



De l'analyse fonctionnelle d'ARNt nucléotidyltransférases vers leur caractérisation par cristallographie sérielle sous rayonnement X

Mon travail de doctorat a été réalisé sous la supervision du Dr. Claude Sauter (ARN - IBMC - CNRS, Université de Strasbourg) et du Prof. Dr. Mario Mörl (Biochimie et Biologie Moléculaire, Université de Leipzig) dans le cadre d'un programme de cotutelle soutenu par l'Université franco-allemande. Son objectif principal était l'application de nouvelles approches de cristallographie aux rayons X à l'étude d'une classe spécifique de polymérases, appelées *enzymes d'addition de CCA*, catalysant l'addition de la queue 3' CCA des ARN de transfert (ARNt).

La dernière décennie a été marquée par d'importants développements technologiques dans le domaine de la biologie structurale, en particulier dans la cristallographie aux rayons X. L'introduction d'accélérateurs linéaires d'électrons appelés lasers à électrons libres à rayons X (XFEL) représente une véritable révolution pour explorer la catalyse enzymatique à l'échelle atomique. Basé sur la cristallographie sérielle aux rayons X résolue dans le temps, ce système est utilisé pour suivre les réactions chimiques et biologiques se déroulant à l'échelle du femto à la micro-seconde (Chapman *et al.*, 2011). Inspirés par ce concept, les synchrotrons de nouvelle génération ont développé des lignes de lumière dédiées aux expériences résolues en temps (*TR-SSX*), telle la ligne T-REXX du synchrotron DESY (Hambourg) (Pearson & Mehrabi, 2020).

Ce projet de thèse vise à développer un pipeline reproductible pour la préparation et la caractérisation d'échantillons adaptés aux expériences *TR-SSX*. Nous nous concentrons sur les ARNt nucléotidyltransférases ou *CCA-adding enzymes* qui catalysent l'addition séquentielle du trinucleotide CCA en position 3' des ARNt. Cette réaction est cruciale, car l'extrémité CCA est le site universel de liaison des acides aminés aux ARNt qui les transportent ensuite vers le ribosome. Ces nucléotidyltransférases se distinguent de toutes les autres polymérases, car elles ne nécessitent aucune matrice nucléotidique pour accomplir leur action (Augustin *et al.*, 2003).

Afin d'obtenir des instantanés des différentes étapes de l'addition du CCA, nous avons choisi trois enzymes de classe II. Notre premier candidat était l'enzyme d'une bactérie psychrophile *Planococcus halocryophilus* (PhaCCA) vivant à une concentration élevée de sel et à des températures négatives dans le permafrost arctique (Mykytczuk *et al.*, 2013). Le second a été identifié chez le ver parasite du moustique *Romanomermis culicivorax* (RcuCCA), organisme présentant les plus petits ARNt fonctionnels jamais observés (de 42 à 46 nucléotides) (Jühling *et al.*, 2018). Enfin notre dernier candidat correspondait à un potentiel ancêtre commun (AncCCA) de l'enzyme du groupe des gammaproteobactéries reconstruite par mon équipe de Leipzig.

Pour commencer, nous devons déterminer les propriétés biochimiques de ces enzymes. Comme l'étude était déjà faite pour PhaCCA et AncCCA, j'ai pu participer à l'étude de RcuCCA,



capable de traiter des ARNt minimaux dépourvus de bras T et D. Alors que les complexes conventionnels ARNt:nucléotidyltransférase montrent une interaction et un ancrage sur le bras T de l'ARNt (Weiner, 2004), la question principale concernait les éléments de RcuCCA donnant la spécificité pour de tels substrats. L'étude a inclus l'enzyme d'*Escherichia coli* (EcoCCA) et humaine (HsaCCA) comme contrôles. Tout d'abord, mon équipe de Leipzig a établi que RcuCCA est capable de se lier et d'ajouter l'extrémité CCA complète à un ARNt canonique, tout comme HsaCCA et EcoCCA. Cependant, seule RcuCCA peut traiter les ARNt miniaturisés du ver. Ensuite, un ensemble de chimères a été conçu en injectant dans HsaCCA des fragments de RcuCCA supposés être impliqués dans la liaison des ARNt. Nous avons ensuite analysé l'affinité de cet ensemble d'enzymes chimériques pour les petits ARNt par retard sur gel (EMSA). En combinant les résultats biochimiques et un modèle computationnel de RcuCCA, nous avons mis en évidence le rôle important de deux lysines du centre catalytique dans la stabilité de la liaison des petits ARNt et l'orientation correcte de l'amorce 3' dans le site catalytique. Tous les résultats décrits ci-dessus ont été publiés dans *International Journal of Molecular Sciences* (Hennig *et al.*, 2020).

Une fois les caractéristiques biochimiques d'une enzyme établies, les expériences de cristallisation peuvent commencer. D'une part, nous avons essayé de faire croître des macrocristaux adaptés à des analyses synchrotron « traditionnelles ». D'autre part, l'objectif était de préparer des échantillons microcristallins dédiés aux expériences de cristallographie sérielle. Dans cet objectif, nous avons combiné des méthodes conventionnelles, c'est-à-dire la diffusion de vapeur dans des microplaques, l'ensemencement microcristallin et le batch, avec des méthodes plus avancées décrites dans cette thèse. L'une de ces techniques repose sur un dispositif microfluidique, appelé ChipX, développé par mon laboratoire à Strasbourg. Conçue pour les expériences de contre-diffusion, la ChipX permet de cribler huit cristallisants différents dans une large gamme de concentrations et d'états de sursaturation. De plus, la ChipX peut être utilisée directement à température ambiante sur des installations synchrotron standard. En se basant sur la cristallographie sérielle, nous avons collecté plusieurs jeux de données sur une sélection de cristaux et les avons combinés pour reconstruire la structure de la macromolécule. La version finale de ChipX a été présentée dans le journal de l'IUCr où la structure du PhaCCA psychrophile a été résolue dans sa forme apo ainsi qu'avec le CMPcPP non hydrolysable (de Wijn *et al.*, 2019). En outre, nous avons élaboré un protocole pour tout cristallographe n'étant pas familier avec de tels dispositifs. Avec quelques microlitres de solution de macromolécules et un équipement de laboratoire de base, nous avons montré dans une vidéo publiée dans *Journal of Visualized Experiments*, comment préparer une ChipX en quelques minutes et l'utiliser pour la collecte de données sur une ligne de faisceau synchrotron standard (de Wijn *et al.*, 2021).

Pendant longtemps, l'un des principaux obstacles de la cristallisation a été de déterminer le



diagramme de phase exact d'une macromolécule sans avoir le contrôle total du processus d'équilibration qui se produit dans la goutte. Avec un besoin croissant de micro- ou nanocristaux utilisés dans les synchrotrons et les XFELs, notre laboratoire, en collaboration avec la société Xtal concept (Hambourg) et l'équipe du Prof. Christian Betzel, a acquis le Xtal Controller (XC900). Cette technologie permet de (1) naviguer dans le diagramme de phase avec une injection contrôlée de cristallisant et d'eau dans une goutte expérimentale, (2) détecter et suivre les premiers événements de nucléation grâce au module intégré de diffusion dynamique de la lumière (DLS), (3) visualiser les cristaux en croissance avec un microscope couplé à une caméra CCD. En utilisant comme modèles PhaCCA et le lysozyme de poule combinés avec le nucléant Tb-Xo4, nous avons montré que nous étions capables (1) de suivre efficacement la formation précoce des nucléi, (2) de contrôler la production de cristaux bien diffractants en jouant sur les cycles de cristallisation/dissolution, (3) d'établir des conditions reproductibles pour obtenir des échantillons micro-cristallins stables et adaptés aux expériences résolues en temps. Tous ces résultats ont été rassemblés et publiés dans la revue *Crystals* en 2020 (de Wijn *et al.*, 2020).

Une part importante de ce projet consistait à la préparation et la purification des trois enzymes cibles, ainsi que des ARNt transcrits *in vitro*. En outre, toutes les méthodes de cristallisation disponibles dans l'équipe de Strasbourg ont été utilisées pour obtenir des échantillons cristallins. Un accent particulier a été mis sur AncCCA qui a initialement formé des cristaux diffractant autour de 6 Å sur la ligne PX2A (synchrotron Soleil, Saint-Aubin). Pour ce projet, nous avons eu accès, en tant que premiers utilisateurs, à un système de criblage de plaques récemment développé sur la ligne PX2A pour des expériences *in situ* à température ambiante (Jeangerard *et al.*, 2018). Ce nouveau système permet d'identifier rapidement les conditions conduisant à des cristaux à haut pouvoir diffractant sans avoir besoin de les manipuler directement. Malgré tous les efforts, nous n'avons pas obtenu de diffraction à une résolution inférieure à 6 Å jusqu'à présent, mais quelques améliorations sont en cours.

La dernière étape de notre pipeline est complémentaire aux expériences à résolution temporelle. Elle vise à déterminer les structures d'enzymes sélectionnées afin de mieux comprendre (1) leur architecture globale, (2) d'identifier leurs propriétés à l'échelle atomique, (3) de servir de modèle pour le remplacement moléculaire dans les expériences résolues en temps.

Ainsi, nous avons utilisé les cinq structures cristallines de PhaCCA avec les résultats biochimiques de l'équipe de Leipzig pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents d'adaptation au froid de cette enzyme. D'après le mécanisme principal d'adaptation au froid, une flexibilité accrue de l'enzyme devrait lui conférer la capacité de remplir son rôle à basse température. Ce postulat est compatible avec l'activité de fidélité réduite prouvée pour PhaCCA (Ernst *et al.*, 2018). Pour déterminer les caractéristiques structurales exactes de cette protéine, nous l'avons comparée à



l'analogue provenant du thermophile *Geobacillus stearothermophilus* (GstCCA). Comme prévu, nos résultats ont montré une flexibilité globale accrue de PhaCCA, affectant principalement le côté C-terminal non conservé où une quantité réduite de structures secondaires a été observée. En outre, le motif C en N-terminal, permettant la réorientation du domaine de la tête et du cou pendant le changement de nucléotide, perd un élément de coiffage d'hélice. Ensemble, nos structures à haute résolution ont mis en évidence les stratégies d'adaptation utilisées par les ARN polymérases dans des conditions de froid extrême. Nos résultats ont été publiés dans *Computational and Structural Biotechnology Journal* (de Wijn *et al.*, 2021).

En conclusion, ce travail de thèse a appliqué un ensemble d'outils et de stratégies disponibles en cristallogénèse pour caractériser la structure et la fonction de trois enzymes d'addition de CCA de classe II par cristallographie à rayons X. Des améliorations doivent encore être apportées, notamment dans le cas de AncCCA et de RcuCCA. Cependant, nos résultats prometteurs devraient bientôt nous conduire à l'étape suivante, à savoir l'application de nouveaux protocoles de cristallographie sérielle grâce aux radiations synchrotron et XFEL pour créer un film moléculaire de l'addition 3'CCA en temps réel et documenter avec de grands détails atomiques l'action de ces fascinantes polymérases.