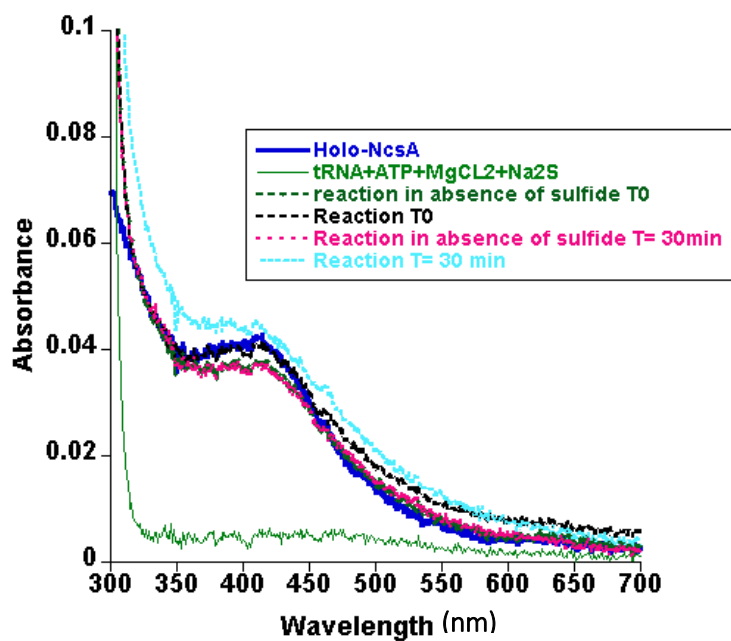


Figure 48: Spectre UV-visible après 30 min de réaction de l'holo-MmNcsA en présence de l'ARNt^{Lys}_{UUU}. La réaction est réalisée en incubant l'holo-MmNcsA (5 μM) avec l'ARNt^{Lys}_{UUU}, l'ATP (500 μM), Mg²⁺ (2,5 μM), Na₂S (250 μM) ou en absence de Na₂S.

C. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les mêmes produits réactionnels ont été analysés après digestion en nucléosides par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (Collaboration avec le Dr J-L. Ravanat, CEA, Grenoble) pour identifier et quantifier les produits de la réaction. Les transitions de masse correspondant à la perte du ribose de s^2U et s^2C ont été suivies et les chromatogrammes montrent la formation de s^2U mais aussi de façon étonnante de s^2C , suggérant que l'holo-MmNcsA serait capable de modifier deux positions : l'uridine en position 34 et une cytosine (probablement en position 32) de l'ARNt substrat **Annexe 1**. Il est donc probable que la spécificité multisite de MmNcsA *in vitro* soit due à l'utilisation d'un transcrit d'ARNt non modifié comme substrat. Les ARNt thiolés en position 34 chez les méthanocoques contiennent la modification méthylaminométhyl sur la position C5 (mm^5) (McCloskey, 2001). Il est donc possible que l'encombrement stérique en position 34 dans des ARNt totaux modifiés en C5 par ce groupe ne permette pas la thiolation de C₃₂ *in vivo*. C'est pourquoi des ARNt totaux d'une souche d'*E. coli* délétée du seul gène *mmA* (responsable de la formation de s^2U_{34} et qui contiennent donc les modifications en C5 de U₃₄) vont être utilisés pour confirmer cette hypothèse.

De plus, la méthode d'analyse des nucléosides par digestion enzymatique des ARNt produits ne permet pas d'identifier la position du nucléotide modifié. C'est pourquoi, des transcrits d'ARNt^{Lys}_{UUU} ont été produits avec une mutation de C₃₂ (A₃₂) ou U₃₄ (A₃₄). Ces deux transcrits mutants seront testés pour confirmer la bi-site spécificité de l'enzyme MmNcsA et vérifier que les positions ciblées par cette enzyme *in vitro* sont bien C₃₂ et U₃₄.

Les résultats préliminaires de spectrométrie de masse ont permis de confirmer que l'holo-MmNcsA est active sur un transcrit d'ARNt substrat non modifié et a besoin de la présence du centre [4Fe-4S] pour être active. Ces expériences seront reproduites et analysées par comparaison à des échantillons standards de s^2U , s^2C , $cmnm^5s^2U$ et mm^5s^2U pour pouvoir quantifier les deux produits formés, ce qui devrait aussi nous permettre de déterminer le nombre de cycles catalytiques effectués par l'enzyme.

Comme expliqué dans l'introduction générale, l'étape d'initiation du transfert de soufre à partir de la cystéine par la L-cystéine désulfurase n'est pas universelle. Certaines archées telles que les méthanococcales (*M. maripaludis*) ou des archées non méthanogènes (*P. horikoshii*) ne possèdent pas de cystéine désulfurase (Liu et al., 2010) **Annexe 2**. Il est postulé que *M. maripaludis* qui vit dans un environnement anaérobie strict et est un producteur de méthane,

contient une concentration élevée en sulfure inorganique et serait capable de l'utiliser comme source de soufre actif (Jones et al., 1983; Kadam et al., 1989). La présence d'une L-cystéine désulfidase (Mmp1468) chez *M. maripaludis*, capable de convertir la cystéine en pyruvate, ammoniacque et sulfure pourrait expliquer la présence d'une forte concentration en sulfure dans cet organisme (Tchong et al., 2005). La fonction de cette enzyme serait donc de générer du sulfure qui servirait de substrat lors de la première réaction dans la biogenèse des thionucléotides ou dans la biosynthèse des centres [Fe-S]. Dans le cas de la formation de s^2U_{34} chez *M. maripaludis*, le sulfure produit par la cystéine désulfidase serait pris en charge par le système de relais du soufre présent chez *M. maripaludis* impliquant l'enzyme UbaA (Mmp1234) qui va thiocarboxyler la protéine SAMP2 (Mmp1357) **Annexe 3**. Les protéines correspondantes (Mmp1468, UbaA et SAMP2), en cours de purification au laboratoire seront utilisées pour mettre au point un test d'activité qui mime la réaction *in vivo*. Ce système est analogue à celui mis en jeu dans *T. thermophilus* impliquant TtuB et TtuC lors de la thiolation d' U_{54} par TtuA (Chen et al., 2017).

La séquence de Ctu1 humaine possède 29% d'identité de séquence avec celle de MmNcsA. Une seule étude indique la présence d'un centre [3Fe-4S] dans la protéine Ctu1 humaine, mais il est probable qu'il s'agisse d'une dégradation d'un centre [4Fe-4S] (Liu et al., 2016). Des comparaisons de séquences indiquent que la protéine Ctu2 ne possède pas les cystéines catalytiques conservées dans les enzymes Ctu1/Ncs6/NcsA, qui coordonnent le centre [Fe-S] et bien souvent, elle présente un seul motif de fixation du zinc (en C-terminal). Il est donc très probable que cette protéine ne possède aucune activité catalytique. Il a été proposé que Ctu2 assurerait la spécificité pour l'ARNt (Leidel et al., 2009).

A ce jour, il n'existe aucune évidence que les enzymes eucaryotes (Ctu1/Ncs6) orthologues à NcsA contiennent un centre [4Fe-4S]. Toutes les tentatives d'obtention des protéines Ctu1 et/ou Ctu2 recombinantes chez *E. coli* ayant échoué sans doute à cause de l'absence de modifications posttranscriptionnelles, nous avons entrepris d'exprimer directement les protéines recombinantes dans des cellules HEK293 humaines (Plateforme de protéines recombinantes Eucaryotes, S. Petres, Institut Pasteur). Ceci devrait nous permettre d'obtenir les deux protéines solubles et d'effectuer des études biochimiques et peut-être structurales.

Références bibliographiques

Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., and Johnson, M.K. (2000). IscU as a Scaffold for Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis: Sequential Assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Clusters in IscU[†]. *Biochemistry* 39, 7856–7862.

Agris, P.F., Sierzputowska-Gracz, H., Smith, W., Malkiewicz, A., Sochacka, E., and Nawrot, B. (1992). Thiolation of uridine carbon-2 restricts the motional dynamics of the transfer RNA wobble position nucleoside. *Journal of the American Chemical Society* 114, 2652–2656.

Agris, P.F., Narendran, A., Sarachan, K., Väre, V.Y.P., and Eruysal, E. (2017). The Importance of Being Modified. In *The Enzymes*, (Elsevier), pp. 1–50.

Alings, F., Sarin, L.P., Fufezan, C., Drexler, H.C.A., and Leidel, S.A. (2015). An evolutionary approach uncovers a diverse response of tRNA 2-thiolation to elevated temperatures in yeast. *RNA* 21, 202–212.

Arragain, S., Bimai, O., Legrand, P., Caillat, S., Ravanat, J.-L., Touati, N., Binet, L., Atta, M., Fontecave, M., and Golinelli-Pimpaneau, B. (2017). Nonredox thiolation in tRNA occurring via sulfur activation by a [4Fe-4S] cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 7355–7360.

Beinert, H. (1983). Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Analytical Biochemistry* 131, 373–378.

Björk, G.R., and Kohli, J. (1990). Synthesis and Function of Modified Nucleosides in tRNA. In *Journal of Chromatography Library*, (Elsevier), pp. B13–B67.

Björk, G.R., Huang, B., Persson, O.P., and Bystrom, A.S. (2007). A conserved modified wobble nucleoside (mcm5s2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *RNA* 13, 1245–1255.

Čavuzić, M., and Liu, Y. (2017). Biosynthesis of Sulfur-Containing tRNA Modifications: A Comparison of Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Pathways. *Biomolecules* 7, 27.

Chavarria, N.E., Hwang, S., Cao, S., Fu, X., Holman, M., Elbanna, D., Rodriguez, S., Arrington, D., Englert, M., Uthandi, S., et al. (2014). Archaeal Tuc1/Ncs6 Homolog Required for Wobble Uridine tRNA Thiolation Is Associated with Ubiquitin-Proteasome, Translation, and RNA Processing System Homologs. *PLoS ONE* 9, e99104.

Chen, C., Tuck, S., and Byström, A.S. (2009). Defects in tRNA Modification Associated with Neurological and Developmental Dysfunctions in *Caenorhabditis elegans* Elongator Mutants. *PLoS Genetics* 5, e1000561.

Chen, M., Asai, S., Narai, S., Nambu, S., Omura, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ikeda-Saito, M., Watanabe, K., Yao, M., et al. (2017). Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by an iron-sulfur protein TtuA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 4954–4959.

Damon, J.R., Pincus, D., and Ploegh, H.L. (2015). tRNA thiolation links translation to stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 26, 270–282.

Dewez, M., Bauer, F., Dieu, M., Raes, M., Vandenhoute, J., and Hermand, D. (2008). The conserved wobble uridine tRNA thiolase Ctu1–Ctu2 is required to maintain genome integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5459–5464.

Fish, W.W. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 357–364.

Forouhar, F., Arragain, S., Atta, M., Gambarelli, S., Mouesca, J.-M., Hussain, M., Xiao, R., Kieffer-Jaquinod, S., Seetharaman, J., Acton, T.B., et al. (2013). Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. *Nature Chemical Biology* 9, 333–338.

Fugate, C.J., and Jarrett, J.T. (2012). Biotin synthase: Insights into radical-mediated carbon–sulfur bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824, 1213–1222.

Gupta, R. (1984). *Halobacterium volcanii* tRNAs. Identification of 41 tRNAs covering all amino acids, and the sequences of 33 class I tRNAs. *J. Biol. Chem.* 259, 9461–9471.

Huang, B., Lu, J., and Bystrom, A.S. (2008). A genome-wide screen identifies genes required for formation of the wobble nucleoside 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 14, 2183–2194.

Jäger, G., Leipuviene, R., Pollard, M.G., Qian, Q., and Bjork, G.R. (2004). The Conserved Cys-X1-X2-Cys Motif Present in the TtcA Protein Is Required for the Thiolation of Cytidine in Position 32 of tRNA from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 186, 750–757.

Jones, W.J., Paynter, M.J.B., and Gupta, R. (1983). Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment. *Archives of Microbiology* 135, 91–97.

- Kadam, P.C., Godbole, S.H., and Ranade, D.R. (1989). Isolation of methanogens from Arabian sea sediments and their salt tolerance. *FEMS Microbiology Letters* 62, 343–347.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., and Kiley, P.J. (1997). Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂:[4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 6087–6092.
- Leidel, S., Pedrioli, P.G.A., Bucher, T., Brost, R., Costanzo, M., Schmidt, A., Aebersold, R., Boone, C., Hofmann, K., and Peter, M. (2009). Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature* 458, 228–232.
- Liu, Y. (2017). Biosynthesis of Sulfur-Containing tRNA Modifications: A Comparison of Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Pathways. *Biomolecules* 7, 27.
- Liu, Y., Sieprawska-Lupa, M., Whitman, W.B., and White, R.H. (2010). Cysteine Is Not the Sulfur Source for Iron-Sulfur Cluster and Methionine Biosynthesis in the Methanogenic Archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 31923–31929.
- Liu, Y., Long, F., Wang, L., Söll, D., and Whitman, W.B. (2014). The putative tRNA 2-thiouridine synthetase Ncs6 is an essential sulfur carrier in *Methanococcus maripaludis*. *FEBS Letters* 588, 873–877.
- Liu, Y., Vinyard, D.J., Reesbeck, M.E., Suzuki, T., Manakongtreecheep, K., Holland, P.L., Brudvig, G.W., and Söll, D. (2016). A [3Fe-4S] cluster is required for tRNA thiolation in archaea and eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 12703–12708.
- McCloskey, J.A. (2001). Post-transcriptional modification in archaeal tRNAs: identities and phylogenetic relations of nucleotides from mesophilic and hyperthermophilic Methanococcales. *Nucleic Acids Research* 29, 4699–4706.
- Nakai, Y., Nakai, M., Lill, R., Suzuki, T., and Hayashi, H. (2007). Thio Modification of Yeast Cytosolic tRNA Is an Iron-Sulfur Protein-Dependent Pathway. *Molecular and Cellular Biology* 27, 2841–2847.
- Nakai, Y., Nakai, M., and Yano, T. (2017). Sulfur Modifications of the Wobble U34 in tRNAs and their Intracellular Localization in Eukaryotic Cells. *Biomolecules* 7, 17.
- Nedialkova, D.D., and Leidel, S.A. (2015). Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity. *Cell* 161, 1606–1618.

- Noma, A., Sakaguchi, Y., and Suzuki, T. (2009). Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Research* *37*, 1335–1352.
- Philipp, M., John, F., and Ringli, C. (2014). The cytosolic thiouridylase CTU2 of *Arabidopsis thaliana* is essential for posttranscriptional thiolation of tRNAs and influences root development. *BMC Plant Biology* *14*, 109.
- Ranjan, N., and Rodnina, M.V. (2017). Thio-Modification of tRNA at the Wobble Position as Regulator of the Kinetics of Decoding and Translocation on the Ribosome. *Journal of the American Chemical Society* *139*, 5857–5864.
- Rapino, F., Delaunay, S., Rambow, F., Zhou, Z., Tharun, L., De Tullio, P., Sin, O., Shostak, K., Schmitz, S., Piepers, J., et al. (2018). Codon-specific translation reprogramming promotes resistance to targeted therapy. *Nature* *558*, 605–609.
- Rezgui, V.A.N., Tyagi, K., Ranjan, N., Konevega, A.L., Mittelstaet, J., Rodnina, M.V., Peter, M., and Pedrioli, P.G. (2013). tRNA tKUUU, tQUUG, and tEUUC wobble position modifications fine-tune protein translation by promoting ribosome A-site binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 12289–12294.
- Schlieker, C.D., Van der Veen, A.G., Damon, J.R., Spooner, E., and Ploegh, H.L. (2008). A functional proteomics approach links the ubiquitin-related modifier Urm1 to a tRNA modification pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 18255–18260.
- Shigi, N. (2014). Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Frontiers in Genetics* *5*.
- Tchong, S.-I., Xu, H., and White, R.H. (2005). L-Cysteine Desulfidase: An [4Fe-4S] Enzyme Isolated from *Methanocaldococcus jannaschii* That Catalyzes the Breakdown of L-Cysteine into Pyruvate, Ammonia, and Sulfide. *Biochemistry* *44*, 1659–1670.
- Torres, A.G., Batlle, E., and Ribas de Pouplana, L. (2014). Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends in Molecular Medicine* *20*, 306–314.
- Tükenmez, H., Xu, H., Esberg, A., and Byström, A.S. (2015). The role of wobble uridine modifications in +1 translational frameshifting in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* *43*, 9489–9499.
- Tyagi, K., and Pedrioli, P.G.A. (2015). Protein degradation and dynamic tRNA thiolation fine-tune translation at elevated temperatures. *Nucleic Acids Research* *43*, 4701–4712.

Vendeix, F.A.P., Murphy, F.V., Cantara, W.A., Leszczyńska, G., Gustilo, E.M., Sproat, B., Malkiewicz, A., and Agris, P.F. (2012). Human tRNA^{Lys}3UUU Is Pre-Structured by Natural Modifications for Cognate and Wobble Codon Binding through Keto–Enol Tautomerism. *Journal of Molecular Biology* 416, 467–485.

Zinshteyn, B., and Gilbert, W.V. (2013). Loss of a conserved tRNA anticodon modification perturbs cellular signaling. *PLoS Genetics* 9.

CONCLUSION

Dans tous les domaines du vivant, la maturation des ARN implique des modifications post-transcriptionnelles des nucléotides. Beaucoup de thionucléotides ont été identifiés dans les ARN de transfert (ARNt), tels que les dérivés de la 2-thiouridine (s^2U), la 4-thiouridine (s^4U), la 2-thiocytidine (s^2C) et la 2-méthylthioadénosine (ms^2A). Ces modifications sont essentielles pour l'efficacité et la fidélité de la traduction du code génétique, car elles assurent la reconnaissance des codons de l'ARNm ou stabilise la structure en forme de « L » de l'ARNt.

De façon intéressante, deux mécanismes différents de substitution d'un atome d'oxygène par un atome de soufre ont été décrits. D'une part, le mécanisme basé sur la chimie des persulfures caractérisé par les enzymes MmnA (s^2U_{34}) et ThiI (s^4U_8) chez les bactéries et, d'autre part, le mécanisme qui utilise un centre [4Fe-4S] qui n'agit pas comme donneur de soufre, mais comme transporteur de l'atome de soufre d'un donneur externe (comme le sulfure inorganique), caractérisé par les enzymes TtcA (s^2U_{32} , chez les bactéries), NcsA/Ncs6/Ctu1 (s^2U_{34} chez les archées et dans le cytoplasme d'eucaryotes) et TtuA (s^2T_{54} chez les bactéries et archées thermophiles), formant la famille d'enzyme TtcA/TtuA. Malgré cette différence de mécanisme, des alignements de séquences et de structures montrent que ces enzymes partagent des similarités dans leur site actif, au niveau du site de fixation de l'ATP et de certaines cystéines catalytiques conservées, qui diffèrent dans leur rôle chimique.

Pour les enzymes MmnA et ThiI d'*E. coli*, une cystéine du site actif reçoit un atome de soufre d'un persulfure lié à une protéine. Cette réaction est potentiellement suivie du transfert de cet atome de soufre au nucléotide cible (U_{34} ou U_8) souvent grâce à une seconde cystéine catalytique. Dans le cas de la famille d'enzymes TtcA/TtuA, trois cystéines du site catalytique coordonnent un centre [4Fe-4S]. Dans le mécanisme proposé pour cette famille, le quatrième fer du centre [4Fe-4S], qui possède un site de coordination libre, reçoit l'atome de soufre d'un donneur de soufre externe, jouant ainsi le rôle de transporteur de soufre lors de la réaction de thiolation du nucléotide cible d'un ARNt (C_{32} , U_{34} et T_{54}).

Même si la croyance initiale était que les thiolases d'ARNt utilisent généralement des persulfures covalamment liés à l'enzyme de modification comme donneur de soufre, de nombreuses expériences ont montré qu'un ion hydrogènesulfure, transporté par le centre [4Fe-4S] coordonné seulement par trois cystéines, peut servir d'agent sulfurant.

La thiolation des nucléotides provenant d'ARNt par les thiolases implique aussi des systèmes de relais du soufre de la cystéine dans le cas où le donneur de soufre n'est pas le sulfure inorganique. Un persulfure lié à des protéines de transport de soufre (système de relais des

protéines TusA/B/C/D/E) ou d'un thiocarboxylate (système de relais de protéines de type ubiquitine : TtuD/C/B ou UbaA/SAMP2), permet d'éviter le relargage de soufre sous une forme toxique pour la cellule. Dans le cas du transfert de soufre depuis le thiocarboxylate en C-terminal d'une protéine vers les enzymes de thiolation de nucléotides d'ARNt, seule la résolution d'une structure d'un complexe holo-thiolase/protéine de type ubiquitine (holoTtuA-TtuB et holoNcsA-SAMP2) en présence ou non d'un ARN (ARNt substrat ou miniARN) pourrait aider à mieux comprendre le mécanisme catalytique des thiolases d'ARNt dépendantes d'un centre [Fe-S].

MATERIELS ET METHODES

Cette partie « matériels et méthodes » ne détaillera que les sujets n'ayant pas encore fait l'objet de publication et représente donc un complément aux publications jointes dans ce manuscrit.

A. Matériels et méthodes

A-I) Matériel biologique et milieux de culture

A-I-1) Souches bactériennes utilisées.

A-I-1-a) *E. coli* DH5 α (DE3)

Génotype : F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 hsdR17(rK⁻, mK⁺) λ ⁻ supE44*

Fonction : cette souche a été utilisée lors de l'extraction plasmidique, pour transformations visant à propager les plasmides du fait de son taux de transformation élevé.

A-I-1-b) *E. coli* BL21 (DE3)

Génotype : F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B- m_B-) λ (DE3)*

Fonction : Cette souche est utilisée pour exprimer certaines protéines recombinantes. La souche possède dans son génome le lysogène λ (DE3) qui porte le gène codant pour la polymérase T7 phagique sous contrôle de l'opéron lactose. Une induction à l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, qui est un analogue non hydrolysable de l'allolactose) permet la transcription du gène d'intérêt porté par le plasmide en aval du promoteur T7. De plus, cette souche est déficiente en certaines protéases, ce qui augmente le rendement en protéines surexprimées.

A-I-1-c) *E. coli* BL21 (DE3) star codon plus

Génotype : F⁻ *ompT hsdS(rB – mB –) dcm⁺ Tet^r gal dcmrne131 λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r].*

b

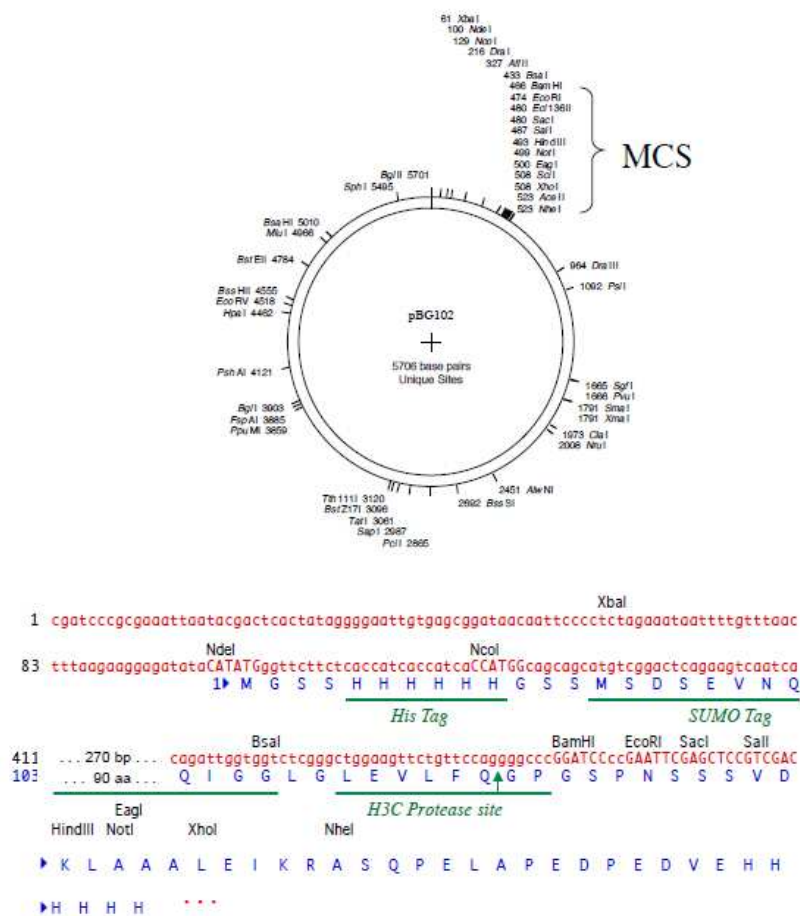


Figure 49: Représentation schématique des vecteurs pGEX-6p-2 (a) et pBG102 (b). Les deux plasmides permettent d'exprimer des protéines recombinantes de fusions. L'étiquette et la protéine de fusion codées par ces deux plasmides peuvent être clivées grâce à la présence d'un site de clivage reconnu par la protéase du rhinovirus humain 3C (H3C ou PreScision). Les sites de restriction BamHI (G/GATCC) et EcoRI (G/AATTC) sont utilisés couramment pour insérer les séquences codantes des protéines d'intérêt.

A-I-2-b) pBG102 (Center for Structural Biology, Vanderbilt university)

Ce vecteur d'expression, dérivé du pET27 (Novagen), permet de réaliser une fusion traductionnelle, qui permet d'obtenir une protéine chimérique contenant en N-terminal, une protéine de fusion SUMO (Small Ubiquitine-like Modifier) étiquetée His₆. Le plasmide porte le gène de résistance à la kanamycine **Figure 49b**.

A-I-3) Milieux de culture

Milieu *Lysogeny Broth* ou *Luria Bertani (LB)* : Ce milieu riche est composé de tryptone (20 g/L), d'extrait de levure (5 g/L), de NaCl (5 g/L). Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH. Ce milieu est utilisé pour la croissance bactérienne d'*E. coli* lors de pré-cultures, pour l'expression des protéines recombinantes, mais également en milieu gélosé (boîtes de pétri LB-agar stériles) pour les transformations par ajout de 17 g/L d'agar.

Chaque milieu de culture a été autoclavé à 120 °C sous une pression de 1bar.

A-I-4) Solutions à usage courant

- ✚ Bleu de dépôt pour gel de protéines dénaturant : SDS 3% (v/v) ; glycérol 10% (v/v) ; bleu de bromophénol 0,1 mg/ml ; 100 mM DTT; 80 mM TRIS-HCl, pH 6,8.
- ✚ Bleu de coloration des gels Urée-PAGE : 0,1% [w/v] bleu de toluidine, 40% [v/v] méthanol et 1% [v/v] acide acétique.
- ✚ Solution I de coloration des gels SDS-PAGE : éthanol 50% ; acide acétique 10% ; 1g Bleu de Coomassie G250.
- ✚ Solution II de décoloration des gels SDS-PAGE : éthanol 30% ; acide acétique 10%.
- ✚ Tampon de migration SDS-PAGE : glycine 14,25 g/l ; TRIS 3 g/l ; SDS 1 g/l (v/v).
- ✚ Tampon TAE de migration en gel d'agarose : 40 mM TRIS, 5mM acétate de sodium, pH 8,0 ; 1mM EDTA.
- ✚ Tampon TBE de migration en gel Urée-PAGE : 100mM TRIS, 100 mM acide borique; 2mM EDTA.
- ✚ Bleu de dépôt pour gel d'ARN dénaturant : 8M urée, 30% sucrose, 0,1% bleu de bromophénole ; 0,1% xylène cyanole.

A-II) Biologie moléculaire

A-II-1) Cellules compétentes et transformation

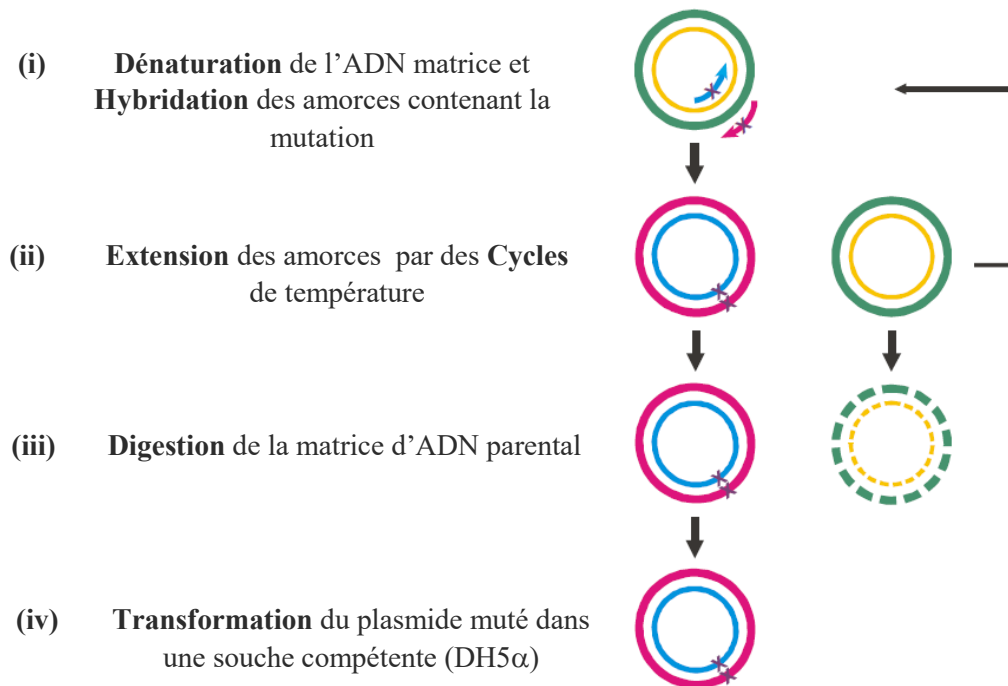
Les cellules sont mises en culture toute la nuit à 37°C dans 10 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié. 50 mL de milieu LB supplémenté en antibiotique estensemencé par

cette préculture à 0,05 DO_{600nm} et incubé à 37°C sous agitation, jusqu'à une DO_{600nm} égale à 0,5. Les cellules sont par la suite centrifugées pendant 10 min à 5000 rpm à 4°C, puis incubées 10 min dans la glace. Le culot est ensuite séché sous une hotte à flux laminaire et repris dans 5 mL de 100 mM CaCl₂. Après incubation pendant 30 min dans la glace, les cellules sont centrifugées 10 min à 5000 rpm à 4°C et le culot est à nouveau séché. Les culots sont repris dans 3,5 mL de solution stérile de 100 mM CaCl₂, contenant 10% glycérol. Des aliquots de 100-200 µL de solution bactérienne sont préparés et congelés immédiatement dans l'azote liquide. Pour réaliser une transformation, un volume correspondant à un aliquot de cellules bactériennes compétentes est incubé en présence de 1 µL de solution plasmidique. Après 15 min d'incubation dans la glace, un choc thermique est réalisé (45 sec-1 min à 42°C) puis 100 µL de solution de LB stérile sont ajoutés. Les cellules sont ensuite incubées à 37 °C pendant 1h, avant d'être étalées sur milieu solide LB-Agar contenant l'antibiotique approprié.

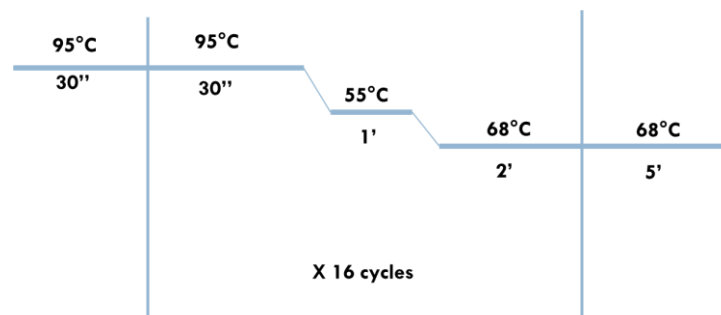
A-II-2) Mutagenèse dirigée

Dans le but d'essayer de cristalliser la forme tronquée en C-terminal (TtcA 1-291) par protéolyse naturelle de TtcA d'*E. coli*, il a été nécessaire d'insérer un codon STOP à la place du codon codant pour l'acide aminé 292. Le mutant a été obtenu par mutagenèse dirigée en « rolling-circle », en utilisant le kit « quickchange » de Quiagen, par hybridation des oligonucléotides complémentaires contenant le codon muté. La matrice d'ADN utilisée lors de la PCR est le pGEX-6P-2-TtcA **Figure 50**. Après la synthèse des brins mutés, la réaction est poursuivie par ajout de 1 µL de DpnI Fast digest (Thermo Fisher Scientific) et le mélange réactionnel est incubé pendant 30 min à 37°C, pour digérer les brins parentaux méthylés et non mutés, pour ne conserver que le brin d'ADN muté. Après transformation, les cellules DH5α d'*E. coli* sont étalées sur milieu sélectif. Les plasmides sont extraits par mini-préparation d'ADN plasmidique et ensuite analysés par séquençage.

a



b



Oligonucléotides :

- **TtcA1-291 sens** : 5' CCGGCGTGCTGGTAACCCAGAAGAAGAT 3'
- **TtcA1-291 anti-sens** : 5' ATCTTCTTCTGGTTAACCAGCACGCCGG 3'

Figure 50: Protocole PCR utilisé pour la mutagenèse dirigée de TtcA1-291 d'*E. coli*. (a) Schéma de la méthode de mutagenèse dirigée par PCR : (i) Le plasmide parental (vert) est dénaturé à 95 °C et les amorces contenant la mutation cible (croix) s'hybrident sur la séquence plasmidique à 55°C. (ii) Sous l'action de la *PfuTurbo* DNA polymérase, il y a extension des amorces à 68°C pour former les brins muté. (iii) Digestion des ADN méthylés parentaux non mutés par l'enzyme DpnI et enfin (iv)

transformation des brins d'ADN plasmidiques néoformés mutés dans une souche d'*E. coli* DH5 α . (b) **Schéma récapitulatif des paramètres de PCR utilisé sur un thermocycleur.** Les nucléotides soulignés correspondent au codon stop inséré par l'ADN polymérase ADN dépendant *pfu turbo*.

B. METHODES BIOCHIMIQUES

B-I) Production et purification des protéines recombinantes

B-I-1) Production des protéines recombinantes

B-I-1-a) Production et purification de TtcA d'*E. coli*, ses mutants et de NcsA de *M. maripaludis*

- i. Production de TtcA sauvage, TtcA 1-291 et TtcA 14-289 tronquée d'*E. coli*

La protéine TtcA sauvage d'*E. coli* et les versions tronquées ont été produites dans des bactéries *E. coli* BL21(DE3) star codon plus rendues compétentes par traitement au CaCl₂. Les bactéries transformées par choc thermique ont été sélectionnées sur milieu agar solide supplémenté en ampicilline (100 mg/L) et chloramphénicol (25 mg/L), après avoir été placées une nuit dans l'étuve à 37°C. Des précultures constituées de milieu LB supplémenté en ampicilline (100 mg/L) et chloramphénicol (25 mg/L) ont étéensemencées par une colonie, puis placées à 37°C sous agitation toute la nuit. La préculture est utilisée pour ensemencer 6 litres de culture du même milieu de façon à obtenir une DO_{600nm} de 0,1, puis les cultures ont été incubées à 37°C sous agitation, jusqu'à une DO_{600nm} de 0,8-1. L'expression de la protéine d'intérêt a été induite par ajout de 1mM d'IPTG pendant 3h et l'incubation a été poursuivie toute la nuit à 20°C, sous agitation. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000g, puis lavées dans du tampon contenant 20 mM TRIS-HCl pH 8, 1M NaCl, 0,1 M saccharose, centrifugées et stockées à -20°C.

- ii. Production de NcsA de *M. maripaludis*

NcsA de *M. maripaludis* a été produite dans des bactéries *E.coli* BL21(DE3) rendues compétentes par traitement au CaCl_2 . Les bactéries transformées par choc thermique ont été sélectionnées sur milieu agar solide supplémenté en kanamycine (50 mg/L) après avoir été placées une nuit dans l'étuve à 37°C. Des précultures constituées de milieu LB supplémenté en kanamycine (50 mg/L) ont été ensemencées par une colonie, puis placées à 37°C sous agitation toute la nuit. La préculture a servi à ensemencer 6 litres de milieu LB de façon à obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,1 et les cultures ont été placées à 37°C sous agitation, jusqu'à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1-1,2. L'expression de la protéine d'intérêt a ensuite été induite par ajout de 500 μM d'IPTG pendant 3h et l'incubation a été poursuivie toute la nuit à 25°C, sous agitation. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000g et stockées à -20°C.

B-I-1-b) Lyse cellulaire

Les culots cellulaires ont été repris dans un tampon 20 mM TRIS pH 8, 500 mM NaCl (TtcA sauvage et TtcA1-292) ou 50 mM NaH_2PO_4 pH 7, 500 mM NaCl (TtcA 14-289 et NcsA) à raison de 10 ml par unité de $\text{DO}_{600\text{nm}}$. Le cassage des cellules a été effectué par un sonicateur de type Branson sonifier 250 : à une puissance de 35%, les cellules ont été soumises pendant 10 minutes à des cycles de 5 secondes d'ultrasons intercalés de 12 secondes d'arrêt. Les lysats ont été centrifugés à 35000g pendant 1 heure, pour séparer le surnageant contenant les protéines surexprimées des culots qui contiennent les débris cellulaires. Les surnageants sont ensuite filtrés à la seringue avec des filtres (MillexGV) de 0,45 μm .

B-I-2) Purification des protéines recombinantes

B-I-2-a) Première étape de purification des protéines : chromatographie d'affinité

- i. Chromatographie d'affinité à la glutathion-S-transférase (GSTRAP): purification de la protéine GST-TtcA sauvage et GST-TtcA 1-291

La purification des protéines a été réalisée par un appareil de type FPLC (chromatographie en phase liquide) : ÄKTA START (GE Healthcare). Une colonne d'affinité GST (GE Healthcare)

de 5 ml, a été équilibrée avec le tampon A 20 mM TRIS pH 8, 500 mM NaCl. Après chargement de l'échantillon sur la colonne, la protéine de fusion avec l'étiquette GST reste accrochée à la colonne alors que les autres protéines ne sont pas retenues. Un lavage a été effectué avec le tampon A, pour éliminer les impuretés qui auraient pu s'accrocher de manière non spécifique. Enfin, la protéine d'intérêt a été éluée par un gradient de tampon B contenant 0-10 mM de glutathion. Les fractions collectées ont été analysées par électrophorèse sur gel 12,5% SDS-PAGE, révélées au bleu de Coomassie, et les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été regroupées.

- ii. Chromatographie d'affinité aux ions nickel (Ni-NTA) : ϵ His-SUMO-TtcA 14-289 d'*E. coli* et ϵ His-SUMO-NcsA de *M. maripaludis*

La purification des protéines a été réalisée par un appareil de type FPLC (chromatographie en phase liquide) : ÄKTA START (GE Healthcare). Une colonne d'affinité Ni-NTA (GE Healthcare de 5 ml), a été équilibrée avec le tampon A 50 mM NaH₂PO₄ pH 7, 500 mM NaCl. Après chargement de l'échantillon sur la colonne, la protéine de fusion avec l'étiquette His₆ reste accrochée à la colonne alors que les autres protéines ne sont pas retenues. Un lavage a été effectué avec le tampon A, pour éliminer les impuretés qui auraient pu s'accrocher de manière non spécifique. Enfin, la protéine d'intérêt a été éluée par un gradient de tampon B contenant 0-1 M d'imidazole. Les fractions collectées ont été analysées par électrophorèse sur gel 12,5% SDS-PAGE, révélées au bleu de Coomassie, et les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été regroupées.

B-I-2-b) Clivage de la protéine de fusion GST ou ϵ His-SUMO par la protéase 3C du rhinovirus humain (PreScision)

Cette protéase reconnaît le site de clivage LeuGluValLeuPheGln/GlyPro situé entre la protéine de fusion GST ou His-SUMO et notre protéine d'intérêt. Les échantillons obtenus précédemment ont été dialysés en présence de la protéase 3C du rhinovirus humain (PreScision) (25 µg/mg de protéine), purifiée au laboratoire, contre 5L de tampon de dialyse 20 mM TRIS pH 8, 500 mM NaCl (TtcA sauvage et TtcA1-292) ou 50 mM TRIS pH 7,5, 150 mM

NaCl (TtcA 14-289 et NcsA) sous agitation sur la nuit à 4°C. Cette dialyse permet à la fois de cliver les étiquettes GST ou His-SUMO et d'éliminer le glutathion ou l'imidazole.

La protéase PreScission (plasmide fournie par S. Mouilleron) clonée dans un plasmide recombinant pGEX-2T qui contient une étiquette GST avec un site de clivage à la thrombine, a été exprimée après induction à 25°C par 0,1 mM d'IPTG sur la nuit. La protéine est purifiée par chromatographie d'affinité au glutathion (GSTRAP).

B-I-2-c) Deuxième étape de purification : chromatographie d'affinité inverse ou chromatographie d'échange de cations

- i. Chromatographie d'affinité à la glutathion-S-transférase inverse: purification de la protéine TtcA sauvage et TtcA 1-291 (GSTRAP inverse)

Une colonne GSTRAP couplée à un système Äkta Start a été équilibrée avec du tampon A (20 mM TRIS pH 8, 500 mM NaCl). Les échantillons de TtcA sauvage et TtcA 1-291 ont été chargés sur la colonne après coupure des étiquettes. La protéine d'intérêt (privée de l'étiquette GST) a été récupérée dans la fraction non retenue. L'étiquette clivée, la protéase 3C du rhinovirus humain qui possède une étiquette GST ainsi que d'éventuels contaminants précédemment accrochés lors de la première purification, ont été retenus sur la colonne GSTRAP et ont été décrochés de la colonne par le tampon A contenant du 10 mM de glutathion. Les fractions collectées ont été analysées sur gel 12% SDS-PAGE et révélées au bleu de Coomassie, et celles contenant la protéine d'intérêt ont été regroupées.

- ii. Chromatographie échangeuse de cations (MonoS): purification de la protéine TtcA 14-289 et NcsA

Après clivage des étiquettes, TtcA 14-289 ou NcsA sont concentrées sur un concentrateur Amicon Ultra-15 (membrane 10K de Merck Millipore) pour être ensuite injectées sur une colonne échangeuse de cations MonoS 5/50 (résine de polystyrène/divinyle benzène, sur laquelle ont été greffés des groupements de méthyle sulfonate), préalablement équilibrée avec du tampon 50 mM NaH₂PO₄ pH 6,5 (TtcA 14-289) ou 50 mM TRIS pH 7,5 (NcsA) et couplée à un système FPLC (GE Healthcare). La protéine est ensuite éluée par un gradient linéaire de 0

à 500 mM NaCl. Cette étape permet de séparer la protéine d'intérêt ($pI_{TtcA14-289} = 7,73$; $pI_{NcsA} = 8,82$) des acides nucléiques et des autres protéines de pI supérieur au pH du tampon qui sortent dans les lavages de la colonne.

B-I-2-d) Troisième étape de purification : chromatographie d'exclusion stérique

Afin d'éliminer les éventuels derniers contaminants et les agrégats de protéines, une étape de gel filtration a été effectuée. Après la chromatographie d'affinité à la glutathion-S-transférase inverse (GSTRAP) ou la chromatographie échangeuse de cations (MonoS), les protéines ont été concentrées sur un concentrateur Amicon Ultra-15 (ou 10K de Merck Millipore) jusqu'à un volume d'environ 5-10 mL. Les échantillons ont ensuite été chargés sur une colonne de gel filtration Superdex 75 (16/60 : 3 000-70 000 Da, limite d'exclusion 100 000 Da), équilibrée dans le tampon 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT. L'élution des protéines est suivie par mesure de l'absorbance UV à 280 nm. La protéine est concentrée à 10 mg/mL et conservée à -80°C après congélation dans l'azote.

B-I-3) Détermination de la concentration des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford (Bradford), l'une des méthodes les plus communément utilisées. Cette méthode colorimétrique est basée sur la fixation du bleu de Coomassie aux résidus de charge positive des protéines, qui est suivi par mesure d'absorption du complexe (protéine-Coomassie) à 595 nm. La concentration protéique des échantillons est alors déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage d'une protéine standard l'albumine de serum bovin (BSA), à différentes concentrations. Les concentrations obtenues par Bradford sont comparées à celles déterminées à partir du coefficient d'extinction molaire théorique à 280nm ($\epsilon_{280\text{nm}}$) calculé par le serveur ExPASy *Bioinformatics Resource Portal* (*ProtParam tool*).

B-II) Reconstitution du centre [4Fe-4S] des protéines en boîte à gants

B-II-1) Préparation de l'apoprotéine NcsA

Afin d'obtenir une apo-protéine et d'éliminer les traces de centre [FeS] présent dans la protéine « as purified » (colorée), la protéine NcsA (5 mg) de *M. maripaludis* (MmNcsA) est incubée en présence de 2 mM de dithionite (agent réducteur) et de 10 mM d'EDTA en boîte à gants (**Figure 3**), pendant 2h à 17°C. Les protéines sont chargées ensuite sur une colonne de déssalage PD10 préalablement équilibrée dans un tampon 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, pour éliminer l'EDTA-Fe ainsi que le dithionite. Après concentration sur une membrane Amicon Ultra-15 (10 kDa cutoff) la concentration de l'apoprotéine est déterminée à partir de l'absorbance à 280 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire théorique ($\epsilon_{\text{NcsA}} = 23840 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

B-II-2) Reconstitution du centre [FeS]

La reconstitution du centre [FeS] et la purification de l'holo-MmNcsA ont été réalisées dans des conditions d'anaérobie strictes à l'intérieur d'une boîte à gants de type Mbraun sous atmosphère contrôlée ($\text{O}_2 < 0,5 \text{ ppm}$) à 18°C **Figure 51**. 100 μM d'apoNcsA est traitée avec 5 mM de DTT dans le tampon 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl pendant 10 min, puis incubée sur la nuit avec 5 excès molaires de sulfate d'ammonium ferreux (Sel de Mohr : $(\text{NH}_4)_2(\text{FeSO}_4)_2, 6\text{H}_2\text{O}$) et de L-cystéine en présence de 2 μM de cystéine désulfurase d'*E. coli* (CsdA, préalablement purifiée au laboratoire). L'holo-NcsA est ensuite centrifugée pendant 20 min, puis chargée sur une colonne de gel filtration Superdex 200 10/300 (GL Sciences), préalablement équilibrée dans un tampon 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT. Cette colonne permet d'éliminer d'éventuels agrégats ainsi que les molécules de faible poids moléculaire (L-cystéine, L-alanine, Fe^{2+} , DTT) en excès. Le pic contenant le dimère de l'holo-NcsA est alors concentré à 15-25 mg/mL dans un concentrateur Vivaspin (30 kDa cutoff).

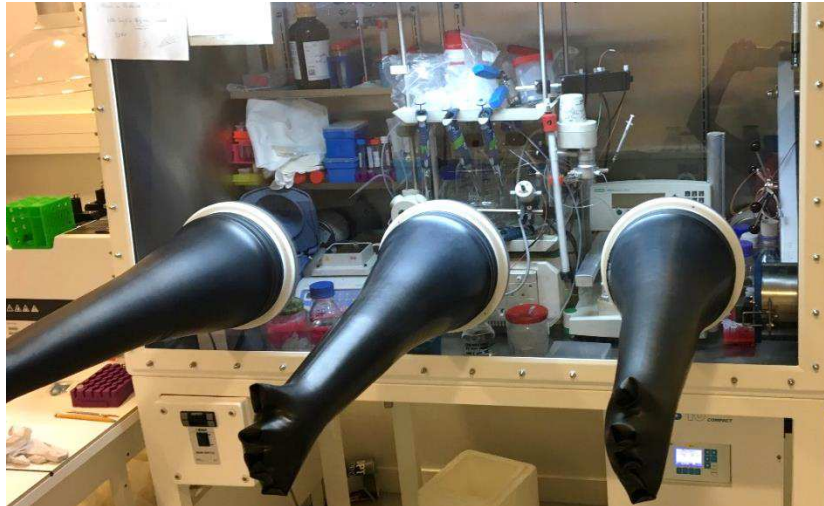


Figure 51: Boîte à gants de type MBraun sous atmosphère contrôlée ($O_2 < 0,5$ ppm). Cette boîte à gants contient un appareil de FPLC de type Biorad connecté à une colonne de gel filtration de type Superdex 200 10/300 (GL Sciences). Elle contient aussi une centrifugeuse de paillasse ainsi qu'un bloc thermique.

B-II-3) Quantification du centre [Fe-S]

B-II-3a) Dosage des atomes de Fer

La quantification des atomes de fer contenus dans le centre [FeS] de la protéine NcsA est réalisée comme décrite dans la méthode de Fish (Fish, 1988). Pour établir la courbe étalon, une solution commerciale de Fe^{2+} (1005 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluée au 36^{ème} permet d'obtenir une solution de référence à 500 μM de Fe^{2+} et de réaliser des standards contenant respectivement 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol de fer dans un volume final de 65 μL . Des solutions protéiques à différentes quantités (entre 0,5 et 2 nmol), sont préparées dans un volume final de 65 μL . Les échantillons et les standards (préparés en duplicata) sont dénaturés par ajout de 45 μL d'acide perchlorique 1M pendant 1h. Après centrifugation (10000 rpm pendant 10 min), 90 μL du mélange sont prélevés auxquels sont ajoutés 72 μL de batho-phénantroline disulfonate (1,7 mg/mL), 36 μL d'ascorbate de sodium (38 mg/mL) et 27 μL d'acétate d'ammonium (solution saturée diluée au 1/3). Après 30 min d'incubation à température ambiante, la différence d'absorbance $DO_{535}-DO_{680}$ est

mesurée sur un spectrophotomètre Cary 1 bio (Varian). Cette valeur comparée à la courbe étalon permet d'obtenir la quantité d'atomes de fer par monomère d'enzyme.

B-II-3b) Dosage des atomes de soufre

La quantification des atomes de soufre présents dans le centre [FeS] de la protéine NcsA est réalisée par la méthode de Beinert (Beinert, 1983). Un cristal translucide de sulfure de sodium (Na_2S , $9\text{H}_2\text{O}$, $M = 240 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) est pesé puis dissous à 100 mM dans de la soude 1M. Une solution à 200 μM est obtenue à partir de cette solution stock. Des solutions de standard de sulfure de sodium 0, 2, 4, 6, 8 et 10 nmol ainsi que de protéines dans les mêmes quantités que celles utilisées pour le dosage du fer sont préparées en duplicata dans un volume final de 100 μL . Le protocole consiste à dénaturer pendant 3 h la protéine par ajout simultané de 300 μL d'acétate de zinc 1% et de 15 μL de soude 3 M provoquant la précipitation immédiate d'hydroxyde de zinc. Les échantillons sont ensuite repris par ajout simultané de 75 μL de *N,N*-diméthyl-*p*-phenylenediamine (DMPD, 1mg/mL, HCl 5N) et de 16 μL de FeCl_3 (3,75 mg/mL, HCl 1N) conduisant à la formation lente de bleu de méthylène. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance $\text{DO}_{670} - \text{DO}_{850}$ est mesurée sur un spectrophotomètre Cary 1 bio (Varian). La quantité d'atomes de soufre par monomère d'enzyme est obtenue en rapportant l'absorbance à la droite de calibration.

B-III) Production, extraction et purification d'ARN de transfert substrat de *MmNcsA*

B-III-1) Extraction et purification des ARNt totaux de la souche *mnmA* d'*E. coli*

Les souches bactériennes d'*E. coli* CGSC (JW1119-1) délétées du gène *mnmA* sont cultivées dans un milieu LB supplémenté en kanamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) jusqu'à une croissance $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1. Après centrifugation, les culots cellulaires sont repris dans 2 mL de tampon 50 mM TRIS pH 7,5, 10 mM MgCl_2 par g de cellule additionnés de 2 mL de phénol pH 4,5 saturé d'eau et mis à incuber sous agitation pendant 1h à température ambiante, ce qui permet de perméabiliser les parois cellulaires. Les cellules sont ensuite centrifugées à 10000 g pendant 20 min à température ambiante. La plupart des ARN (dont les ARNr et ARNt), l'ADN, les polysaccharides et les

petites molécules libres (nucléotides, acides aminés) se retrouvent dans la phase aqueuse, les protéines étant dénaturées. Le surnageant est récupéré et extrait une seconde fois avec du phénol pH 4,5. Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée en évitant toute contamination par l'interface phénol/eau. Les ARNt totaux sont précipités par ajout de 300 mM d'acétate de sodium pH 5,2 et 3 excès d'éthanol froid conservé à -20°C. Après 2h d'incubation à -20°C, les acides nucléiques sont centrifugés à 6500 g pendant 1h, puis les culots sont lavés avec de l'éthanol à 70% pour éliminer les sels ainsi que les petites molécules. Après centrifugation à 6500 g pendant 20 min à 4°C le culot est repris dans le tampon 50 mM TRIS pH 7,5. Les ARNt totaux sont injectés sur colonne DEAE-Sépharose (diéthylaminoéthanol : amine tertiaire), préalablement équilibrée avec 50 mM TRIS pH 7,5. Les ARNt totaux sont ensuite élués par un gradient de 0-1 M NaCl dans le même tampon.

B-III-2) Transcription *in vitro* et purification de l'ARNt^{lys}_{UUU} de *M. marisaludis*

L'ARNt^{lys}_{UUU} de *M. marisaludis* (MmARNt^{lys}_{UUU}) a été transcrit *in vitro* (Milligan et al.) en incubant pendant 1h à 37°C 0,04 mg/ml d'ARN polymérase T7 (précédemment purifiée au laboratoire) en présence de 10 µM de matrice d'ADN, 10 µM d'amorce T7 (Eurogentec ; **Tableau 1**), 4 mM de NTP (N = A, U, C, G) et 30 mM de MgCl₂ dans 10 mL de tampon 40 mM TRIS pH 8, 5 mM DTT, 1 mM spermidine, 10% PEG 8000 et 0.001 % triton X100. La réaction est arrêtée par addition de 2,64g d'urée, de xylène cyanole, de bleu de bromophénole et le précipité formé est dissous par ajout de 50 mM d'EDTA. L'ARNt transcrit est par la suite purifié sur un gel PAGE 12% contenant d'urée 8M, puis l'ARNt est extrait du gel par ajout d'un tampon 0,3 M d'acétate de sodium pH 5,2. L'ARNt extrait est ensuite filtré et injecté sur une colonne DEAE-sépharose, préalablement équilibrée avec un tampon 300 mM d'acétate de sodium pH 5,2. Les ARNt sont ensuite élués par un gradient de 0,3-3 M d'acétate de sodium pH 5,2, puis chargés sur une colonne de désalage PD10 (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans un tampon 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl.

Chaque solution utilisée lors de la transcription *in vitro* a été préalablement autoclavée à 120°C sous une pression de 1bar et/ou préparée avec de l'eau sans RNase (RNase-free).

<u>ARNt mature</u>	5'GGGCCCCGUAGCUUAGUCUGGUAGAGCGCCUGACUUUUAUCAG GCGGUCGAGGGUUCGAAUCCCUUCGGGCCCGCCA 3'
<u>Matrice d'ADN</u>	5' T GCGGGCCCGAAGGGATTCGAACCCTCGaCCGCCTGATTA AAAAGTCAGGCGCTCTACCaGACTAAGCTACGGGCCCT TATAGTGAGTCGTA TTA 3'
<u>Amorce T7</u>	5' TAATACGACTCACTATA 3'

Tableau 1: Séquences d'ADN matrice (partie soulignée en bleu s'hybridant à l'amorce T7) et de l'amorce utilisée lors de la transcription *in vitro* de $MmARNt^{lys_{UUU}}$. Cette méthode de transcription *in vitro* utilise une matrice d'ADN contenant une modification 2'-O-méthyl sur le ribose du deuxième nucléotide (G en bleu), qui permet un arrêt précis de la transcription (Kao et al., 1999).

B-IV) Test d'activité *in vitro* de l'holo-NcsA

B-IV-1) Conditions expérimentales

1 μ M de l'holo-MmNcsA (ou 10 μ M de l'apo-MmNcsA) est incubé en présence d'ATP 500 μ M, $MgCl_2$ 2,5 mM, d'ARNt 20 μ M (ARNt totaux de la souche *mnmA* d'*E. coli* ou $MmARNt^{lys_{UUU}}$) et Na_2S 500 μ M, pendant 30 min à 37 °C dans un volume final de 100 μ L de 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl. Les ARNt produits sont visualisés sur gel d'électrophorèse 12% en condition dénaturante contenant de l'APM ou digérés et les nucléosides analysés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (MS/MS).

B-IV-2) Visualisation des produits d'ARNt thiolés : gel retard d'APM en condition dénaturante

Les ARNts (2,5 µg d'ARNt par puits) sont séparés par électrophorèse sur un gel 12% urée-PAGE, supplémenté de 10 µg/mL de [(N-acryloylamino)phényl]mercuric chloride (APM, préalablement synthétisé au laboratoire **Figure 52** (Blondi and Burke, 2012)). Les ARNt thiolés vont interagir avec le composé mercurique et seront retenus sur le gel, ce qui va entraîner un retard des produits thiolés par rapport au substrat non thiolé. Les ARNts sont visualisés par coloration au bleu de toluidine, puis décoloration à l'eau.

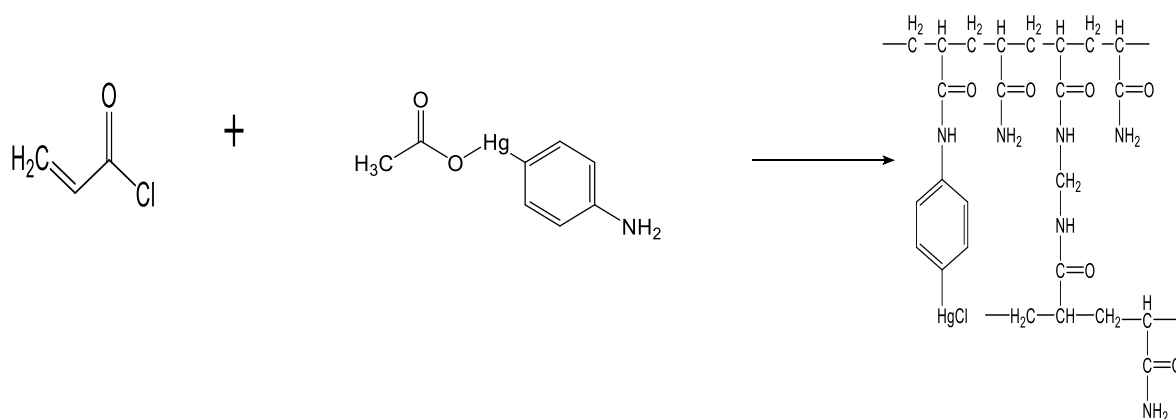


Figure 52: Schéma simplifié de la synthèse de [(N-acryloylamino)phényl]mercuric chloride (APM). Adapté de Biondi et al, 2012 (Biondi and Burke, 2012).

B-IV-3) Digestion des ARNt et analyse des nucléotides modifiés

Les ARNt sont digérés à 37°C sur la nuit, en présence de ZnSO_4 0,1 mM et nucléase P1 (2 unités, Sigma), puis traités à la phosphatase alcaline (2 unités Sigma) pendant 2h à 37°C pour libérer les nucléotides déphosphorilés. L'étape suivante consiste en l'identification du volume de rétention des nucléosides modifiés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS, collaboration avec le Dr Jean-Luc Ravanat, CEA, Grenoble).

B-V) Caractérisation spectroscopique du centre [Fe-S]

La spectroscopie UV-visible est utilisée pour mesurer la concentration protéique et pour suivre l'assemblage du centre Fe-S dans l'apoprotéine ou la réduction de ce centre [4Fe-4S]. Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés dans une cuvette en quartz (parcours optique de 1 cm) dans des conditions anaérobies dans une boîte à gants, sur un spectrophotomètre XL-100 Uvikon muni d'une fibre optique.

B-VI) Cristallisation, collecte des données de diffraction aux rayons X et détermination de la structure des protéines

La cristallographie aux rayons X est une technique qui permet d'accéder à la structure tridimensionnelle de la matière ordonnée et de déterminer en particulier la structure de protéines à l'échelle atomique. Trois grandes étapes sont nécessaires : (i) la cristallogenèse qui permet d'obtenir des cristaux de protéines qui devraient avoir une taille et une qualité suffisante pour obtenir des jeux de diffraction ; (ii) l'enregistrement et le traitement des données de diffraction des rayons X et enfin (iii) la résolution de la structure, qui nécessite le phasage et un affinement itératif de la structure par rapport aux données de diffraction.

B-VI-1) Cristallogenèse des protéines

B-VI-1-a) Principe et technique de la cristallisation

i. Principe de la cristallisation

Au cours d'une expérience de cristallisation, les molécules sont amenées à interagir entre elle de manière spécifique pour former un arrangement ordonné, régulier et tridimensionnel : le cristal. Les molécules passent donc d'un état soluble à un état solide ordonné, ces deux états étant en équilibre.

La cristallisation consiste à utiliser un agent précipitant pour amener la protéine étudiée dans la zone métastable du diagramme de solubilité, état de sursaturation ou se forment des germes cristallins **Figure 53**.

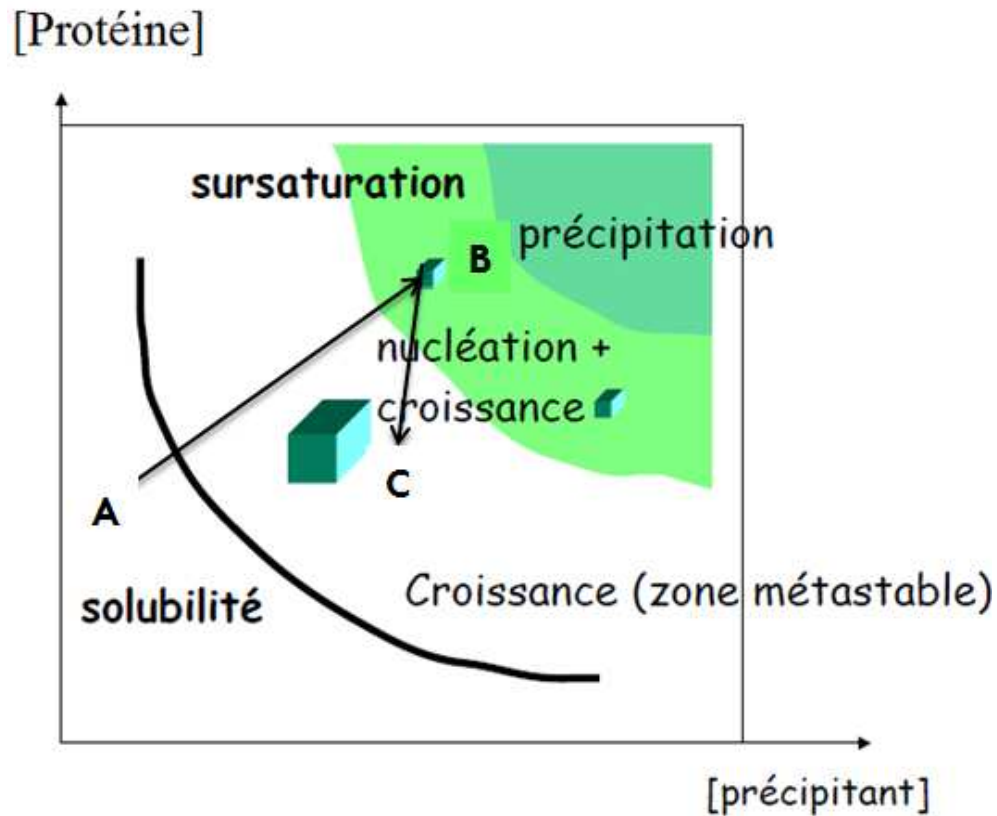


Figure 53: Diagramme de phases d'une protéine. Pour que la protéine passe d'un état soluble à un état cristallin, il faut diminuer sa solubilité. Pour se faire, on peut augmenter sa concentration ou celle de l'agent précipitant. Ainsi la protéine qui est en solution sous-saturée (A), va passer progressivement vers une zone de nucléation (B). C'est dans cette zone que se forment les premiers germes cristallins. La protéine passant petit à petit à un état cristallin, sa concentration va diminuer dans la solution. Ainsi la croissance du cristal va se poursuivre dans la zone appelée métastable (sursaturée) (C).

Les paramètres affectant la cristallisation sont spécifiques à chaque protéine, puisqu'ils agissent directement sur sa solubilité. Les principaux facteurs biochimiques et physicochimiques influençant la cristallisation sont :

- ✚ La pureté de la protéine, terme qui inclut la présence ou l'absence de molécules contaminantes et l'homogénéité conformationnelle ou de séquence de la protéine. Le temps de purification de la protéine, pendant lequel la protéine peut se dégrader, peut influencer sur son homogénéité.

- ✚ La concentration en protéine, qui est un facteur crucial pour la cristallisation de la protéine puisqu'elle régit les interactions protéine-protéine.
- ✚ La nature et la concentration de l'agent précipitant, qui vont permettre de diminuer la solvataion des protéines et ainsi favoriser les interactions spécifiques protéine-protéine. Divers agents précipitants sont utilisés :
 - Les solvants organiques qui favorisent les interactions ioniques.
 - Les sels non chaotropiques tels que le sulfate d'ammonium.
 - Les polymères organiques, comme les polyéthylènes glycols (PEG), qui vont entrer en compétition avec la solvataion de la protéine.
- ✚ La température qui affecte la stabilité de la protéine et a une influence majeure sur la cinétique de cristallisation.
- ✚ Le pH qui détermine la charge nette de la protéine et la solubilité de la protéine.
- ✚ La présence ou l'absence de ligands, qui peuvent induire un changement conformationnel pouvant ordonner certaines parties flexibles de la protéine et donc favoriser la cristallisation.
- ✚ Les divers additifs qui peuvent favoriser les contacts cristallins et l'homogénéité conformationnelle de la protéine.

ii. Technique utilisée : diffusion en phase vapeur

Plusieurs techniques permettent de diminuer progressivement la solubilité de la protéine afin de l'amener à un état cristallin par dialyse ou batch, ou par diffusion en phase vapeur (Watts, 1993). L'une des techniques de diffusion en vapeur les plus utilisées est la goutte assise et suspendue (Wlodawer and Hodgson, 1975), dans lesquelles la vapeur d'eau s'équilibre entre deux solutions de concentration différentes en agent précipitant dans un milieu clos. Dans la technique de la goutte suspendue, un volume de (1 μ L à 5 μ L) de solution protéique, auquel est ajouté à un volume de solution précipitante (1 μ L à 5 μ L) est déposé sur une lamelle. La lamelle est ensuite posée au-dessus d'un récipient contenant la solution de précipitant et

l'ensemble est scellé hermétiquement. La solution précipitante est donc diluée sur la lamelle par rapport à celle présente dans le puits. Les concentrations en protéine et agent précipitant vont progressivement augmenter dans la goutte pour atteindre lentement un état de sursaturation. Dans des conditions favorables, la protéine va atteindre la zone de nucléation conduisant à la formation des premiers germes cristallins **Figure 54**. Cette technique a été utilisée avec des boîtes *Linbro* (condition aérobie ; Molecular dimensions) ou des boîtes *EasyXtal* (condition anaérobie ; Quiagen) pour la reproduction des cristaux et l'affinement des conditions de cristallisation.

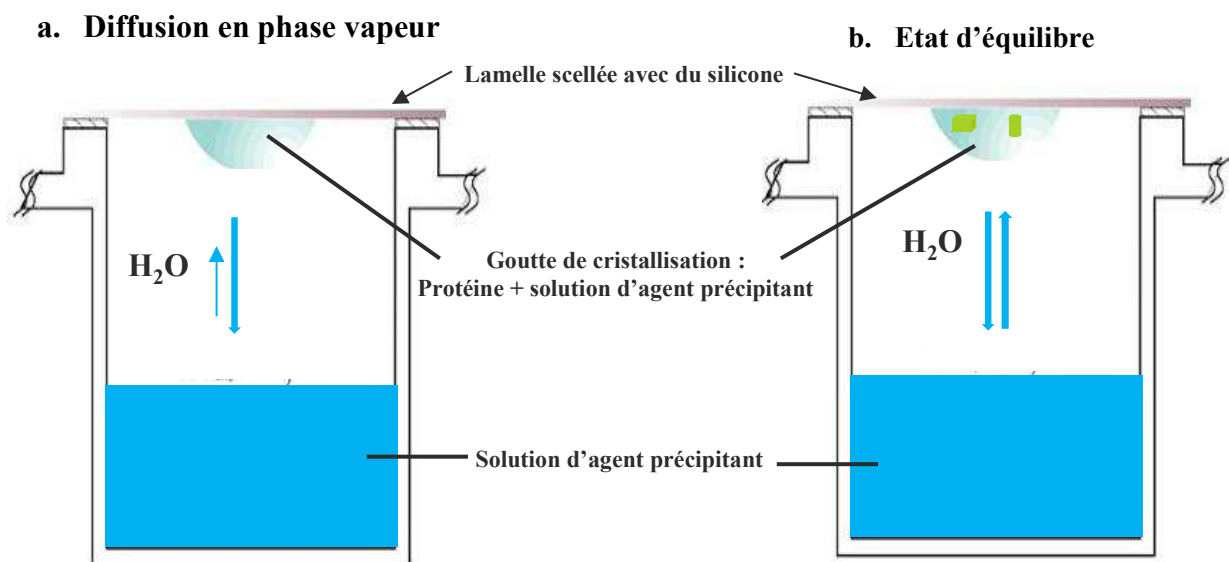


Figure 54: schéma représentant la diffusion en vapeur avec la technique de la goutte suspendue.

Une solution d'agent précipitant de grand volume (1ml) et de concentration C est déposée dans un réservoir, qui est équilibrée contre un petit volume (1 μL dans notre cas), de solution protéique déposée sur une lamelle à laquelle sont ajoutées 1 μL de solution précipitant de concentration C . La lamelle est ensuite scellée sur le puits par une graisse (silicone). (a) La concentration en protéine et en agent précipitant de la goutte augmente pour atteindre l'état d'équilibre (b) dans lequel la concentration en précipitant est la même dans le puits et dans la goutte.

Pour la recherche de conditions de cristallisation, la méthode de la goutte assise est utilisée avec des kits commerciaux. Ces kits commerciaux permettent de tester de nombreuses conditions de

cristallisation. Et cette technique diffère de la précédente car la goutte contenant la protéine est déposée sur un support situé à côté du puits contenant l'agent précipitant.

B-VI-1-b) Recherche et amélioration des conditions de cristallisation

L'utilisation de kits commerciaux (Classic suite, PEGII suite, MbClass II suite etc...) et de robots de cristallisation « Mosquito » permettent de pipeter de très petits volumes (100nL) et de cribler de nombreuses conditions de cristallisation. Ces kits composés de 96 conditions différentes, correspondent à des conditions favorables à la cristallisation des protéines (Jancarik and Kim, 1991).

Des dilutions des protéines à cristalliser ont été réalisées à partir des protéines stock (*E. coli* TtcA sauvage 10-70 mg/mL, TtcA 1-291 10⁻¹⁵ mg/mL, TtcA 14-289 10⁻³⁰ mg/mL et *MmNcsA* 10-20 mg/mL) dans le tampon de cristallisation 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM DTT. Les expériences ont été réalisées en présence ou en absence d'analogue d'ATP non hydrolysable ou AMP (1 mM) et MgCl₂ (5 mM).

Ces expériences ont été réalisées en gouttes assises selon la méthode de diffusion en phase vapeur dans des plaques 96 puits (TTPLabtech, **Figure 55b**) sur lesquelles un mélange de 0,1 µL de protéine et 0,1 µL de solution précipitante (réservoir) est déposé sur un support séparé du réservoir, par le robot « Mosquito ». Différents rapports volume protéine/volume précipitant (1 :1 ; 1 :2 ; 2 :1) peuvent être déposés. Les boîtes sont scellées et stockées à 4°C (TtcA) ou 19°C. Les gouttes sont observées régulièrement sur plusieurs semaines à l'aide d'un microscope, pour vérifier la présence de cristaux.

B-VI-1-c) Optimisation des cristaux de *MmNcsA*

Une condition de cristallisation du kit PEGII suite contenant 0,1 M HEPES pH 7,5, 0,2 M sulfate d'ammonium, 18% PEG 4000 et 10% d'isopropanol a permis d'obtenir des cristaux de l'apoprotéine *MmNcsA* à 15mg/mL **Figure 55a**. Les cristaux étant petits ou maclés (poussent les uns sur les autres), une étape d'optimisation consiste à faire varier différents paramètres autour de la condition de cristallisation (pH, concentration en PEG, en protéine et en sulfate d'ammonium). L'optimisation des cristaux est réalisée à la main (en goutte suspendue) dans des plaques de 24 puits (Linbro, **Figure 55d**) ou de 15 puits (EasyXtal, **Figure 55c**) en

conditions aérobie (apo-NcsA) ou anaérobie (holo-NcsA, **Figure 55e**) respectivement. Un mélange de 1 μL de protéine (10-15 mg/mL) et 1 μL de la solution de précipitant est déposé sur une lamelle siliconée (Linbro) ou un bouchon à visse (EasyXtal).

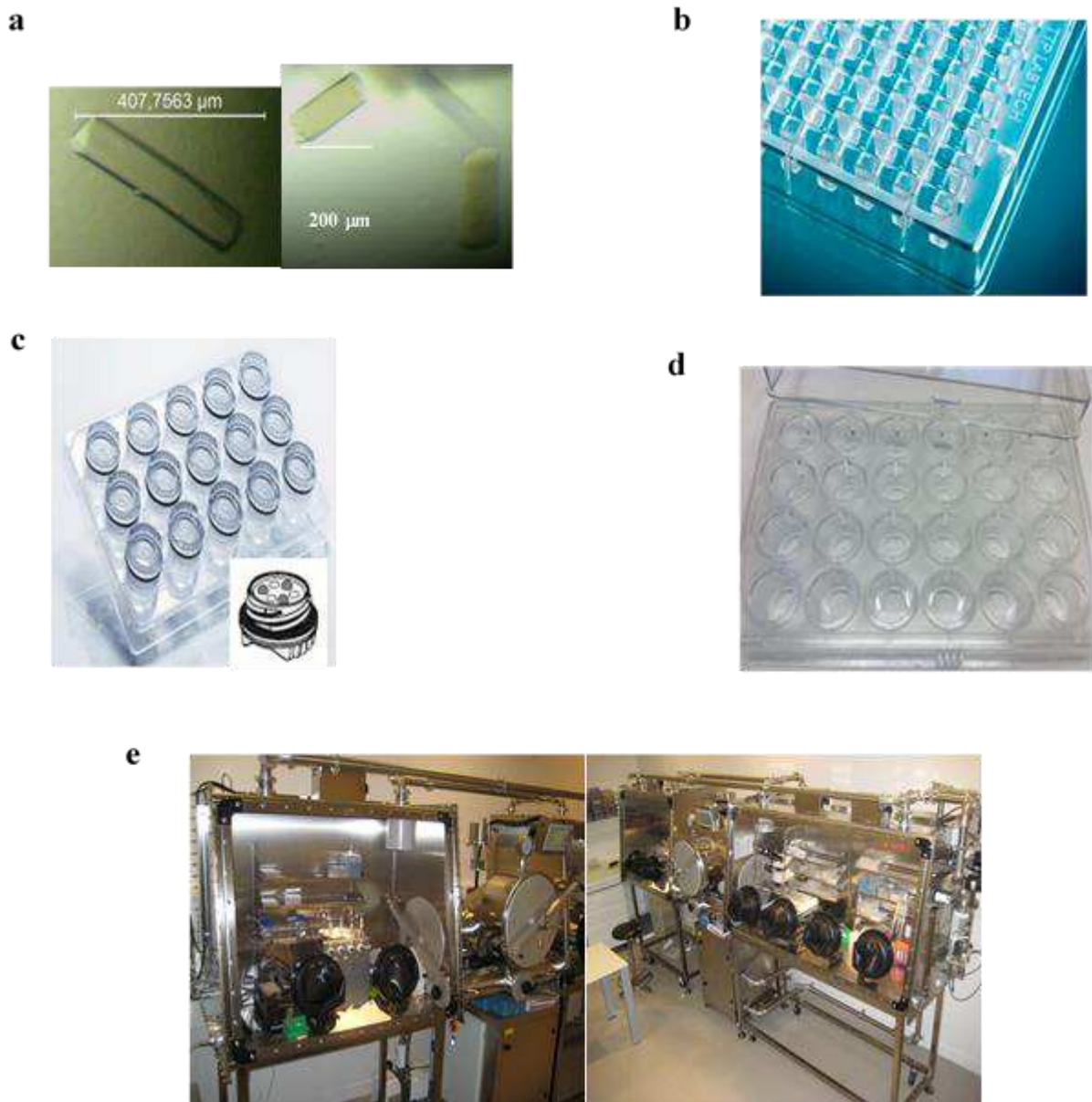


Figure 55 : (a) Cristaux de l'apo-MmNcsA (gauche) et l'holo-MmNcsA (droite). (b) Boîte TTPQ (TTP Labtech) utilisée lors du criblage des conditions de cristallisation. 96 puits sont remplis avec 70 μL des différentes solutions de cristallisation contenues dans les kits et dans les trois cupules sont déposés trois rapports différents de mélange (protéine + agent précipitant). (c) Boîtes EasyXtal et (d) Linbro (Molecular Dimensions) utilisées lors de l'affinement des conditions de cristallisation en

aérobie et en anaérobie respectivement. Les puits sont remplis avec 1 mL de différentes solutions de la condition de cristallisation du kit commercial (0,1 M HEPES pH 7,5, 0,2 M sulfate d'ammonium, 18% PEG 4000 et 10% d'isopropanol). **(e) Boîte à gants pour la cristallisation des protéines en anaérobie :** la chambre à gauche contient le robot de cristallisation Orix Nano

B-VI-2) Congélation, enregistrement et traitement des données de diffraction aux rayons X

B-VI-2-a) Congélation des cristaux

Lors de l'enregistrement des données de diffraction au synchrotron, les cristaux vont être soumis à des rayons X très intenses (12 keV). Ces rayonnements entraînent la formation de radicaux libres, ce qui peut mener à la dégradation de la protéine dans le cristal. Pour éviter la diffusion des radicaux et les dommages dus aux radiations, il est impératif de congeler le cristal. A l'inverse des cristaux de sels, les cristaux de protéines contiennent un pourcentage important de solvant (30 à 70%). Il est donc primordial lors de la congélation du cristal de le protéger contre la formation de glace, qui pourrait l'endommager et affecter son pouvoir de diffraction, et éviter aussi la présence d'anneaux de glace sur les clichés de diffraction qui bruitent les mesures des intensités de diffraction. Pour cela, les cristaux sont trempés quelques secondes dans une solution de cryoprotectant, comme le glycérol. La concentration de cryoprotectant, dépend de la condition de cristallisation. Les cristaux sont ensuite pêchés à l'aide de boucles de taille adaptée à la taille du cristal et congelés rapidement dans l'azote liquide. Dans la boîte à gants, la procédure diffère légèrement, du fait de l'impossibilité d'entrer de l'azote liquide à l'intérieur de la chambre anaérobie. Une petite chambre cylindrique pouvant conserver le cristal dans sa boucle, contenant du propane liquide (température de solidification, -187°C) est congelée dans de l'azote liquide et entrée dans la boîte à gants **Figure 56**. L'opération doit être réalisée en moins de 2-3 minutes, pour que le cristal soit instantanément congelé au contact du propane liquide. Une fois à l'extérieur de la boîte à gants, le cristal est transféré dans l'azote liquide en attendant les expériences de diffractions.

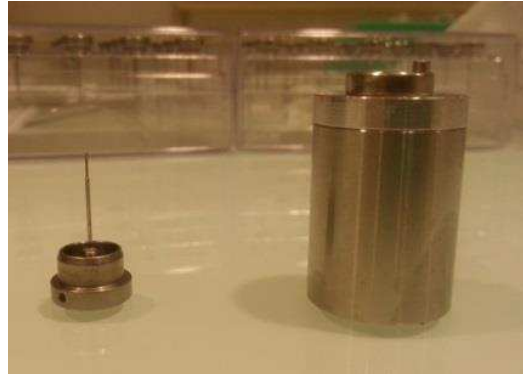


Figure 56: Boucle (à gauche) et dispositif de congélation de cristaux à l'intérieur d'une boîte à gants (droite). La chambre cylindrique est remplie de propane liquide, congelée par l'azote liquide et entrée dans la boîte à gants en anaérobie. Elle sert à accueillir le cristal dans sa boucle.

B-VI-2-b) Enregistrement des données de diffraction

La diffraction des rayons X consiste à envoyer des rayons X sur un cristal, qui seront renvoyés dans des directions spécifiques dépendant de la longueur d'onde du faisceau incident et du cristal. Les ondes diffractées par le cristal peuvent être décrites par deux paramètres : le module $|F_{(hkl)}|$ et la phase $\Phi^{(hkl)}$. Ainsi, chaque réflexion (h, k, l) sera associée à un facteur de structure qui va dépendre de la nature de l'atome à travers le facteur de diffusion atomique f_j et de la position (xyz) de chaque atome j au sein de la maille dans le réseau direct. Ce facteur de structure décrit ainsi la contribution de l'ensemble des atomes, à travers leurs électrons à la diffraction, selon l'**Équation 1** :

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\Phi_{hkl}} = \sum_{j=1}^N f_j e^{[2i\pi(hx_j + ky_j + lz_j)]}$$

Équation 1: Calcul du facteur de structure. $|F_{(hkl)}|$: amplitude ou le module de l'onde diffractée ; $\Phi^{(hkl)}$: phase de l'onde diffractée, f_j : le facteur de diffusion atomique ; (x_j, y_j, z_j) : coordonnées de l'atome j, et hkl indices de Miller (ou coordonnée dans l'espace réciproque).

Il existe une relation mathématique, la transformée de Fourier, entre les amplitudes diffractées, c'est-à-dire les facteurs de structure F_{hkl} dans le réseau réciproque et la distribution de la densité électronique du cristal $\rho(xyz)$ dans le réseau direct (réel ; **Équation 2**) :

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Équation 2: Transformée de Fourier. Avec xyz les coordonnées dans l'espace réel, hkl les indices de Miller et V le volume de la maille.

Les cristaux de NcsA congelés ont été analysés au synchrotron SOLEIL à Gif-Sur-Yvette sur la ligne Proxima 2. Pour la collecte des données, les cristaux sont montés sur une tête goniométrique, qui permet d'orienter et positionner le cristal par rapport au faisceau de rayons X. Un flux d'azote permet de garder à 100K le cristal tout au long de l'expérience. L'expérience consiste à irradier le cristal par les rayons X avec un temps d'exposition (de 0,1 à 0,5 sec) et un pas d'oscillations choisi (de 0,1 à 0,5°) par l'expérimentateur en fonction du faisceau de rayons X et des caractéristiques propres aux paramètres du cristal (maille, mosaïcité, etc...). Différents clichés sont collectés, pour couvrir un secteur angulaire permettant d'obtenir la meilleure complétude du jeu de données sont collectés.

B-VI-2-c) Traitement des données de diffraction aux rayons X

Les clichés de diffraction sont indexés et intégrés en utilisant le logiciel XDS (Kabsh, 2010) et mis à l'échelle avec XSCALE (Otwinowski and Minor, 1997). Les cristaux de l'apoptéine ont diffracté à 8 Å et ceux de l'holo-NcsA à 2,8 Å de résolution.

i. Détermination des paramètres de maille ainsi que le réseau de Bravais

La maille est la plus petite unité élémentaire définie par les nœuds du réseau de Bravais, qui constitue un cristal. A partir de la maille, le motif cristallin peut être reconstitué par des opérations de translation. Le faisceau diffracté contient l'information sur le contenu de la maille

ii. Intégration des données et mise à l'échelle

A partir du groupe d'espace et des paramètres de maille du cristal, les clichés sont ensuite intégrés à l'aide du logiciel XDS, pour mesurer l'intensité de chacune des taches, le bruit de fond, affiner les valeurs de mosaïcité, la position du centre du faisceau, la distance entre le cristal et le détecteur et les paramètres de maille. Les données intégrées pour chaque image sont rassemblées et mises à l'échelle pour mettre à niveau les intensités de réflexions équivalentes.

La qualité des jeux de données enregistré est ensuite évaluée en fonction de différents paramètres tels que la résolution maximale, la complétude, la redondance ainsi que par le facteur R_{sym} qui permet de quantifier le désaccord entre les intensités de réflexions équivalentes. Plus ce facteur R_{sym} est bas et meilleur est le jeu de données. Il s'exprime par l'équation suivante **Équation 3**:

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{h'k'l'} \sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I_{h'k'l'} \rangle|}{\sum_{hkl} I_{hkl}}$$

Équation 3: Indice d'accord des intensités équivalentes par symétrie et leur moyenne. Avec $I_{h'k'l'}$ l'intensité moyenne de la réflexion unique $h'k'l'$ et I_{hkl} l'intensité mesurée de la réflexion hkl .

Deux autres paramètres sont également pris en compte pour juger de la qualité d'un jeu de données, l'estimation du ratio signal/bruit (I/σ , avec I l'intensité et σ l'écart type de l'intensité (généralement supérieur à 1) et le $CC_{1/2}$ (indicateur de la qualité du jeu de données en général supérieur à 30%). Tous ces paramètres vont permettre de définir la résolution maximale à laquelle le jeu de données est exploitable.

iii. Contenu de l'unité asymétrique et coefficient de Matthews

L'unité asymétrique du cristal peut contenir plusieurs molécules non liées par des symétries cristallographiques (NCS : symétrie non cristallographique). La probabilité du nombre de molécules dans l'unité asymétrique et le pourcentage de solvant sont estimés grâce au coefficient de Matthews (Matthews, 1968) :

$$Vm = \frac{V}{M \cdot Z}$$

V_m représente le volume massique, **V** le volume de l'unité asymétrique qui prend en compte le volume de la maille et le nombre d'unités asymétriques dans une maille, **M** la masse moléculaire de la protéine et **Z** le nombre de molécules dans l'unité asymétrique.

Pour une analyse systématique des protéines de structure comme dans le cas de l'holo-NcsA, le calcul donne une forte probabilité de la présence de deux monomères dans l'unité asymétrique et 48% de solvant.

B-VI-3) Phasage et affinement de la structure de l'holo-NcsA

B-VI-3-a) Phasage par remplacement moléculaire

Lors de l'enregistrement d'un cliché de diffraction, l'amplitude de l'onde diffractée est mesurée mais l'information de la phase est perdue. La phase doit donc être déterminée par une méthode indirecte comme le remplacement isomorphe, la diffusion anormale ou le remplacement moléculaire.

i. Le remplacement moléculaire

La résolution du problème de phase par remplacement moléculaire est la méthode la plus utilisée. Cette technique nécessite un modèle tridimensionnel suffisamment proche de la structure de la protéine étudiée pour avoir des chances de réussite (Rossmann, 1990) (un modèle présentant environ 30% d'identité de séquence ou plus). Le but est de positionner une ou plusieurs molécules de la protéine modèle dans la densité électronique de la protéine étudiée. ,

afin de pouvoir calculer une première estimation des phases pour les facteurs de structure. Il faut pour cela déterminer les fonctions de rotation pour orienter le modèle et de translation permettant de positionner au mieux le modèle dans l'unité asymétrique, pour simuler le contenu de la maille (Rossmann and Blow, 1962).

Pour résoudre les phases de l'holo-NcsA par remplacement moléculaire, nous avons utilisé comme modèle l'apo-PhTtuA qui possède 30% d'identité de séquence avec NcsA. Différents modèles de l'apo-PhTtuA ont été réalisés par le logiciel Phenix-Sculptor, qui améliore le modèle de remplacement moléculaire proposé en se servant dans notre cas de l'alignement de séquences et/ou de structures. Les alignements de séquences de MmNcsA et PhTtuA ont permis de muter uniquement les résidus de MmNcsA qui ne sont pas conservés et d'enlever une boucle en C-terminal de PhTtuA, qui est absente dans MmNcsA. Et le remplacement moléculaire par Phaser MR (McCoy et al., 2007) dans CCP4 (Winn et al., 2011) a permis d'obtenir une solution unique. Le remplacement moléculaire a consisté à positionner deux copies du monomère en corps rigides, c'est-à-dire déterminer deux fonctions de translation et deux fonctions de rotation.

ii. La diffusion anormale

Pour obtenir des informations sur la phase, il est possible d'utiliser la diffusion anormale de certains atomes, lorsque l'énergie des rayons X incidents est proche du seuil 'absorption de ces atomes. Dans le cas où ces atomes ont un numéro atomique suffisamment élevé, la diffusion anormale à une longueur d'onde unique (SAD) permet de résoudre la structure de la protéine.

La première étape consiste à localiser les sites des diffuseurs anormaux, dans notre cas, un jeu de données a été enregistré sur le même cristal de l'holo-NcsA utilisé pour la collecte des données natives, à la longueur d'onde d'absorption de l'atome de fer (7,11 keV), pour confirmer la position du centre [4Fe-4S] dans la structure protéique.

B-VI-3-b) Construction du modèle et affinement de la structure

i. Construction du modèle de l'holo-NcsA

Les données obtenues pour l'holo-MmNcsA sont anisotropes, c'est-à-dire que la limite de diffraction n'est pas la même dans toutes les directions. Nous avons utilisé le serveur

<http://staraniso.globalphasing.org/cgi-bin/staraniso.cgi>, pour la corriger. Après avoir résolu la phase par remplacement moléculaire, les phases sont affinées en utilisant le logiciel BUSTER (Bricogne G, Blank E, Brandl M, Flensburg C, Keller P, Paciorek P, Roversi P, Sharff A, Smart O, Von Rhein C, Womack T (2018). BUSTER version 2.10.2. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd), puis reconstruites dans la carte expérimentale à l'aide du logiciel COOT (Emsley et al., 2010). Le programme BUSTER a la particularité d'être efficace sur les basses résolutions. Il permet d'améliorer la densité électronique des boucles flexibles et des petites molécules.

ii. Affinement des facteurs de structure

Le but de l'étape d'affinement est de réduire l'écart entre les facteurs de structures observés (F_{obs}) et ceux calculés à partir du modèle (F_{calc}). Ce processus est réalisé par une alternance de reconstruction manuelle du modèle dans COOT, ainsi que des cycles de minimisations successifs d'une fonction représentant différents écarts résiduels concernant les caractéristiques stéréochimiques des protéines (la longueur et angles de liaisons), la gestion des collisions stériques et NCS.

Le modèle construit est évalué après chaque cycle d'affinement grâce au facteur R_{work} , qui permet de juger de l'accord entre le modèle et les facteurs de structure observés. Le facteur R_{free} , calculé à partir de 5% des réflexions non utilisées lors de l'affinement, permet d'éviter une surinterprétation de la carte de densité. Ces deux facteurs doivent être le plus faible possible et dépendent de la NCS, la résolution et du groupe d'espace.

La qualité de la structure est finalement vérifiée grâce au serveur MolProbity (Chen et al., 2010; Davis et al., 2007), qui examine la géométrie de la protéine, les angles de torsions du diagrammes de Ramachandran et les collisions stériques, et propose un score **Tableau 3**.

Paramètres cristallographiques de l'Holo-NcsA	
Collecte de données (avant Staraniso)	
Ligne de lumière	PROXIMA II
Longueur d'onde (Å)	0,9793
Résolution (Å)	43,93-2,8 (2,97-2,8)
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Paramètre de maille	55 84,46 145,4 90 90 90
Complétude	99,4 (98,1)
Réflexions observées	94041 (15175)
Réflexions uniques	17277 (2690)
Redondance	5,4 (5,6)
I/σI	6,47 (0,59)
CC_{1/2}	0,995 (0,195)
Wilson B (Å²)	93,7
Statistiques d'affinement (après Staraniso)	
R_{work}/R_{free}	0,233/0,256
Nombres d'atomes	
Protéine	4344
Zn, Fe, S	2 x (2, 4, 4)
Eau	69
SO4	50
Facteurs B (Å²)	
Protéine	91,7
Zn, Fe/S	90,9/181,9
Eau	53,3
SO4	142,4
rmsds	
Longueur de liaisons (Å)	0,008
Longueur des angles (Å)	1,05

Tableau 3 : Statistiques des données de diffraction et d'affinement de la structure de l'holo-MmNcsA.

Références bibliographiques

Beinert, H. (1983). Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Analytical Biochemistry* 131, 373–378.

Biondi, E., and Burke, D.H. (2012). Separating and Analyzing Sulfur-Containing RNAs with Organomercury Gels. In *RNA Abundance Analysis*, H. Jin, and W. Gassmann, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 111–120.

Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 248–254.

Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2010). *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 66, 12–21.

Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., Block, J.N., Kapral, G.J., Wang, X., Murray, L.W., Arendall, W.B., Snoeyink, J., Richardson, J.S., et al. (2007). MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research* 35, W375–W383.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of *Coot*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 66, 486–501.

Fish, W.W. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 357–364.

Jancarik, J., and Kim, S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* 24, 409–411.

Kao, C., Zheng, M., and Rüdiger, S. (1999). A simple and efficient method to reduce nontemplated nucleotide addition at the 3' terminus of RNAs transcribed by T7 RNA polymerase. *Rna* 5, 1268–1272.

Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology* 33, 491–497.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). *Phaser* crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* 40, 658–674.

Milligan, J.F., Groebe, D.R., Whherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Research* 16.

Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 307–326.

Rossmann, M.G. (1990). The molecular replacement method. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography* 46, 73–82.

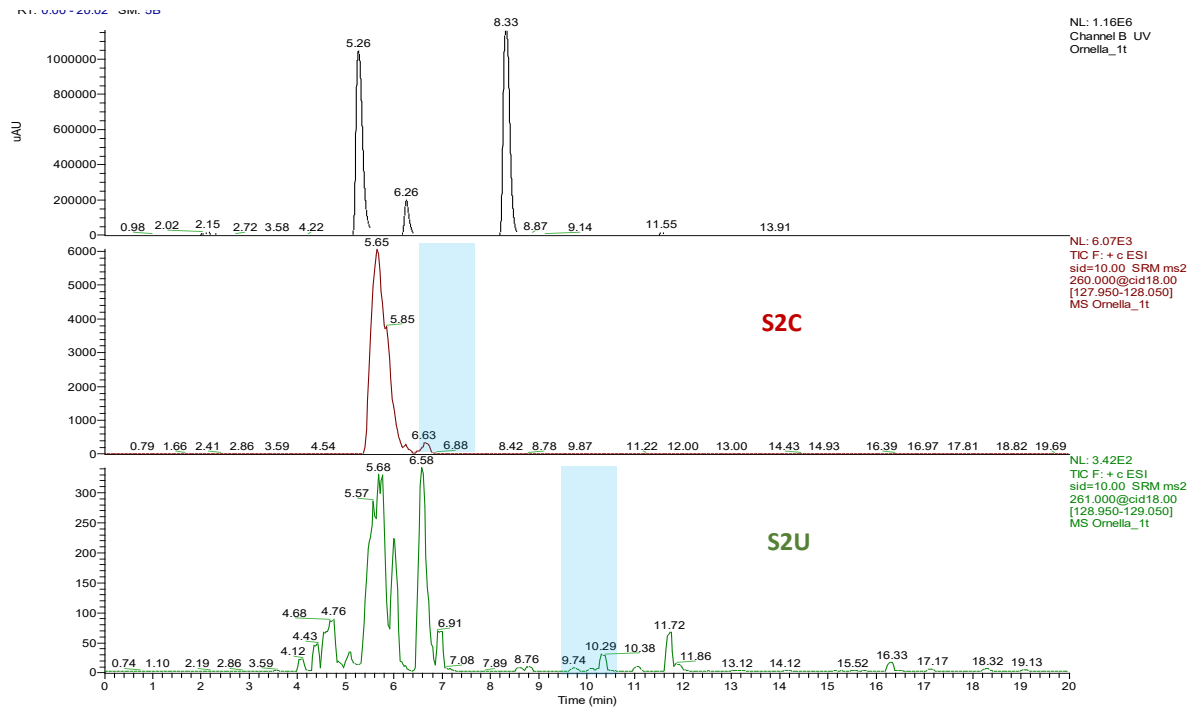
Rossmann, M.G., and Blow, D.M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica* 15, 24–31.

Watts, A. (1993). Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach. *FEBS Letters* 319, 283–284.

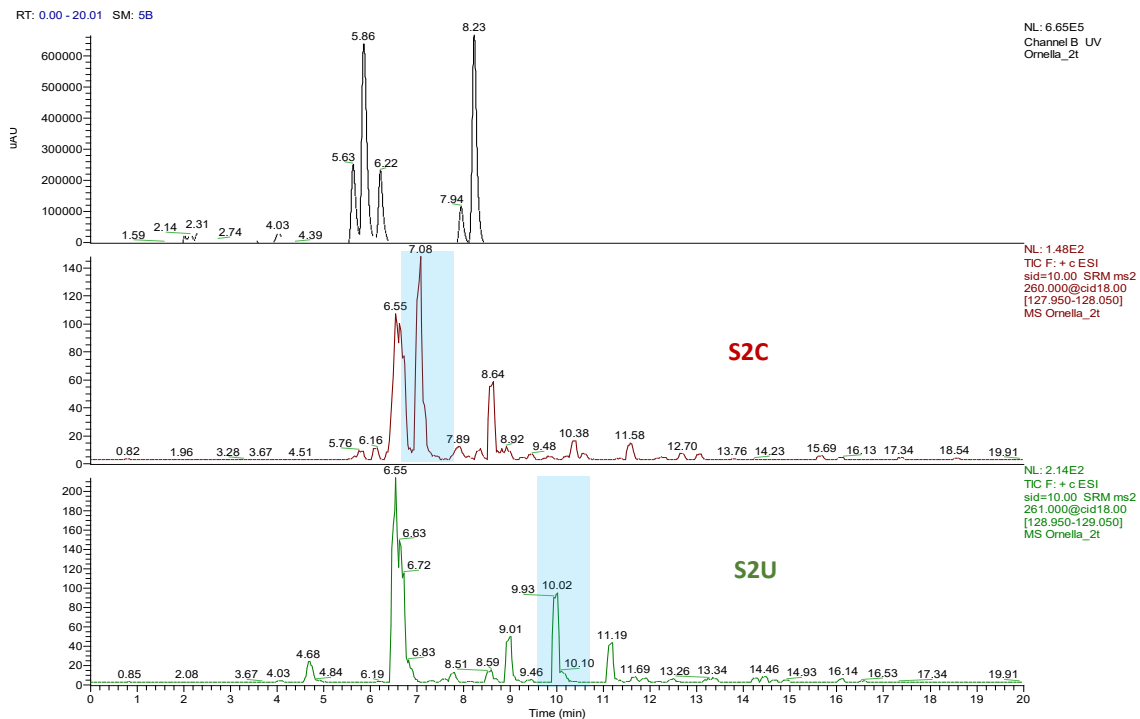
Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A., et al. (2011). Overview of the *CCP 4* suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 67, 235–242.

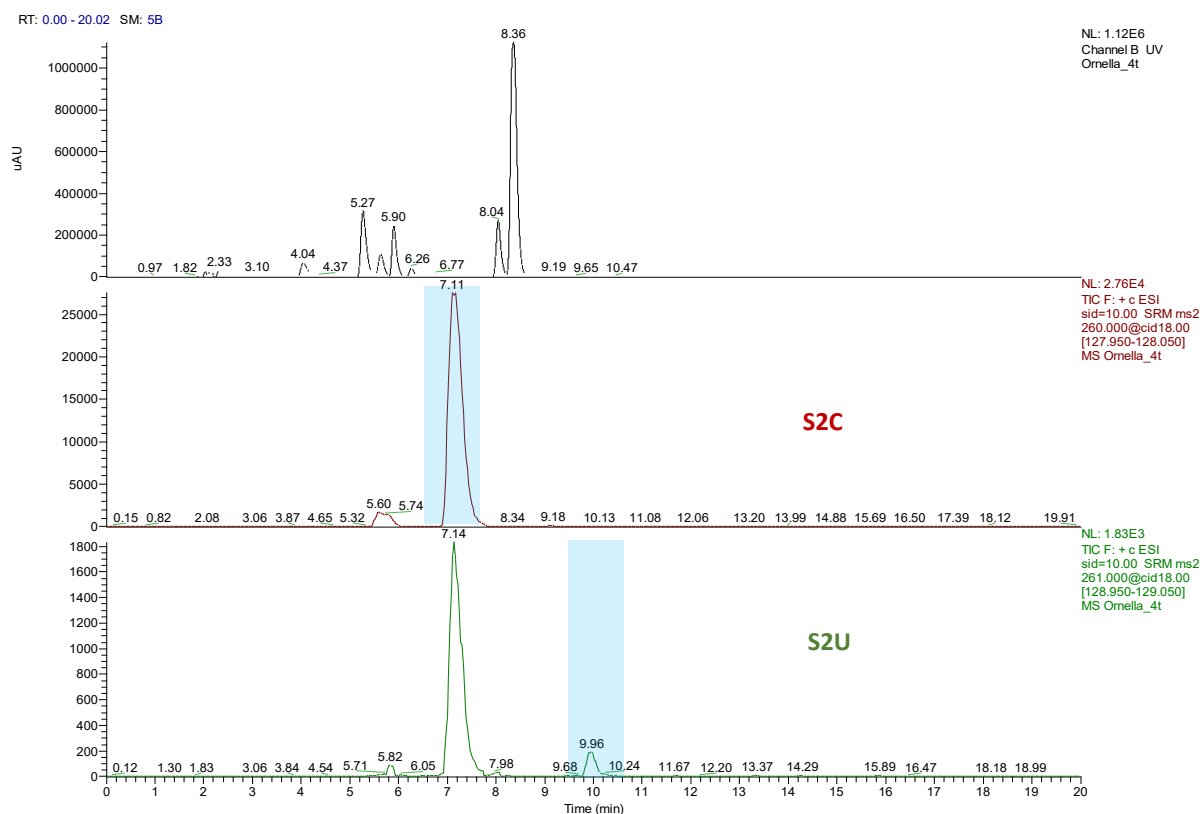
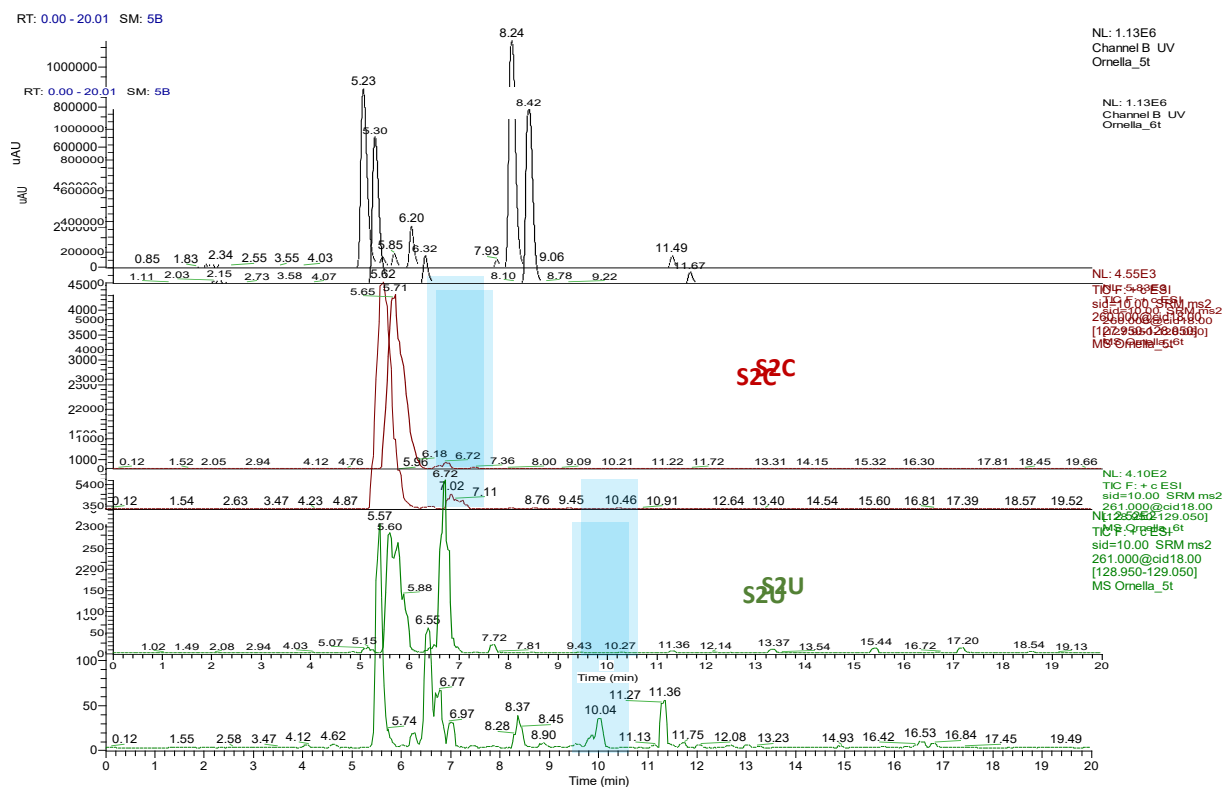
Wlodawer, A., and Hodgson, K.O. (1975). Crystallization and Crystal Data of Monellin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 398–399.

ANNEXES

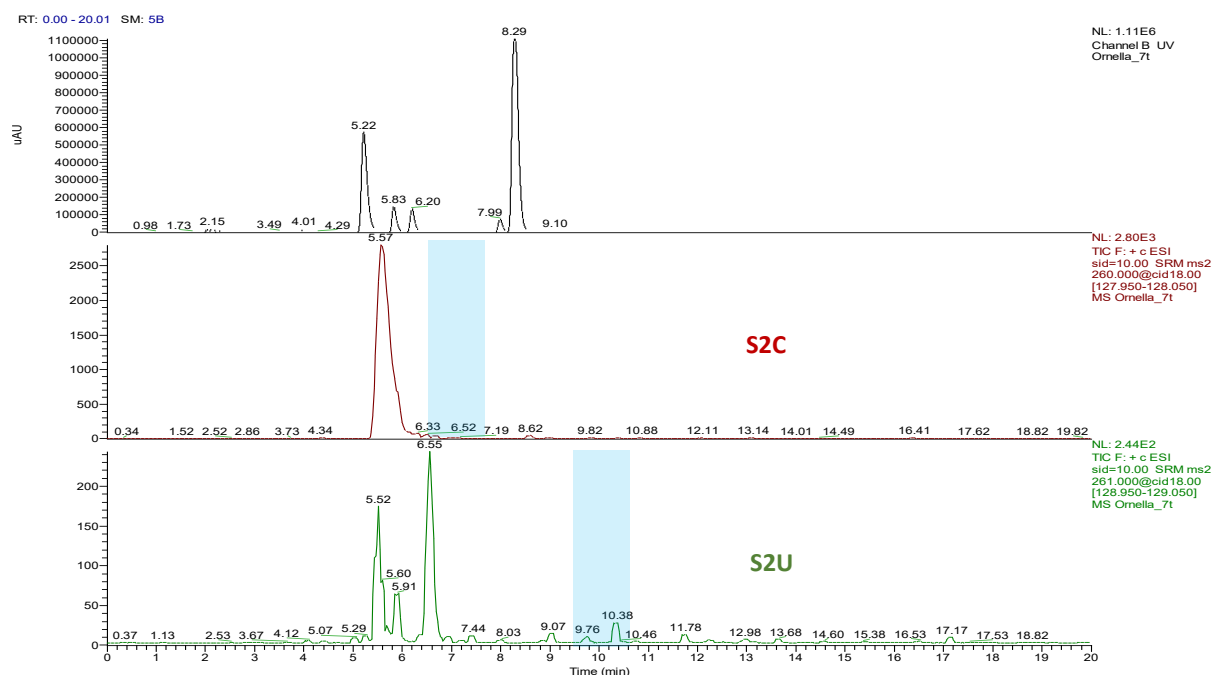
a) ARNt^{Lys}_{UUU} seul

b) Réaction en présence de l'apo-MmNcsA (10 µM)

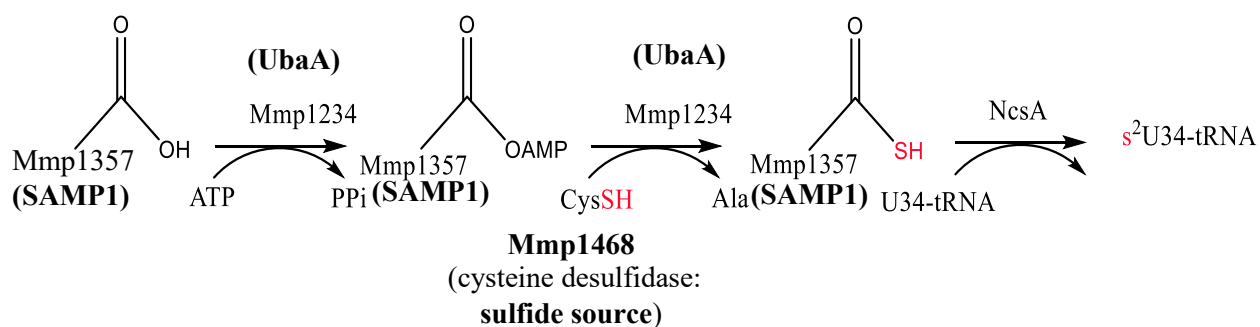


c) Réaction en présence de l'holo-MmNcsA (1 μ M)d) Réaction en absence de sulfure de sodium (Na_2S)e) Réaction en absence d'ions magnésium (MgCl_2)

f) Réaction en absence d'ATP (ATP)



Annexe 1 : Résultats préliminaires des tests d'activité de la protéine MmNcsA dans la condition expérimentale suivante: (a) 20 μM MmARNt^{Lys}_{UUU} est incubé en présence ou non de 500 μM ATP (f), 2,5 mM MgCl₂ (e), de 500 μM Na₂S (d) et (c) 1 μM de l'holo-NcsA (ou (b) 10 μM de l'apo-NcsA) pendant 30 min à 37 °C dans un volume final de 100 μL de 25 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl. L'analyse des nucléotides est réalisée par spectrométrie de masse couplée à l'HPLC, après digestion des produits ARNt. Les transitions de masse correspondant à la perte du ribose de s²C et s²U sont suivies et la position de s²C (chromatogramme marron) et s²U (chromatogramme vert) est surlignée en bleu.



Annexe 3 : Mécanisme de relais du transfert de soufre impliquant les protéines de type ubiquitine chez l'archée *Méthanococcus maripaludis*. Mmp1468 : cystéine désulfidase, source de soufre ; Mmp1234 : protéine UbaA homologue à TtuC ; Mmp1357 : protéine SAMP1 de type ubiquitine et homologue de TtuB (*T. thermophilus*) ou Urm1 (eucaryote) ; protéine NcsA : thiolase de la position U₃₄ des ARNt.

Résumé

Les ARN de transfert (ARNt) sont des composants essentiels de la machinerie de traduction génétique. Pour être fonctionnels, ces ARNt subissent des modifications chimiques post-transcriptionnelles. Ces modifications permettent d'améliorer la reconnaissance entre l'ARNt et ses partenaires durant la traduction et assurent ainsi la fidélité et l'efficacité de la traduction. Le soufre est présent dans plusieurs nucléosides au sein de ces ARNt, comme dérivé de la thiouridine (s^4U_8 , s^2U_{34} , $m^5s^2U_{54}$), de la 2-thioadénosine ($ms^{2i6}A_{37}$, $ms^{2t6}A_{37}$) et la 2-thiocytidine (s^2C_{32}). Mon projet a consisté en l'étude structurale et fonctionnelle de la famille d'enzymes TtcA/TtuA, une superfamille dépendante d'un centre [FeS] impliquée dans la thiolation des ARNt.

La thiolation de la méthyl-uridine universellement conservée à la position 54, catalysée par l'enzyme TtuA, stabilise les ARNt de bactéries thermophiles et d'archées hyperthermophiles et est nécessaire pour la croissance à haute température de ces organismes. La thiolation de l'uridine en position 34 dans la boucle de l'anticodon, qui est nécessaire pour une croissance normale et la résistance aux stress chez la levure, est effectuée par deux systèmes complètement différents : la protéine MnmA qui a été bien étudiée et est présente chez les bactéries et les mitochondries des organismes eucaryotes et les protéines NcsA/NcsA/Ctu1 dans tous les autres organismes, dont le cytoplasme des eucaryotes. Des études spectroscopiques, cristallographique et des tests d'activité de TtuA et NcsA ont montré que: (i) le centre [4Fe-4S] est coordonné par seulement trois cystéines qui sont entièrement conservées, permettant au quatrième fer de fixer du soufre exogène, qui agit probablement comme agent sulfurant ; (ii) le site de fixation de l'ATP est adjacent au centre [4Fe-4S]. Un nouveau mécanisme de sulfuration des ARNt a été proposé, dans lequel l'atome de fer non liant du centre [4Fe-4S] catalytique fonctionne comme transporteur de soufre, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives sur la fonction des centres [Fe-S] en biologie.

Mots Clés :

Modifications des ARNt, Thiolase, s^2U_{34} , s^2T_{54} , centre [Fe-S], Diffraction des rayons X.

Abstract

Transfer RNAs are essential components of cellular translation machinery. To achieve their function they possess several post-transcriptional chemical modifications. These modifications improve recognition between tRNA and its partners during translation and thus ensure translation fidelity and efficiency. Sulfur is present in several of these modified nucleosides: as thiouridine and its derivatives (s^4U_8 , s^2U_{34} , $m^5s^2U_{54}$), 2-thioadenosine derivatives ($ms^{2i6}A_{37}$, $ms^{2t6}A_{37}$) and 2-thiocytidine (s^2C_{32}). My project consisted in the structural and functional study of enzymes of the TtcA/TtuA family a [4Fe-4S]-dependent superfamily, involved in the thiolation of transfer RNAs (tRNAs). My aim was to show that enzymes that catalyze the simple non-redox substitution of the C2-uridine carbonyl oxygen by sulfur at position 54 (TtuA) and 34 (Ncs6/Ctu1/NcsA) in tRNAs use an iron-sulfur cluster cofactor and elucidate the biochemical and structural mechanisms of the TtuA and NcsA reactions.

The thiolation of the universally conserved methyl-uridine at position 54, catalyzed by TtuA, stabilizes tRNAs from thermophilic bacteria and hyperthermophilic archaea and is required for growth at high temperature of these organisms. On the other hand, the thiolation of uridine 34 in the anticodon loop of tRNAs, which is required for normal growth and stress resistance in yeast, is carried out by two completely different systems: the well-studied MnmA protein (present in bacteria and in the eukaryotic mitochondrion) and the Ncs6/NcsA/Ctu1 proteins in all other organisms, including the eukaryotic cytoplasm. Spectroscopic and crystallographic analysis, together with activity tests enzymatic of TtuA and NcsA showed that: (i) the [4Fe-4S] cluster is ligated by three cysteines only that are fully conserved, allowing the fourth unique iron to bind an exogenous sulfide, which likely acts as the sulfurating agent; (ii) the ATP-binding site is adjacent to the cluster. A new mechanism for tRNA sulfuration was proposed, in which the unique iron of the catalytic [4Fe-4S] cluster functions as a sulfur carrier, opening new perspectives regarding functions of iron-sulfur cluster in biology.

Keywords:

tRNA modifications, Thiolase, s^2U_{34} , s^2T_{54} , [Fe-S] cluster, X-ray diffraction.