Université Louis Pasteur de Strasbourg Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé



# Doctorat

Discipline : Sciences du Vivant

# **Quentin VICENS**

Structures cristallographiques de complexes entre des fragments d'acides ribonucléiques comportant le site A ribosomique et des antibiotiques de la famille des aminoglycosides

Soutenu le jeudi 19 décembre 2002

Jury :

Pr Bernard EHRESMANN Dr Jean-Pierre GUILLOTEAU Dr Alberto D. PODJARNY Pr Marina V. RODNINA Pr Eric WESTHOF Président et examinateur Rapporteur externe Rapporteur interne Rapporteur externe Directeur de thèse

# Remerciements



# **Table des matières**

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	11
I. Origines et propriétés des antibiotiques	11
A. Historique des maladies infectieuses et de leurs traitements	11
B. Les antibiotiques : une découverte scientifique majeure du XX <sup>e</sup> siècle	12
C. Classification générale des antibiotiques	14
II. Les aminoglycosides : généralités	17
A. Classification des aminoglycosides	17
B. Caractéristiques	20
1) Spectre d'action	20
2) Le site A comme cible cellulaire	21
3) Mode d'action	21
C. Les traitements aux aminoglycosides : le revers de la medaille	23
2) Phénomènes de résistance	23 25
	20
A Caractérisation biochimique	<b>30</b>
1) Concentrations minimales d'inhibition	30
2) Cartographie aux sondes chimiques	31
3) Constantes de dissociation	32
B. Etudes par résonance magnétique nucléaire	34
C. Etudes par cristallographie aux rayons X	37
D. Confrontation des résultats des différentes études structurales	42
IV. Etudes structurales d'autres complexes	45
V. Revue des interactions ARN/aminoglycosides	47
VI. Présentation des résultats de ce travail de thèse	61
CHAPITRE 2 : STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DE TROIS	
COMPLEXES SITE A/AMINOGLYCOSIDES	63
I. Les étapes depuis la conception jusqu'à la diffraction	63
A. Conception des oligoribonucléotides	63
B. Synthèses chimiques et purifications	67
1) Résultats	67
2) Problèmes de déprotection	71
3) Problèmes de purifications par HPLC	74
C. Recherche de conditions de renaturation	76
1) Résultats des antibiogrammes	76
2) Résultats des expériences de fusion	77
3) Résultats des expériences par PAGE	79
D. Cristallisation et premiers essais de diffraction	80
<ol> <li>Cristallogénèse dos fragmente F3 et A1</li> </ol>	8U 0 1
2) Cristallogénèse du fragment A3	81 82
4) Ontimisation des conditions de cristallisation	82
5) Expériences de micro- et macro-ensemencement	93
E. Cristallisation de différents complexes	94
1) Cristallisation de complexes contenant la tobramycine	94
2) Cristallisation de complexes contenant la généticine	95

<ul> <li>3) Cristallisation de complexes contenant différents aminoglycosides</li> <li>4) Cristallisation en présence de cations, sans inhibiteur</li> <li>5) Cristallisation d'autres fragments</li> </ul>	95 98 98
II. Structure tridimensionnelle du complexe site A/paromomycine (Publication 1)	101
III. Structure tridimensionnelle du complexe site A/tobramycine (Publication 2)	115
IV. Structure tridimensionnelle du complexe site A/généticine (Publication 3)	127
CHAPITRE 3 : DIFFERENTS ASPECTS DE LA RECONNAISSANCE MOLECULAIRE DES AMINOGLYCOSIDES	149
<ul> <li>I. Comparaison avec les aminoglycosides liés aux enzymes de résistance <ul> <li>A. Analyse conformationnelle des aminoglycosides</li> <li>B. Structures tridimensionnelles des sites de fixation</li> <li>C. Implication des molécules d'eau dans la reconnaissance moléculaire</li> <li>D. Vers la conception de nouveaux inhibiteurs</li> </ul> </li> </ul>	<b>149</b> 151 153 156 158
<ul> <li>II. Comparaison avec des oligosaccharides fixés par des protéines</li> <li>A. Vues générales des structures tridimensionnelles de quelques complexes</li> <li>B. Analyse structurale des sites de fixation</li> </ul>	<b>160</b> 161 163
III. Rôle des molécules d'eau dans la reconnaissance	166
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS	169
CHAPITRE 5: PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	175
I. Conception de fragments incorporant le site A de l'ARN 16S	175
<ul><li>II. Synthèse chimique d'ARN en phase solide</li><li>A. Cycle de synthèse chimique</li><li>B. Déprotection des oligoribonucléotides</li><li>C. Calcul du rendement de synthèse</li></ul>	<b>175</b> 175 178 178
<ul> <li>III. Purification et analyse des fragments d'ARN <ul> <li>A. Chromatographie échangeuse d'ions</li> <li>B. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) <ul> <li>1) PAGE analytique</li> <li>2) PAGE préparative</li> </ul> </li> <li>C. Dosage de l'ARN</li> <li>D. Spectrométrie de masse MALDI-TOF</li> </ul></li></ul>	<b>179</b> 179 181 181 181 182 182
<ul> <li>IV. Etudes de renaturation et de stabilité en solution des complexes ARN/aminoglycosides</li> <li>A. Températures de fusion</li> <li>B. Antibiogrammes</li> <li>C. Etude par PAGE</li> </ul>	<b>183</b> 183 184 185
V. Cristallogénèse et cristallisation	185
VI. Cristallographie aux rayons X A. Résolution des structures tridimensionnelles B. Validation des structures tridimensionnelles	<b>185</b> 185 185
BIBLIOGRAPHIE	187

# Abréviations

A <sub>260</sub>	Absorbance mesurée à la longueur d'onde de 260 nm
ACE	2'-bis-(acétoxyethoxy)-méthyle éther
ADIT	Auto dep. input tool (outil de déposition automatique)
APS	Ammonium persulphate (persulfate d'ammonium)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ASWY	Average stepwise yield (rendement moyen par étape)
ASR-27	Oligoribonucléotide de 27 nucléotides contenant le site A
CPG	Controlled pore glass (bille de verre de diamètre contrôlé)
DMT	Diméthoxytrityle
DOS	Désoxystreptamine
EDTA	Acide éthylène diamine N,N,N',N'-tétraacétique
ESRF	European synchrotron radiation facility (installation européenne de rayonemment synchrotron)
FMN	Flavine mono-nucléotide
HDV	Virus de l'hépatite delta
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HEPES	Acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)
HPLC	High pressure liquid chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)
K <sub>D</sub>	Constante de dissociation
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (désorption-laser ionique assistée par matrice-mesure du temps de vol)
MES	Acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique
MPD	2,4-méthylpentanediol
nt	Nucléotide
OY	Overall yield (rendement global)
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis (electrophorèse sur gel de polyacrylamide)
PDB	Protein Data Bank
PEG-400	Polyéthylène glycol de poids moléculaire 400
PM	Poids moléculaire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMS	Root mean square (écart quadratique moyen)
RRE	Rev responsive element
SA	Sulfate d'ammonium
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
site A	Site de décodage de l'ARNt aminoacylé

SLi	Sulfate de lithium
SPR	Surface plasmon resonance
TAR	Transactivating responsive element
TBDMS	Tertiobutyldiméthylsilyl
TBE	Tris-borate-EDTA
TCA	Acide trichloroacétique
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthylènediamine
Tm	Température de fusion
TS	Thymidilate synthase
W	Atome d'oxygène de la molécule d'eau

La nature représente une succession de miracles.

L'homme ne peut pas l'améliorer ; il ne peut que la modifier.

Peter Benchley



# **Chapitre 1**

# Introduction

# I. Origines et propriétés des antibiotiques

# A. Historique des maladies infectieuses et de leurs traitements

Les bactéries, les virus, certains champignons et parasites, appartiennent à la famille des « organismes vivants invisibles à l'œil nu » appelés « microbes » ou « micro-organismes ». Les microbes, qui constituent la plus ancienne forme de vie sur Terre, se retrouvent en grand nombre dans l'environnement et participent au bon fonctionnement de notre écosystème (Pace 1997). Par exemple, plus de la moitié de l'oxygène présent dans l'atmosphère est produit par des micro-organismes (source : « Microbeworld » ; www.microbeworld.org). Une faible proportion de ces microbes est responsable de manifestations spectaculaires redoutées par les hommes : les maladies infectieuses. Depuis l'origine des temps, les hommes sont en effet la cible de maladies infectieuses (Armelagos 1998). Certaines études archéologiques ont permis l'identification de traces d'infections dans des ossements vieux de millions d'années et d'autres suggèrent que le pharaon Ramsès V serait mort de la variole il y a 3000 ans. Athènes, la capitale de la Grèce, fut décimée par une épidémie de typhus en 331 av. J.-C. De nombreuses autres maladies « célèbres » causées par des microbes, telles la peste, le choléra et la lèpre, ont ravagé la population mondiale au cours des siècles. De nos jours encore, des fléaux infectieux tels le paludisme et le SIDA sont responsables de la mort de plusieurs millions de personnes chaque année. C'est pourquoi les hommes ont toujours cherché à se protéger et/ou se guérir de ces infections.

Au cours des siècles, ils ont découvert des remèdes de manière fortuite ou empirique. Dans l'Antiquité, l'encens et la myrrhe, sécrétés par des arbres du Moyen-Orient, étaient utilisées pour panser les plaies et entraient dans la préparation des produits utilisés pour l'embaumement (Pelt 2001). Les guerriers grecs se soignaient de leurs blessures grâce à des moisissures qu'ils grattaient sur les murs. Hippocrate (460-377 av. J.-C.) a sauvé les principales villes grecques de la peste en allumant de grands feux dégageant des composés aromatiques. En l'an 1000, les Chinois s'imunisaient contre la variole en inhalant des poudres provenant des crôutes séchées que cette infection provoque. En cas d'infections cutanées, ils appliquaient des graines de soja moisies sur les lésions. Toutes ces traditions perpétuées à travers les générations constituent les origines des traitements anti-infectieux actuels.

Une importante contribution occidentale à la connaissance et à la prévention des maladies infectieuses a été apportée par les savants des XVIII<sup>e</sup> et XIX<sup>e</sup> siècles. Leurs recherches ont été les premières à établir le lien entre un type de maladie et un agent pathogène déterminé, un des principes de base de la médecine actuelle. Ainsi, en 1796, le médecin britannique Edward Jenner effectua la première vaccination contre la variole à partir de souches virales atténuées. Robert Koch fut en 1873 le premier à identifier le bacille responsable de la tuberculose. Dans les années 1880, Louis Pasteur découvrit le staphylocoque, responsable de furonculoses sévères, puis réussit a stimuler l'imunisation contre certaines maladies (choléra, rage) par des inocculation d'agents pathogènes atténués. Les avancées foudroyantes de la recherche scientifique au XX<sup>e</sup> siècle ont permis la première éradication planétaire par vaccination d'une maladie, la variole.

# B.Les antibiotiques : une découverte scientifique majeure du XX<sup>e</sup> siècle

A l'aube du XX<sup>e</sup> siècle, suite à la mise en évidence des relations existant entre une maladie infectieuse et un agent pathogène précis, naquit le concept de « chimiothérapie antibactérienne » (source : « Biologie et Recherche » ; www.123bio.net). Des substances chimiques spécifiques isolées, correctement administrées, sont capables de détruire les organismes infectieux tout en laissant l'hôte infecté intact, conduisant ainsi à sa guérison. Ce concept constitue aujourd'hui encore le guide principal dans la recherche d'agents anti-infectieux actifs contre les bactéries, contre les virus ou contre les prions (source : « Antimicrobial chemotherapy » ; www.bmb.leeds.ac.uk).

Déjà en 1889, Jean-Antoine Villemin avait proposé le terme « antibiote » pour désigner tout « principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie » (source : « Cours de bactériologie générale » ; www.microbes-edu.org). En 1908, le Prix Nobel de médecine fut attribué à Paul Ehrlich pour sa mise au point du « salvarsan », composé contenant de l'arsenic qui tue les spirochètes responsables de la syphilis. Vingt ans plus tard, Sir Alexander Fleming remarqua qu'une moisissure de type

*Penicillium* était capable d'inhiber la croissance des staphylocoques. A la fin des années 1930, Domagk et Tréfouël démontrèrent l'action d'un sulfamide sur certaines souches de streptocoques. Pendant la Seconde guerre mondiale, les chercheurs Ernst Boris Chain et Sir Howard Walter Florey poursuivirent les travaux de Fleming et isolèrent la « pénicilline » puis déterminèrent sa formule chimique. Les premiers médicaments à base de pénicilline furent fabriqués industriellement aux Etats-Unis dès 1942 et



permirent de sauver plusieurs millions de vies humaines (Figure 1.1). Ce fut la porte ouverte à la recherche de principes actifs chez d'autres organismes (moisissures de fruits, bactéries filamenteuses vivant dans le sol, ...) permettant d'enrayer l'essentiel des infections bactériennes connues. En 1941, le terme « antibiotique » fut proposé par Selman Waksman pour désigner « toute substance chimique produite par un micro-organisme capable d'inhiber le développement et de détruire d'autres micro-organismes en solution diluée » (Denis, et al. 2001). Au cours des décennies suivantes, l'arsenal anti-bactérien n'a cessé de s'enrichir de nouveaux antibiotiques. La streptomycine fut isolée à partir de Streptomyces griseus (1943), le chloramphénicol à partir de Streptomyces venezualaela (1947), la chlortétracycline à partir de *Streptomyces aureofaciens* (1948), l'érythromycine à partir de Streptomyces erythreus (1952), etc. Depuis les années 1950-60, de multiples dérivés semi-synthétiques d'antibiotiques naturels (par exemple la fluoroquinolone), rendus plus actifs par ajout de divers substituants, et des antibiotiques entièrement synthétiques (par exemple l'azithromycine) sont commercialisés par les entreprises pharmaceutiques. Ils s'agit toutefois uniquement de molécules appartenant à des classes d'antibiotiques déjà connues. En effet, au cours des trente dernières années, les connaissances scientifiques n'ont permis la découverte que d'une seule nouvelle famille d'antibiotiques non-naturels, celle des oxazolidinones (Slee, et al. 1987 ; Swaney, et al. 1998). Aujourd'hui, les traitements anti-bactériens à base d'antibiotiques, appelés « antibiothérapies », sont largement prescrits. En 1997, la commercialisation des antibiotiques représentait un marché mondial de 16 milliards d'euros (Carbon et Bax 1998). En France, près de 60 millions de prescriptions de traitements antibiotiques sont délivrées en ville chaque année (source : « Economie de la santé » ; www.medcost.fr). En provoquant une importante diminution du taux de mortalité, la découverte des antibiotiques a profondément bouleversé la médecine moderne.

## C. Classification générale des antibiotiques

Afin de faciliter leur application thérapeutique, les antibiotiques ont été classés en différentes familles, subdivisées en groupes et sous-groupes. Les critères de classification sont (i) le mode d'action, (ii) l'origine, (iii) la nature chimique, (iv) la modalité d'action et (v) le spectre d'action. Ainsi, à une parenté structurale s'affilie un mode d'action semblable ainsi qu'une modalité d'action et un spectre d'action particuliers. Les cibles bactériennes principales sont la paroi, la membrane plasmique, l'appareil de synthèse des acides nucléiques, certaines enzymes impliquées dans le métabolisme (Tableau 1.1). L'appareil de synthèse des protéines constitue à lui seul la cible d'environ la moitié des antibiotiques connus (Tableau 1.2) (sources : « Cours de bactériologie générale » ; www.microbes-edu.org/« Pharmacologie » ; www-sante.ujf-grenoble.fr/« Biologie et Recherche » ; www.123bio.net). Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la famille des aminoglycosides, antibiotiques qui interfèrent avec la synthèse des protéines.

synthèse des proteines.										
Mode d'action	Classe d'antibio- tiques	Exemple	Origine	Nature chimique	Modalité d'action	Spectre d'action				
Attaque de la paroi	β-lactamine	Pénicilline G	Penicillium notatum		Inhibition des transpeptidases	Gram +				
	Glycopeptide	Vancomycine	Streptomyces orientalis	Sucres et acides aminés fixés sur un heptapeptide comportant 5 cycles aromatiques	Blocage de la synthèse du peptidoglycane	Gram +				
Attaque de la membrane plasmique	Polymixine	Polymixine B	Bacillus polymyxa	Polypeptide de 10 acides aminés	Interaction avec les phospholipides membranaires et complexation aux endotoxines	Gram -				
Attaque de la synthèse des acides nucléiques	Rifamycine	Rifampicine	Streptomyces nocardia mediterranei		Inhibition de l'ARN polymérase-ADN dépendante	Gram + / Gram -				
	Quinolone	Acide nali- dixique	Synthèse chimique		Blocage de la réplication de l'ADN par inhibition de l'ADN gyrase	Gram -				
Attaque du métabolisme de l'acide folique	Sulfamide	Sulfadiazine	Synthèse chimique		Inhibition de la dihydrofolate synthétase	Gram + / Gram -				
	Diaminopyridine	Triméthoprime	Synthèse chimique		Inhibition de la dihydrofolate réductase	Gram + / Gram -				

Tableau 1.1 : Les différentes classes d'antibiotiques autres que ceux interférant avec la	а
synthèse des protéines.	

Classe	Exemple	Origine	Nature chimique	<b>Modalité</b> d'action	Spectre
Aminoglycoside	Néomycine	Streptomyces fradiae	NH5+ HO OF NH5+ HO OF OF OF OH HO OH OH OH	Induction d'erreurs dans la traduction par fixation au site A dans la sous-unité 30S	Gram + / Gram -
Tétracycline	Chlortétracycline	Streptomyces aureofaciens		Inhibition de la fixation de l'ARN de transfert aminoacylé à la sous-unité 30S	Gram + / Gram -
Oxazolidinone	Linezolid	Synthèse chimique		Inhibition de l'association des sous- unités 30S et 50S	Gram +
Macrolide	Erythromycine	Streptomyces erythreus		Induction d'erreurs dans la traduction par fixation au site P dans la sous-unité 50S	Gram +
Phénicolé	Chloramphénicol	Streptomyces Venezualae		Inhibition de l'activité peptidyl-transférase par laison à la sous- unité 50S	Gram + / Gram -
Lincosamide	Lyncomycine	Streptomyces lincolnensis		Induction d'erreurs dans la traduction par fixation au site P dans la sous-unité 50S	Gram +
Synergistine	Streptogramine A Streptogramine B	Streptomyces graminofaciens	$\left  \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\$	Action synergique au niveau de la sous- unité 50S : inhibition de la fixation de l'ARN de transfert au ribosome et inhibition de la traduction de l'ARN messager	Gram + / Gram -
Acide fusidique	Acide fusidique	Fusidium coccineum		Fixation au facteur d'élongation de la traduction EF-G, empêchant la fixation de l'ARN de transfert aminoacylé	Gram +

Tableau 1.2 : Les différentes classes of	d'antibiotiques interférant ave	ec la synthèse des protéines.
--	---------------------------------	-------------------------------

# II. Les aminoglycosides : généralités

## A. Classification des aminoglycosides

Les aminoglycosides sont des bases faibles, cationiques à pH physiologique (Botto et Coxon 1983 ; Kaul et Pilch 2002), et solubles dans l'eau. Ils contiennent un cycle à 6 atomes de carbone de type aminocyclitol relié par des liaisons glycosidiques à un ou plusieurs dérivés de sucres. Cet aminocyclitol peut être un cycle streptidine, actinamine ou fortamine, mais le plus souvent il s'agit d'un cycle 2-désoxystreptamine (2-DOS) (Kondo et Hotta 1999 ; Ritter et Wong 2001) (Figure 1.2). Les aminoglycosides sont ainsi classés en deux sous-familles : celle des composés contenant un cycle 2-DOS (Tableau 1.3), et



celle des composés n'en contenant pas (Tableau 1.4) (Wright, *et al.* 1998). Au sein de la première sous-famille, les aminoglycosides sont classés en fonction du mode de substitution du cycle 2-DOS (Price et Godfrey 1974). Le cycle 2-DOS peut être fonctionnalisé à différentes positions :

- en position 4 (apramycine),
- en position 5 (hygromycine B),
- en positions 4 et 5 (groupe 4,5-2-DOS : néomycine, paromomycine),
- en positions 4 et 6 (groupe 4,6-2-DOS : kanamycine, tobramycine).

Le sous-groupe des aminoglycosides 4,6-2-DOS se subdivise lui-même en deux groupes : celui de la kanamycine produit par des souches de type *Streptomyces*, et celui de la gentamicine produit par des souches de type *Micromonospora* (à noter : la différence d'orthographe entre les suffixes « -mycine » et « -micine ») (Tableau 1.3).

Au sein d'un même sous-groupe, les aminoglycosides se distinguent par le nombre et la position des groupements hydroxyles, ammonium et méthyles (Rinehart 1969). Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux aminoglycosides appartenant aux sous-groupes 4,5-2-DOS et 4,6-2-DOS. En plus de posséder le cycle 2-DOS en commun

(cycle II), ces aminoglycosides ont aussi le cycle I en commun, avec quelques différences dans le nombre et la nature des groupements fonctionnels. Les cycles I et II constituent la partie néamine (Tableau 1.3). La néamine est elle-même un antibiotique, mais de plus faible affinité pour le site A et de moindre efficacité (Alper, *et al.* 1998 ; Hyun Ryu, *et al.* 2002).

Le cycle 2-DOS est coloré	é en bleu. La partie n	éamine est encadrée par de	es pointillés.
Substitution glycosidique	Exemple	Origine	Nature chimique
4-	Apramycine	Streptomyces tenebrarius	HO $\frac{6}{5}$ $\frac{3}{4}$ $\frac{9'}{10}$ $\frac{1}{10}$ $\frac{9'}{10}$ $\frac{1}{10}$ $\frac{1}{1$
5-	Hygromycine B	Streptomyces hygroscopicus	OH NH2 HO OH OH OH OH OH OH II
4,5-	Néomycine Paromomycine	Streptomyces fradiae Streptomyces rimosus	$\begin{array}{c} \hline N\acute{e}amine~(R=NH_{3}^{+}):\\ \hline Ribostamycine\\ (n\acute{e}amine+cycle~III)\\ N\acute{e}omycine~(R=NH_{3}^{+})\\ \hline Paromomycine~(R=OH)\\ \hline \\ 3^{'''} \hline \\ HO \\ \hline \\ 2^{'''} \hline \\ HO \\ \hline \\ 3^{'''} \hline \\ HO \\ \hline \\ 0^{'''} \hline \\ HO \\ \hline \\ 0^{'''} \hline \\ 0^{''''} \hline \\ 0^{'''''} \hline \\ 0^{''''''''''''''''''''''''''''''''''''$
4,6-	Kanamycine Tobramycine	Streptomyces kanamyceticus Streptomyces tenebrarius	$Kanamycine A (R_1=OH; R_2=OH) Kanamycine B (R_1=NH_3^+; R_2=OH) Tobramycine (R_1=NH_3^+; R_2=H)$
	Gentamicine C1a Généticine	Micromonospora purpurea Micromonospora rhodorangea	$\begin{array}{c} \overset{9''_{CH_3}}{\overset{NH_2+}{\overset{H_3}{\overset{H_2+}{\overset{H_3}{\overset{H_3}{\overset{H_3}{\overset{H_3+}{\overset{H_3}{\overset{H_3+}{\overset{H_3}{\overset{H_3+}}{\overset{H_3+}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}}{\overset{H_3}}{\overset{H_3}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}$



# **Tableau 1.4 :** Aminoglycosides ne contenant pas le cycle 2-DOS.

# B. Caractéristiques

## 1) Spectre d'action

Les aminoglycosides présentent l'avantage d'être des antibiotiques à large spectre, efficaces aussi bien contre des bactéries Gram+ que Gram-. Ils sont doués de propriétés bactéricides : ils provoquent la mort des bactéries au lieu d'uniquement bloquer leur croissance. Cependant, du fait de leur toxicité et de certains mécanismes de résistance (voir §C.), ils sont essentiellement utilisés en médecine hospitalière dans le cas de graves infections dues à *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Certains aminoglycosides, telles la paromomycine et la généticine, ont une activité anti-parasitique

(Wagman, *et al.* 1974 ; Waitz, *et al.* 1974), ce qui justifie leur emploi actuel contre certains parasites se développant chez des patients atteints du SIDA (Griffiths, *et al.* 1998).

#### 2) Le site A comme cible cellulaire

Les aminoglycosides ont pour cible cellulaire principale la sous-unité 30S du ribosome bactérien (Cox, *et al.* 1964 ; Davies 1964 ; Gale, *et al.* 1981 ; Wright, *et al.* 1998). Différents sites de fixation ont été identifiés par cartographie aux sondes chimiques, selon le sous-groupe auquel appartient l'aminoglycoside (Moazed et Noller 1987 ; Woodcock, *et al.* 1991). Ces sites de fixation sont toujours hautement conservés dans la phylogénie des bactéries (Moazed et Noller 1987). Les antibiotiques appartenant aux sous-groupes de l'apramycine, de l'hygromycine B, de la kanamycine et de la néomycine se fixent au site de décodage de l'ARN de transfert aminoacylé (site A) au niveau de l'ARN ribosomique 16S (Moazed et Noller 1987 ; Woodcock, *et al.* 1991) (Figure 1.3). La streptomycine interagit en partie avec le site A (Moazed et Noller 1987 ; Spickler, *et al.* 1997) et avec la protéine S12 (Gale, *et al.* 1981). Son mécanisme d'action est cependant différent de celui des autres aminoglycosides (Davis 1987 ; Gale, *et al.* 1981).

#### 3) Mode d'action

Les aminoglycosides sont responsables de plusieurs dysfonctionnements irréversibles liés à leur fixation au site A, qui s'enchaînent pour conduire à la mort de la bactérie (Mingeot-Leclercq, et al. 1999; Wright, et al. 1998). Un petit nombre d'aminoglycosides (sous forme cationique au pH physiologique) traverse passivement la paroi des bactéries et se lie par interactions électrostatiques aux lipides de la membrane plasmique des bactéries. Ces aminoglycosides traversent ensuite la membrane plasmique par un mécanisme dépendant de l'énergie fournie par le potentiel transmembranaire, et qui impliquerait une protéine-transporteur (Wright, et al. 1998). Au sein de la bactérie, la spécificité des aminoglycosides pour le site A représente la clé de leur action antibiotique. Des études cinétiques (Pape, et al. 2000; Rodnina et Wintermeyer 2001) et cristallographiques (Carter, et al. 2000; Ogle, et al. 2001) ont montré que les aminoglycosides se liant au site A stabilisent une conformation locale particulière de la sous-unité 30S. Cette stabilisation fausse le mécanisme de lecture de l'ARNm à traduire (mécanisme de décodage), favorisant ainsi l'incorporation d'acides aminés erronés dans les protéines en cours de synthèse (Davies et Davis 1968 ; Davies, et al. 1965). Par conséquent, la fixation d'un aminoglycoside au site A provoque une accumulation de protéines incorrectement traduites dans la bactérie (Davis 1987). Certaines de ces protéines vont endommager la membrane plasmique : elles sont incorporées à cette membrane et forment des pores qui favorisent une entrée non-contrôlée et irréversible d'ions et d'aminoglycosides dans la bactérie (Davis 1987 ; Davis, *et al.* 1986). Rapidement, les compositions ioniques intracellulaires sont perturbées et l'augmentation du nombre de molécules d'aminoglycosides dans la dans la cellule provoque l'inhibition de tous les ribosomes, empêchant la poursuite de toute synthèse de protéines, ce qui conduit à la mort de l'agent infectieux.



Figure 1.3 : Localisation du site A au sein de la structure secondaire de l'ARN 16S d'Escherichia coli.

(D'après le diagramme disponible sur le « Comparative RNA Web Site » : www.rna.icmb.utexas.edu). Les bases protégées en présence des aminoglycosides sont indiquées en bleu (d'après Moazed et Noller, 1987 ; Woodcock *et al.*, 1991). Les pourcentages de covariations associant chaque paire de bases aux deux adénines 1492 et 1493 sont indiqués de part et d'autre du cadre rouge. Ils ont été calculés à l'aide du programme COSEQ (Massire 1998) à partir de l'alignement de séquences procaryotes de l'ARN 16S disponibles sur le serveur du « Ribosomal Database Project II » : rdp.cme.msu.edu).

# C. Les traitements aux aminoglycosides : le revers de la médaille

#### 1) Effets secondaires toxiques

D'importants phénomènes de toxicité liés à l'usage des aminoglycosides ont été identifiés au niveau du rein (nephrotoxicité) et de l'oreille (ototoxicité) (Forge et Schacht 2000). Des toxicités au niveau de l'œil (Campochiaro et Conway 1991) et des effets bloquants de l'activité neuromusculaire dûs à une compétition avec les ions calcium ont aussi été observés, mais avec une moindre fréquence (source : « Aminoglycosides, a practical review » ; www.aafp.org) (Forge et Schacht 2000). L'origine précise de ces toxicités est controversée et résulte sans doute de la combinaison de plusieurs mécanismes selon le type de cellules endommagées, la nature de l'aminoglycoside (en particulier son nombre de charges positives), sa concentration, etc.

## (a) Nephrotoxicité

Environ 5% de la dose d'aminoglycoside administrée subsiste au niveau de la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales (Mingeot-Leclercq et Tulkens 1999). Ce pourcentage est suffisant pour permettre aux aminoglycosides de se lier aux phospholipides acides des membranes des cellules épithéliales avant d'être internalisés par endocytose puis accumulés dans des lysosomes (Begg et Barclay 1995). Ainsi exposés à des pH proches de 5,0, permettant une protonation de toutes leurs fonctions amines, les aminoglycosides se lient par interactions électrostatiques avec les phospholipides acides de



Figure 1.4 : Séquences des sites A cytoplasmique et mitochondrial chez l'homme.

Les nucléotides différents du site A de *E. coli* sont contourés. La numérotation indiquée correspond à celle du site A d'*E. coli* (la numérotation propre à l'ARN 12S mitochondrial est indiquée entre parenthèses).

la membrane plasmique (Chung, et al. 1985). Ils forment des agrégats et inhibent l'activité de certaines phospholipases, ce qui perturbe l'intégrité de la membrane (Mingeot-Leclercq et Tulkens 1999). Cette toxicité se manifeste par des signes d'altération des lysosomes dans l'urine et par l'excrétion d'enzymes des membranes cellulaires et de protéines ordinairement réabsorbées par les tubules rénaux. D'autres mécanismes impliquent la formation de radicaux libres par des complexes entre des aminoglycosides du type 4,6-2-DOS et des ions métalliques (Ali 1995 ; Forge et Schacht 2000 ; Jezowska-Bojczuk, *et al.* 1998 ; Priuska, *et al.* 1998). La liaison au site A des ribosomes cytoplasmiques (Bar-Nun, *et al.* 1983 ; Lynch et Puglisi 2001a) et des ribosomes des organelles (microsomes et mitochondries) (Ali 1995 ; Kurtz 1974) (Figure 1.4) a aussi été identifiée comme source de toxicité. Les moyens qui permettent de diminuer les effets nephrotoxiques des aminoglycosides consistent à administrer les aminoglycosides en une seule dose quotidienne au lieu de trois, et à modifier chimiquement les aminoglycosides de manière à défavoriser leur interaction avec les phospholipides (Mingeot-Leclercq et Tulkens 1999 ; Mingeot-Leclercq, *et al.* 1991).

#### (b) Ototoxicité

La toxicité au niveau de l'oreille induite par les aminoglycosides vient de leur pénétration dans les liquides et le tissu de l'oreille interne, au niveau vestibulaire et cochléaire, selon des mécanismes d'assimilation similaires à ceux observés au niveau du rein (source : « Pharmacologie spéciale-Aminoglycosides » ; www. antiinfectieux.org) (Begg et Barclay 1995). Comme pour la nephrotoxicité, plusieurs mécanismes semblent être responsables de l'ototoxicité. L'accumulation des aminoglycosides dans les cellules ciliées de la cochlée est responsable du développement d'une toxicité spécifique qui conduit à une dégénérescence de ces cellules (Begg et Barclay 1995). Les aminoglycosides se lient aux phosphoinositides sur la face interne de la membrane plasmique et interfèrent avec une cascade de régulations métaboliques (Forge et Schacht 2000). Comme dans le cas des nephrotoxicités, la formation de radicaux libres a aussi été évoquée comme source de toxicité au niveau de l'oreille (Forge et Schacht 2000 ; Hirose, et al. 1997 ; Takumida et Anniko 2001 ; Wu, et al. 2002). Des examens cliniques ont révélé la présence d'une mutation ponctuelle (A1555G) au niveau du site A de l'ARNr 12S mitochondrial qui engendre une hypersensibilité aux aminoglycosides (Hutchin et Cortopassi 1994 ; Hutchin, et al. 1993). L'augmentation de l'affinité des aminoglycosides pour ce site A mutant (Hamasaki et Rando 1997) provoquerait une synthèse erronée de protéines mitochondriales impliquées (Hutchin et Cortopassi 1994) ou non (Giordano, et al. 2002) dans la chaîne respiratoire. D'autres mutations de l'ARNr 12S mitochondrial sembleraient engendrer une ototoxicité similaire (Yoshida, et al. 2001).

La toxicité se manifeste au niveau vestibulaire par des nausées et des vertiges, et au niveau cochléaire par des bourdonnements d'oreille et des pertes auditives conduisant progressivement vers une surdité qui peut être complète. Comme l'ototoxicité touche un tissu nerveux, contrairement à la toxicité rénale, elle est irréversible. Afin de prévenir les risques d'apparition d'ototoxicité lors d'une administration d'aminoglycosides, il est ainsi recommandé de vérifier que le patient ne porte pas certaines mutations au niveau de l'ARNr 12S mitochondrial (Hutchin et Cortopassi 1994) et d'effectuer en parallèle une thérapie anti-oxydante (Forge et Schacht 2000 ; Wu, *et al.* 2002).

### 2) Phénomènes de résistance

L'utilisation massive des antibiotiques en médecine (Neu 1992) et comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale (Lipsitch, *et al.* 2002 ; Smith, *et al.* 2002) sont les causes principales de l'apparition et de la multiplication de souches bactériennes résistantes, un phénomène initialement décrit par Sir A. Fleming et ses collaborateurs dès 1945 (Gale, *et al.* 1981). Plus d'un million des hospitalisations annuelles aux Etats-Unis sont dues à des infections provoquées par des bactéries résistantes (Mobashery et Azucena Jr. 1999). Toutes les classes d'antibiotiques sont concernées (Neu 1992) et en juin 2002 a été isolée la première bactérie résistante à tous les antibiotiques connus à ce jour (Sievert, *et al.* 2002). La compréhension de ces mécanismes est aujourd'hui une priorité afin d'éviter un basculement vers une situation médicale similaire à celle de la période antérieure à la découverte des antibiotiques.

#### (a) Mécanismes de résistance aux aminoglycosides

Les types de mécanismes de résistance aux antibiotiques sont peu nombreux (Walsh 2000). Trois stratégies de résistance aux aminoglycosides sont principalement employées par les bactéries (Davies et Wright 1997 ; Mobashery et Azucena Jr. 1999).

#### Réduction de l'assimilation intracellulaire

La réduction de l'entrée d'aminoglycosides dans la bactérie s'établit par des phénomènes réversibles de résistance adaptive dès les premiers contacts entre les bactéries et les aminoglycosides (Barclay et Begg 2001). Une exposition progressive à des concentrations de plus en plus élevées en aminoglycosides révèle une capacité des bactéries à s'adapter et à croître en présence de quantités importantes d'antibiotiques (Joynson, *et al.* 2002). Ces mécanismes visent indifféremment tous les aminoglycosides

(Mingeot-Leclercq, *et al.* 1999). Ils semblent impliquer un ralentissement de croissance des souches bactériennes (Joynson, *et al.* 2002) et une diminution de la perméabilité de la membrane cytoplasmique par des modifications au niveau des protéines transmembranaires qui défavorisent le passage de petites molécules chargées à travers la membrane (Mingeot-Leclercq, *et al.* 1999 ; Mobashery et Azucena Jr. 1999). Des pompes énergétiques réalisant un efflux des aminoglycosides hors de la cellule ont aussi été identifiées (Magnet, *et al.* 2001 ; Mingeot-Leclercq, *et al.* 1999 ; Moore, *et al.* 1999).

#### Camouflage du site A

Le fonctionnement biologique particulier des bactéries leur permet d'évoluer rapidement et de développer des parades pour contrer les attaques extérieures (Mobashery et Azucena Jr. 1999). Dans des conditions de croissance favorables, environ 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> mutations apparaissent dans 1 ml de milieu de culture bactérienne. L'aminoglycoside n'est pas lui-même mutagène, mais il donne l'opportunité à la bactérie de sélectionner les rares mutants résistants au sein de la population sensible. En conséquence, si la mutation est bénéfique pour la bactérie, elle va rapidement se propager et, en une nuit, l'ensemble de la population sera porteuse de la mutation (source : site suédois du Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et de la pêche; www.jordbruk.regeringen.se) (Mobashery et Azucena Jr. 1999). C'est pourquoi certaines souches de bactéries résistantes possèdent des mutations d'origine génétique au niveau du site A de l'ARNr 16S. Il suffit d'une seule mutation pour empêcher l'interaction de l'aminoglycoside avec l'ARN et de la sorte éliminer son efficacité (Böttger, et al. 2001; Prammananan, et al. 1998; Taniguchi, et al. 1997). Une autre stratégie de camouflage du site A est d'origine enzymatique. Certaines méthylases ajoutent un groupement méthyle à une position particulière du site A (Beauclerk et Cundliffe 1987 ; Bujnicki et Rychlewski 2001), provoquant une résistance similaire à celle observée dans le cas des mutations (Wright, et al. 1998).

#### • Inactivation de l'aminoglycoside par modification enzymatique

La source la plus répandue de résistance aux aminoglycosides est la présence, dans les milieux intra- et extra-cellulaires, d'enzymes qui inactivent les antibiotiques par fixation covalente de groupements chimiques sur certains groupements fonctionnels (Azucena et Mobashery 2001 ; Davies 1994 ; Mobashery et Azucena Jr. 1999 ; Neu 1992). Il existe trois types d'enzymes, classés selon la modification chimique réalisée (Shaw, *et al.* 1993) :

- les aminoglycoside-nucléotidyltransférases (ANT) catalysent le transfert d'un nucléotide triphosphate sur une fonction hydroxyle,
- les aminoglycoside-acétyltransférases (AAC) catalysent le transfert du groupement acétyl de l'acétyl-coenzyme A sur une fonction amine ou hydroxyle,
- les aminoglycoside-phosphotransférases (APH) catalysent le transfert du groupement phosphoryl d'une molécule d'ATP sur une fonction hydroxyle (Figure 1.5).



Chaque famille d'enzymes comprend plusieurs isoformes qui diffèrent par la nature de l'aminoglycoside et de la position modifiés (Shaw, *et al.* 1993). Parmi la cinquantaine d'enzymes répertoriées à ce jour, diverses caractéristiques sont rencontrées : certaines enzymes acceptent plusieurs substrats (Azucena et Mobashery 2001 ; Benveniste et Davies 1971 ; Fong et Berghuis 2002), certaines sont spécifiques des aminoglycosides portant un groupement amine en position 6' du cycle I (Zhu, *et al.* 1999), et d'autres transfèrent des groupements chimiques sur plusieurs positions à la fois (Daigle, *et al.* 1999 ; Shaw, *et al.* 1993). Ces modifications structurales ont toutes pour conséquence d'encombrer l'aminoglycoside de telle sorte qu'il ne puisse plus interagir avec le site A (Davies et Wright 1997 ; Kotra, *et al.* 2000) (Figure 1.5). Ce mécanisme de résistance est redoutable puisque les gènes codant pour ces enzymes, généralement présents sur des transposons et des plasmides, sont facilement et rapidement diffusés à travers toute la population bactérienne par transfert horizontal (Davies et Wright 1997 ; Rather 1998 ; Walsh 2000).

#### (b) Stratégies pour freiner les mécanismes de résistance

Des efforts pour diminuer les prescriptions inadaptées d'antibiotiques (Gould 1999 ; Perz, et al. 2002) et pour élaborer des traitements à base de combinaisons particulières d'antibiotiques (Ida, et al. 2002 ; Walsh 2000) représentent les premiers moyens de se prémunir contre l'ascension fulgurante des phénomènes de résistance. D'autre part, l'exemple de la Suède, qui a éliminé les antibiotiques de l'alimentation animale dès 1986, montre que des souches bactériennes redeviennent sensibles aux traitements antibiotiques lorsqu'elles ne sont plus exposées à ces antibiotiques pendant plusieurs générations (source : site suédois du *Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et de la pêche* ; www.jordbruk.regeringen.se).

De nombreux gènes codant pour les enzymes de résistance aux aminoglycosides sont naturellement présents chez les organismes de type Streptomyces et Micromonospora qui produisent des aminoglycosides (Davies 1994; Rather 1998). C'est pourquoi, les transferts de ces gènes vers d'autres micro-organismes, tels les bactéries, sont toujours possibles, même au sein d'une population d'individus sensibles. En conséquence, des stratégies visant à interférer avec ces enzymes ont été mises au point. La plupart des dérivés semi- ou entièrement synthétiques des aminoglycosides ont été conçus à partir des années 1970 afin d'être de mauvais substrats des enzymes de modification (Azucena et Mobashery 2001; Kondo et Hotta 1999; Mingeot-Leclercq, et al. 1999). L'amikacine (Kawaguchi, et al. 1972) et l'arbekacine (Kondo, et al. 1973), des aminoglycosides dérivés de kanamycines possédant une chaîne 4-amino-2-hydroxybutirique en position 1, sont encore utilisés en médecine de nos jours (Kondo et Hotta 1999 ; Price 1986 ; Ritter et Wong 2001) (Figure 1.6). En 1999 a été synthétisé un aminoglycoside portant une fonction 3'-oxo, substrat d'une enzyme APH(3') mais capable de s'auto-regénérer suite à sa phosphorylation par cette enzyme (Haddad, et al. 1999) (Figure 1.6). En 2000, des dimères d'aminoglycosides résistants à une enzyme bifonctionnelle APH(3')-AAC(6') ont été synthétisés (Sucheck, et al. 2000) (Figure 1.6).

Les avancées de la biologie moléculaire et de l'automatisation de la synthèse chimique (Wijkmans et Beckett 2002) ont permis la recherche par chimie combinatoire de nouveaux dérivés d'aminoglycosides basés sur le cycle 2-DOS et sur la néamine (Greenberg, *et al.* 1999 ; Marcaurelle et Seeberger 2002 ; Sucheck et Shue 2001). Des entreprises pharmaceutiques ont lancé plusieurs programmes de recherche de nouveaux agents antiinfectieux plus efficaces et moins sujets aux mécanismes de résistances (Böddeker, *et al.* 2002 ; Bürli, *et al.* 2002 ; Desnottes 1998 ; Letavic, *et al.* 2002 ; Sciotti, *et al.* 2002). A la fin de l'année 2000, 19 nouveaux antibiotiques étaient en développement dans plusieurs entreprises (Coates, *et al.* 2002 ; Fisher-Wilson 2002). Enfin, dans la recherche de nouveaux types d'agents anti-infectieux, des voies autres que celles de l'antibiothérapie (utilisation de peptides antimicrobiens provenant d'insectes, de bactériophages, vaccinations, ...) sont aussi explorées (Schuch, *et al.* 2002 ; Tan, *et al.* 2000).



# **III. Etudes structurales et fonctionnelles de complexes site A/aminoglycosides**

L'étude des interactions entre les antibiotiques et le ribosome est importante à la fois pour la compréhension des mécanismes d'action des antibiotiques et pour celle du mode de fonctionnement des ribosomes. Tandis que le mécanisme d'interférence des aminoglycosides avec la traduction de l'ARNm en protéines a été identifié au niveau du ribosome dès les années 1960 (Davies, et al. 1965) puis caractérisé par microbiologie dans les années 1970 (Benveniste et Davies 1973 ; Price et Godfrey 1974), il a fallu attendre la fin des années 1980 pour que le site précis de fixation des aminoglycosides soit identifié (Moazed et Noller 1987; Woodcock, et al. 1991). Différents modèles d'étude du site A ont été proposés (Miyaguchi, et al. 1996 ; Purohit et Stern 1994 ; Recht, et al. 1996). A partir de 1996 sont apparus les premiers résultats d'études structurales, par RMN, de complexes entre le site A et des aminoglycosides (Fourmy, et al. 1996 ; Yoshizawa, et al. 1998). A partir de la fin de l'année 2000, les structures cristallographiques de complexes de la particule ribosomique 30S ont fourni les premières images de l'interaction entre aminoglycosides et le site A dans sa cible naturelle, à une résolution de 3.0 Å (Carter, et al. 2000 ; Ogle, et al. 2001). Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été démarré en 1998, au moment où la structure du complexe site A/paromomycine résolue par RMN représentait la seule source d'information structurale concernant le mode d'interaction des aminoglycosides avec le site A.

## A. Caractérisation biochimique

## 1) Concentrations minimales d'inhibition

Des mesures de concentrations minimales d'inhibition (MIC) ont été effectuées *in vitro* à partir de la fin des années 1960 sur les ribosomes sauvages de différents organismes (Garrod et O'Grady 1968 ; Price et Godfrey 1974) et sur des ribosomes porteurs de mutations provoquant une résistance aux aminoglycosides (De Stasio, *et al.* 1989 ; Prammananan, *et al.* 1998 ; Recht, *et al.* 1999 ; Recht et Puglisi 2001). Les résultats de ces études indiquent des différences entre les aminoglycosides au niveau de leur activité d'inhibition de la traduction par des ribosomes sauvages (Tableau 1.5) et de leur susceptibilité à différents mutants (Tableau 1.6). Des relations ont été établies entre la

**Tableau 1.5**: Valeurs des MIC (µg/ml) de différents aminoglycosides pour l'inhibition de ribosomes sauvages d'Escherichia coli (réf. 1, 2, 4, 5) et de Mycobacterium chelonae (réf. 3) obtenues par différents laboratoires (Gentamicine C=mélange de gentamicines C1, C1a et C2).

Réfé- rence	Apra- mycine	Néamine	Néomy- cine	Paromo- mycine	Kanamy- cine A	Tobra- mycine	Genta- micine C	Généticine	
1	-	12,5	8	8	4	1	1	-	
2	10	40	5	10	10	2,5	2,5	-	
3	-	-	32	-	16	4	32	-	
4	5	20	5	5	2,5	1,25	1,25	2,5	
5	10	-	10	10	5	2,5	5	5	
1 : Garrod et O'Grady (1968) ; Price et Godfrey (1974) 2 : De Stasio <i>et al.</i> (1989) 3 : Prammananan <i>et al.</i> (1998)									

4 : Recht et al. (1999)

5 : Recht et al. (2001)

structure des aminoglycosides (nombre de sucres attachés sur le cycle 2-DOS, nombre de fonctions hydroxyles et amines, ...) et leur activité (Benveniste et Davies 1973).

Comme elles sont effectuées à partir de milieux de culture de cellules bactériennes mises en présence d'aminoglycosides, les mesures de MIC sont les seules à permettre une quantification de l'activité inhibitrice propre à chaque aminoglycoside qui reflète la réalité biologique. Ces analyses permettent aussi de déterminer indirectement l'influence de mutations ponctuelles naturelles sur l'activité des aminoglycosides (Sander, et al. 1996).

**Tableau 1.6**: Valeurs des MIC ( $\mu$ g/ml) de différents aminoglycosides pour l'inhibition de ribosomes mutants d'Escherichia coli (réf. 1, 3, 4) et de Mycobacterium chelonae (réf. 2) obtenues par différents laboratoires (Gentamicine C=mélange de gentamicines C1, C1a et C2).

Mutation exprimée	Apra- mycine	Néamine	Néo- mycine	Paromo- mycine	Kana- mycine A	Tobra- mycine	Genta- micine C	Généticine
U1406A <sup>4</sup>	2,5	-	5	5	640	160	320	640
A1408G <sup>3</sup>	>1280	>1280	640	20	1280	160	160	2,5
A1408G <sup>2</sup>	-	-	>1024	-	>1024	>1024	>256	-
C1409U <sup>1</sup>	20	80	5	10	20	2,5	2,5	-
G1491U <sup>1</sup>	640	160	160	320	160	40	40	-
G1491C <sup>1</sup>	320	160	80	320	160	20	20	-
1 : De Stasio	et al. (198	39)						

2 : Prammananan et al. (1998)

3: Recht et al. (1999) 4 : Recht et al. (2001)

## 2) Cartographie aux sondes chimiques

Quelques années après les publications des résultats de cartographies aux sondes chimiques qui avaient dévoilé le site de fixation des aminoglycosides contenant un cycle 2-DOS sur l'ARNr 16S (Moazed et Noller 1987; Woodcock, et al. 1991), parurent des résultats obtenus avec une technique similaire pour un oligoribonucléotide analogue de l'extrémité 3' de l'ARN 16S ne contenant que 49 nucléotides (sans les modifications des nucléotides naturels) (Purohit et Stern 1994) (Figure 1.7). Deux ans plus tard, deux groupes publiaient indépendemment le même ensemble de cartographies, mais pour un oligoribonucléotide de 27 nucléotides (ASR-27) (Miyaguchi, *et al.* 1996 ; Recht, *et al.* 1996) (Figure 1.7). Ces résultats révélaient deux importantes caractéristiques : (i) les oligoribonucléotides contiennent les nucléotides du site A suffisants pour l'interaction avec les aminoglycosides, (ii) les aminoglycosides interagissent de la même manière avec le site A au sein du ribosome et dans un contexte d'oligoribonucléotide. Ces particularités ont permis une étude approfondie (mesures de constantes de dissociation, RMN, calculs théoriques, ...) du mode d'interaction des aminoglycosides avec le site A incorporé dans l'oligoribonucléotide ASR-27.

#### 3) Constantes de dissociation

A la fin des années 1990, divers laboratoires ont utilisé différentes techniques pour mesurer les constantes de dissociation ( $K_D$ ) entre différents aminoglycosides et le site A au



sein du ribosome ou incorporé dans des oligoribonucléotides (ASR-27 ou un analogue de l'ARNr 16S contenant 130 nucléotides) :

- technique d'empreinte quantitative (Recht, *et al*. 1996),
- SPR (Surface Plasmon Resonance) (Alper, *et al.* 1998 ; Wong, *et al.* 1998)
- spectrométrie de masse « electrospray » (Griffey, et al. 1999; Sannes-Lowery, et al. 2000),
- compétition avec un ligand fluorescent (Hyun Ryu, *et al.* 2002 ; Hyun Ryu et Rando 2001 ; Wang, *et al.* 1997).

Quelles que soient les techniques employées, des  $K_D$  de l'ordre du micromolaire ont été mesurées pour tous les aminoglycosides testés

(Tableau 1.7). Des K<sub>D</sub> de 1-2  $\mu$ M sont obtenus pour la plupart des aminoglycosides appartenant aux familles de l'apramycine et des 4,5- et 4,6-2-DOS, sauf pour la néomycine (K<sub>D</sub>≈0,1  $\mu$ M) et la néamine (K<sub>D</sub>≈10  $\mu$ M).

Les valeurs de  $K_D$  ne reflètent pas les activités propres à chaque aminoglycoside. En effet, l'échelle des activités des aminoglycosides observée par mesure de MIC n'est pas retrouvée parmi les valeurs de  $K_D$ , en particulier dans le cas d'études de séquences mutées (Tableaux 1.6 et 1.7). Il est probable que les oligonucléotides-modèles utilisés pour les mesures ne reproduisent pas la situation biologique de l'environnement du site A. En outre, la similarité entre les valeurs de  $K_D$  obtenues à partir de modèles (Tableau 1.7) et celles récemment obtenues à partir de ribosomes entiers (Hyun Ryu, *et al.* 2002) ne constitue pas une justification des méthodes utilisant les modèles. En effet, les constantes de l'ordre du  $\mu$ M obtenues à partir de ribosomes peuvent résulter d'une moyennation des  $K_D$  observées pour plusieurs sites de fixation plus ou moins spécifiques (Hyun Ryu, *et al.* 2002).

différents laboratoires.										
Réfé- rence	Séquence	Apra- mycine	Néamine	Néo- mycine	Paromo- mycine	Kana- mycine*	Tobra- mycine	Genta- micine B	Géné- ticine	
1	sauvage	-	-	-	0,2	-	-	-	-	
2	sauvage	6,3	7,8	0,02	0,2	18	1,5	1,7	-	
	U1406A	9,3	5,5	0,01	0,03	28	2,1	9,9	-	
	U1495A	13	31	0,4	2,7	33	4,1	12	-	
3	sauvage	2	-	-	0,1	2	2	-	-	
	A1408G	0,5	-	-	0,7	2	2	-	-	
	C1409U	2	-	-	1,1	>20	>20	-	-	
	C1491U	2	-	-	2	2	2	-	-	
	Site A	0,5	-	-	>20	1,6	1,4	-	-	
	H. sapiens									
4	sauvage	-	-	0,05	1,7	1,3	1,4	-	-	
	A1408G	-	-	1,1	2	6	7,5	-	-	
	Site A	-	-	0,3	2,2	1,4	1,6	-	-	
	H. sapiens									

**Tableau 1.7 :** Valeurs des K<sub>D</sub> (μM) de différents aminoglycosides pour le modèle ASR-27 incorporant différentes séquences de site A (*E. coli, H. sapiens* et différents mutants), obtenues par différents laboratoires.

1 : Recht et al. (1996)

2 : Wong et al. (1998)

3 : Griffey *et al.* (1999)

4 : Hyun Ryu et Rando (2001)

\* : Valeurs pour la kanamycine A en noir et pour la kanamycine B en rouge.

## B. Etudes par résonance magnétique nucléaire

Les premières observations au niveau atomique du site A (inséré dans l'oligoribonucléotide-modèle ASR-27), seul et complexé à deux aminoglycosides, ont été obtenus par un laboratoire américain (Fourmy, *et al.* 1996 ; Fourmy, *et al.* 1998a ; Fourmy, *et al.* 1998b ; Yoshizawa, *et al.* 1998). Les structures publiées permettent de définir le site de fixation d'un dérivé 4,5-2-DOS, la paromomycine (Fourmy, *et al.* 1996), et d'un dérivé 4,6-2-DOS, la gentamicine C1a (Yoshizawa, *et al.* 1998) au niveau du site A (Figure 1.8). Chaque antibiotique se fixe dans le sillon profond du site A, au niveau d'une poche formée par l'extrusion de la base A1492 hors de l'hélice d'ARN et par la paire de bases noncanonique A1408•A1493 (écart RMS supérieur à 3 Å entre les adénines 1492 et 1493 au

sein du site A libre et fixé à un aminoglycoside) (Figure 1.9). Les antibiotiques sont maintenus par des liaisons hydrogène entre les groupements fonctionnels des cycles I à III et les nucléotides 1405 à 1409 et 1491 à 1495. Dans les deux complexes, la partie néamine (cycles I et II)



commune aux dérivés 4,5- et 4,6-2-DOS interagit de manière similaire avec le site A (écart RMS de 0,3 Å entre les atomes des cycles I et II) (Figure 1.10). Tandis que le cycle III de la tobramycine interagit avec la guanine 1405, les cycles III et IV de la paromomycine ne sont pas impliqués dans des contacts spécifiques. Ainsi, la spécificité du mode de fixation des aminoglycosides au site A semble être liée essentiellement à la partie néamine

Dans le même laboratoire ont été publiées plus récemment les structures en solution du modèle ASR-27 portant la mutation A1408G, seul (Lynch et Puglisi 2001b) et complexé à la paromomycine (Lynch et Puglisi 2001a). La mutation A1408G est retrouvée aussi bien chez certaines souches de bactéries résistantes que chez les organismes eucaryotes

(Böttger, *et al.* 2001). Les structures globales du modèle ASR-27 muté, complexé ou non à la paromomycine, sont différentes de celles du modèle sauvage (Figure 1.11). La déviation RMS globale entre les structures des complexes muté et sauvage est de 2,7 Å. L'analyse de la structure du complexe muté montre que le résidu G1408 est déplacé dans le sillon profond du site A afin d'éviter des mauvais contacts avec le nucléotide A1493. La formation de la paire de bases non-canonique G1408•A1493 ne permet pas l'ancrage des cycles I et II au site A (Figure 1.12).





paromomycine (en orange) et à la gentamicine C1a (en magenta). La superposition est réalisée avec les atomes de la néamine.



(Numéros d'identification respectifs dans la PDB : 1FYO et 1FYP).


## C. Etudes par cristallographie aux rayons X

A la fin de l'année 2000, le groupe britannique dirigé par Venki Ramakrishnan a publié les structures cristallographiques à 3,0 Å de résolution de la sous-unité ribosomique 30S de *Thermus thermophilus* seule (Wimberly, *et al.* 2000) et complexée à plusieurs antibiotiques, dont la paromomycine (Carter, *et al.* 2000). Des structures ont ensuite été publiées pour la sous-unité 30S complexée à la paromomycine, à un analogue de la boucle de l'anticodon d'un ARNt et à un oligoribonucléotide de séquence complémentaire à celle de l'anticodon, jouant le rôle du brin d'ARNm (Ogle, *et al.* 2001). Entre les organismes *Thermus thermophilus* et *Escherichia coli*, 73 % des nucléotides constituant l'ARN 16S sont conservés (Tung, *et al.* 2002). La séquence du site A est conservée, sauf pour la paire de bases 1410-1490 (A-U chez *Escherichia coli* et G=C chez *Thermus thermophilus*), ce qui n'interfère pas avec la structure tertiaire du site A (Tung, *et al.* 2002). Il est par conséquent possible de confronter les résultats des études antérieures (obtenues pour l'organisme *Escherichia coli*) aux structures cristallographiques de la particule 30S.





Les protéines sont colorées en rouge, l'ARN 16S en gris (sauf l'hélice 44 qui est représentée en jaune), la paromomycine en orange (Numéro d'identification dans la PDB : 1FJG).

La paromomycine se lie au sillon profond du site A situé à une extrémité de l'hélice 44, la plus longue de toute la sous-unité et située sur la face en contact avec la sous-unité 50S dans le ribosome (Figure complet 1.13). La conformation de la partie néamine de la paromomycine liée au site A est similaire à celle observée par RMN (écart RMS de 0,2 Å entre les atomes des cycles I et II). Cependant, les conformations et les orientations des cycles III et IV sont différentes (Figure 1.14). De plus, dans la structure cristallographique, le cycle I de la paromomycine est intercalé comme une base dans l'hélice d'ARN. Il s'empile sur la guanine 1491 et forme deux liaisons hydrogène avec les sites Watson-Crick de l'adénine 1408. Cette intercalation a pour conséquence de forcer



les deux bases A1492 et A1493 à pointer hors de l'hélice, de manière nettement plus prononcée que dans la structure RMN (Figure 1.14). Ainsi, la paire de bases A1408•A1493 observée dans la structure RMN n'est pas observée dans la structure cristallographique. En absence de paromomycine, les deux adénines 1492 et 1493 pointent plutôt vers l'intérieur de l'hélice mais la densité électronique correspondante est mal définie (Wimberly, *et al.* 2000) (écart RMS de 0,6 Å pour les atomes du squelette sucres-phosphates du site A ; écart RMS de 6,4 Å entre les adénines 1492 et 1493 dans les structures de la sous-unité seule et complexée à la paromomycine) (Figure 1.15). Etrangement, la structure du site A complexé à la paromomycine résolue par RMN est similaire à celle du site A résolue par cristallographie en absence de ligand (écart RMS de 1,2 Å pour les atomes du squelette sucres-phosphates du site A ; écart RMS de 1,2 Å pour les atomes du squelette sucres-phosphates du site A résolue par cristallographie en absence de ligand (écart RMS de 1,2 Å pour les atomes du squelette sucres-phosphates du site A ; écart RMS de 1,2 Å pour les atomes du squelette sucres-phosphates du site A ; écart RMS de 1,2 Å entre les deux adénines 1492 et 1493) (Figure 1.16).

Au cours de la traduction des ARNm en protéines, l'étape ultime de sélection des ARNt corrects est la formation, soit de trois paires de bases canoniques, soit de deux paires cano-



de la sous-unité 30S complexé à la paromomycine (en orange) superposée à la structure du site A seul (en gris). La superposition est réalisée avec les atomes du squelette sucres-phosphates. niques et d'une paire « wobble », entre les trois nucléotides constituant un codon sur l'ARNm et les trois nucléotides complémentaires dans l'anticodon de l'ARNt correspondant (méca-



nisme de « décodage ») (Crick 1966 ; Moore et Steitz 2002). Un acide aminé erroné est incorporé dans la protéine en voie de synthèse lorsqu'un ARNt non correct est sélectionné suite à une reconnaissance codon/anticodon

quasi-correcte (un ou deux appariements canoniques) ou incorrecte (aucun appariement canonique) avec l'ARNm. Plusieurs régions du ribosome sont impliquées dans la fidélité de la sélection de l'ARNt-aminoacylé correct (Rodnina, *et al.* 2002). Au sein de la sousunité 30S, une interaction codon/anticodon correcte est différenciée d'une interaction quasi- ou incorrecte au niveau des adénines 1492 et 1493 du site A (Moazed et Noller 1990 ; Noller 1991 ; Purohit et Stern 1994 ; Yoshizawa, *et al.* 1999) par un changement conformationnel qui décide de la poursuite de la traduction (Pape, *et al.* 2000 ; Rodnina et Wintermeyer 2001 ; Stahl, *et al.* 2002). Les aminoglycosides agissent sur ce mécanisme : ils stabilisent des interactions codon/anticodon quasi-correctes, ce qui a comme conséquence une modification des cinétiques des étapes contrôlant la fidélité de la traduction (Pape, *et al.* 2000).

Les structures cristallographiques de la sous-unité ribosomique 30S montrent quatre états discrets du site A qui offrent une explication structurale au phénomène de « décodage » (Figure 1.17) (Ogle, *et al.* 2001 ; Wimberly, *et al.* 2000). Dans la structure du ribosome obtenue en absence de ligands (Wimberly, *et al.* 2000), les adénines 1492 et 1493 sont empilées à l'intérieur de l'hélice 44 et voisines de la cytosine 1054, de la guanine 530 et de la protéine S12 (Figure 1.17a). Dans le complexe avec l'ARNt et l'ARNm (Ogle, *et al.* 2001), les adénines 1492 et 1493 pointent hors de l'hélice 44 vers le sillon peu profond de la mini-hélice formée par l'interaction codon/anticodon (Figure 1.17b). Elles établissent des liaisons hydrogène directes avec les première et deuxième paires de bases de la mini-hélice, formant ainsi les interactions type I/type II caractéristiques d'un motif « A minor » (Doherty, *et al.* 2000 ; Nissen, *et al.* 2001) (Figure 1.18). Ce motif d'interaction, fréquemment employé par les ARN de grande taille pour

médier des interactions intra- ou inter-moléculaires (Carter, *et al.* 2000 ; Michel et Westhof 1990 ; Nissen, *et al.* 2001 ; Soukup, *et al.* 2002), n'est formé que si les deux paires de bases visées par les deux adénines sont canoniques (Battle et Doudna 2002 ; Ogle, *et al.* 2001). La formation du motif « A minor » entre les deux adénines consécutives du site A et la mini-hélice codon/anticodon semble être à l'origine du faible taux d'erreur  $(10^{-3}-10^{-4})$  du mécanisme de « décodage » (Ramakrishnan 2002). La fixation de l'ARNt et de l'ARNm à la sous-unité 30S provoque également un changement de conformation de la base G530 : elle passe de la conformation *syn* à *anti* afin d'interagir avec la deuxième et, dans une moindre mesure, avec la troisième paires de bases de la mini-hélice (Figures 1.17 et 1.18). L'ensemble de ces interactions vers la mini-hélice codon/anticodon est stabilisé par d'autres résidus, tels la cytosine 1054 et des acides aminés faisant partie de la protéine S12. Dans la structure de la sous-unité 30S complexée à la paromomycine (Carter, *et al.* 2000 ; Ogle, *et al.* 2001), les adénines 1492 et 1493 pointent hors de l'hélice en absence d'ARNt et d'ARNm (sans toutefois modifier la conformation de G530) (Figure 1.17c). En présence



Figure 1.17 : Quatre états distincts du site A révélés par quatre structures cristallographiques différentes.

Sous-unité 30S seule (a), en présence d'analogues d'ARNt et d'ARNm (b), complexée à la paromomycine (c), en présence d'ARNt, d'ARNm et de paromomycine (d). L'ARN 16S est représenté en gris (en orange pour le site A complexé à la paromomycine), l'ARNt en bleu, l'ARNm en vert, la protéine S12 en rouge et certains des ions magnésium en magenta. Figure adaptée de (Ogle *et al.* 2001 ; Rodnina *et al.* 2002) (Numéros d'identification respectifs dans la PDB : 1FJF, 1IBM, 1IBK et 1IBL).

d'ARNt et d'ARNm, la paromomycine stabilise une conformation similaire du site A et des autres résidus impliqués dans le « décodage » (Ogle, et al. 2001) (Figure 1.17d). En conséquence, ces structures montrent que la fixation de la paromomycine au site A induit un changement conformationnel du site A similaire à celui résultant de la fixation des ARNt et ARNm corrects. Il est proposé que la liaison de la paromomycine au site A, en compensant le coût énergétique associé au changement conformationnel des adénines 1492 et 1493, provoquerait une augmentation de l'affinité des ARNt quasi-corrects responsable d'un accroissement du taux d'erreurs de traduction (Ogle, et al. 2001; Ramakrishnan et Moore 2001).



reconnaissance de la mini-hélice codon/anticodon par les résidus de la sous-unité ribosomique 30S.

Interactions type I (a)/type II (b) impliquant les adénines 1492 et 1493 ; interactions avec la troisième paire de bases, ici une paire G•U (c) (numéro d'identification dans la PDB : 1IBL).

Les résidus de l'ARNr, de l'ARNt, de l'ARNm, de la protéine S12 sont colorés respectivement en gris (sauf les adénines 1492 et 1493 représentées en orange), en bleu, en vert, en rouge. Un ion magnésium est indiqué en magenta.

#### D. Confrontation des résultats des différentes études structurales

Sur la base des structures de complexes obtenues par RMN avec le modèle ASR-27 (Fourmy, *et al.* 1996 ; Yoshizawa, *et al.* 1998), les auteurs proposèrent plusieurs explications de la spécificité des aminoglycosides pour le site A procaryote au niveau moléculaire. Il est intéressant d'analyser ces propositions en regard des structures de la particule 30S complexée à divers ligands (ARNt, ARNm, paromomycine, ...) (Carter, *et al.* 2000 ; Ogle, *et al.* 2001 ; Wimberly, *et al.* 2000).

Les structures cristallographiques confirment que la spécificité de reconnaissance des aminoglycosides pour le site A est commandée par les deux cycles constituant la néamine et par la conservation des nucléotides 1405-1410 et 1490-1496. Cependant, les structures résolues par RMN ne montrent pas d'insertion du cycle I dans l'hélice 44 (les contacts identiques à ceux observés dans les structures cristallographiques sont de 0,1 à 1,3 Å plus longs-cf. Publication n°1). D'autre part, les structures cristallographiques démontrent que la paire A1408•A1493 n'est pas requise pour l'interaction, et son observation par RMN résulte probablement d'une fausse interprétation des données. Il n'existe aucune structure cristallographique d'un ribosome eucaryote à l'heure actuelle, mais les structures de la sous-unité 30S procaryote laissent penser que la mutation A1408G n'est pas la seule responsable de la moindre affinité des aminoglycosides pour le site A. D'autres mutations sont présentes au niveau du site A eucaryote : (i) la paire de bases 1401-1491 est une paire C=G (comme pour 80% des procaryotes) ou une paire C•A (chez l'Homme par exemple), pour respectivement 40% et 60% des organismes, (ii) la paire A1410-U1490 présente chez les procaryotes est inversée chez les eucaryotes. Ainsi, la différence de géométrie entre une paire de bases A•A et une paire de bases G•A observée par RMN pour les positions 1408 et 1493 (Lynch et Puglisi 2001a; Lynch et Puglisi 2001b) ne saurait constituer la seule explication de la discrimination « site A procaryote »/« site A eucaryote », à plus forte raison si cette paire de bases n'est pas formée in vivo.

La moitié des interactions décrites dans les structures RMN ne sont pas observées dans les structures cristallographiques (voir Publication n°1 pour une comparaison détaillée). De plus, les structures RMN comprennent de nombreux contacts physiquement improbables (par exemple : distance de 2,8 Å (inférieure à la somme des rayons de van der Waals) entre les deux oxygènes des carbonyles en position 4 des uraciles consituant la paire U1406•U1495, au lieu de 3,1 Å dans la structure de la sous-unité 30S complexée à la paromomycine). Des liaisons hydrogène décrites dans les structures RMN sont formées entre des partenaires distants de plus de 3,5 Å (par exemple : distance moyenne de 4,0 Å entre l'atome O2'' de la gentamicine C1a et l'atome O4 de U1406). De plus, la conformation de l'ARN autour de la paromomycine dans la structure RMN est globalement similaire à celle de l'ARN non-complexé au sein de la sous-unité 30S (§ III.C.).

L'ensemble de ces observations laisse penser que les structures RMN utilisant le modèle ASR-27 ne permettent ni de comprendre la spécificité des aminoglycosides pour le site A, ni d'expliquer le mécanisme d'action des aminoglycosides. C'est pourquoi ces structures ne permettent ni de fournir une explication correcte aux phénomènes de résistance au niveau moléculaire, ni de concevoir de nouveaux antibiotiques, plus spécifiques, moins sensibles aux résistances et moins toxiques.





Le cadre rouge entourant la structure secondaire de chaque molécule d'ARN correspond au site de fixation de l'aminoglycoside étudié. (Numéros d'identification dans la PDB, de haut en bas : 1EI2, 1QD3, 1NEM, 1TOB, 2TOB).

#### IV. Etudes structurales d'autres complexes

De nombreuses études ont montré la capacité que possèdent les aminoglycosides de stabiliser et/ou d'inhiber certains systèmes in vitro, ou plus rarement, in vivo. In vitro, les aminoglycosides interfèrent avec certains mécanismes de régulation du virus HIV-1 en inhibant la fixation des protéines Tat et Rev aux motifs TAR (Transactivating responsive element) (Mei, et al. 1998; Mei, et al. 1995; Wang, et al. 1998) et RRE (Rev responsive element) (Zapp, et al. 1993) situés sur l'ARN génomique du virus. Ils sont aussi capables d'interagir avec plusieurs sites dans la partie 5' du même ARN viral (McPike, et al. 2002; Sullivan, et al. 2002). Ils se lient de manière spécifique au site de fixation de la thymidilate synthase (TS) situé dans la partie 5'-non traduite des ARN messagers humains (Tok, et al. 1999). Ils stabilisent des hélices triples d'ADN et d'ARN (Arya et Coffee 2000 ; Arya, et al. 2001). Les aminoglycosides sont également des inhibiteurs des réactions autocatalytiques d'ARN en tête de marteau (Clouet-d'Orval, et al. 1995 ; Stage, et al. 1995), du virus de l'hépatite delta (HDV) (Chia, et al. 1997; Rogers, et al. 1996), de l'ARN en épingle à cheveu (Earnshaw et Gait 1999), et de la composante ARN de la ribonucléase P (Mikkelsen, et al. 1999). Ils stabilisent une épingle à cheveu qui contrôle le mécanisme d'épissage alternatif de l'exon tau 10 chez l'Homme (Varani, et al. 2000). In vivo, ils inhibent l'auto-épissage de certains introns du groupe I (Schroeder, et al. 2000 ; Waldsich, et al. 1998). Des expériences de sélection in vitro ont permis la synthèse de fragments d'ARN appelés « aptamères » (Uphoff, et al. 1996) liant spécifiquement des aminoglycosides tels la kanamycine ou la lividomycine (Lato, et al. 1995), la néomycine (Wallis, et al. 1995) et la tobramycine (Hamasaki, et al. 1998; Wang, et al. 1996; Wang et Rando 1995) avec des affinités environ 1000 fois supérieures à celle du site A.

Sauf dans le cas de l'épissage des introns de groupe I, les différents mécanismes inhibés par les aminoglycosides sont différents du mécanisme d'inhibition de la synthèse des protéines et les sites d'interaction des aminoglycosides n'ont pas de similarité avec le site A. De plus, à des propriétés d'inhibition *in vitro* ne correspondent pas systématiquement des propriétés d'inhibition *in vivo* (Waldsich, *et al.* 1998). Le seul point commun entre les séquences des différents sites de fixation des aminoglycosides sur ces divers ARN est la présence de paires de bases non-canoniques et de bases pointant hors des hélices (Gallego et Varani 2001 ; Hermann et Westhof 2000 ; Hyun Ryu et Rando 2002 ;

Michael et Tor 1998). Cinq structures autres que celles des complexes avec le site A ont été résolues par RMN pour différents aminoglycosides : une structure de la néomycine complexée par une tige-boucle impliquée dans l'épissage de l'exon tau 10 (Varani, *et al.* 2000) et une structure de la néomycine liée à l'élément TAR (Faber, *et al.* 2000), une structure de la néomycine (Jiang, *et al.* 1999) et deux structures de la tobramycine (Jiang, *et al.* 1997; Jiang et Patel 1998) complexées par des aptamères correspondants (Figure 1.19). Une analyse de ces structures montre que la conformation des cycles constituant les aminoglycosides est le plus souvent conservée, tandis que les orientations entre les cycles sont différentes. Les aminoglycosides interagissent dans les sillons profond ou peu profond d'une portion d'hélice ou d'une boucle déformée par une ou plusieurs paires de bases non-canoniques, et/ou par une base qui pointe hors de l'hélice. Aucune structure ne montre d'intercalation de cycles dans les brins d'ARN et la néamine semble jouer un rôle moins important dans la fixation des aminoglycosides à ces séquences (Hermann et Westhof 1999b). Une structure de la néomycine en interaction avec l'ARNt<sup>Phe</sup> a été également résolue par cristallographie à 2,6 Å (Mikkelsen, *et al.* 2001) (Figure 1.20). Dans cette

structure, la néomycine est située dans le sillon profond entre la boucle D et le bras de l'anticodon, dans une zone proche (entre 4 et 10 Å) de quatre molécules d'ARNt symétriques. En outre, les conformations des cycles de la néomycine sont



tordues, alors que seulement quatre liaisons hydrogène sont observées entre la néomycine et l'ARNt, dont une vers un oxygène O2', une vers un oxygène de groupement phosphate et une avec un angle non favorable. Les facteurs d'agitation thermique sont de 65 Å<sup>2</sup> en moyenne pour la néomycine et de 48 Å<sup>2</sup> pour l'ARN. Il est probable que cette structure reflète une liaison non-spécifique de la néomycine à l'ARNt<sup>Phe</sup>.

## V. Revue des interactions ARN/aminoglycosides

Au début de ce travail de thèse, j'ai participé à l'élaboration d'une revue intitulée « Aminoglycoside-RNA interactions » parue dans l'édition de décembre 1999 du journal *Current Opinion in Chemical Biology*.<sup>1</sup> Cette revue se concentre essentiellement sur les paramètres structuraux et physico-chimiques nécessaires à la liaison des aminoglycosides aux ARN ribosomiques et catalytiques. Les effets des aminoglycosides sur différents ARN catalytiques sont comparés. L'accent est mis sur l'importance des charges positives portées par les aminoglycosides pour le déplacement de cations métalliques impliqués dans la catalyse de certains ARN.<sup>2</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Walter, F., Vicens, Q. and E. Westhof (1999). Aminoglycoside-RNA interactions. *Curr Op Chem Biol*, 3:694-704.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Les références citées dans la revue mais non mentionnées dans le corps de la thèse ne sont pas reprises en fin de manuscrit.



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Franck Walter, Quentin Vicens and Eric Westhof

Aminoglycoside-RNA interactions.

Current Opinion in Chemical Biology 3 (1999), 694-704

Pages 694-704 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://dx.doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00028-9

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

#### VI. Présentation des résultats de ce travail de thèse

Ce travail a porté sur l'étude par cristallographie aux rayons X de fragments d'ARN d'une quarantaine de nucléotides incorporant le site A bactérien, complexés à des aminoglycosides. Ce travail a été démarré à l'automne 1998, alors que seule la structure du complexe ASR-27/paromomycine résolue par RMN était connue (Fourmy, et al. 1996). La première structure cristallographique résultant de notre travail a été obtenue durant l'hiver 2000-2001 avec la paromomycine, un aminoglycoside de la famille des dérviés 4,5-2-DOS. En effet, deux années ont été nécessaires à l'obtention des premiers cristaux d'un complexe entre la paromomycine et un oligoribonucléotide contenant le site A d'Escherichia coli. Dans un premier temps seront résumées les principales étapes conduisant à ce résultat (synthèse chimique, purification, étude de renaturation, cristallisation). Les structures des complexes obtenus à des résolutions de 2,40-2,54 Å avec la paromomycine, avec la tobramycine (automne 2001) et avec la généticine (été 2002), deux aminoglycosides appartenant chacun à un sous-groupe différent de dérivés de 4,6-2-DOS, seront présentées dans un deuxième temps. Un examen de ces trois structures montre que la partie néamine commune aux trois aminoglycosides s'intercale dans l'hélice de manière similaire dans ces différentes structures et dans la structure du ribosome complexé à la paromomycine (Carter, et al. 2000), en interagissant avec l'adénine 1408 et en provoquant l'extrusion des deux adénines 1492 et 1493. Aux résolutions atteintes (2,40-2,54 Å), l'analyse des contacts montre que la reconnaissance et la fixation font intervenir de nombreuses liaisons hydrogène directes ou faisant participer des molécules d'eau, vers les atomes des bases et vers les groupements phosphates des adénines 1492 et 1493. La comparaison des structures tridimensionnelles des complexes site A/aminoglycosides permet d'expliquer au niveau moléculaire les différents résultats biochimiques (cartographie aux sondes chimiques et enzymatiques) et les phénomènes de résistance décrits auparavant. Dans un troisième temps, enfin, seront mises en regard les structures cristallographiques obtenues pour les complexes site A/aminoglycosides et pour divers complexes enzymes de résistance/aminoglycosides et oligosaccharides/protéines disponibles dans les banques de données.



# **Chapitre 2**

# Structures cristallographiques de trois complexes site A / aminoglycosides

## I. De la conception à la diffraction

## A. Conception des oligoribonucléotides

D'après les résultats biochimiques (Miyaguchi, *et al.* 1996 ; Purohit et Stern 1994 ; Recht, *et al.* 1996) et la structure du complexe avec la paromomycine résolue par RMN (Fourmy, *et al.* 1996), les nucléotides 1405 à 1410 et 1490 à 1496 sont suffisants pour l'interaction avec les aminoglycosides. Cependant, le modèle ASR-27 étudié par RMN n'est pas un bon candidat pour des études par cristallographie aux rayons X. En effet, ASR-27 est composé d'un seul oligoribonucléotide qui doit se replier en une tige-boucle coiffée d'une tétra-boucle 5'-UUCG pour constituer le site A. Les tétra-boucles de séquences consensus 5'-GNRA, 5'-

UNCG ou 5'-CUUG (N=A, C, G ou U; R=A ou G) sont caractérisées par une exceptionnelle stabilité thermodynamique (Molinaro et Tinoco 1995 ; Tuerk, *et al.* 1988), de sorte qu'elles sont fréquemment rencontrées dans les molécules d'ARN naturelles (Batey, *et al.* 1999 ; Moore 1999 ; Woese, *et al.* 1990). De nombreuses tentatives ont été opérées

**Figure 2.1 :** Structure secondaire attendue pour une tétraboucle (gauche) et celle de l'oligoribonucléotide obtenue dans le cristal (droite). (D'après Holbrook, *et al.* 1991).

pour les cristalliser dans un contexte d'oligoribonucléotide proche de celui du modèle ASR-27, c'est-à-dire contenant une hélice de quelques plateaux de bases canoniques coiffée par une tétra-boucle (Holbrook et Kim 1997 ; Masquida et Westhof 1999). Dans les conditions de concentrations élevées en ARN et en sels nécessaires à la cristallisation qui favorisent certains empilements cristallins, les oligoribonucléotides étudiés préfèrent se replier sous forme de doubles hélices comportant des paires de bases non-canoniques plutôt que sous forme de tiges-boucles (Baeyens, *et al.* 1996 ; Holbrook, *et al.* 1991) (Figure 2.1). Plusieurs approches ont récemment permis l'observation de tétra-boucles par cristallographie :

- cristallisation d'ARN de grandes tailles comportant des tétra-boucles, seuls (Batey, *et al.* 2000; Cate, *et al.* 1996; Ferré-D'Amaré et Doudna 1999; Zhang et Doudna 2002), ou en complexe avec une ou plusieurs protéines (Ban, *et al.* 2000; Ennifar, *et al.* 2000; Oubridge, *et al.* 2002; Price, *et al.* 1998; Wimberly, *et al.* 2000),
- cristallisation d'oligoribonucléotides possédant différentes longueurs de tige (Correll, *et al.* 1998 ; Correll, *et al.* 1999),
- cristallisation d'oligoribonucléotides à partir d'une solution hautement diluée progressivement concentrée (Ennifar, *et al.* 2001).



Les séquences des sites A des organismes eubactériens Escherichia coli et Thermus thermophilus (ne différant que par la nature du plateau de bases 1410–1490 : A-U chez E. coli; G=C chez T. thermophilus) ont été incorporées dans une première série de quatre fragments (Figure 2.2). Les fragments F1 à F4 contiennent l'ensemble de la séquence sauvage de l'ARN 16S, des nucléotides 1401 à 1416 et 1484 à 1501, inséré entre des paires de bases G=C. Tandis que les fragments F1 et F2 correspondent respectivement aux séquences consensus d'E. coli et de T. thermophilus, les fragments F3 et F4 possèdent des différences au niveau d'une ou deux paires de bases associées aux différentes covariations observées chez d'autres organismes. Ces quatre fragments sont formés de deux oligoribonucléotides différents de longueurs comprises entre 19 et 22 nucléotides. Une analyse de la littérature montre en effet que la séquence de l'oligoribonucléotide est un paramètre plus important que la nature et les concentrations d'agents cristallisants dans la recherche de conditions qui conduisent à la formation de cristaux (Holbrook, et al. 2001 ; Masquida et Westhof 1999). Afin d'optimiser les chances de cristallisation, des extrémités pendantes ont été ajoutées pour les fragments F2-F4 (Anderson, et al. 1996). Enfin, pour des raisons de moindre coût de la synthèse chimique, le dernier nucléotide en 3' de chaque brin est un désoxyribonucléotide.



Une erreur de séquence (paire de base additionnelle par rapport à la séquence sauvage) a été détectée dans les fragments F1-F4 après leur synthèse (Figure 2.3). Les fragments des séries suivantes ont été conçus de manière à ne plus comporter cette erreur. Les fragments A1–A2 de la série n°2 comprennent deux brins plus courts (15 et 16 nucléotides pour A1 ; 11 et 12 nucléotides pour A2). Seul le site A d'*E. coli* est incorporé dans le fragment A2 (Figure 2.1).

A partir de la série n°3, les fragments sont formés de deux brins identiques qui s'apparient pour constituer deux sites A. Ils sont longs de 21 à 28 nucléotides et comprennent uniquement les nucléotides du site A séparés par des paires G=C. Différentes natures d'extrémités 5' et 3' ont été testées pour la cristallisation. L'ajout du brome en position 5 d'une cytosine (fragment A3.5) a été effectuée dans un souci de réaliser des essais de remplacement isomorphe et de diffusion anomale. Ce sont les fragments A3 et A3.4 de la série n°3 qui ont conduit à l'obtention de cristaux en présence de divers aminoglycosides.

Les fragments des séries n°4 et 5 ont été conçus après la résolution de la première structure. Tandis que les fragments de la série n°3 ne diffèrent entre eux que par leurs extrémités, ceux des séries n°4 et 5 comprennent des variations en une ou plusieurs positions, aux extrémités comme au sein du site A, dans un souci de tenter d'améliorer la cristallisation et/ou de disposer de structures comparatives de plusieurs mutants. Ainsi, les fragments A3.8, A3.12-14 et A3.17 comprennent le site A d'*E. coli* sauvage et différentes modifications introduites afin de comparer leurs effets sur la cristallisation. Les fragments B1 et B2 comportent des nucléotides supplémentaires, nécessaires pour l'interaction avec l'hygromycine B. Certains fragments comprennent les séquences des sites A humain cytoplasmique (A3.10, A3.16), mitochondrial (A3.11) et mitochondrial muté (A3.13).

Les fragments des séries n°1 à 3 ont été synthétisés par chimie sur support solide automatisée en collaboration avec le service de synthèse d'oligonucléotides du laboratoire (voir §B.1 & B.2 et chapitre 5). Les fragments des séries n°4 et 5, ainsi que ceux de la série n°3 régulièrement utilisés pour des tests de cristallisation, ont été obtenus par la suite auprès de la société américaine Dharmacon Research Inc. Cette société a développé une méthode de synthèse plus efficace, produisant des oligoribonucléotides de meilleure qualité (voir §B.2).

#### B. Synthèses chimiques et purifications

#### 1) Résultats

Entre trois et cinq synthèses ont été réalisées pour chaque oligoribonucléotide de la série n°1 à une échelle de 1 µmole (Tableau 2.1). La qualité de chaque synthèse est déterminée à l'aide des valeurs ASWY et OY correspondant respectivement au rendement par étape et au rendement global. Une synthèse correcte possède généralement un OY supérieur à 30 %, les valeurs ASWY restant supérieures à 90 % (Tableau 2.2).

**Tableau 2.1 :** Bilan des synthèses et des purifications réalisées pour les oligoribonucléotides dela série n°1.

Nom	Longueur	OY	Quantité	Chromatogramme	Méthode de	Quantité	Quantité	
du	(nt)	(%)	avant	analytique	purification	après	purifiée après	
brin			purification			purification	2 <sup>e</sup> déprotection	
			( <b>mg</b> )			(mg)	(mg)	
1.1#1	19	58	3,20	Synthèse correcte	HPLC			
1.1#2	19	54,9	2,00	Synthèse correcte	HPLC	0,64	1,00	
1.1#3	19	?ª	2,70	Synthèse correcte	HPLC			
1.2#1	21	66	3,50	Mauvaise déprotection	PAGE	-	3,50	
1.2#2	21	37,5	3,50	Synthèse correcte	HPLC		2.80	
1.2#3	21	45,2	3,50	Synthèse correcte	HPLC	-	2,80	
2.1#1	20	60,1	3,00	Synthèse correcte	HPLC	0,24	0,60	
2.1#2	20	41,5	2,30	Mauvaise déprotection	HPLC	-	2,30	
2.1#3	20	39,4	3,50	Synthèse correcte	HPLC	-	0,80	
2.2#1	22	52,2	3,60	n-1-mère majoritaire ?	PAGE	-	3,60	
2.2#2	22	43,9	1,80	Synthèse correcte	PAGE	0,50	-	
2.2#3	22	37,4	2,60	Synthèse correcte	PAGE	0,60	-	
3.1#1	20	67	3,60	Synthèse correcte	HPLC			
3.1#2	20	56,2	2,70	Synthèse correcte	HPLC	1,20	1,80	
3.1#3	20	54,3	3,10	Synthèse correcte	HPLC			
3.2#1	22	67,1	3,50	Synthèse correcte	HPLC	0,40 (avec 3.2#4)	0,50 (avec 3.2#4)	
3.2#2	22	29,7	2,10	Mauvaise déprotection	PAGE	-	2,10	
3.2#3	22	24,2	2,20	Mauvaise déprotection	PAGE	-	2,20	
3.2#4	22	60,1	2,90	Synthèse correcte	PAGE	Avec 3.2#1	Avec 3.2#1	
4.1#1	20	32,7	1,80	Synthèse correcte	HPLC			
4.1#2	20	33,3	1,80	Synthèse correcte	HPLC	1,30	0,90	
4.1#3	20	45,3	3,30	Synthèse correcte	HPLC			
4.1#4	20	47,9	2,60	Synthèse correcte	HPLC			
4.1#5	20	49,9	2,00	Synthèse correcte	HPLC			
4.2#1	22	4,6	3,00	Mauvaise synthèse	non	-	-	
4.2#2	22			Mauvaise synthèse	non	-	-	
4.2#3	22	43,3	3,40	Pic faible	HPLC	-	1,30	
4.2#4	22	58,5	2,70	Pic faible	HPLC	-	0,60	
4.2#5	22	64	4,00	Mauvaise déprotection	PAGE	-	4,00	
<sup>a</sup> rendement non-affiché par le moniteur								

La première colonne indique le numéro du brin synthétisé suivi du numéro de la synthèse.



Tableau 2.2 : Exemples de suivis de synthèses de



**Figure 2.4 :** Chromatogrammes analytiques d'une synthèse correcte (brin 1.1#3 en a) et d'une synthèse de mauvaise qualité (brin 3.2#3 en b).

La longueur d'onde utilisée est 260 nm (sensibilité=0,19 UA<sub>260</sub> en a et 0,15 UA<sub>260</sub> en b). Echelle des temps en abscisses : 1 largeur de carreau=3 min.



Après déprotection et précipitation au n-butanol, un échantillon de chaque synthèse est analysé par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) analytique en conditions dénaturantes. La qualité du profil d'élution obtenu sur le chromatogramme (Figure 2.4) détermine la méthode de purification de l'ensemble de la synthèse, par HPLC préparative

(Figure 2.5) ou par PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide) préparative en conditions dénaturantes. En effet, lorsque le chromatogramme ne montre pas de pic distinct, il s'avère plus judicieux de purifier les oligoribonucléotides correspondants par

PAGE. Au cours de la purification par HPLC, les fractions sont récupérées à partir du pied du pic correspondant à l'oligoribonucléotide attendu. Une analyse par PAGE montre que les fractions récupérées entre la pointe et la demi-hauteur du pic sont en général pures (Figure 2.6). Cependant, de l'ARN est également retrouvé dans certaines fractions précédentes, qui sont rassemblées avant d'être purifiées à nouveau. Les fractions qui contiennent uniquement l'oligoribonucléotide désiré



sont rassemblées puis dessalées avant d'être concentrées pour former les solutions-stocks de chaque oligoribonucléotide dans l'eau. Les synthèses purifiées par PAGE sont directement concentrées, sans vérification de la pureté.

Enfin, une troisième catégorie de synthèses apparaît mal déprotégée. Des essais et des résultats publiés (Murray, *et al.* 1994) montrent que la méthode de purification par PAGE

ne permet pas d'éliminer les fragments mal déprotégés. L'ensemble de ces synthèses sera purifié par HPLC préparative après une étape de deuxième déprotection.

## 2) Problèmes de déprotection

La déprotection du groupement TBDMS fixé sur l'oxygène 2' des ARN synthétisés dépend de la longueur de l'ARN (Gasparutto, *et al.* 1992), de sa séquence, et surtout du degré d'humidité de la solution de déprotection (TBAF 1 M/THF). Celui-ci varie selon les flacons employés. S'il est supérieur à 5%, la déprotection ne sera pas efficace (Hogrefe, *et* 

al. 1993). De plus, il existe une concentration et un temps de déprotection optimaux pour chaque fragment (Murray, et al. 1994). Les oligoribonucléotides 1.2#1, 2.1#2, 2.2#1, 3.2#2, 3.2#3 et 4.2#5 correspondent à des fragments mal déprotégés (Tableau 2.1). En effet, il s'agit de synthèses à rendement correct (sauf 3.2#2 et 3.2#3) qui présentent un profil de mauvaise synthèse en chromatographie analytique (Figure 2.7). De plus, sur PAGE analytique, la bande correspondant au fragment attendu n'apparaît pas (Figure 2.7). Etant données les conditions dénaturantes employées (température élevée au cours des purifications et haute concentration en urée) et le fait que cela soit observé pour des synthèses de brins différents, il ne s'agit pas de conformations différentes du même ARN. La seconde déprotection est effectuée en présence de 1 ml de solution TBAF 1 M/THF, au lieu de 1,5 ml (pendant 24h à l'obscurité) (Figure 2.7). Pour les synthèses de qualité correcte purifiées par HPLC, les fractions récupérées après le fragment de taille attendue sont rassemblées et également déprotégées une seconde fois. (Tableau 2.2).



brin 2.1#2 après la 1<sup>e</sup> déprotection. Chromatogramme analytique obtenu après la 2<sup>e</sup> déprotection (c).

La longueur d'onde utilisée est 260 nm (sensibilité=0,15 UA<sub>260</sub> en a et 0,05 UA<sub>260</sub> en c). Echelle des temps en abscisses : 1 largeur de carreau=3 min.



D'autres protocoles de déprotection, utilisant du trihydrofluorure de triéthylamine (Westman et Strömberg 1994) ou une solution 0,01 M d'acide chlorhydrique à pH=2,0 (Kawahara, et al. 1995), ont été testés. Entre temps, la société américaine Dharmacon Research Inc. a développé une méthode de synthèse chimique sur support solide qui utilise des synthons possédant des groupements protecteurs différents de ceux utilisés au laboratoire (Scaringe, et al. 1998). En particulier, les oxygènes 2' des oligoribonucléotides synthétisés sont protégés par un groupement 2'-bis-(acétoxyethoxy)-méthyle éther (2'-ACE). Le temps de couplage d'un nucléotide est court, le rendement de

synthèse est élevé et la méthode de déprotection est rapide et efficace (Figure 2.8). Cependant, les synthons nécessaires à la fabrication de ces oligoribonucléotides n'étant pas commercialisés, les oligoribonucléotides ont été obtenus directement synthétisés auprès de la société. Plusieurs tests comparatifs ont été effectués pour des oligoribonucléotides de différentes tailles. Des expériences en spectrométrie de masse MALDI-TOF effectuées sur certaines séquences mal déprotégées ont révélé la présence d'un groupement résiduel de 54 g/mol après la déprotection au TBAF/THF (Figure 2.9). Ce groupement, attribué à une fonction cyanoéthyle ou tertiobutyle, n'est jamais retrouvé dans les oligoribonucléotides obtenus auprès de Dharmacon Research Inc. (Figure 2.9).



**Figure 2.9 :** Spectres MALDI-TOF d'une synthèse par Dharmacon Research Inc. (a), d'une synthèse correcte (b) et d'une synthèse mal déprotégée (c) effectuées au laboratoire.

La séquence A3 (PM=7031,3 g/mol) a été utilisée pour les tests (les différences de masse observées sont dues à la différence de nature—protéine ou acide nucléique—entre l'oligoribonucléotide testé et le calibrant, ici du cytochrome C). La masse attendue est encadrée en rouge. Les pics additionnels (indiqués par des lettres) correspondent à des adduits d'ions ou au groupement résiduel.

Les fragments A1 et A2 (série n°2) et A3 (série n°3) ont été synthétisés et purifiés par HPLC au laboratoire selon le même procédé que les fragments F1 à F4. Les fragments de la série n°3 ont été commandés directement auprès du service de synthèse des oligonucléotides du laboratoire. Les quantités d'oligoribonucléotides récupérées après purification et regroupement des fractions correspondant aux différentes synthèses du même brin, estimées par mesure de l'absorbance à 260 nm (A<sub>260</sub>), sont faibles par rapport aux rendements habituellement obtenus selon cette méthode (Tableau 2.3). Les problèmes de déprotection et de purification associés à certains oligoribonucléotides (en particulier ceux contenant la séquence 3' du site A : 1.2, 3.2, 4.2, A1.2 et A2.2) sont responsables de cette perte de matériel. Par comparaison, les fragments des séries suivantes (de longueurs équivalentes), commandés chez Dharmacon Research Inc. à l'échelle similaire de 1 µmole, ont en général un rendement de 1,5 mg par synthèse après purification, et sans distinction de séquence.

Tableau 2.3 : Quantités finales d'oligoribonucléotides obtenues après purification.												
Nom du brin	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2	A1.1	A1.2	A2.1	A2.2
Quantité finale récupérée (mg)	1,2	0,4	0,4	0,5	1,2	0,4	1,3	0	0,3	0,4	1,0	0,3

Les quantités limitantes en oligoribonucléotides étant survenues pour un brin sur deux en moyenne (avec comme cas extrême celui de l'oligoribonucléotide 4.2 dont aucun échantillon n'a été récupéré pur), la conception des séries suivantes (n° 3 à 5) s'est orientée vers la synthèse de fragment conçus pour s'assembler en double hélice mais ne comportant qu'un seul brin. Cette approche a de plus permis de diviser le nombre de séquences à synthétiser par deux.

#### 3) Problèmes de purifications par HPLC

La comparaison entre l'ensemble de ces purifications et celles effectuées pour d'autres oligoribonucléotides de différentes longueurs synthétisés au laboratoire révèle que la purification d'oligoribonucléotides par HPLC est véritablement appropriée pour des oligoribonucléotides d'une longueur maximale de 15-20 nt. Au-delà, cette méthode de purification ne permet souvent plus une séparation correcte de l'oligoribonucléotide et de ses contaminants : la zone du pic d'élution contenant l'oligoribonucléotide attendu devient plus restreinte, et une quantité non-négligeable d'oligoribonucléotide est perdue par dilution dans d'autres fractions contenant des contaminants (Figure 2.6).



En outre, le système HPLC utilisé pour les purifications des oligoribonucléotides de la série n°1 a rapidement généré un relargage d'ARN (Figure 2.10). Il a alors été nécessaire de procéder à ajustements des lors des purifications. Les oligoribonucléotides identiques ont été purifiés l'un à la suite de l'autre, avant que le système ne soit nettoyé par passage d'une solution acide (10 ml HCl / 80% MeCN; pH=3,5), et par une succession de gradients à vide. La purification des oligoribonucléotides suivants est entreprise, et

ainsi de suite pour tous les oligoribonucléotides purifiés par HPLC (Tableau 2.1).

Des problèmes de séparation ont rapidement surgi. Ni l'augmentation de la température pendant les chromatographies préparatives, ni le démontage du système et le nettoyage des pièces, ni le passage de tampons à pH très basique (NaOH 25 mM ; pH=12,5), ni même le reconditionnement de la résine échangeuse d'une d'anions (passage solution 50 mM NH<sub>4</sub>Cl / 20% MeOH) n'ont permis d'y remédier. L'étanchéité de la valve d'injection, l'usure des pompes, ainsi que le vieillissement de la colonne seront mis en cause. La colonne fut remplacée par une colonne identique et la



chaîne HPLC Waters® remplacée par une chaîne HPLC Dionex® informatisée, avant la purification des oligoribonucléotides des autres séries (Figure 2.11). Les oligo-

ribonucléotides commandés chez Dharmacon Research Inc., ne souffrant pas de problèmes de déprotection et obtenus en plus grande quantité, seront systématiquement purifiés par PAGE en conditions dénaturantes.

## C. Recherche de conditions de renaturation

Les fragments de la série n° 1 ne comportent pas la séquence sauvage correcte de l'extrémité 3' de l'ARN 16S. Cependant, le site d'interaction avec les aminoglycosides n'etant pas perturbé, ces fragments ont été utilisés pour des essais préliminaires de stabilité en solution, de renaturation et de cristallogénèse en présence d'aminoglycosides. Ces essais ont été effectués afin d'établir un protocole de renaturation qui permette la formation de complexes entre les fragments d'ARN et les aminoglycosides, mais sans dégrader ni l'antibiotique, ni l'ARN. En effet, une solution de sulfate de néomycine est instable entre les pH 2,0 et 9,0 (Budavari, *et al.* 1989), et stable seulement pendant cinq jours à 37°C (catalogue Sigma®). Les protocoles testés sont ceux habituellement utilisés pour renaturer des solutions d'ARN : dénaturation à haute température (en général 80 ou 90°C) pendant 1 à 5 min suivie d'un refroidissement lent (quelques heures) jusqu'à température ambiante.

#### 1) Résultats des antibiogrammes

La technique de l'antibiogramme a été employée afin de vérifier que la néomycine n'est pas altérée au cours des processus de renaturation d'ARN. Des volumes identiques de différentes solutions de 0,6 mM de néomycine sont déposés au centre d'une boîte de Petri contenant un tapis de bactéries *Escherichia coli* (souche DH5α). Au bout d'une nuit à 37°C, on observe une inhibition de croissance des bactéries autour des dépôts de néomycine matérialisée par un halo. Un dépôt est effectué avec une solution de néomycine



**Figure 2.12 :** Antibiogrammes obtenus avec une dilution de la solution-stock de néomycine à 0,6 mM (a), une solution de renaturation (ARN/néomycine) (b), une solution de renaturation (néomycine seule) (c) (deux dépôts ont été effectués dans la condition c).

provenant directement du stock. Un deuxième dépôt est effectué avec une solution de renaturation (0,6 mM fragment F3/0,6 mM néomycine/0,1 mM MgCl<sub>2</sub>/50 mM Na cacodylate pH 6,0) préalablement portée progressivement à 95°C en 30 min, maintenue à 95°C pendant 5 min puis refroidie lentement jusqu'à température ambiante pendant 2h. Un troisième dépôt est effectué avec une solution similaire mais ne comportant pas d'ARN. La néomycine ne semble pas affectée par les hautes températures utilisées pour la renaturation (Figure 2.12). Chauffée ou non, elle est aussi efficace pour inhiber la croissance des bactéries. Cependant, l'inhibition est moins prononcée en présence de l'ARN. Dans ce cas, soit la néomycine est dégradée, soit son interaction avec l'ARN l'empêche d'être active.

## 2) Résultats des expériences de fusion

Des expériences de dénaturation thermique ont été effectuées par mesure de l'A<sub>258</sub> de solutions contenant environ 0,4  $\mu$ M de fragment F3 en présence de diverses concentrations de MgCl<sub>2</sub> (0,1 mM-15 mM) et de néomycine (0,1  $\mu$ M-3,0 mM), dans une solution tampon contenant 5 mM de NaCl et 50 mM de cacodylate de sodium à pH=6,0. Une augmentation de la concentration en MgCl<sub>2</sub> ne semble pas provoquer une stabilisation du fragment (Tableau 2.4 ; Figure 2.13). Un phénomène d'hystérèse est observé : le profil obtenu en chauffant n'est pas superposable à celui obtenu en refroidissant l'échantillon. L'écart augmente proportionnellement à la concentration en magnésium, signe d'une dégradation de l'ARN.

<b>Tableau 2.4 :</b> Valeurs des températures defusion et exemples de profils obtenus pour lefragment F3.					
MgCl <sub>2</sub> (mM)	Néomycine (mM)	Tm (°C)	Profil		
-	-	44	а		
0,1	-	hystérèse	b		
0,1	1,0 x 10 <sup>-4</sup>	51	с		
0,1	4,0 x 10 <sup>-4</sup>	54	d		
0,1	0,75	83	e (1 <sup>er</sup> profil),		
			f (2 <sup>e</sup> profil)		
5,0	-	hystérèse			
15,0	-	hystérèse			
15,0	1,5	hystérèse			
15,0	3,0	hystérèse			

Le fragment est par contre progressivement stabilisé par des concentrations croissantes en néomycine (Tableau 2.4 ; Figure 2.14). Ainsi, il semble prometteur d'effectuer les tests de cristallogénèse en présence d'un excès de néomycine par rapport au fragment d'ARN (rapports stoechiométriques 5:1 ou 10:1).











#### 3) Résultats des expériences par PAGE

Deux solutions de renaturation sont réalisées, l'une avec le fragment F2 et l'autre avec le fragment F3, dans un rapport néomycine : ARN de 7:1. Ces solutions sont portées à 95°C dans un bloc chauffant pendant 30 min, maintenues à 95°C pendant 5 min ou 30 min, puis refroidies lentement ( $\approx$  2h) jusqu'à température ambiante. Une PAGE dénaturante est ensuite effectuée. Le gel montre que le protocole de renaturation utilisé dégrade l'ARN, même au bout de 5 min à 95°C (Figure 2.15). Il est possible que les groupements amines de la néomycine soient responsables de réactions de catalyse acido-basique induisant une coupure de l'ARN, comme c'est le cas pour d'autres systèmes ARN/aminoglycosides (Earnshaw et Gait 1999 ; Westhof 1999). L'observation d'une dégradation entre en contradiction avec les mesures de températures de fusion qui indiquent une importante stabilisation de l'ARN en présence d'aminoglycoside.

En conclusion de ces études, il apparaît que le complexe ARN/néomycine est fragile en solution. L'ARN se dégrade lorsqu'il est chauffé en présence de néomycine. La néomycine est moins efficace après avoir été chauffée en présence de l'ARN, ce qui peut suggérer qu'elle se dégrade elle-aussi. C'est pourquoi il apparaît plus judicieux de chauffer l'ARN à

une température inférieure à 95°C et de n'ajouter l'aminoglycoside qu'à une température de 37°C, dans un rapport stoechiométrique néomycine/ARN (5:1) par exemple. Aucune dégradation n'est observée pour des échantillons portés à 45°C pendant 3 min puis à 22°C pendant 10 minutes avant ajout de la néomycine. Des expériences de retard sur gel ont aussi été effectuées avec 10 µM de fragment A1 en présence de 10 et 100 µM de néomycine (45s à 90°C, puis 2 min à 4°C, puis 8



min à 27°C) dans une solution tampon contenant 3 mM  $MgCl_2$ . Un déplacement de bande a été observé entre les simples et doubles brins, mais pas entre les doubles brins en présence ou non de néomycine (non représenté).

## D. Cristallisation et premiers essais de diffraction

#### 1) Cristallogénèse du fragment F3

Au cours d'un stage antérieur au Diplôme d'Etudes Approfondies effectué au laboratoire, une matrice de 24 conditions de cristallisation rassemblant les paramètres importants pour la cristallisation des ARN avait été établie à partir d'une analyse bibliographique (Masquida et Westhof 1999). Une matrice similaire a été appliquée à la cristallisation du fragment F3 en présence de néomycine par diffusion de vapeur en goutte suspendue (Tableau 2.5). Cette matrice comprend quatre agents cristallisants, chacun testé à deux concentrations différentes, ainsi que des ions mono- (NaCl) et divalents (MgCl<sub>2</sub>). La solution est tamponnée par 50 mM de cacodylate de sodium à un pH légèremement acide (pH=6,0). Trois solutions de renaturation ont été préparées à température ambiante, contenant : 1,5 mM brin 3.1/1,5 mM brin 3.2/0,1 mM MgCl<sub>2</sub>/0,75, 1,5 ou 3 mM de sulfate de néomycine, testant ainsi trois rapports néomycine/fragment F3 (1:2, 1:1 et 2:1), tout en évitant une concentration élevée en magnésium qui pourrait inhiber la fixation de l'aminoglycoside au site A (Famulok et Hüttenhofer 1996).

Des précipités ont été obtenus pour les conditions B6 (immédiatement), B3 à B6 (après un jour), puis pour toute la rangée (après 4 jours). Aucune évolution des gouttes n'a été

observée pour les autres conditions (gouttes claires), sauf pour la condition D2 : une espèce apparemment cristalline de dimension légèrement inférieure à  $100 \mu m$  est apparue au bout de 4 jours. Des essais de diffraction n'ont pas permis de déterminer la nature de ce cristal.

#### **Tableau 2.5 :** Matrice de conditions de cristallisation appliquée au fragment F3.

Chaque condition comprend 5 mM NaCl et 0,1 mM MgCl<sub>2</sub> (Néo=néomycine). Les volumes des gouttes sont de 1,2 µl (solution du complexe F3/néomycine)+1,2 µl (solution de cristallisation) pour des concentrations en néomycine de 0,75 et 1,5 mM et de 1 µl+1 µl dans les autres cas. Les réservoirs ont pour volume 500 µl. Les conditions en MPD sont effectuées avec 60% MPD dans le réservoir. La température de cristallisation est 22°C.

La condition ayant donné un cristal est indiquée en gras.

	Α	В	С	D
1	MPD 15%	PEG 400 10%	SLi 1,6 M	SA 1,5 M
	Néo 0,75 mM	Néo 0,75 mM	Néo 0,75 mM	Néo 0,75 mM
2	MPD 15%	PEG 400 10%	SLi 1,6 M	SA 1,5 M
	Néo1,5 mM	Néo 1,5 mM	Néo 1,5 mM	Néo 1,5 mM
3	MPD 15%	PEG 400 10%	SLi 1,6 M	SA 1,5 M
	Néo 3,0 mM	Néo 3,0 mM	Néo 3,0 mM	Néo 3,0 mM
4	MPD 30%	PEG 400 20%	SLi 1,9 M	SA 2,0 M
	Néo 0,75 mM	Néo 0,75 mM	Néo 0,75 mM	Néo 0,75 mM
5	MPD 30%	PEG 400 20%	SLi 1,9 M	SA 2,0 M
	Néo 1,5 mM	Néo 1,5 mM	Néo 1,5 mM	Néo 1,5 mM
6	MPD 30%	PEG 400 20%	SLi 1,9 M	SA 2,0 M
	Néo 3,0 mM	Néo 3,0 mM	Néo 3,0 mM	Néo 3,0 mM

## 2) Cristallogénèse des fragments F3 et A1

Les premiers essais de cristallisation exposés ci-dessus ont encouragé les études de renaturation décrites au paragraphe I.C. Suite aux résultats de ces études, les essais de cristallisation suivants ont été effectués avec les fragments F1, F3 et A1. Une solution contenant 1 mM de chaque fragment et 0,1-2,0 mM MgCl<sub>2</sub>/ est chauffée à 45°C pendant 3 min puis laissé à 22°C pendant 10 min avant ajout de sulfate de néomycine. L'ajout de néomycine au fragment F1 dans un rapport néomycine/ARN (5:1) provoque une précipitation. Une précipitation similaire est observée lors de l'ajout de néomycine aux fragments F3 et A1 dans des rapports respectifs de 2,2:1 et 1:1, mais cette précipitation est éliminée après une légère dilution et un chauffage à 37°C pendant quelques minutes. Une matrice de conditions en kit, la matrice Natrix<sup>©</sup> (Hampton Research<sup>®</sup>), est finalement réalisée à 22°C en entier avec le fragment A1 (0,8 mM ARN/0,8 mM néomycine) et de manière clairsemée (uniquement les conditions ne contenant pas de solvant organique) avec le fragment F3 (0,9 mM ARN/1,9 mM néomycine). Cette matrice rassemble 48 conditions ayant déjà donné des cristaux pour des complexes ARN/protéine ou ARN/ligand (Tableau 2.6). Outre les variations de types et de concentrations en agents cristallisants et en additifs, cette matrice propose un criblage du pH, de 5,6 à 8,5. Cette approche est intéressante dans l'étude d'un complexe ARN/antibiotique dépendant fortement du nombre de groupements aminés protonés. Des précipités ont été observés immédiatement ou au bout d'une semaine dans la majorité des conditions, exceptées les conditions n°8, 11, 21, 30, 34, 35 et 40. Les conditions n°11, 30 et 40 contiennent du sulfate d'ammonium ou de lithium, et se rapprochent ainsi de la condition ayant produit un cristal lors des premiers essais (§I.D.1.).

#### Tableau 2.6 : Matrice de 48 conditions Natrix©.

Le numéro référençant chaque condition est indiqué en début de chaque colonne, et encadré en rouge pour les conditions n'ayant pas précipité.

Les volumes des gouttes réalisées sont de 1,2  $\mu$ l (solution du complexe A1/néomycine)+1,2  $\mu$ l (solution de cristallisation) et de 1  $\mu$ l (solution du complexe F3+néomycine)+1  $\mu$ l (solution de cristallisation).

Sel	Tampon	Agent cristallisant
1. 0.01 M Magnesium Chloride	1. 0.05 M MES pH 5.6	1. 2.0 M Lithium Sulfate monohydrate
2. 0.01 M Magnesium Acetate	2. 0.05 M MES pH 5.6	2. 2.5 M Ammonium Sulfate
3. 0.1 M Magnesium acetate	3. 0.05 M MES pH 5.6	3. 20% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
4. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Sulfate	4. 0.05 M MES pH 5.6	4. 10% v/v Polvethylene Glycol 400
5. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	5. 0.05 M MES pH 5.6	5. 5% w/v Polyethylene Glycol 8000
6. 0.1 M Ammonium Sulfate, 0.01 M Mg Chloride	6. 0.05 M MES pH 5.6	6. 20% w/v Polyethylene Glycol 8000
7. 0.02 M Magnesium Chloride	7. 0.05 M MES pH 6.0	7. 15% v/v iso-Propanol
8. 0.1 M Ammonium Acetate, 0.005 M Mg Sulfate	8. 0.05 M MES pH 6.0	8. 0.6 M Sodium Chloride
9. 0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	9. 0.05 M MES pH 6.0	9. 10% v/v Polyethylene Glycol 400
10. 0.005 M Magnesium Sulfate	10. 0.05 M MES pH 6.0	10. 5% w/v Polyethylene Glycol 4000
11. 0.01 M Magnesium Chloride	11. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	11. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
12. 0.01 M Magnesium Sulfate	12. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	12. 1.8 M Lithium Sulfate monohydrate
13. 0.015 M Magnesium Acetate	13. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	13. 1.7 M Ammonium Sulfate
14. 0.1 M Potassium Chloride, 0.025 M Mg Chloride	14. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	14. 15% v/v iso-Propanol
15. 0.04 M Magnesium Chloride	15. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	15. 5% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
16. 0.04 M Magnesium Acetate	16. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	16. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
17. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	17. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	17. 10% w/v Polyethylene Glycol 4000
18. 0.01 M Magnesium Acetate	<ol><li>0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5</li></ol>	<ol><li>1.3 M Lithium Sulfate monohydrate</li></ol>
19. 0.01 M Magnesium Sulfate	19. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	19. 2.0 M Ammonium Sulfate
20. 0.1 M Ammonium Acetate, 0.015 M Mg Acetate	20. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	20. 10% v/v iso-Propanol
21. 0.2 M Potassium Chloride, 0.005 M Mg Chloride	21. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21. 10% w/v 1,6 Hexanediol
22. 0.08 M Magnesium Acetate	22. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	22. 15% v/v Polyethylene Glycol 400
23. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	23. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	23. 10% w/v Polyethylene Glycol 4000
24. 0.2 M Ammonium Acetate, 0.01 M Ca Chloride	24. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	24. 10% w/v Polyethylene Glycol 4000
25. 0.08 M Magnesium Acetate	25. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	25. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
26. 0.2 M Potassium Chloride, 0.1 M Mg Acetate	26. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	26. 10% w/v Polyethylene Glycol 8000
27. 0.2 M Ammonium Acetate, 0.01 M Mg Acetate	27. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	27. 30% w/v Polyethylene Glycol 8000
28. 0.05 M Magnesium Sulfate Aq.	28. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	28. 1.6 M Lithium Sulfate monohydrate
29. 0.01 M Magnesium Chloride	29. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	29. 4.0 M Lithium Chloride anhydrous
30. 0.01 M Magnesium Chloride	30. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	30. 1.6 M Ammonium Sulfate
31. 0.005 M Magnesium Chloride	31. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	31. 25% V/V Polyetnylene Glycol Monometnyl Ether 550
32. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	32. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	32. 20% W/V 1,6 Hexanediol
33. U.2 M Ammonium Chloride, U.01 M Mg Chloride	33. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	33. 30% W/V 1,6 Hexanediol
34. 0.1 M Polassium Chloride, 0.005 M Mg Sullate Aq.	34. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	34. 15% V/V Z-Methylene Chronitaneolo
26. 0.1 M Potassium Chlorida, 0.01 M Ca Chlorida	26 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	26 10% v/v Polyethylene Clycol 400
30. 0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	30. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	27 20% v/v Polyethylene Civcol 200
37. 0.2 M Ammonium Acotato, 0.15 M Mg Acotato	38 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	38 5% w/v Polyelinylene Glycol 200
30. 0.1 M Ammonium Acetate, 0.02 M Mg Chloride	30. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	30. 5% w/v Polyethylene Clycol 4000
40 0.01 M Magnesium Chloride	40 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	40 1 6 M Ammonium Sulfate
41 0.1 M Potassium Chloride 0.015 M Mg Chloride	41 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	41 10% v/v Polvethylene Glycol Monomethyl Ether 550
42 0.01 M Magnesium Chloride	42 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	42 5% v/v iso-Propanol
43 0.05 M Ammonium Acetate. 0.01 M Mg Chloride	43 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	43 10% v/v 2-Methvl-2 4-pentanediol
44. 0.2 M Potassium Chloride. 0.05 M Mg Chloride	44. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	44. 10% w/v Polvethylene Glycol 4000
45 0.025 M Magnesium Sulfate Ag	45. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	45. 1.8 M Ammonium Sulfate
46. 0.005 M Magnesium Sulfate Ag.	46. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	46. 35% w/v 1.6 Hexanediol
47. 0.1 M Potassium Chloride. 0.01 M Ma Chloride	47. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	47. 30% v/v Polyethylene Glvcol 400
48. 0.2 M Ammonium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	48. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48. 30% w/v Polvethvlene Glycol 4000

## 3) Cristallogénèse du fragment A3

#### (a) Fragment A3 synthétisé au laboratoire et purifié par HPLC

Après purification par HPLC, l'obtention de 1 mg de fragment A3, appartenant à la série n°3 (synthèse exécutée au laboratoire), a permis d'effectuer une série de nouveaux essais de cristallogénèse directement inspirés par les conditions de cristallisations des molécules d'ARN (Masquida et Westhof 1999), comme précédemment, mais aussi par celles
ayant permis la cristallisation de molécules d'ADN complexées à des petites molécules organiques. Au commencement de cette étude, l'essentiel des informations structurales de complexes entre des oligoribonucléotides (le plus souvent des aptamères) et des petites molécules (en plus des aminoglycosides) telles que l'AMP (Jiang, et al. 1996 ; Lin et Patel 1997), l'arginine et la citrulline (Yang, et al. 1996), la FMN (Fan, et al. 1996), l'ATP (Dieckmann, et al. 1996), la théophylline (Zimmermann, et al. 1997), provenait d'études par RMN. Seulement quelques structures cristallographiques de petites molécules liées à une molécule d'ARN était connues : celles d'un agent mutagène intercalant, la proflavine, liée à différents dimères de nucléotides (Shieh, et al. 1982; Swaminathan, et al. 1982), et celles d'agents antibactériens, antiviraux et antitumoraux tels la nétropsine et la distamycine A liés à l'ARNt<sup>Phe</sup> (Rubin et Sundaralingam 1984). Cependant, la chimie de synthèse de l'ADN ne souffrant pas des problèmes liés à la protection du groupement O2' des molécules d'ARN, son développement avait permis dès les années 1970 un essor des études cristallographiques de petites molécules interagissant avec des oligodésoxyribonucléotides (Berman et Young 1981; Neidle et Berman 1983; Neidle, et al. 1987). Plusieurs structures cristallographiques avaient ainsi pu être obtenues pour des ligands interagissant dans le petit sillon par des groupements chargés positivement (souvent des groupements guanidinium) : la nétropsine (Kopka, et al. 1985a ; Kopka, et al. 1985b), la distamycine A (Chen, et al. 1994; Kopka, et al. 1985b), la triostine A (Wang, et al. 1984; Wang, et al. 1986), la daunomycine (Wang, et al. 1987), l'agent Hoechst 33258 (Pjura, et al. 1987; Quintana, et al. 1991), le fluorochrome DAPI (Larsen, et al. 1989).

Les compositions des différentes solutions utilisées pour la résolution de ces structures, par cristallographie et par RMN, ont été compilées (Tableaux 2.7 et 2.8). Cette compilation a été mise en regard de celle publiée pour les structures cristallographiques d'oligoribonucléotides (Masquida et Westhof 1999). Il est ressorti de cette analyse que l'agent cristallisant le plus souvent utilisé est le 2,4-méthylpentanediol (MPD), à une concentration dans la goutte de 1,5 à 24 fois inférieure à celle du réservoir. Le tampon est le plus souvent du cacodylate de sodium à un pH neutre (pour les complexes d'ADN) ou légèrement acide (pour les complexes d'ARN), et contient des ions mono- et divalents. L'ARN est à une concentration supérieure ou égale à 1 mM. La température de cristallisation est en général de 4°C pour les complexes d'ADN alors qu'elle est de 20°C ou supérieure à 30°C pour les molécules d'ARN. Une matrice de conditions de cristallisation a été construite à partir de ces comparaisons (Tableau 2.9).

cristallographiques de structures de complexes ADN ou ARN/ligands antérieures à 1998.						
Structure	Composition de la goutte	Composition du réservoir	Référence			
Structures cristallographiq	ues de complexes ARN/ligan	ds				
CpA et UpG/Proflavine	CpA:UpG:Proflavine (1:1:3) 0,17 M SA	?	Aggarwal, et al. 1984			
ARNt <sup>Phe</sup> /Nétropsine ou distamycine A	5 mg ARNt <sup>Phe</sup> 10 mg MgCl <sub>2</sub> 1 mM spermine 10 mM Na cacodylate pH=6,5 12,5% MPD 5°C	-	Rubin, et al. 1984			
Structures cristallographiq	ues de complexes ADN/ligan	nds				
d(CGCGAATT <sup>Br</sup> CGCG) <sub>2</sub> / Nétropsine	0,3 mM ADN 0,6 mM nétropsine 6,3 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> 0,3 mM hydrochlorure de spermine 10% MPD 4°C	32,5% MPD	Kopka, et al. 1985			
d(ICICICIC) <sub>2</sub> / Distamycine A	0,3 mM ADN (simple brin) 1 mM distamycine A 20 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Na cacodylate pH=7,0 2,5% MPD Température ambiante	60% MPD	Chen, et al. 1994			
d(GCGTACGC) <sub>2</sub> / Triostine A	1,2 mM ADN (double brin) 1,1 mM triostine A (dans MeOH/CHCl <sub>3</sub> 1:1) 8 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM NaCl 1 mM spermine 20 mM Na acétate pH=4,5 12% MPD	30% MPD	Wang, et al. 1984			
d(GCGTACGC) <sub>2</sub> / Triostine A	2,0 mM ADN (double brin) 1,5 mM triostine A (dans MeOH/CHCl <sub>3</sub> 1:1) 10 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Na cacodylate pH=7,0 5% MPD	35% MPD	Wang, et al. 1986			
d(CGTACG) <sub>2</sub> / Daunomycine	2,0 mM ADN (simple brin) 2,0 mM daunomycine 15 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM spermine 30 mM Na cacodylate pH=6,5 5% MPD	30% MPD	Wang, et al. 1987			
d(CGCGAATTCGCG) <sub>2</sub> / Hoechst 33258	0,21 mM ADN (double brin) 0,21 mM Hoechst 33258 5,38 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> 0,21 mM spermine-acétate pH=7,0 20% MPD	32,5% MPD	Pjura, et al. 1987			
d(CGCGAATTCGCG) <sub>2</sub> / Hoechst 33258	0,22 mM ADN (double brin) 0,22 ou 0,44 mM Hoechst 33258 5,0 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> 0,5 mM spermine-HCl pH=6,9 15% MPD 4°C	32,5% MPD	Quintana, et al. 1991			
d(CGCGAATTCGCG)₂/ DAPI	0,28 mM ADN 0,23 DAPI.2HCl 5,38 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> 0,22 mM spermine-HCl pH=7,0 20% MPD 4°C	40% MPD	Larsen, et al. 1989			

Tableau 2.7 : Compilation des compositions des solutions utilisées pour les résolutions

Toutes ces expériences de cristallisation ont été effectuées en diffusion de vapeur, sauf celle du complexe contenant l'ARNt<sup>Phe</sup>, réalisée par cristallisation en batch.

antérieures à 1998.						
Structure	Composition de l'échantillon	Référence				
ASR-27/Paromomycine	3 et 4,5 mM ARN	Fourmy, et al. 1996;				
	10 mM Na phosphate pH=5,5 ou 6,4	Fourmy, et al. 1998				
	25, 35 et 45°C					
Aptamère I/Tobramycine	10 mM phosphate pH=6,8	Jiang, et al. 1996				
Aptamère II/Tobramycine	10 mM phosphate pH=6,1	Jiang, et al. 1998				
Aptamère/AMP	2-3 mM complexe	Jiang, et al. 1996				
	0,2 mM EDTA					
	10 mM Na phosphate pH=6,7					
Aptamère/Citrulline	1-2 mM ARN	Yang, et al. 1996				
Aptamère/Arginine	2-4 mM ligand					
	60 mM NaCl pH=6,7					
	5, 13 et 20°C					
Aptamère/FMN	2-4 mM ARN	Fan, et al. 1996				
	2-4 mM FMN					
	2-4 mM MgCl <sub>2</sub>					
	150 mM NaCl					
	0,1 mM EDTA					
	10 mM Na phosphate pH=6,5					
Aptamère/ATP	0,5-1,6 mM ARN	Dieckmann, et al. 1996				
	100 mM NaCl					
	pH=6,0					
Aptamère/Théophylline	3 mM complexe (1:1)	Zimmermann, et al. 1997				
	2 mM MgCl <sub>2</sub>					
	30 mM NaCl					
	20 mM Na phosphate pH=6,8					

Tableau 2.8 : Compilation des compositions des solutions utilisées pour
les résolutions par RMN de structures de complexes ARN/ligands
antérieures à 1998.

# **Tableau 2.9 :** Matrice construite à partir des conditions d'études structuralesde complexes ADN- et ARN/ligands et appliquée à la cristallisation du complexefragment A3/paromomycine.

Chaque condition comprend 100 mM NaCl (Par=paromomycine) et 50 mM Na cacodylate pH=5,6 (fond blanc) ou pH=6,4 (fond gris). Les volumes des gouttes réalisées sont de 1  $\mu$ l (solution du complexe A3/paromomycine)+1  $\mu$ l (solution de cristallisation).Les réservoirs contiennent 500  $\mu$ l de 60% MPD.

1	2	3	4	5	6
5% MPD	10% MPD	15% MPD	20% MPD	25% MPD	30% MPD
2 mM Par	2 mM Par	2 mM Par	2 mM Par	2 mM Par	2 mM Par
5% MPD	10% MPD	15% MPD	20% MPD	25% MPD	30% MPD
4 mM Par	4 mM Par	4 mM Par	4 mM Par	4 mM Par	4 mM Par
5% MPD	10% MPD	15% MPD	20% MPD	25% MPD	30% MPD
2 mM Par	2 mM Par	2 mM Par	2 mM Parl	2 mM Par	2 mM Par
5% MPD	10% MPD	15% MPD	20% MPD	25% MPD	30% MPD
4 mM Par	4 mM Par	4 mM Par	4 mM Par	4 mM Par	4 mM Par
	5% MPD 2 mM Par 5% MPD 4 mM Par 5% MPD 2 mM Par 5% MPD 4 mM Par	1         2           5% MPD         10% MPD           2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD           4 mM Par         4 mM Par           5% MPD         10% MPD           2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD           2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD           4 mM Par         4 mM Par	I         Z         S           5% MPD         10% MPD         15% MPD           2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD           4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD           2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD           2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD           2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD           4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par	1         2         3         4           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD           2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD           4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD           2 mM Par         4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD           2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD           3 mM Par         4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par	I         Z         S         4         S           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD         25% MPD           2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD         25% MPD           4 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD         25% MPD           2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD         25% MPD           2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD         25% MPD           2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par         2 mM Par           5% MPD         10% MPD         15% MPD         20% MPD         25% MPD           4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par         4 mM Par

Plusieurs facteurs ont permis d'éviter la formation de précipités lors de la préparation des solutions de renaturation de complexes « fragment d'ARN »/aminoglycoside :

- préparation d'une solution contenant 1 mM fragment d'ARN/25 mM NaCl/10 mM MgSO<sub>4</sub>/100 mM Na cacodylate (pH=5,6 ou 6,4),
- chauffage de cette solution à 85°C pendant 2 min,
- refroidissement lent (2h) jusqu'à 37°C,
- ajout de paromomycine au lieu de néomycine (la paromomycine possède un groupement ammonium de moins que la néomycine), dans un rapport ARN/paromomycine de 1:1 ou 1:2, préalablement dissoute dans une solution contenant 50 mM Na cacodylate de même pH (pH=5,6 ou 6,4)/25 mM NaCl/0-10 mM MgSO<sub>4</sub>,
- incubation pendant 5 min à 37°C,
- refroidissement lent (3h) jusqu'à 22°C.



obtenus pour le complexe fragment A3/paromomycine.

La matrice de conditions de cristallisation en MPD est réalisée pour le fragment A3 aux pH 5,6 et 6,4, à 22°C et à 37°C. Des précipités sont immédiatement observés dans toutes les gouttes à pH 5,6 et dans celles à pH 6,4 en présence de 4 mM paromomycine (rapport 1:2 ARN/paromomycine). De légers précipités sont observés à pH 6,4 pour 2 mM paromomycine. Ces légers précipités subsistent à 23°C mais se transforment (au

bout de deux semaines) en assemblages micro-cristallins à 37°C (Figure 2.16). Les essais de cristallographie entrepris ne permettent pas de déterminer la nature du cristal.

Des essais de ciblage de meilleures conditions sont entrepris, uniquement à 2 mM paromomycine, aux pH 6,4 et 7,0, à 37°C (Tableau 2.10). Les gouttes restent claires ou contiennent des séparations de phases, avec apparition de micro-oursins dans certains cas (A1, A3, B1, B2, D1, D4-D6). Pour obtenir des cristaux de meilleure qualité, il apparaît important de trouver des conditions qui ne favorisent pas la séparation de phases. En effet, s'il se produit une séparation de phases, il est impossible de contrôler la concentration en ARN dans la goutte.

#### de cristallisation). La composition des réservoir de 500 µl est indiquée en italique. 1 2 3 4 5 6 5% MPD 2,5% MPD 3,5% MPD 5% MPD 5% MPD 2,5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 30% MPD 30% MPD 60% MPD 60% MPD 60% MPD idem B 5% MPD 10% MPD 15% MPD 2.5% MPD 4% MPD 5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 100 mM KCl 100 mM NaCl 100 mM NaCl 100 mM KCl 100 mM KCl 60% MPD 60% MPD 1 mM spermine 1 mM spermine 1 mM spermine 1 mM spermine 60% MPD 60% MPD 60% MPD 60% MPD С 3% MPD 5% MPD 10% MPD 3% MPD 5% MPD 10% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 100 mM NaCl 100 mM NaCl 100 mM KCl 100 mM KCl 100 mM KCl 30% MPD 30% MPD 30% MPD 30% MPD 30% MPD 30% MPD D 3% MPD 5% MPD 10% MPD 3% MPD 5% MPD 10% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 100 mM NaCl 100 mM NaCl 100 mM KCl 100 mM KCl 100 mM KCl 1 mM spermine 30% MPD 30% MPD 30% MPD 30% MPD 30% MPD 30% MPD

### **Tableau 2.10 :** Matrice d'affinement des conditions de cristallisation du complexe A3/paromomycine.

Chaque condition comprend 50 mM Na cacodylate pH=6,4 (fond blanc) ou pH=7,0 (fond gris). Les volumes des gouttes réalisées sont de 1  $\mu$ l (solution du complexe A3/paromomycine)+1  $\mu$ l (solution de cristallisation). La composition des réservoir de 500  $\mu$ l est indiquée en italique.

#### (b) Fragment A3 commandé et purifié par PAGE

L'obtention de fragments résultant de synthèse de meilleure qualité commandé chez Dharmacon Research Inc., suivie d'une purification par PAGE a permis l'apparition d'oursins ou d'étoiles puis de plaquettes (souvent empilées ou en bouquets, typiques de la cristallisation d'ARN (Holbrook, *et al.* 2001) en présence de solutions de cristallisation contenant 2 mM de paromomycine/1,5-5% MPD/1-2% glycérol/100-250 mM NaCl/0-10 mM MgSO<sub>4</sub>/50 mM Na cacodylate pH 6,4, contre 500 µl de 40-60% MPD dans le



**Figure 2.17 :** Plaquettes de différentes tailles et différentes directions de croissance, obtenues pour le complexe fragment A3/paromomycine à partir de l'oligoribonucléotide commercial (a-c) ou synthétisé au laboratoire (d).

réservoir (croissance en 3 jours, à 37°C) (Figure 2.17a-c). Toutefois, c'est bien la méthode de purification qui est discriminante, car des plaquettes similaires ont pu par la suite être obtenues avec des oligoribonucléotides synthétisés au laboratoire et purifiés par PAGE (Figure 2.17d). D'autre part, aucun cristal n'a été obtenu en absence de paromomycine, ni en présence de spermine.



premier cliché a donné des paramètres de maille appartenant au groupe orthorhombique, avec a=33,4 Å, b=47,3 Å, c=103,0 Å, et une mosaïcité de  $0,9^{\circ}$ .

D'autres essais de diffraction ont été effectués à l'aide du diffractomètre Enraf Nonius disponible au laboratoire. Des clichés ont été enregistrés pour des expositions de 40 min/image, avec une oscillation de 0,5 ° ou 1°, pour différents angles  $\varphi$  (0, 90°). 50° d'espace à 0,5° d'oscillation ont été enregistrés, mais les taches étant de faible intensité (environ deux fois le bruit de fond), le programme DENZO (Otwinowski et Minor 1996) n'est pas capable d'indexer et donc de traiter le jeu de données. D'autres essais ont été entrepris avec des temps d'exposition de 1 h, mais sans succès. Un test de spectrométrie MALDI-TOF effectué avec un cristal lavé Des plaquettes et des morceaux de plaquettes provenant de bouquets ont été cryo-congelés dans des solutions de même composition que celles ayant servi à la cristallisation, mais contenant 40-60% MPD et 0 ou 10% glycérol. Ces cristaux ont été testés à l'ESRF (Grenoble) sur la ligne BM30 ( $\lambda$ =0,9743 Å). Une exposition de 10s/image, avec une oscillation de 1°, pour un angle  $\varphi$ =90° a permis l'obtention d'un cliché de diffraction avec 3,0 Å comme limite de résolution (Figure 2.18). L'analyse de ce





puis dissous après plusieurs trempages dans de l'eau a permis de confirmer la présence de paromomycine dans le cristal (sans toutefois pouvoir certifier sa fixation au site A) (Figure 2.19).

#### 4) Optimisation des conditions de cristallisation

En attendant de pouvoir effectuer un enregistrement complet sur ligne de rayonnement synchrotron, une optimisation des conditions de cristallisation a été entreprise afin de chercher à obtenir des cristaux autres que des plaquettes.

#### (a) Diminution de la vitesse de croissance cristalline



**Figure 2.20 :** Oursins obtenus à partir de précipité (a) et cristaux obtenus en présence d'agarose (b).

Afin de ralentir la croissance, d'autres températures de cristallisation ont été testées. A 4°C, l'ensemble des conditions a provoqué la formation de précipités et à 21°C, quelques conditions ont produit des précipités qui donnèrent eux-mêmes naissance à

des oursins après 2 semaines (Figure 2.20a). Des gouttes en présence de concentrations de 0,3-0,8% d'agarose ont aussi été posées. Des plaquettes de formes légèrement différentes sont apparues après 1 jour (Figure 2.20b).

#### (b) Plan factoriel incomplet

La première méthode d'optimisation testée a été un plan factoriel incomplet (Carter Jr 1999), développée avec Andreas Werner, étudiant de l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg en stage au laboratoire. Cette méthode a été utilisée à l'origine dans

<b>Tableau 2.11 :</b> Niveaux des facteurssélectionnés pour le plan factoriel incomplet.							
Niveaux $-\alpha$ $-1$ $0$ $+1$ $+\alpha$ Facteurs							
[A3] (mM)	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2		
[MPD] (%)	1,5	2,5	3,5	4,5	6,0		
[MPD rés.] (%)	20	30	40	50	60		
[glycerol] (%)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0		
[NaCl] (mM)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25		

l'industrie pour optimiser les protocoles de fermentation. Cinq facteurs (les concentrations en ARN, MPD, glycérol, NaCl dans la solution de cristallisation et en MPD dans le réservoir) ont été pris en compte car les rôles qu'ils jouent dans les processus de cristallisation sont considérés comme majeurs. Pour chacun de ces facteurs, cinq niveaux ont été définis dans un espace raisonnable de valeurs autour d'une valeur centrale



représentant la condition de référence (Tableau 2.11). Ce choix était délicat car il repose sur une analyse visuelle subjective de la qualité des cristaux obtenus précédemment. La matrice de conditions comprend les 16 combinaisons des niveaux +1 et -1(la concentration en NaCl n'étant pas prise en compte), les combinaisons  $\alpha$ =+2 ou -2 réalisées six fois et la combinaison centrale  $\alpha$ =0 réalisée trois fois comme contrôle de l'expérience (Figure 2.21). Des scores arbitraires ont été attribués aux résultats sur une échelle de 0 à 60

(« 0 » pour une goutte claire et « 60 » pour une grande plaquette). Le programme Mathematica 2.2 (Wolfram Research, Inc.) a été utilisé pour calculer une régression linéaire entre les valeurs obtenues. Les valeurs optimales calculées par le programme sont : 1 mM A3/1,5% MPD/1% glycérol/150 mM NaCl pour la solution de cristallisation et 60% MPD pour le réservoir.

#### (c) Plan simplex

Ces valeurs ont été utilisées comme point de départ d'optimisation par une autre approche, le plan simplex (Prater, *et al.* 1999), basée cette fois sur la variation de trois variables : les concentrations en MPD dans la solution de cristallisation et dans le réservoir, ainsi que le volume de la goutte. Ensuite, des combinaisons entre ces trois variables, équidistantes au point de départ C0, ont été définies. Dans le cas de 3 variables, l'espace des conditions couvert forme un tétraèdre (Figure 2.22) de sommets C0, C1, C2, C3. Une fois que les essais de cristallisation ont été effectués, on remplace la condition

ayant donné le plus mauvais résultat (ici C1) par la condition symétrique par rapport à l'hypersurface formée dans ce cas par les trois autres sommets du tétraèdre (C4). Il s'agit alors de comparer aux autres le résultat donné par cette nouvelle condition, en éliminant à nouveau la plus mauvaise condition (C3), en la remplaçant par son symétrique (C5), et ainsi de suite. Il est possible de changer la taille de la variation dès que l'on s'approche d'un



optimum. Ce plan simplex a permis une optimisation des conditions d'obtention de plaquettes (Tableau 2.12, conditions C6). Fin septembre 2000, un jeu de données a été enregistré pour le complexe fragment A3/paromomycine. La résolution est de 2,5 Å.

<b>Tableau 2.12 :</b> Matrice et résultats du plan simplex. Les concentrations constantes dans la solution de cristallisation sont 50 mM Na cacodylate (pH=6,4)/150 mM NaCl/1% glycérol. Le trait blanc indique une longueur de 200 μm.								
Combinaisons	C0 (0,0,0)	C1 (p,q,q)	C2 (q,p,q)	C3 (q,q,p)	C4→C0	C4→C1		
[MPD](%)	1,5	0,56	1,26	1,26	0,56	2,13		
[MPD rés.] (%)	50,0	53,5	64,2	53,5	64,2	58,3		
Volume (µl)	1+1	1,47+1,47	1,47+1,47	2,89+2,89	2,89+2,89	2,10+2,10		
Résultat	-AD	*	-		No. of Concession, State			
Score	+++	-	++	+	+	++++		
Combinaisons	C4→C2	C5→C3	C6→C0	C6→C2	C6→C4	C6→C5		
[MPD] (%)	0,95	1,75	1,66	1,96	1,58	1,04		
[MPD rés.] (%)	40,6	57,6	65,0	49,3	55,9	52,4		
Volume (µl)	2,10+2,10	0,79+0,79	1,12+1,12	0,93+0,93	0,66+0,66	1,47+1,47		
Résultat								
Score		+++	+	+++	+++	+++		



**Figure 2.23 :** Cristaux obtenus dans trois conditions-témoins (a) à partir de 1,0 mM de fragment A3 (b), 1,0 mM de fragment A3.2 (c), 1,1 mM de fragment A3.3 (d) et 1,0 mM de fragment A3.4 (e) complexés à la paromomycine.

#### (d) Cristallisation de fragments de séquences différentes

Afin de tester l'effet de différentes variations de séquences sur la cristallisation, des essais de cristallisation ont été entrepris pour un fragment similaire au fragment A3 mais ne possédant pas la cytosine en 5' (fragment A3.1 ; Figure 2.2). Des précipités ont été observés dans les conditions testées. Des plaquettes de formes nettement moins géométriques ainsi que des sphérulites ont toutefois été obtenus pour deux conditions (parmi 12 testées) après 5 jours. D'autres oursins sont apparus après 17 jours dans une autre condition.

Trois conditions donnant des plaquettes en présence de A3 (Figure 2.23a,b) ont été sélectionnées et appliquées à des concentrations de 1,0 et 1,1 mM de trois autres fragments différent du fragment A3 par leurs extrémités (fragments A3.2-A3.4 ; Figure 2.2). Des plaquettes de formes, de tailles, et d'agencements variés ont été obtenues en 3 jours (Figure 2.23c-e). Ces résultats ont montré que l'extrémité est importante pour la cristallisation, mais que sa nature ne joue pas particulièrement sur l'empilement cristallin. Des essais de cristallisation d'un fragment similaire au fragment A3 mais comportant une Br<sup>5</sup>C en position 2 de la séquence (fragment A3.5 ; Figure 2.2) ont été entrepris mais n'ont pas permis l'obtention de cristaux.

#### 5) Expériences de micro- et macro-ensemencement

Des expériences d'ensemencement ont été effectuées avec le fragment A3. Des gouttes en état métastable (1,0 mM ARN/2,0 mM de paromomycine/3,5% MPD/2,0% glycérol/150 mM NaCl/5,0 mM MgSO<sub>4</sub>/50 mM Na cacodylate pH 6,4) de volumes 1,0  $\mu$ l+1,0  $\mu$ l et 2,0  $\mu$ l+2,0  $\mu$ l ont été posées à 37°C contre des réservoirs contenant 500  $\mu$ l de 30-40% MPD. Après équilibration pendant deux jours, une goutte a été ensemencée



Figure 2.24 : Plaquettes obtenues par macro- (a) et micro-ensemencement (b).

avec un cristal de 100x50x10 µm et trois gouttes avec un poil de moustache de chien préalablement trempé dans une solution contenant des cristaux broyés à l'aide d'un outil Hampton Research®. L'ensemencement a été réalisé à 21°C après

Tableau 2.13 : Composition des quatre conditions-témoins.								
Chaque goutte est formée de 1 µl (solution de renaturation : 1,0 mM ARN/2,0 mM aminoglycoside/75 mM Na cacodylate								
(pH=6,4)/25 mM NaCl/10 mM MgSO <sub>4</sub> ) + 1 $\mu$ l (solution de cristallisation). Le trait blanc indique une longueur de 200 $\mu$ m.								
	Condition n°1	Condition n°2	Condition n°3	Condition n°4				
Solution de	2 mM Par	2 mM Par	2 mM Par	2 mM Par				
cristallisation	1,5% MPD	2,5% MPD	1,5% MPD	3,5% MPD				
	2,0% Glycérol	2,0% Glycérol	1,5% Glycérol	2,0% Glycérol				
	150 mM NaCl	250 mM NaCl	150 mM KCl	250 mM KCl				
	50 mM Na cacodylate							
	(pH=6,4)	(pH=6,4)	(pH=6,4)	(pH=6,4)				
Réservoir	40% MPD	40% MPD	40% MPD	40% MPD				
Résultat								
	_		_					

équilibration lente des gouttes de 37 à 21°C, puis les gouttes ont de nouveau été portées à 37°C. Au bout de trois jours, plusieurs cristaux ont été obtenus, mais toujours sous la forme de plaquettes (Figure 2.24). D'autres essais en goutte assise, pour des volumes de goutte similaires, ont donné naissance à des plaquettes de forme semblable.

#### E. Cristallisation de différents complexes

L'ensemble des expériences d'optimisation a permis de trouver des conditions de cristallisation du fragment A3 permettant l'obtention de grandes plaquettes, souvent arrangées en bouquets, atteignant une taille de  $800x450x10 \ \mu$ m. Quatre conditions ont été choisies comme conditionstémoins (Tableau 2.13) pour des tests en présence de différents inhibiteurs, de différentes séquences, etc.

#### 1) Cristallisation de complexes contenant la tobramycine

Les quatre conditions-témoins donnent naissance à des baguettes longues qui croissent en forme de bou-



tobramycine complexée au fragment A3 à partir de deux conditions-témoin (a-b) et au fragment A3.4 à partir de conditions voisines (c-d).

Les variations par rapport aux conditions-témoin sont indiquées entre parenthèses. Les concentrations d'ARN et de tobramycine dans la solution de renaturation sont indiquées en italique. quets en présence du fragment A3 et de tobramycine au lieu de paromomycine (Figure 2.25a-b). Des plaquettes de meilleure qualité sont obtenues en présence du fragment A3.4 et de tobramycine (Figure 2.25c-d). Un jeu de données complet a été enregistré fin février 2001 pour le complexe fragment A3.4/tobramycine. La résolution est de 2,55 Å.

#### 2) Cristallisation de complexes contenant la généticine



Des cristaux, se présentant toujours sous forme de plaquettes arrangées en bouquets, ont été obtenus pour des complexes formés entre le fragment A3 et la généticine (Figure 2.26). Deux enregistrements de jeux de données ont été effectués en novembre 2001 et mars 2002 pour ce complexe. La résolution est de 2,40 Å.

#### 3) Cristallisation de complexes contenant différents aminoglycosides

#### (a) Néomycine

Cet aminoglycoside a été utilisé dès les premières expériences de renaturation et de cristallisation en présence du fragment A3. Les précipités systématiquement observés dès l'ajout de l'antibiotique lors de la renaturation ne sont pas obtenus avec le protocole de renaturation adopté pour la paromomycine. Lors des essais de cristallisation, des précipités

en fome de « boules brunes » ont été observés pour les conditions donnant des cristaux en fome de plaquettes avec la paromomycine (Figure 2.27a). Des tests de renaturation à différents pH (6,6-6,8), à des concentrations plus élevées en sels monovalents



(100 mM NaCl ou KCl) n'ont pas permis d'empêcher la formation de précipités.L'apparition de ces derniers a en revanche pu être évitée par l'emploi de néomycine à des

concentrations de 0,5-1,5 mM, pour 1 mM d'ARN. Des essais de cristallisation ont conduit à l'apparition de troubles et de séparations de phases qui se sont transformés en « boules brunes » et en micro-cristaux (Figure 2.27b). Des expériences de micro-ensemencement à partir de ces micro-cristaux broyés ont permis l'obtention de cristaux en forme de plaquettes qui coexistent dans les gouttes avec les « boules brunes » (Figure 2.27c).



Condition n°4 (4,0 mM kanamycine B) 2,2 mM kanamycine B 1,1 mM fragment A3

Condition n°2 (1,5 mM ribostamycine) 1,5 mM ribostamycine 1,0 mM fragment A3





Condition n°2 2,0 mM amikacine 1,0 mM fragment A3 Condition n°2 2,2 mM apramycine 1,1 mM fragment A3

Figure 2.28 : Différents types de cristaux obtenus pour divers aminoglycosides complexés au fragment A3.

Les variations par rapport aux conditions-témoin sont indiquées entre parenthèses. Les concentrations d'ARN et d'aminoglycoside dans la solution de renaturation sont indiquées en italique.



Les adénines 1492 et 1493 sont indiquées en gras. (Numéro d'identification dans la PDB : 1HNZ).

## (b) Divers 2-DOS aminoglycosides

Plusieurs cristaux ont été obtenus en présence de kanamycine B, de ribostamycine, d'amikacine et d'apramycine (Figure 2.28). Les plaquettes obtenues en présence de kanamycine B et de ribostamycine ont été testées par diffraction à l'ESRF (Grenoble). La résolution est  $\geq$  3,0 Å pour les différents cristaux testés, pour une diffraction de faible qualité. Des optimisations sont en cours au laboratoire pour les cristaux obtenus en présence d'apramycine et d'amikacine (travaux de Boris François).

#### (c) Hygromycine B

Cet aminoglycoside possède une structure différente des autres 2-DOSaminoglycosides, ce qui lui confère la propriété de se lier différemment au site A (Chapitre 1). Les fragments B1 et B2 (Figure 2.2) ont été conçus sur le modèle du fragment A3 afin d'incorporer des nucléotides supplémentaires, nécessaires à l'interaction avec l'hygromycine B. Les quatre conditions-témoin ont été utilisées pour cristalliser les fragments B1 et B2 en présence d'hygromycine B seule ou d'un mélange stoechiométrique hygromycine B/paromomycine 1:1. En effet, d'après la structure cristallographique de la particule ribosomique 30S résolue en présence d'hygromycine B à 3,30 Å (Brodersen, *et al.* 2000), la fixation de l'hygromycine B ne promeut pas la sortie des adénines A1492 et A1493 qui sont importantes pour l'empilement cristallin dans nos structures (Figure 2.29). L'ajout de paromomycine pourrait favoriser la fixation concomitante de paromomycine et d'hygromycine B au site A ou bien la fixation de paromomycine dans l'un des deux sites, la fixation de l'hygromycine B se faisant dans l'autre. Des essais ont également été effectués pour les fragments B1 et B2 avec la paromomycine seule. Des micro-cristaux, des plaquettes et des aiguilles ont été obtenus pour les fragments B1 et B2 dans chacun de ces divers contextes de partenaires antibiotiques (Figure 2.30). Les oursins apparus avec le fragment B2 en présence d'hygromycine B seule n'ont pas pu être optimisés par micro-ensemencement.



B et/ou la paromomycine complexés aux fragments B1 et B2.

Les variations par rapport aux conditions-témoin sont indiquées entre parenthèses. Les concentrations d'ARN et d'aminoglycoside dans la solution de renaturation sont indiquées en italique.

Etant donné l'aspect des cristaux obtenus pour le complexe fragment B1/paromomycine, il est probable que les cristaux obtenus en présence de l'hygromycine В et la de paromomycine ne contiennent que des complexes composés d'ARN et de paromomycine. Un enregistrement de données a été effectué sur la ligne ID29 ( $\lambda$ =0,9150 Å) à l'ESRF en octobre 2001 (enregistrement de 100° d'espace), avec une résolution de 3,0 Å. Le jeu de données n'a pas pu être indexé, empêchant un affinement de cette structure.

#### 4) Cristallisation en présence de cations, sans inhibiteur

La cristallisation du fragment A3 en absence d'inhibiteur est intéressante pour la comparaison avec la forme complexée par les aminoglycosides. Les cations sont connus pour entrer en compétition avec l'interaction entre les aminoglycosides et le



site A (Famulok et Hüttenhofer 1996 ; Hermann et Westhof 1998 ; Hermann et Westhof 1999a ; Noah et Wollenzien 1998). De plus, la structure de la particule 30S en absence d'antibiotique révèle la présence de deux ions magnésium qui stabilisent le site A (Ogle, *et al.* 2001).

Des essais en présence de 25-100 mM MgSO<sub>4</sub> ne permettent pas l'obtention de cristaux. Des agrégats ont été obtenus pour des concentrations de 120-160 mM SrCl<sub>2</sub> (Figure 2.31a). Des précipités, des cristaux en forme d'étoiles et des plaquettes carrées non-reproductibles ont été obtenus pour le fragment A3 en absence d'inhibiteur, pour des concentrations de 5-20 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>].3Cl (Figure 2.31b-c). Des essais de diffraction à l'ESRF ont indiqué une résolution de 6,0 Å. Une optimisation des conditions de cristallisation est poursuivie par Boris François au laboratoire (ajout de divers cations à différentes concentrations).

#### 5) Cristallisation d'autres fragments

#### (a) Site A sauvage

Le site A eubactérien sauvage possède une cytosine méthylée sur le carbone 5 en position 1407. Après examen de la structure, il apparaît qu'une méthylation à cette position n'entraînerait pas de modification de l'interaction aminoglycoside/ARN observée par cristallographie (Publication n°1). Afin de confirmer cette analyse, des essais de cristallisation ont été entrepris pour une séquence incorporant cette méthylation (fragment A3.9; Figure 2.2). A ce jour, seuls des sphérulites et des agrégats ont été obtenus.

#### (b) Fragments divers contenant le site A procaryote

Différents fragments d'ARN comprenant le site A ont été conçus en vue de plusieurs études structurales utilisant le système de cristallisation offert par le fragment A3 et la paromomycine. Le fragment A3.12 (Figure 2.2) a été construit afin d'incorporer des bases méthylées en position 2' du ribose. Cette modification permet une stabilisation de doubles hélices d'ARN (Auffinger et Westhof 2001). D'autre part, une structure cristallographique du complexe fragment A3.12/paromomycine permettrait une analyse comparative de l'organisation des molécules d'eau autour du fragment d'ARN contenant le site A. Des cristaux ont été obtenus à 20°C au



bout de 3 jours, mais ils disparaissent rapidement (Figure 2.32a).

Dans chaque site A, les deux adénines en extrusion sont impliquées dans des interactions vers des paires G=C de molécules symétriques (Publication n°1). Nous avons conçu des fragments (A3.14 et A3.15) permettant d'observer la reconnaissance entre ces adénines et des paires de bases G•U. Des micro-cristaux ont été obtenus pour les deux séquences testées (Figure 2.32b-c).

Des fragments ont aussi été conçus afin d'augmenter le nombre de tours d'hélices entre les deux sites A, modifiant ainsi les orientions des paires d'adénines en saillie l'une par rapport à l'autre. Le fragment A3.8, contenant une paire de bases U•U supplémentaire entre les paires G=C centrales du fragment (Figure 2.2), conduit à l'obtention de plaquettes agencées en bouquet mais aussi de baguettes à section carrée (Figure 2.32d). Ces cristaux ont la même résolution que ceux obtenus avec le fragment A3 (2,50 Å). Dans certaines conditions, le fragment A3.8 cristallise alors que le fragment A3 ne cristallise pas. Le fragment A3.8 est ainsi régulièrement utilisé pour tester la cristallisation d'autres antibiotiques, en parallèle au fragment A3. Un autre fragment (A3.17), comprenant cette fois deux paires G=C alternées au centre du fragment (Figure 2.2), a été conçu. Il se révèle prometteur pour la cristallisation en présence d'apramycine (travaux de Boris François).

#### (c) Site A eucaryote

Afin de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance moléculaire, il a semblé intéressant d'entreprendre des essais de cristallisation de chacun des sites A eucaryotes

cytoplasmique et mitochondrial (sauvage et portant la mutation A1555G). Des essais de cristallisation ont été démarrés pour les fragments A3.10-A3.13 en présence de paromomycine et de tobramycine. Seules des séparations de phases ont été obtenues avec le fragment A3.10. Des essais sont en cours avec le fragment A3.16 (qui contient aussi le site A eucaryotique cytoplasmique mais possède des extrémités différentes). Des cristaux différant de plaquettes ont été obtenus pour des complexes entre le fragment A3.11 et la paromomycine (Figure 2.33). Les cristaux obtenus diffractent à une résolution de 3 Å mais sont poly-cristallins.



Les premiers essais de cristallisation du fragment A3.13 ont conduit à l'obtention de séparation de phases et de sphérulites en présence de paromomycine.

#### **II. Structure tridimensionnelle du complexe** site A/paromomycine (Publication 1)

Fin septembre 2000, un jeu complet a été enregistré sur la ligne ID14-EH1 à l'ESRF (Grenoble) pour le complexe fragment A3/paromomycine. La résolution atteinte est de 2,50 Å. Le phasage de la structure a été effectué par remplacement moléculaire à partir d'un modèle correspondant à la séquence de la moitié du fragment A3, sans la cytosine en 5' : le site A provenant de la sous-unité 30S complexée à la paromomycine (Carter, et al. 2000) est inséré entre quatre paires de bases G=C. Aucune solution de remplacement moléculaire n'a pu être obtenue à partir de la structure du site A complexé à la paromomycine résolue par RMN (Fourmy, et al. 1996). L'affinement s'est poursuivi par dynamique moléculaire (recuit simulé) et corrections manuelles à l'écran graphique. L'analyse de la structure du complexe a été publiée dans l'édition d'août 2001 de la revue Structure sous le titre « Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site ».<sup>1</sup> Dans cette publication, le rôle des molécules d'eau dans la reconnaissance moléculaire est mis en valeur. Les résultats des comparaisons entre les différentes structures de complexes site A/aminoglycosides et l'analyse des données de cartographie en solution et de résistance sont également présentés. Les interactions d'empilement cristallin effectuées par les deux adénines 1492 et 1493 miment la reconnaissance de la mini-hélice codon/anticodon observée dans la sous-unité 30S lors du « décodage », ce qui indique que la structure obtenue reflète une situation biologique.<sup>2</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Vicens, Q. & E. Westhof (2001). Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure*, **9**:647-658.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Les références citées dans la publication mais non mentionnées dans le corps de la thèse ne sont pas reprises en fin de manuscrit.



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Quentin Vicens and Eric Westhof

Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site.

Structure 9 (2001), 647-658

Pages 647-658 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00629-3

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

#### **III. Structure tridimensionnelle du complexe** site A/tobramycine (Publication 2)

Fin février 2001, un jeu complet a été enregistré sur la ligne ID14-EH2 à l'ESRF (Grenoble) pour le complexe fragment A3.4/tobramycine. La résolution atteinte est de 2,55 Å. Le phasage de la structure a été effectué par remplacement moléculaire à partir de la structure du complexe fragment A3/paromomycine. L'affinement s'est poursuivi par dynamique moléculaire (recuit simulé) et corrections manuelles à l'écran graphique. La publication parue dans l'édition de juin 2002 de la revue *Chemistry & Biology* sous le titre « Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site » présente l'analyse de la structure du complexe.<sup>1</sup> La structure du

complexe site A/tobramycine est comparée à celle du complexe site A/paromomycine résolue précédemment (Publication n°1) et à celle du complexe site A/gentamicine C1a résolue par RMN à l'aide du modèle ASR-27. Des explications moléculaires à certains mécanismes de résistances spécifiques au sous-groupe des 4,6-2-DOS sont également proposées.<sup>2</sup>



<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Vicens, Q. & E. Westhof (2002). Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site. *Chem Biol*, **9**:747-755.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Les références citées dans la publication mais non mentionnées dans le corps de la thèse ne sont pas reprises en fin de manuscrit.



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

#### Quentin Vicens and Eric Westhof

Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site.

Chemistry & Biology 9 (2002), 747-755

Pages 747-755 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00153-9

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

#### **IV. Structure tridimensionnelle du complexe site A/généticine (Publication 3)**

En novembre 2001 et mars 2002, un jeu complet a été enregistré sur les lignes ID14-EH1 et ID14-EH4 à l'ESRF (Grenoble) pour le complexe fragment A3/généticine. La résolution atteinte est de 2,4 Å. Le phasage de la structure a été effectué par remplacement moléculaire à partir de la structure du complexe fragment A3.4/tobramycine. L'analyse de la structure du complexe a été publiée dans l'édition du 28 février 2003 de la revue Journal of Molecular Biology sous le titre : « Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide ».<sup>1</sup> Cette structure étant la troisième résolue selon une approche similaire pour un complexe site A/aminoglycoside, des spécificités dans les modes de reconnaissance (rôle de l'empilement du cycle I et de l'interaction avec l'adénine 1408; géométrie de la paire U1406•U1495) peuvent être déduites des comparaisons avec les structures des autres complexes et de l'analyse combinée de mutations qui entraînent des résistances. De plus, la généticine ayant la particularité de se lier aux séquences de site A d'un grand nombre d'organismes, des ouvertures vers la compréhension au niveau moléculaire de certains mécanismes de toxicité liés à l'usage d'aminoglycosides sont proposées. La comparaison de la structure du complexe site A/généticine avec celle du complexe site A/gentamicine C1a résolue par RMN est également présentée.<sup>2</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Vicens, Q. & E. Westhof (2003). Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J Mol Biol*, **326**:1175-1188.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Les références citées dans la publication mais non mentionnées dans le corps de la thèse ne sont pas reprises en fin de manuscrit.



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

#### Quentin Vicens and Eric Westhof

Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16 S ribosomal RNA A site oligonucleotide.

J. Mol. Biol. 326 (2003), 1175-1188

Pages 1175-1188 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01435-3

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr. Supplementary material

**Table SI: Hydrogen bond distances observed in the three complexes.** The values are given in Å. A slash separates the distances observed for watermediated H-bonds.

n. o.=contact not observed; n. r.=contact not relevant.

	Geneticin	Tobramycin	Paromomycin
Ring I			
N2' — O4''	n. r.	n. r.	3.2
N2' — O5''	n. r.	n. r.	3.1
N2' - W - O5	3.0 / 2.7	2.8 / 3.0	n. r.
N2′ — W — W — N7 (G1491)	3.0 / n. o. / n. o.	2.8 / 3.4 / 2.5	n. r.
N2′ — W — O2P (A1492)	n. o.	3.0 / 3.1	n. o.
N2′ — W — O1P (A1493)	n. o.	2.9 / 3.0	3.3 / 2.9
O3' — O2P (A1492)	2.7	n. r.	2.9
O4' — O2P (A1493)	2.5	2.7	2.5
O4' — W	n. o.	3.5	n. o.
O5′ — N6 (A1408)	2.8	2.9	3.2
R6' — N1 (A1408)	3.3 (R=OH)	3.1 (R=NH3+)	2.5 (R=OH)
R6′ — W	n. o.	n. o.	2.8
Ring II	1	L	
N1 — O4 (U1495)	2.7	2.6	2.8
N1 — W — N4 (C1496)	3.0 / n. o.	3.5 / 2.5	2.8 / n. o.
N1 — W — W	n. o.	n. o.	2.7 / 2.7
N1 — O2''	3.1	3.0	n. r.
N3 — O1P (A1493)	2.8	3.1	3.1
N3 — N7 (G1494)	2.9	2.7	2.8
N3 — O2P (G1494)	2.7	2.6	3.1
C4 — O6 (G1494)	3.3	3.0	3.3
O5 — O5''	3.3	3.2	n. r.
O6 — W	n. o.	n. o.	3.2
O6 — W	n. o.	n. o.	3.5
O6 — W — O4 (U1406)	n. r.	n. r.	2.6 / 2.6
Ring III			
O2'' — O6 (G1405)	2.7	2.8	n. r.
O2'' — N4 (C1407)	n. r.	n. r.	2.7
C2'' — W — N6 (A1408)	n. r.	n. r.	3.3 / 2.6
N3'' — N7 (G1405)	2.8	2.7	n. r.
N3'' — O2P (G1405)	2.9	n. o.	n. r.
O4'' — O2P (U1406)	2.7	n. r.	n. r.
O4'' — W	n. o.	3.0	n. r.
O5'' — N7 (G1491)	n. r.	n. r.	2.7
O5'' — N4 (C1407)	2.9	3.10	n. r.
Ring IV			
N2''' — O2P (G1405)	n. r.	n. r.	3.0
O3''' — W	n. r.	n. r.	3.5
O4''' — O1P (G1405)	n. r.	n. r.	3.8



#### Figure S1: Packing interactions implicating the bulged adenines and G=C pairs.

The interactions are shown in surface representation with guanines in green, cytosines in red, adenines in yellow (site 1 & conf. 1 in site 2) or in cyan (conf. 2 in site 2) and water molecules in blue.



## Figure S2: Superimposition of the A site bound to geneticin on previous structures.

The superimposition is based on the sugar-phosphate atoms. The A site is oriented as in figure 3. Each subset shows the A site bound to geneticin (color code as in figure 3) superimposed on the A site (dark grey) bound to tobramycin,<sup>9</sup> paromomycin<sup>38</sup> or gentamicin<sup>37</sup> (light grey). The RMS deviations are given below (the number after the dash corresponds to the RMS difference of the bulged adenines based on all the atoms).



## Figure S3: Superimposition of U1495•U1406 pairs from different structures containing the A site.

The view is similar to figure 5c. The superimposition is based on the pyrimidine ring atoms of U1495.



### **Chapitre 3**

## Différents aspects de la reconnaissance moléculaire des aminoglycosides

### I. Comparaison avec les aminoglycosides liés aux enzymes de résistance

Afin d'approfondir la compréhension de la reconnaissance moléculaire des aminoglycosides, il est intéressant de comparer les structures des aminoglycosides liés au site A et celles des aminoglycosides liés au site actif des enzymes de résistance qui catalysent des modifications chimiques d'aminoglycosides. Parmi les quelques dizaines d'enzymes de résistance répertoriées à ce jour (Shaw, et al. 1993), seulement trois enzymes, une par famille (ANT, APH et AAC (Chapitre 1, §II.C.2), ont été cristallisées en présence de divers aminoglycosides appartenant aux sous-groupes des dérivés 4,5- et 4,6-2-DOS et de substrats nécessaires à la catalyse tels l'acétylcoenzyme A (acétylCoA) et l'adénosine diphosphate (ADP) (Fong et Berghuis 2002; Pedersen, et al. 1995; Vetting, et al. 2002) (Tableau 3.1). D'autre part, des analyses conformationnelles ont été effectuées par RMN pour divers aminoglycosides liés aux trois types d'enzymes : une enzyme APH(3') (Cox, et al. 1996; Cox et Serpersu 1997), une enzyme AAC(6') (DiGiammarino, et al. 1998), une enzyme ANT(2") (Ekman, et al. 2001) et une enzyme AAC(3) (Owston et Serpersu 2002). L'analyse de l'ensemble de ces structures met en évidence des similarités et des différences entre les modes de fixation à l'ARN et aux protéines qui doivent être pris en compte pour la conception de nouveaux inhibiteurs.

<b>Tableau 3.1 :</b> Enzymes de résistance complexées à des aminoglycosides résolues par         cristallographie aux rayons X.							
Nom de l'enzyme	Origine	Nombre d'acides aminés	Amino- glycoside complexé	Résolution (Å)	R/R <sub>free</sub> (%)	N° d'iden- tification dans la PDB	Référence
ANT(4'/4'')	Staphylococcus	2x253	Kanamycine	2,5	16,8/-	1KNY	Pedersen et
	aureus	(dimère)	А				al. 1995
APH(3')	Enterococcus	264	Kanamycine	2,4	23,4/29,1	1L8T	Fong et al.
	faecalis		А				2001
			Néomycine	2,7	23,0/30,8	1L8U	
AAC(2')	Mycobacterium	2x181	Kanamycine	1,5	17,9/20,2	1M4I	Vetting et
	tuberculosis	(dimère)	А				al. 2002
			Tobramycine	1,8	17,4/21,1	1M4D	
			Ribostamycine	1,8	16,5/20,2	1M4G	]

L'APH(3') est un monomère possédant un seul site de fixation, tandis que l'ANT(4'/4'') et l'AAC(2') sont des dimères qui, en conséquence, renferment deux sites de fixation. Dans le cas de l'ANT(4'/4''), ces sites de fixation sont situés au cœur de la protéine, tandis que dans le cas de l'AAC(2'), ils sont situés sur la face externe, à 40 Å l'un de l'autre (Figure 3.1). Les structures de l'AAC(2') (Vetting, *et al.* 2002) et de l'ANT(4'/4'') (Sakon, *et al.* 1993) ont également été résolues en absence d'aminoglycoside, et la comparaison avec les structures complexées indique que la fixation des aminoglycoside n'entraîne pas d'autres modifications de la structure tridimensionnelle que celles observées localement au niveau des sites actifs (Pedersen, *et al.* 1995; Vetting, *et al.* 2002).



**Figure 3.1 :** Structures tridimensionnelles de l'ANT(4'/4") (a) et de l'APH(3') (b) complexées à la kanamycine A et de l'AAC(2') complexée à la tobramycine (c).

Les hélices  $\alpha$  sont indiquées en bleu, les brins  $\beta$  en jaune, les molécules d'eau en rouge. Les différents ligands (aminoglycosides et : un analogue de l'ATP (a), ADP (b), coenzyme A (c)) sont indiqués en vue tout-atomes.
		<b>φ1</b> <sup>a</sup>	<b>φ</b> 2 <sup>a</sup>	<b>ф3</b> <sup>ь</sup>	ф4 <sup>ь</sup>
		(°)	(°)	(°)	(°)
Site A					
Paromomycine	Site I	-155	-159	-83	158
	Site 2	-147	-156	-75	152
Tobramycine	Site 1	-155	-160	112	-142
	Site 2	-151	-163	114	-156
Généticine	Site 1	-159	-152	113	-146
	Site 2	-158	-150	109	-147
ANT(4'/4'')					
Kanamycine A	Site 1	25	-123	122	-146
	Site 2	41	-139	125	-115
APH(3')					
Kanamycine A		-153	-146	147	-135
Néomycine		-156	-152	-103	127
AAC(2')					
Kanamycine A	Site 1	-172	166	118	-149
	Site 2	-173	170	109	-144
Tobramycine	Site 1	-165	165	109	-150
-	Site 2	-168	169	105	-144
Ribostamycine	Site 1	-179	173	66	161
-	Site 2	180	-179	63	164
<sup>a</sup> $\phi$ 1=(C3-C4-O1'-C1') et $\phi$ 2=(C4-O1'-C1'-C2') pour tous les aminoglycosides <sup>b</sup> $\phi$ 3=(C6-C5-O5-C1'') et $\phi$ 4=(C5-O5-C1''-C2'') pour les dérivés 4,5-2-DOS et $\phi$ 3=(C1-C6-O6-C1'') et $\phi$ 4=(C6-O6-C1''-C2'') pour les dérivés 4,6-2-DOS					

Tableau 3.2 : Valeurs des angles dièdres entre

#### A. Analyse conformationnelle des aminoglycosides

Quel que soit le type d'enzyme, les conformations des cycles des aminoglycosides complexés sont similaires à celles observées pour les aminoglycosides en solution et complexés au site A : les cycles à six atomes adoptent la forme chaise, avec les groupements fonctionnels en positions équatoriales (Ekman, et al. 2001; Owston et Serpersu 2002). La seule exception est le cycle IV de la néomycine, en forme bateau dans la structure de l'enzyme APH(3') (Fong et Berghuis 2002). Les cycles des aminoglycosides adoptent cependant des orientations relatives plus ou moins différentes les unes des autres en fonction de la macro-molécule à laquelle les aminoglycosides sont complexés (écarts RMS avec la tobramycine

complexée au site A de 1,1 Å pour la kanamycine A complexée à APH(3') et de 2,0 Å pour la kanamycine A complexée à ANT(4'/4'') (Tableau 3.2). De manière remarquable, les cycles I et II constituant la néamine gardent une orientation similaire dans les aminoglycosides 4,5- et 4,6-2-DOS, aussi bien dans les complexes avec l'ARN que dans ceux avec les enzymes (Figure 3.2a-b), sauf dans le cas de l'ANT(4'/4'') (Figure 3.2c). Ce résultat est cohérent avec les études de RMN menées sur une enzyme ANT(2'') complexée à l'isépamicine (famille de la kanamycine A) (Ekman, *et al.* 2001) et sur une AAC(3) complexée à la kanamycine A ou à la ribostamycine (Owston et Serpersu 2002). Tandis que les orientations entre les cycles II et III des dérivés 4,6-2-DOS sont également remarquablement conservées dans toutes les structures (présence de deux liaisons hydrogène intramoléculaires entre les deux cycles—Tableau 3.3), celles des cycles II et III des dérivés 4,5-2-DOS montrent certaines disparités. Par exemple, le cycle III de la ribostamycine complexée à l'AAC(2') est retourné par rapport au cycle III de la paromomycine fixée au site A (Figure 3.2a). Une analyse par RMN montre même un dérivé de ribostamycine possédant des cycles I et III empilés (Cox, et al. 1996). Ces analyses indiquent que les conformations et les orientations des cycles sont globalement similaires dans différents contextes (ARN ou protéine), en particulier pour le sous-groupe des composés 4,6-2-DOS. Ainsi, la géométrie de l'orientation des cycles I et II semble déterminante pour la reconnaissance autant par les nucléotides du site A (Publications n°1-

3) (Carter, *et al.* 2000;



Figure 3.2 : Superposition de la paromomycine complexée au site A (orange), de la ribostamycine complexée à l'AAC(2') (magenta) et de la néomycine complexée à l'APH(3') (gris) (a) ; superposition de la tobramycine complexée au site A (cyan), de la tobramycine complexée à l'AAC(2') (vert) et de la kanamycine A complexée à l'APH(3') (rose) (b) ; superposition de la tobramycine complexée au site A (cyan) et de la kanamycine A complexée à ANT(4'/4'') (rose) (c) ;
Les superpositions sont basées sur les atomes du cycle 2-DOS (cycle II). Les

molécules d'eau formant des liaisons hydrogène avec l'aminoglycoside sont indiquées par des sphères de couleur correspondant à la structure à laquelle elles appartiennent. Celles retrouvées à des positions similaires dans différentes structures sont indiquées par des flèches.

Fourmy, *et al.* 1996 ; Yoshizawa, *et al.* 1998) que par les acides aminés situés dans les sites actifs des enzymes (Ekman, *et al.* 2001). Ce résultat n'est cependant pas surprenant, puisque (i) la partie néamine correspond à la seule partie conservée entre les dérivés 4,5-2-DOS et 4,6-2-DOS et (ii) les sites de fixation dans les enzymes de résistance doivent être capables, comme le site A, d'accueillir une grande variété d'aminoglycosides différents.

#### B. Structures tridimensionnelles des sites de fixation

La fixation de l'aminoglycoside dans une enzyme est rendue possible par un réarrangement local des acides aminés constituant la poche d'interaction (Pedersen, et al. 1995; Vetting, et al. 2002). Ces acides aminés sont pour la plupart des acides aminés acides (Tableau 3.3) : quatre acides glutamiques dans les sites de l'ANT(4'/4'') (Pedersen, et al. 1995) (Figure 3.3); quatre acides aspartiques, trois acides glutamiques, et le groupement carboxylique terminal de la protéine dans le site de l'APH(3') (Fong et Berghuis 2002) (Figure 3.4); cinq acides aspartiques, un acide glutamique et le groupement carboxylique terminal dans les sites de l'AAC(2') (Vetting, et al. 2002) (Figure 3.5). Le site de l'APH(3') comporte de plus un acide aminé basique qui interagit avec certains hydroxyles du cycle I. Ainsi, chaque groupement hydroxyle et ammonium de l'aminoglycoside interagit avec des groupements fonctionnels de même nature (carbonyle, amine, ...) dans le site A et dans les enzymes de résistance (Tableau 3.3). En outre, comme dans les structures d'aminoglycosides complexés au site A, l'essentiel des contacts est concentré au niveau de la partie néamine commune, afin de permettre la reconnaissance de plusieurs aminoglycosides au niveau d'un seul site. Ainsi, les groupements hydroxyles et amines de la néamine interagissent essentiellement avec des groupements carbonyles. En particulier, les atomes N1 et N3 du cycle 2-DOS ont des environnements similaires dans les structures des enzymes et du site A. En effet, dans les trois structures des complexes avec le site A résolues à pH=6,4, l'atome N3 du cycle II est sous forme ammonium, puisqu'il forme trois liaisons hydrogène avec les groupements accepteurs N7(G1494), O1P(A1493), O2P(G1494) (Publications n°1-3). L'atome N3 est également sous forme ammonium dans les complexes APH(3')/kanamycine et APH(3')/néomycine cristallisés à pH>9,0 (Tableau 3.3; Figure 3.4), puisqu'il établit des liaisons hydrogène vers trois groupements carbonyles. L'atome N1 est en général moins déshydraté, et maintient une liaison hydrogène intra-moléculaire vers le cycle III (Tableau 3.3 ; Figures 3.3 & 3.5).

Les comparaisons des dérivés 4,5-2-DOS et 4,6-2-DOS liés aux enzymes montrent la flexibilté des chaînes latérales de certains acides aminés interagissant avec les cycles additionnels qui caractérisent ces deux sous-groupes d'aminoglycosides. La superposition de la partie néamine de la néomycine et de la kanamycine A fixées à l'enzyme APH(3') montre que tous les acides aminés, exceptés les résidus Glu160 et Glu230, gardent la

même conformation dans les deux complexes (Figure 3.6). Ces deux résidus forment des liaisons hydrogène avec le cycle III de la kanamycine A. Dans les structures de la tobramycine et de la ribostamycine complexées par l'enzyme AAC(2'), la différence de position du cycle III provoque des changements conformationnels du résidu Asp35 (Figure 3.7). Ainsi, tandis que l'adaptabilité du site A à accueillir des aminoglycosides différents provient de la formation de liaisons hydrogènes alternatives vers certains nucléotides—selon le mode de substitution du cycle 2-DOS—, celle des enzymes de résistance provient de la flexibilité des chaînes latérales constituant la poche de fixation.

**Tableau 3.3 :** Comparaison des liaisons hydrogène impliquant les groupements fonctionnels de la néamine dans les complexes aminoglycoside/site A et aminoglycoside/enzyme.

La lettre « W » désigne l'atome d'oxygène d'une molécule d'eau. Les groupements chargés positivement ou négativement au pH de l'expérience sont indiqués respectivement en bleu et rouge. Les groupements polaires sont indiqués en vert.

Groupements fonctionnels de la néamine	Site A + Tobramycine ou Paromomycine (pH=6,5)	AAC(2') + Tobramycine (pH=5,5)	APH(3') + Kana- mycine A (pH=9,0-9,5)	ANT(4'/4'') + Kana- mycine A (pH=7,7)
Cycle I				
N2' (Tobramycine)	-W-05	-W-O (Val81)/N (Val89)	-	-
	-W-O2P (A1492)	-W-O (Val81)/N (Ser117)	-	-
	-W-O1P (A1493)	-O (Ser117)	-	-
O2' (Kanamycine A)	-	-	-W-Oδ2 (Asp190)/Nη1 (Arg226)/Oδ2 (Asp261)	—Οε2 (Glu67A)
	-	-	-	-Oε1 (Glu141B)
O3' (Kanamycine A /	-O2P (A1492)	-	Oδ2 Asp190	-Oε1 (Glu67A)
Paromomycine)	-W-N2'/O2P (G1491)/O2P (A1492)/W	-	-W-Oδ1 (Asn195)/Nδ2 (Asn195)/Oδ2 (Asp261)	—Οε1 (Glu176A)
	-	-	-W-Oδ2 (Asp190)/Nη1 (Arg226)/Oδ2 (Asp208)/O3P (ADP)/W/W	—Οε1 (Glu145B)
	-	-	-W-O4'/O82 Asp208/O1P ADP/W/W	-
04'	-O2P (A1493)	-W-O (Asp40)/N (Gly83)/Oε1 (Glu82)	-W-O3'	—Οε1 (Glu145B)
	-W	-W-Oδ1 (Asp40)/Nδ1 (His43)/Oε1 (Glu82)	-W-O1P (ADP)/O3P (ADP)/W/W	-
05'	-N6 (A1408)	-W-N6'/O5	-	-
N6'	-N1 (A1408)	Oδ2 (Asp35)	$-O\varepsilon 1$ (Glu157)	-
	-	-W-O5'/O5	-Oter1 (Phe264)	-
	-	-W-Oδ2 (Asp35)/Oδ2 (Asp40)/Oδ2 (Asp179)	-	-
	-	-W-N3/Oδ1 (Asp40)/Oδ2 (Asp179)	-	-
Cycle II				
N1	-O2'' (cycle III)	-O2'' (cycle III)	-O (Asn158)	-O2'' (cycle III)
	-O4 (U1495)	Oδ1 (Asp152)	-Oε2 (Glu160)	-Oγ (Ser94B)
	-W-N4 (C1498)	-	-Oε2 (Glu262)	-
N3	-O1P (A1493)	-Oter1 (Trp181)	-O (Asp261)	-Oel (Glu141B)
	-N7 (G1494)	-W-N6'/Οδ1 (Asp40)/Οδ2 (Asp179)	—Οε2 (Glu157)	-
	-O2P (G1494)	-W-Oter2 (Trp181)/Oε1 (Glu82)/Oε2 (Glu82)	-Oter1 (Phe264)	-
C4	-O6 (G1494)	-	-	-
05	-O5'' (cycle III)	-W-O5'/N6'/W/O82 (Asp35)	-O5'' (cycle III)	-O5'' (cycle III)
	-	-	-02'	-



**Figure 3.3 :** Vues stéréo des sites 1 (a) et 2 (b) de l'enzyme ANT(4'/4") complexés à la kanamycine A et à un analogue de l'ATP, et représentation schématique des contacts correspondants.

Les flèches violettes désignent les fonctions chimiques modifiées par l'enzyme.





Les molécules d'eau et les ions magnésium sont représentés respectivement par des sphères de couleurs rouge et vert. Les flèches vertes désignent les fonctions chimiques modifiées par l'enzyme.



Les molécules d'eau sont représentées par des sphères de couleurs rouge. Les flèches rouges désignent les fonctions chimiques modifiées par l'enzyme.

#### C. Implication des molécules d'eau dans la reconnaissance moléculaire

La fixation des aminoglycosides aux enzymes provoque l'expulsion de plusieurs molécules d'eau (de 6 à 8 dans le cas de l'AAC(2') (Vetting, *et al.* 2002). Aux résolutions atteintes (2,7-1,5 Å), environ une dizaine de molécules d'eau sont observées autour de chaque aminoglycoside complexé à l'APH(3') et à l'AAC(2'). Ces molécules d'eau médient des liaisons hydrogène entre les groupements fonctionnels des aminoglycosides et les acides aminés, augmentant ainsi la capacité qu'ont les sites de fixation de ces enzymes à s'adapter aux différentes structures que les aminoglycosides peuvent posséder. Huit



liaisons hydrogène directes et quatre médiées par des molécules d'eau sont formées par les groupements de la néamine dans les complexes site A/aminoglycosides comme dans les complexes APH(3')/aminoglycosides obtenus à des résolutions similaires (Tableau 3.3). Aucune liaison hydrogène médiée par une molécule

d'eau n'est observée dans le complexe ANT(4'/4'') résolu à 2,50 Å (cinq sont directes), tandis que cinq liaisons directes et six pontées par des molécules d'eau sont observées dans les complexes AAC(2')/aminoglycosides (résolutions de 1,50-1,80 Å). Dans la structure du complexe AAC(2')/tobramycine, des molécules d'eau occupent l'espace utilisé par le cycle III de la ribostamycine dans la structure du complexe AAC(2')/ribostamycine (Figure 3.7). Deux molécules d'eau sont retrouvées à des positions similaires dans les structures de la paromomycine liée au site A et de la ribostamycine liée à l'AAC(2') (Figure 3.2a). Deux molécules d'eau sont également retrouvées à des positions analogues dans les structures de la tobramycine liée au site A et de la kanamycine A liée à APH(3') (Figure 3.2b). Ainsi, la modulation des propriétés structurales des sites de fixation d'aminoglycosides est aussi importante pour la reconnaissance des différents aminoglycosides par la même molécule d'ARN (le site A) que par le même site de fixation d'une protéine. Les structures à haute

résolution à présent disponibles à la fois pour le site A (Publications n°1-3) et pour des enzymes de résistance (Fong et Berghuis 2002 ; Pedersen, *et al.* 1995 ; Vetting, *et al.* 2002) complexés à différents aminoglycosides permettent de considérer certaines de ces molécules d'eau dans les stratégies de conception de nouvelles molécules.



**Figure 3.7 :** Superposition de la tobramycine (cyan) et de la ribostamycine (jaune) fixées par l'AAC(2'). Les atomes de carbone des acides aminés et les molécules d'eau représentés et sont colorés en fonction de la structure à laquelle ils appartiennent.

(Numéros d'identification respectifs dans la PDB : 1M4D et 1M4G).

#### D. Vers la conception de nouveaux inhibiteurs

Les caractéristiques structurales les plus proches entre les complexes aminoglycosides/site A et aminoglycosides/enzyme sont observées pour l'enzyme APH(3'). Toutefois, un examen des surfaces d'accessibilité des sites de fixation des aminoglycosides dans les complexes avec l'APH(3') et dans ceux avec ANT(4'/4'') et AAC(2') révèle que la face de l'aminoglycoside principalement en contact avec les acides aminés dans les trois enzymes est la face opposée à celle en contact avec les nucléotides dans le site A (Figure 3.8). Cette différence de complémentarité des surfaces de van der Waals observées dans les complexes aminoglycoside/enzyme et aminoglycoside/site A pourrait être exploitée dans la conception de nouveaux antibiotiques (Fong et Berghuis 2002). Il est en effet envisageable d'encombrer spatialement une seule face afin d'empêcher la fixation des antibiotiques aux enzymes de résistance, tout en maintenant leur capacité d'interagir avec le site A. Encombrer les cycles III et IV des aminoglycosides, dont l'importance pour la fixation au site A semble aussi mineure que celle pour la fixation aux enzymes, constitue également une ouverture vers la synthèse de nouveaux antibiotiques. Cependant, les points communs sont tellement nombreux entre les modes de reconnaissance moléculaire d'aminoglycosides par le site A et par les trois types d'enzymes que la conception de molécules qui ciblent spécifiquement le site A tout en étant de pauvres substrats pour les enzymes de résistance est délicate. Il semble néanmoins préférable de développer des nouveaux composés ne comportant pas de cycles dérivés de sucres, afin de réduire le risque que ces nouveaux antibiotiques ne deviennent rapidement substrats des enzymes de résistance (Vetting, et al. 2002).



résistance (b-d).

La surface d'accessibilité de la macromolécule a été calculée pour une sphère de 1,40 Å de rayon roulant sur les résidus situés à moins de 10 Å de l'aminoglycoside. Dans chaque structure, des flèches noires indiquent le cycle I.

# II. Comparaison avec des oligosaccharides fixés par des protéines

Les sucres et leurs dérivés, sous forme d'oligo- et de polysaccharides divers, constituent les molécules biologiques les plus abondantes. Dans le monde vivant, divers saccharides servent d'agents structurants (cellulose, chitine, ...), de sources d'énergie (glucose, fructose, saccharose, lactose, ...) et de réserve nutritionnelle (glycogène, amidon, ...) (Voet et Voet 1998). D'autres jouent des rôles-clé dans des processus de reconnaissance moléculaire tels que la communication, l'adhésion et la différentiation cellulaires, les réponses immunitaires, etc. (Robyt 1998 ; Sears et Wong 1996) L'origine de l'intervention d'oligosaccharides à ces différents niveaux est due à leurs structures chimiques particulières. Les oligosaccharides, possédant une structure linéaire, ramifiée ou cyclique, contiennent un ou plusieurs hétérocycles de cinq ou six atomes liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Chaque unité saccharidique possède plusieurs groupements fonctionnels (hydroxyles, amines, ...) dont l'orientation précise est nécessaire aux processus impliquant une reconnaissance spécifique par les macromolécules biologiques. Cette reconnaissance est essentiellement effectuée par des protéines : dans chaque famille de protéines existantes (enzymes, transporteurs, récepteurs, hormones, toxines, ...) ont été identifiées plusieurs protéines possédant des sites de fixation de saccharides (Sears et Wong 1996; Sears et Wong 1998; Williams et Davies 2001). Au début du mois de novembre 2002, 1411 structures cristallographiques de protéines liées à des dérivés de saccharides étaient répertoriées dans la PDB. La compréhension des multiples modes de reconnaissance moléculaire de divers oligosaccharides par des protéines permet d'envisager par exemple la synthèse d'inhibiteurs de toxines bactériennes (Williams et Davies 2001) et le développement de vaccins efficaces dans la protection contre certains cancers (Livingston, et al. 1997). Les aminoglycosides étant des dérivés aminés de saccharides, il est intéressant de comparer les modes de reconnaissance de ces antibiotiques par les nucléotides du site A et par les enzymes de résistance avec d'autres oligosaccharides de structures chimiques voisines, mais jouant des rôles biologiques entièrement différents.

# A. Vues générales des structures tridimensionnelles de quelques complexes

Une des familles de protéines fixant des saccharides les mieux caractérisées est celle des lectines. Ces protéines, distinctes des immunoglobulines, interagissent avec des saccharides sans effectuer sur eux de catalyse enzymatique. Les structures d'un grand nombre de lectines d'origines animale et végétale ont été résolues par cristallographie aux rayons X complexées à différents oligosaccharides (Delbaere, *et al.* 1993 ; Feinberg, *et al.* 2001 ; Hamelryck, *et al.* 1999 ; Loris 2002 ; Naismith et Field 1996 ; Saul, *et al.* 2000) (Figure 3.9). En outre, d'autres structures cristallographiques ont révélé par exemple les modes de fixation d'oligosaccharides à des transporteurs périplasmiques bactériens (Quiocho et Vyas 1984 ; Quiocho, *et al.* 1989 ; Vyas, *et al.* 1998), à un transporteur du fer (Ferguson, *et al.* 1998), à des anticorps (Bundle, *et al.* 1994 ; Villeneuve, *et al.* 2000), à des porines (Forst, *et al.* 1998), à des enzymes dégradant la paroi des cellules végétales (Szábó, *et al.* 2001), à des toxines (Swaminathan et Eswaramoorthy 2000 ; Williams et Davies 2001), (Figure 3.9) ... Toutes ces protéines sont constituées d'une ou plusieurs sous-unités. Les sites de fixation des oligosaccharides (un ou plusieurs par protéine) sont situés soit au cœur de la protéine, soit sur la face externe.



Figure 3.9 : Exemples de structures cristallographiques de protéines complexées à des oligosaccharides.

(a) Protéine de liaison du L-arabinose/L-arabinose (Numéro d'identification dans la PDB : 1ABE ; Quiocho, *et al.* 1984) ; (b) Isolectine I de *Lathyrus ochrus*/trisaccharide contenant du N-acétyllactosamine (1LOG ; Bourne, *et al.* 1990) ; (c) Lectine IV de *Griffonia simplicifolia*/tétrasaccharide déterminant de groupe sanguin humain (facteur Lewis b) (1GSL ; Delbaere, *et al.* 1993) ; (d) Anticorps Se155-4/ trisaccharide de *Salmonella paratyphi* (1MFD ; Bundle, *et al.* 1994) ; (e) Porine ScrY de *Salmonella typhimurium* spécifique du sucrose/sucrose (1AOT ; Forst, *et al.* 1998) ; (f) Récepteur d'ion ferrichrome chez *Escherichia coli*/lipopolysaccharide (1FCP ; Ferguson, *et al.* 1998).

Les hélices  $\alpha$  sont indiquées en bleu, les brins  $\beta$  en jaune, les molécules d'eau en rouge. Les différents ligands sont indiqués en vue tout-atomes.



#### B. Analyse structurale des sites de fixation

Figure 3.10 : Quelques exemples de sites de fixation d'oligosaccharides.

(a) L-arabinose complexé à une protéine de liaison du L-arabinose/ (Numéro d'identification dans la PDB : 1ABE ; Quiocho, *et al.* 1984) ;
(b) Deux molécules de sucrose complexées à une porine ScrY de *Salmonella typhimurium* (1AOT ; Forst, *et al.* 1998) ;
(c) Trisaccharide complexé à l'isolectine I de *Lathyrus ochrus* (1LOG ; Bourne, *et al.* 1990) ;
(d) Pentasaccharide lié à un récepteur de type lectine (1K9I ; Feinberg, *et al.* 2001).

Les atomes de carbone des saccharides sont indiqués en noir. Les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges.

Lorsqu'ils sont complexés à ces différents types de protéines, les cycles des oligosaccharides adoptent une conformation de type « chaise », avec les divers groupements fonctionnels (essentiellement hydroxyles) rayonnant du cycle en positions équatoriales ou axiales selon la nature du saccharide et de l'environnement. Les groupements de ces différents cycles modulent la reconnaissance moléculaire (Lemieux 1996). Les oligosaccharides interagissent partiellement ou totalement avec la protéine, par des liaisons hydrogène et des interactions de van der Waals, dans des poches formées principalement d'acides aminés chargés et polaires (Figure 3.10). Des molécules d'eau, partiellement ou totalement enfouies dans les sites de fixation, permettent d'optimiser le nombre de liaisons hydrogène potentiel de chaque cycle saccharidique (Bourne et Cambillau 1993). Certains saccharides n'interagissent avec la protéine que par l'intermédiaire de molécules d'eau (Bourne, et al. 1990) (Figure 3.10c). Les sites de fixation contiennent également un grand nombre de résidus aromatiques qui s'empilent ou non sur un ou plusieurs cycles saccharidiques (Figures 3.11 et 3.12). En diminuant la constante diélectrique locale, ces interactions d'empilement favorisent la formation de nombreuses liaisons hydrogène (Lemieux 1996). Ces interactions d'empilement sont si-

milaires à celles observées entre le cycle I des aminoglycosides et la guanine 1491 dans les différents complexes formés entre les aminoglycosides et le site A (Figure 3.13). La reconnaissance moléculaire spécifique de saccharides semble ainsi dépendre d'une combinaison particulière bien définie d'interactions d'empilements et de liaisons hydrogène. Cependant, il est à noter qu'aucune interaction d'empilement n'a été observée dans les structures des aminoglycosides liés aux enzymes de résistance résolues à ce jour.









#### III. Rôle des molécules d'eau dans la reconnaissance

Chaque site de fixation d'oligosaccharide est en général capable d'accueillir plusieurs types de substrats différant les uns des autres par la position des groupements hydroxyles, le nombre et le type de branchement des cycles, ... Cette adaptabilité est contrôlée par la nature et la composition du site de fixation, ainsi que par les molécules d'eau présentes à l'interface protéine/saccharide. En effet, la présence de molécules d'eau permet de moduler la structure du site, afin d'accueillir différents ligands avec la même affinité. Par exemple,



les saccharides L-arabinose et D-galactose sont tous deux des substrats ayant une affinité de 10<sup>-7</sup> M pour un même transporteur situé dans le périplasme des bactéries à Gram négatif (Miller, *et al.* 1983). Des structures cristallographiques ont été obtenues pour les complexes avec le L-arabinose (Quiocho et Vyas 1984) et le D-galactose (Quiocho, *et al.* 1989) à des résolutions de 1,7 Å et 1,8 Å respectivement. Le site de fixation

de ces saccharides est situé entre les deux domaines constituant la protéine (Figure 3.9a). La structure du site complexé par le L-arabinose ou le D-galactose est similaire, sauf autour de l'atome d'oxygène O5' inséré dans le cycle. Dans la structure du complexe avec le saccharide L-arabinose, l'atome O5' forme une liaison hydrogène médiée par deux molécules d'eau vers l'amine de la chaîne principale de l'acide aminé Met108. Dans la structure du complexe avec le D-galactose, cette liaison hydrogène est remplacée par une liaison médiée par une seule molécule d'eau entre le groupement hydroxyle exocyclique O6' et l'amine de Met108 (Figure 3.14).

Des situations similaires sont retrouvées dans les complexes enzyme de résistance/amnoglycosides et site A/aminoglycosides. Certaines molécules d'eau sont toujours à la même position, tandis que d'autres remplacent les groupements fonctionnels présents appartiennent.



dans certains ligands, mais absents dans d'autres (Figures 3.2, 3.6 & 3.7). Ainsi, les liaisons hydrogène directes impliquant ces groupements sont remplacées par une ou plusieurs liaisons hydrogènes pontées par des molécules d'eau. Par exemple, dans le complexe site A/paromomycine (Publication n°1), le groupement N2' du cycle I forme une liaison hydrogène intra-

moléculaire avec le cycle III, et l'atome O5'' du cycle III établit une liaison hydrogène directe avec l'atome N7 de la guanine 1491 sur laquelle le cycle I est empilé (Figure 3.15). Dans la structure du complexe site A/tobramycine, ces interactions sont remplacées par une liaison hydrogène pontée par deux molécules d'eau (Figure 3.15).

Le rôle des molécules d'eau dans la reconnaissance entre une protéine et un ligand peut être prépondérant dans certains complexes (Bourne, *et al.* 1990 ; Lemieux 1996). Ainsi, l'association du ligand à son site de fixation résultant d'une déshydratation partielle, un ligand idéal n'est pas nécessairement un ligand pour lequel la complémentarité de surface et le nombre de liaisons hydrogène vers les acides aminés sont maximisés. Il s'agit plutôt d'un ligand qui préserve ou promeut l'inclusion de molécules d'eau à des sites d'hydratation précis (Ladbury 1996). C'est pourquoi la prise en compte des molécules d'eau dans une stratégie de conception de nouveaux ligands augmente considérablement les chances de succès (Ladbury 1996). Toutefois, la difficulté d'évaluer la contribution des molécules d'eau à la force et à la spécificité de l'interaction rend cette tâche délicate. Les comparaisons des structures de divers saccharides (aminoglycosides, oligosaccharides, ...), complexés par plusieurs types de macromolécules (site A, protéines variées), permettent d'illustrer la capacité des molécules d'eau à moduler la reconnaissance de saccharides. Ces différents aspects pourront être considérés dans les stratégies de conception de nouveaux antibiotiques.



## **Chapitre 4**

### Conclusions

Ce travail de thèse a porté sur l'étude par cristallographie aux rayons X de fragments d'ARN incorporant le site A de l'ARNr 16S bactérien, complexés à des antibiotiques appartenant à la classe des aminoglycosides. Des fragments possédant différentes longueurs et différentes extrémités ont été conçus afin d'incorporer le motif réduit du site A dans des doubles hélices d'ARN d'une quarantaine de nucléotides. Ces fragments ont été synthétisés au laboratoire par méthode chimique automatique et/ou obtenus auprès d'une entreprise. La pureté requise pour des expériences de cristallographie étant très élevée (>98%), des méthodes de purification par chromatographie échangeuse d'ions ou par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide ont dû être mises au point. Des expériences de cristallisation ont été réalisées pour chaque fragment d'ARN complexé à des aminoglycosides par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue, à partir de conditions dérivées de celles ayant permis l'obtention de cristaux pour des fragments d'ARN et pour des complexes ADN/ligands. Des cristaux en forme de plaquettes atteignant parfois une taille de  $600*450*10 \ \mu m$  ont été obtenus pour des complexes avec des aminoglycosides appartenant à trois sous-classes différentes : la paromomycine, la tobramycine et la généticine. Les enregistrements de jeux de données ont été rendus possibles par l'utilisation de rayonnement synchrotron. Les structures des complexes ont été obtenues par remplacement moléculaire (résolutions de 2,40, à 2,54 Å) à partir de modèles comportant la structure du site A au sein de la sous-unité ribosomique 30S (Carter, et al. 2000).

Dans ces trois structures, les brins d'ARN s'associent sous forme d'une double hélice comportant deux poches dans lesquelles viennent se fixer les aminoglycosides. Comme dans la structure de la sous-unité 30S complexée à la paromomycine (Carter, et al. 2000), la partie néamine commune aux trois aminoglycosides s'intercale dans l'hélice de manière similaire et provoque l'extrusion des deux adénines 1492 et 1493. Cette conformation particulière du complexe est stabilisée par (i) des interactions d'empilement et  $C-H/\pi$ entre le cycle I (non plan) et la guanine 1491, (ii) deux liaisons hydrogène directes entre le cycle I et l'adénine 1408, (iii) six liaisons hydrogènes directes ou médiées par l'eau vers les oxygènes des phosphates des adénines 1492 et 1493, (iv) une dizaine de liaisons hydrogènes directes ou pontées par des molécules d'eau avec les paires de bases canoniques G1405=C1496, C1407=G1494, C1409=G1491 et la paire de bases noncanonique U1406•U1495. Ainsi, quel que soit le type d'aminoglycoside, un nombre similaire de liaisons hydrogène directes est observé vers l'ARN. Il apparaît que la faculté d'adaptation particulière du site A à accueillir différents types d'aminoglycosides provient : (i) de l'extrême conservation des nucléotides qui interagissent avec la partie néamine commune à ces différents aminoglycosides, (ii) de la combinaison des flexibilités des adénines non-appariées A1408, A1492, A1493 et de la paire non-canonique U1406•U1495, (iii) de la présence de nombreuses molécules d'eau jouant le rôle de médiateur de liaisons hydrogène, (iv) de la formation d'interactions d'empilement entre une base particulière et le cycle I.

Les structures du site A au sein de ces trois complexes sont proches de celles du site A présent dans les structures de la sous-unité ribosomique 30S complexée uniquement à la paromomycine (Carter, *et al.* 2000), ou simultanément aux trois ligands paromomycine, ARNm et ARNt (Ogle, *et al.* 2001). En effet, les conformations des antibiotiques et de l'ARN sont similaires dans l'ensemble de ces structures. C'est vraisemblablement l'insertion du cycle I de l'aminoglycoside dans l'hélice d'ARN et la formation de liaisons hydrogène directes avec l'adénine 1408 qui jouent un rôle majeur dans la spécificité de reconnaissance. Ces interactions caractéristiques stabilisent une conformation particulière du site A à l'origine de l'augmentation du taux d'erreur lors de la traduction, source de l'effet antibiotique. En conséquence, l'approche que nous avons développée au cours de ce travail permet l'étude structurale par cristallographie aux rayons X d'un motif d'ARN de 13 nucléotides extrait d'une molécule d'ARN naturelle d'origine bactérienne comportant plus de 1500 nucléotides. Hors de son contexte et sous certaines conditions (ici : l'insertion

de deux sites entre un certain nombre de paires de bases Watson-Crick, dans des fragments constitués de deux brins de 20-22 nt), ce motif est capable de former une hélice comportant trois adénines non-appariées et une paire de bases non-canonique. Comme au sein du ribosome, il est apte à interagir spécifiquement avec une famille de petites molécules. Ainsi, les structures cristallographiques obtenues au cours de ce travail reflètent la situation biologique tout en offrant une plus haute résolution, nécessaire à l'amélioration de notre perception de la reconnaissance moléculaire entre l'ARN et les aminoglycosides. Les résultats de cette étude permettent de valider certaines propositions (localisation du site d'interaction des aminoglycosides, importance de la néamine pour la spécificité de reconnaissance), basées sur les structures antérieures de complexes entre un oligoribonucléotide modèle de 27 nucléotides et des aminoglycosides résolues par RMN (Fourmy, et al. 1996; Yoshizawa, et al. 1998), et d'en invalider d'autres (formation de la paire de bases A1408•A1493, absence d'empilement du cycle I). Les structures cristallographiques résolues au cours de ce travail serviront de base à des travaux de dynamique moléculaire qui permettront de déterminer avec précision l'importance relative des liaisons hydrogène, le rôle de chaque molécule d'eau, ... Toutefois, il est certain que des structures à des résolutions de l'ordre de 1,0 Å apporteraient des corrections à ces modèles et des informations supplémentaires sur les mécanismes moléculaires de la spécificité de reconnaissance.

Les analyses comparatives des structures obtenues pour la paromomycine, la tobramycine et la généticine permettent de rationaliser l'ensemble des données de cartographie en solution, de mesures de constantes de dissociation et de résultats de microbiologie obtenu pour différents types d'aminoglycosides et pour différents mutants du site A. Elles offrent des explications moléculaires à l'origine de la diminution d'affinité entre les aminoglycosides et le site A, caractéristique commune aux différents mécanismes de résistance répertoriés chez les bactéries (camouflage du site A, inactivation enzymatique de l'aminoglycoside). Ainsi, une mutation ponctuelle à un endroit particulier du site A (par exemple, la mutation A1408G) suffit à priver l'aminoglycoside de contacts directs avec l'ARN. De même, une modification chimique particulière de l'aminoglycoside (par exemple, l'acétylation de la position 6') empêche la formation des liaisons hydrogène nécessaires à l'interaction.

Le système développé pour l'étude cristallographique du site A reproduisant fidèlement la situation biologique, il est possible d'étudier une grande variété de composés mais aussi de séquences de sites comportant des mutations ponctuelles associées à des résistances et/ou correspondant aux séquences du site A chez les organismes eucaryotes. Dès la résolution de la première structure cristallographique, obtenue pour l'oligoribonucléotide contenant la séquence sauvage du site A de l'organisme Escherichia coli complexé à la paromomycine, des cristaux ont été obtenus pour plusieurs aminoglycosides différents. De plus, des résultats prometteurs ont été obtenus pour plusieurs oligoribonucléotides comportant les séquences des sites A humains cytoplasmique et mitochondrial, pour lesquels la fixation d'aminoglycosides est source de toxicité. Des cristaux ont pu être obtenus sous réserve de conserver : (i) une longueur similaire pour l'oligoribonucléotide, (ii) un nombre de plateaux de bases similaire de part et d'autre des sites, (iii) des extrémités 5' comportant un ou deux nucléotides non-appariés, (iv) la conformation extrahélicale des adénines correspondant aux adénines 1492 et 1493 du site A. L'empilement cristallin est en effet fortement dépendant de tous ces paramètres. Une approche ultime consisterait à co-cristalliser par exemple une enzyme de résistance catalysant la méthylation de la position N7 du résidu G1495 en présence de l'oligoribonucléotide contenant le site A. La cristallisation de ces différents complexes a été optimisée pour plusieurs séquences et plusieurs aminoglycosides ; les jeux de données correspondants ont été enregistrés et les traitements des données sont en cours (travaux de Boris François). L'ensemble des résultats de ces études conduisent à une amélioration directe de la compréhension du mode de reconnaissance moléculaire des aminoglycosides par l'ARN, et indirecte de celle des mécanismes de résistance. Cette connaissance devrait faciliter ensuite la conception d'antibiotiques d'un nouveau type, entièrement synthétiques, moins sujets aux phénomènes de résistance et moins toxiques. Les nouveaux antibiotiques pourront à leur tour être analysés par cristallographie selon le même procédé, à condition que leur fixation au site A induise la conformation extra-hélicale des adénines 1492 et 1493. Cette exigence particulière, qui pourrait être considérée comme un inconvénient de la méthode, est en fait un avantage : la conformation extra-hélicale des adénines peut être considérée comme un signe de l'efficacité du ligand étudié à interférer avec la synthèse des protéines.

De manière générale, les résultats de cette étude illustrent le caractère modulaire particulier des molécules d'ARN : les ARN naturels fonctionnels sont formés de l'assemblages de plusieurs motifs structuraux. Un motif indépendant possédant une structure autonome peut être extrait de son contexte biologique afin d'être étudié en détail inséré dans un système simplifié. Cette méthode comporte plusieurs écueils : le nombre limité de motifs pouvant être étudiés selon cette méthode, la détermination précise de la séquence du motif nécessaire et suffisante à l'arrangement de sa structure autonome, la mise au point de la méthode d'analyse du motif, la validité des résultats obtenus à l'aide du modèle contenant le motif isolé, ... Néanmoins, les avantages d'une telle approche sont majeurs : l'ARN peut être synthétisé rapidement et en grande quantité, les protocoles de purification, de renaturation, de caractérisation structurale et fonctionnelle, de cristallisation sont plus simples à mettre en œuvre, la résolution finale de la structure est plus haute que celle du motif dans son contexte naturel. Cette méthode a déjà pu être étendue à d'autres sites de reconnaissance. En effet, des résultats encourageants ont été obtenus pour l'hygromycine B, dont le site de fixation chevauche le site A. Des cristaux ont été obtenus pour des oligoribonucléotides comportant le site A et les nucléotides additionnels nécessaires à la fixation de l'hygromycine B. L'hygromycine B ne promouvant pas elle-même la conformation extra-hélicale des adénines 1492 et 1493, des co-cristaux ont pu apparaître en présence de paromomycine. Ainsi, au-delà de l'étude cristallographique systématique de plusieurs complexes site A/aminoglycosides que permet cette démarche, ces différents résultats amènent à penser qu'il est possible d'appliquer une approche similaire à l'analyse de modules structuraux issus de contextes naturels entièrement différents.



## **Chapitre 5**

## **Protocoles expérimentaux**

# I. Conception de fragments incorporant le site A de l'ARN 16S

L'ensemble des fragments des séries n°1 à 5 conçus pour incorporer le site A procaryote (Figure 2.2) est testé à l'aide du programme de repliement de structures secondaires d'ARN MFOLD (Jossinet et Westhof 2001 ; Zuker 2000). Ce programme permet de vérifier, sur la base de paramètres énergétiques théoriques, que les fragments se replient en adoptant la structure secondaire pour laquelle ils ont été imaginés. En effet, quelques structures cristallographiques d'oligonucléotides ont montré un glissement des brins l'un par rapport à l'autre au cours du processus de cristallisation, conduisant à une structure secondaire plus stable, mais différente de celle souhaitée (Masquida, et al. 1999; Masquida et Westhof 1999). Le fichier d'entrée du programme de repliement n'acceptant que la séquence d'un seul brin, les tests de repliement ont été effectués à partir des deux brins mis bout-à-bout et séparés par une séquence de huit uridines. Cette astuce a été validée par des tests sur des structures cristallographiques d'oligonucléotides publiées (Masquida, et al. 1999), dont la structure secondaire dans le cristal est différente de celle désirée.

### **II. Synthèse chimique d'ARN en phase solide** A. Cycle de synthèse chimique

Les précurseurs utilisés pour la synthèse (Glen Research®) sont sous forme de phosphoramidites : les oxygènes O5', O2' et le phosphore lié à l'oxygène O3' sont protégés respectivement par des groupements diméthoxytrityl (DMT), tertiobutyldiméthylsilyl (TBDMS) et (2-cyanoéthyl)-(N,N-diisopropyl). Le dernier nucléotide en 3' de l'oligoribonucléotide à produire est fixé par son O3' sur une bille de verre poreux (bille CPG). Il constitue le support sur lequel vont se greffer successivement les phosphoramidites. Les amines exocycliques des bases sont protégées par des groupements N-phenoxyacétyl (N6 des adénines), N-*p*-isopropylphenoxyacétyl (N2 des guanines) et N-benzoyl (N4 des cytosines). Les phosphoramidites sont solubilisés dans l'acétonitrile à une concentration de 0,1 M. Une fois en solution, ces réactifs conservent leur efficacité environ trois jours. La quantité de matrice dC- ou dG-CPG utilisée varie selon l'échelle de synthèse : elle est de 0,023 g pour une échelle de synthèse de 1  $\mu$ mole et de 0,1135 g pour une échelle de 5  $\mu$ moles. Cette matrice est déposée dans une colonne de synthèse en polypropylène de taille adaptée. La colonne est sertie à ses extrémités par des membranes semi-perméables en téflon permettant une mise en contact des réactifs, de l'argon et des oligoribonucléotides au cours des différentes étapes de la synthèse.

Les flacons contenant les différents phosphoramidites, les solutions utilisées et les colonnes contenant les supports de synthèse sont installés sur un synthétiseur automatique ADN/ARN 392 à deux colonnes (Applied Biosystems-Perkin Elmer®). Le processus de synthèse est cyclique (Figure 5.1). Il est entièrement programmé sur l'appareil. A chaque étape, un système de valves géré par microprocesseur s'enclenche pour mettre en présence les composés qui doivent réagir. Chaque cycle de couplage correspond à l'accrochage d'un phosphoramidite sur le précédent, dans le sens 3' vers 5'. Il se décompose en quatre étapes, réalisées dans l'acétonitrile sous atmosphère d'argon par un synthétiseur:

- détritylation à l'acide trichloroacétique (TCA) du groupement protecteur (DMT) fixé sur l'oxygène O5' du nucleotide déjà greffé,
- *couplage du nouveau nucléotide* par substitution nucléophile sur son phosphore au degré d'oxydation III en présence de tetrazole,
- *inactivation des extrémités non-couplées* par la fixation d'un groupement acétyl sur l'oxygène O5' (par action conjointe de l'anhydride acétique et du N-methylimidazole),
- *oxydation* par l'iode des phosphores (III) des nucléotides couplés en phosphore (V).

Les réactifs utilisés sont fournis par la société Perkin Elmer® : acétonitrile anhydre, tétrazole/acétonitrile, anhydride acétique/lutidine/tétrahydrofurane, N-méthyl-

imidazole/tétrahydrofurane, iode/eau/pyridine/ tétrahydrofurane, acide trichloroacétique/dichlorométhane.

Une étape de lavage à l'ammoniaque permet de décrocher les oligoribonucléotides du support solide et de déprotéger les amines exocycliques et les oxygènes liés aux atomes de phosphore. Les oxygènes O2' sont déprotégés lors d'une deuxième étape, en conditions légèrement acides afin d'éviter l'hydrolyse alcaline de l'ARN.



#### Figure 5.1 : Cycle de synthèse chimique sur support solide.

Pour chaque étape, les nucléotides sont représentés avec leurs groupements protecteurs respectifs. La figure résume l'accrochage d'un précurseur phosphoramidite correspondant à une uridine sur un dinucléotide 5'-GdC-3' protégé. Les liaisons oxygène-phosphore ont été aggrandies dans un souci de clarté.

La durée d'un cycle complet dépend de la quantité de phosphoramidites que l'on désire coupler : environ 1 heure pour une quantité de 5  $\mu$ moles, et environ 20 minutes pour 1  $\mu$ mole. Une étape de couplage dure 720 secondes, quelle que soit l'échelle de synthèse. Toutefois, le couplage est interrompu au bout de 240 s et 480 s à l'échelle 5  $\mu$ moles : une basse pression d'argon crée un flux qui permet une homogénéisation des réactifs et des matrices de synthèse.

#### B. Déprotection des oligoribonucléotides

Une fois la synthèse effectuée, plusieurs étapes permettent de cliver l'ARN du support solide et de libérer les groupements protecteurs (Tableau 5.1). La dernière étape est la libération du groupement TBDMS fixé sur l'oxygène 2' des oligoribonucléotides synthétisés.

Les oligoribonucléotides fournis par Dharmacon Research Inc. sont livrés protégés en position 2' par la fonction ACE. Il sont déprotégés par hydrolyse en milieu acide : 400  $\mu$ l de tampon de déprotection commercial (acide acétique 100 mM, TEMED pH 3,8) sont ajoutés à 0,25  $\mu$ mol d'ARN. Après solubilisation et homogénéisation, le mélange est placé 30 minutes à 60°C. Les sous-produits de cette réaction, l'éthylène glycol et l'acide formique (Figure 5.2), sont évaporés sous vide puis les culots d'oligoribonucléotides sont solubilisés dans 200  $\mu$ l d'urée 8 M.

Tableau 5 1 · Déprotections successives des oligoribonucléotides

Opération réalisée	Réactifs utilisés	Commentaires			
décrochage de l'ARN et déprotection des bases puis évaporation à sec de l'ammoniaque sous vide	solution ammoniaque/méthanol (3/1)	1,5 ml/ $\mu$ mole est injecté régulièrement à l'aide d'une seringue par volume de 0,3 ml/ $\mu$ mole dans la colonne pendant 24 heures			
déprotection des oxygènes O2'	solution méthanol/eau distillée (1/1)	50 µ1			
	fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) 1 M (dans le tétrahydrofurane)	1,5 ml/ $\mu$ mole (24 h à l'obscurité)			
précipitation des ARN au n-butanol et séchage	200 µl eau distillée 700 µl acétate de sodium 3 M (pH 5,8) qsp 20 ml n-butanol	<ul> <li>séparation de l'ARN des molécules silylées par partage entre les phases aqueuse et organique</li> </ul>			
		<ul> <li>précipitation des ARN</li> <li>(4 heures à -20°C)</li> <li>centrifugation à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C</li> <li>séchage sous vide durant quelques heures</li> <li>L'ARN est alors sous forme de « pastille ».</li> </ul>			

#### C. Calcul du rendement de synthèse

Un moniteur installé sur l'appareil permet de calculer des rendements d'efficacité de la synthèse effectuée au laboratoire. Il mesure la conductance en fonction du temps lors de l'élimination du groupement détrityl à chaque début de cycle de couplage. Le logiciel *OligoNet*, qui pilote le synthétiseur, calcule deux valeurs à partir de ces mesures :

- OY (Overall Yield)=conductance la plus plus basse/conductance la plus haute,
- ASWY (Averaged StepWise Yield)=OY<sup>1/n</sup> (avec n=nombre de couplages réalisés).



La valeur OY s'approxime à un rendement global de la synthèse, tandis que la valeur ASWY correspond à un rendement par étape, pondéré par le nombre de couplages effectués au moment de la mesure. Il est ainsi possible

de déterminer la qualité de chaque synthèse. Une synthèse de bonne qualité possède généralement un OY supérieur à 30 % (les valeurs ASWY restent supérieures à 90 %).

#### III. Purification et analyse des fragments d'ARN

Deux méthodes sont couramment employées pour la purification de fragments d'ARN destinés à des expériences de cristallisation : la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) échangeuse d'ion et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) (Holbrook, *et al.* 2001 ; Holbrook et Kim 1997). Les purifications sont réalisées dans les deux cas en conditions dénaturantes (température de 55-75°C et ajout d'urée). Les fragments des séries 1 et 2 ont été purifiés par chromatographie préparative. A partir de la série 3, les fragments ont été systématiquement analysés par chromatographie et électrophorèse puis purifiés par électrophorèse préparative.

#### A. Chromatographie échangeuse d'ions

Chaque cycle de synthèse ayant un rendement d'environ 98 %, des séquences d'ARN tronquées ont été accumulées et acétylées au cours des différentes étapes. 1  $\mu$ mole de

fragment d'ARN déprotégé sous forme de « pastille » est dissous dans 5 ml d'eau ultrapure milliQ (Millipore). Après mesure de l'absorbance à 260 nm (A<sub>260</sub>), une chromatographie analytique est réalisée par HPLC en conditions dénaturantes (75°C/4 M urée) avec un échantillon comprenant 0,1-0,2 UA<sub>260</sub> (1 UA<sub>260</sub>  $\approx$  40  $\mu$  g/ml d'oligoribonucléotide). Elle permet d'évaluer la qualité de l'ARN après déprotection et le moment de son élution. L'HPLC est effectuée à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions Nucleopac® PA-100 (Dionex) commandée par une chaîne HPLC Waters-625 LC System® (pour les fragments des séries n°1 et 2) ou par une chaîne HPLC Dionex® (pour les fragments des séries n°3 à 5).

La solution contenant l'ARN (phase mobile) passe à travers une résine (phase stationnaire) constituée de microbilles de métacrylate, sur lesquelles sont greffées électrostatiquement des amines quaternaires. Dans un deuxième temps, une chromatographie préparative réalisée pour l'ensemble de la synthèse permet la séparation de l'ARN voulu des fragments plus courts accumulés lors de la synthèse. Une saturation de la colonne se produisant au-delà de 150 UA<sub>260</sub>, il est nécessaire d'effectuer une série de quelques HPLC

préparatives pour chaque synthèse de 1  $\mu$ mole. Une élution optimale est réalisée par un gradient de perchlorate de sodium (NaClO<sub>4</sub>) entre

<b>Tableau 5.2 :</b> Gradient utilisé pour l'élution des molécules d'ARN lorsde la purification par HPLC.						
Temps (min)	Débit (ml/min)	Solution A (%)	Solution B (%)			
0	1	85	15			
2	1	85	15			
50	1	30	70			
55	1	10	90			
58	1	10	90			
60	1	85	15			
70	0,2	85	15			

60 mM et 280 mM, avec les solutions A (1 mM NaClO<sub>4</sub>/20 mM MES pH 6,2/4 M urée) et **B** (400 mM NaClO<sub>4</sub>/20 mM MES pH 6,2/4 M urée) en 48 minutes, à 75°C (Tableau 5.2). Les fractions rassemblées sont dessalées par gel-filtration sur une colonne Sephadex® NAP-G25 (Pharmacia). Ces fractions (environ 2,5 ml au total) sont évaporées à sec sous pression réduite (environ 4 heures au concentrateur Speed Vac®). L'oligoribonucléotide est finalement dissous à une concentration d'environ 30-40 mg/ml dans l'eau milliQ.

#### B. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

#### 1) PAGE analytique

Afin d'évaluer précisément le degré de pureté de l'oligonucléotide, une expérience de PAGE analytique est effectuée en complément de la chromatographie analytique. Chaque gel (volume final=100 ml) est préparé à partir d'une solution de 20 % acrylamide:bisacrylamide (19:1) (Roth®) contenant 8 M urée (Q-biogene®), 0,5X trisborate-EDTA (TBE, Q-biogene®, tris 44,5 mM pH 8,3/acide borique 44,5 mM/EDTA 1 mM), 0,5 % persulfate d'ammonium (APS, Merck®) et 0,3 % en volume de TEMED (Roth®). Chaque échantillon contenant 1,5  $\mu$ l de la solution d'ARN et 8,5  $\mu$ l d'une solution à 0,05 % de bleu de bromophénol/0,05 % de xylène cyanol/7,2 M urée est déposé dans un puits préalablement rincé avec du tampon de migration TBE 0,5X. La migration s'effectue pendant 4-5h sous une tension de 30-40W, dans une solution tampon TBE 0,5X. Une fois le gel démoulé, la révélation de la position de l'ARN sur le gel se fait par coloration au bleu de toluidine (16,4 mM bleu de toluidine/40 % EtOH/1 % acide acétique). Après plusieurs rinçages à l'eau déminéralisée, le gel est séché sous vide à 70°C sur papier Whatmann® 3MM.

#### 2) PAGE préparative

Pour la PAGE préparative, l'ensemble d'une synthèse de 1  $\mu$ mole (~1-2 mg d'ARN dissous dans 200  $\mu$ l d'urée 8 M) est déposé dans un puits couvrant la largeur d'un gel de même composition que le gel analytique, mais d'un volume de 280 ml. La migration s'effectue pendant 6-8h à 40-50W dans du TBE 0,5X. Elle est suivie grâce au dépôt de 20  $\mu$ l de solution à 0,05 % de bleu de bromophénol/0,05 % de xylène cyanol/7,2 M urée dans un puits séparé. Une fois le gel démoulé, la bande correspondant à l'ARN pur est identifiée sous UV puis découpée et broyée. La diffusion de l'ARN hors du gel se fait par la méthode « Crush & Soak » (Sambrook et Russell 2001) dans une solution d'élution (200 mM NaCl/tris 10 mM pH 7,5/NaEDTA 0,5 mM) sous agitation pendant 16h à 4°C. La solution d'élution est renouvelée une fois puis filtrée sous pression réduite à l'aide d'un filtre Nalgène® de 0,2  $\mu$ m. Le filtre est rincé avec 1 ml d'eau milliQ. Le filtrat total est précipté pendant 4h à -20°C par ajout de 100  $\mu$ l d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et de 2,5X son volume d'éthanol pur. Il est ensuite centrifugé pendant 30 min à 8000 rpm à 4°C. Enfin, le

culot d'ARN est lavé deux fois à l'éthanol 90% puis mis à sécher sous vide pendant 15 min. Le culot est ensuite resuspendu dans  $100 \ \mu$ l d'eau milliQ.

#### C. Dosage de l'ARN

L'évaluation du rendement quantitatif de la purification s'effectue par mesure de l' $A_{260}$ . Les coefficients d'extinction molaire sont calculés pour chaque séquence selon la méthode développée par J. D. Puglisi et I. Tinoco (Puglisi et Tinoco Jr. 1989). Des solutions de 250  $\mu$ l au 1/500<sup>e</sup> de chaque synthèse sont utilisées.

#### D. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Dans un souci de compléter l'analyse de pureté des oligoribonucléotides suite aux problèmes de déprotection rencontrés, les premières séquences de la série 3 synthétisées au laboratoire ont été testées par spectrométrie de masse. La technique utilisée est la mesure du temps de vol des macromolécules ionisées par désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption-Time Of Flight) (Becchi 1995), en collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique dirigé par A. van Dorsselaer (UMR7509-CNRS, Strasbourg). Cette méthode mesure des masses moléculaires de biopolymères pouvant aller jusqu'à 500 kDa avec une précision de quelques Da.

Les molécules d'oligoribonucléotide sont incorporées à une matrice puis ce mélange est déposé sur une cible et séché. La cible est placée dans l'appareil MALDI-TOF et un vide de  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  mbar est créé. Un laser à azote ( $\lambda$ =337 nm) irradie la cible. En absorbant fortement à la longueur d'onde du laser, la matrice permet de transmettre à l'oligonucléotide analysé des photons émis par le laser, tout en le protégeant des effets destructeurs du laser (Cavusoglu 2002). Elle permet également d'éviter l'agrégation des oligonucléotides, conduisant à l'obtention d'ions moléculaires principalement monochargés (Hahner, *et al.* 1997). Les ions ainsi formés sont accélérés sous un potentiel de 20kV jusqu'à un détecteur. Le temps de vol mis par les ions pour atteindre le détecteur est proportionnel au rapport m/z des ions.

Environ 1  $\mu$ l d'échantillon contenant 20 pmoles d'oligoribonucléotide dans l'eau est mélangé à 1  $\mu$ l de matrice 6-aza-2-thiothymine (Lecchi, *et al.* 1995) (Figure 5.3) dissoute à saturation dans une solution eau/acétonitrile (50/50). Ce mélange est déposé sur une cible, séché sous vide, puis lavé avec 2  $\mu$ l d'une solution eau/acide acétique (50/50). De

meilleurs résultats sont obtenus par ajout à l'échantillon de billes de résine échangeuse de cations (Biorad®, 50W-X8, 200-400 µm), qui augmentent le rapport signal/bruit en



réduisant les adduits d'ions monovalents (Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>). La calibration est effectuée par un dépôt d'échantillon de cytochrome C (PM=12 kDa), préparé dans les mêmes conditions. Les expériences sont réalisées sur un appareil Biflex III (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Allemagne). Les logiciels d'acquisition et d'exploitation des spectres sont respectivement XACQ version 4.0 et XMASS version 5.0 (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Allemagne).

#### IV. Etudes de renaturation et de stabilité en solution des complexes ARN/aminoglycosides

#### A. Températures de fusion

L'expérience est basée sur l'observation du phénomène d'hyper-chromicité des acides nucléiques : une même séquence nucléique absorbe davantage sous l'état dénaturé (déplié) que sous l'état renaturé (replié). Ainsi, l'expérience consiste à mesurer l'absorbance à 258 nm d'une solution d'ARN chauffée progressivement puis refroidie à la température de départ Classiquement, le résultat est une courbe d'allure sigmoïdale, ce qui traduit la coopérativité du phénomène de dénaturation/renaturation. Le point d'inflexion de cette courbe donne la température de fusion (Tm), température à laquelle la moitié de l'ARN est sous forme dénaturée. Ainsi, il est possible de varier les propriétés de la solution et de



**Figure 5.4 :** Exemples de définition des tangentes pour une courbe de fusion (a) et de détermination du Tm à partir de la courbe correspondant à la fraction de molécules dépliées en fonction de la température (b).

mesurer pour chaque variation la température de fusion. La comparaison entre les différentes valeurs de Tm renseigne sur la stabilité des ARN étudiés. La valeur du Tm est calculée à l'aide de deux lignes de base tangentes aux parties « basse » et « haute » de la courbe de fusion (Figure 5.4). A l'aide de

ces lignes de bases, il est possible de déterminer la valeur de la fraction de molécules dans l'état déplié  $\alpha = (c1_T - c2_T)/(A_{258} - c2_T)$ ,  $c1_T$  et  $c2_T$  correspondant respectivement aux valeurs des lignes de bases des formes repliée et dépliée (Marky et Breslauer 1987 ; Mergny et Lacroix 2002 ; Puglisi et Tinoco Jr. 1989). Ainsi,  $\alpha = 1$  pour l'ensemble de la population à

l'état déplié, et  $\alpha$ =0 pour l'ensemble de la population à l'état replié. La valeur du Tm correspond à la température pour laquelle  $\alpha$ =0,5.

Dans cette étude, les mesures de températures de fusion sont réalisées avec 500 µl de solution contenant  $\approx 0.4 \ \mu\text{M}$  de fragment F3 (0,1<A<sub>258</sub><0,2)/0,1  $\mu$ M-3,0 mM néomycine/0,1 mM-15 mM MgCl<sub>2</sub>/5 mM NaCl/50 mM Na cacodylate pH 6,0. L'eau milliQ® utilisée pour la préparation des échantillons est dégazée par agitation sous vide pendant quelques minutes. L'appareil utilisé pour les mesures est un spectrophotomètre UV modèle 941 (Uvikon®) comportant un bain-marie externe. La solution est déposée dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm, puis recouverte d'une mince couche d'huile de paraffine. La cuve est fermée par un bouchon. La sonde de mesure de température de l'appareil est placée dans une cuve séparée contenant uniquement de l'eau. L'A<sub>258</sub> est mesurée régulièrement au cours du chauffage progressif de l'échantillon, programmé de 15 à 90-95°C (≈0,5°C/min), puis du refroidissement (≈1,3°C/min). Préalablement à l'expérience de dénaturation thermique, les molécules d'ARN ont été renaturées soit par chauffage pendant 2 min à 80°C en bain-marie puis retour lent à température ambiante pendant ≈16h, soit un premier cycle de dénaturation-renaturation effectué à vide dans le spectrophotomètre. L'ensemble des mesures est traité à l'aide du logiciel KALEIDAGRAPH® (Synergy Software).

#### B. Antibiogrammes

Un tapis bactérien est obtenu par étalement d'une solution de bactéries DH5 $\alpha$  (souche *E. coli* déficiente pour la recombinaison et utilisée pour la croissance de plasmides et cosmides) sur boîte de Petri contenant du milieu 2YT (1,6 % (p/v) bacto-tryptone/1,0 % (p/v) extrait bacto-levure/85 mM NaCl). Au centre de la boîte est déposée une goutte de 2 µl de solution de néomycine. Plusieurs concentrations de néomycine sont testées. Le système est incubé durant la nuit à 37°C. La sensibilité à l'antibiotique se traduit par une inhibition de croissance de la souche bactérienne matérialisée par un halo (« plage de lyse »). La taille de la plage de lyse est proportionnelle à la concentration en néomycine. La concentration de 0,6 mM en néomycine est choisie pour les tests. Une expérience est effectuée dans des conditions similaires pour une solution de renaturation comprenant 0,6 mM fragment F3/0,6 mM néomycine/0,1 mM MgCl<sub>2</sub>/50 mM Na cacodylate pH 6,0. Cette solution est portée à la température de 95°C dans un bloc chauffant (~30 min), maintenue à

95°C (≈5 min), puis refroidie lentement jusqu'à température ambiante (≈2h). Une troisième expérience est réalisée avec la même solution, mais privée d'ARN.

#### C. Etude par PAGE

Une solution de renaturation est réalisée avec les fragments 2 et 3 (rapport néomycine:ARN de 7:1). Cette solution est portée à la température de 95°C dans un bloc chauffant ( $\approx$  30 min), maintenue à 95°C (5 min ou 30 min), puis refroidie lentement jusqu'à température ambiante ( $\approx$  2h). Une électrophorèse dénaturante est ensuite effectuée sur gel d'acrylamide 20 % / urée 8 M (migration de 2h à 120 V / 30 mA / 2 W).

#### V. Cristallogénèse et cristallisation

Les protocoles expérimentaux correspondant aux différents essais de cristallogénèse et aux expériences de cristallisation (matrices de conditions, techniques et plans d'optimisation) sont présentés dans le chapitre 2, §I.D.

#### VI. Cristallographie aux rayons X

#### A. Résolution des structures tridimensionnelles

Le protocole de résolution de structure appliqué à chacun des fragments complexé à la paromomycine, la tobramycine et la généticine (obtention des facteurs de structure, remplacement moléculaire, affinement du modèle moléculaire), est similaire pour chacune des structures et décrit en détail dans la partie correspondant à la section « Matériel et méthodes » de chacune des publications n°1 à 3 (chapitre 2, §II-IV). Le premier modèle de structure tridimensionnelle affinable du complexe fragment A3/paromomycine a été obtenu sans difficulté majeure à partir de la méthode de remplacement moléculaire, à l'aide d'une construction incorporant la structure du site A complexé à la paromomycine dans la sous-unité 30S (Carter, *et al.* 2000) (Publication n°1). Les structures des complexes fragment A3.4/tobramycine et fragment A3/généticine ont été obtenues par remplacement moléculaire à l'aide de la structure du complexe fragment A3/paromomycine (Publication n°2) et de celle du complexe fragment A3/tobramycine, respectivement (Publication n°3).

#### B. Validation des structures tridimensionnelles

En fin d'affinement, l'accord entre le modèle affiné et les données expérimentales, ainsi que la géométrie du modèle sont vérifiés à l'aide de la routine « *model\_stats* » du programme CNS (Brünger, *et al.* 1998). Le modèle de la structure finale (au format PDB),

préparé par la routine « *xtal\_pdbsubmission* » du programme CNS, ainsi que les facteurs de structures (au format CNS) sont déposés sur le site Internet de la Protein Data Bank (www.rcsb.org) à l'aide de l'outil ADIT (« Auto Dep Input Tool »). Lors de la déposition, la géométrie de la structure est à nouveau vérifiée par les différentes procédures de contrôle proposées par l'outil ADIT (Das, *et al.* 2001).
## Bibliographie

Ali B. H. (1995). Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol*, **26**:1477-1487.

Alper P. B., M. Hendrix, P. Sears and C.-H. Wong (1998). Probing the specificity of aminoglycoside-ribosomal RNA interactions with designed synthetic analogs. *J Am Chem Soc*, **120**:1965-1978.

Anderson A. C., B. E. Earp and C. A. Frederick (1996). Sequence variations as a strategy for crystallizing RNA motifs. *J Mol Biol*, **259**:696-703.

Armelagos G. J. (1998). Des réseaux planétaires pour les microbes. La Recherche, 314:74-77.

Arya D. P. and R. L. Coffee, Jr. (2000). DNA triple helix stabilization by aminoglycoside antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett*, **10**:1897-1899.

Arya D. P., R. L. Coffee, Jr., B. Willis and A. I. Abramovitch (2001). Aminoglycosidenucleic acid interactions: remarkable stabilization of DNA and RNA triple helices by neomycin. *J Am Chem Soc*, **123**:5385-5395.

**Auffinger P. and E. Westhof** (2001). Hydrophobic methyl groups stabilize the hydration shell of 2'-O-methylated RNA duplexes. *Angew Chem Int Ed*, **40**:4648-4650.

Azucena E. and S. Mobashery (2001). Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist Updat*, **4**:106-117.

**Baeyens K. J., H. L. Debondt, A. Pardi and S. R. Holbrook** (1996). A curved RNA helix incorporating an internal loop with G•A and A•A non-Watson-Crick base pairing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**:12851-12855.

Ban N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**:905-920.

**Bar-Nun S., Y. Shneyour and J. S. Beckmann** (1983). G-418, an elongation inhibitor of 80S ribosomes. *Biochim Biophys Acta*, **741:**123-127.

**Barclay M. L. and E. J. Begg** (2001). Aminoglycoside adaptative resistance Importance for effective dosage regimens. *Drugs*, **61**:713-721.

Batey R. T., R. P. Rambo and J. A. Doudna (1999). Tertiary motifs in RNA structure and folding. *Angew Chem Int Ed*, **38**:2327-2343.

Batey R. T., R. P. Rambo, L. Lucast, B. Rha and J. A. Doudna (2000). Crystal structure of the ribonucleoprotein core of the signal recognition particle. *Science*, **287**:1232-1239.

Battle D. J. and J. A. Doudna (2002). Specificity of RNA-RNA helix recognition. Proc

*Natl Acad Sci USA*, **99:**11676-11681.

**Beauclerk A. A. and E. Cundliffe** (1987). Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J Mol Biol*, **193**:661-671.

**Becchi M.** (1995). Spectrométrie de masse des protéines, p. 59-68. *Dans Les cahiers IMABIO Purification et caractérisation des protéines à fin d'études structurales*, vol. 15. CNRS, Paris.

Begg E. J. and M. L. Barclay (1995). Aminoglycosides-50 years on. Br J Clin Pharmacol, 39:597-603.

**Benveniste R. and J. Davies** (1971). Enzymatic acetylation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying an R factor. *Biochemistry*, **10**:1787-1796.

**Benveniste R. and J. Davies** (1973). Structure-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics: role of hydroxyl and amino groups. *Antimicrob Agents Chemother*, **4**:402-409.

Berman H. M. and P. R. Young (1981). The interaction of intercalating drugs with nucleic acids. *Annu Rev Biophys Bioeng*, **10**:87-114.

**Böddeker N., G. Bahador, C. Gibbs, E. Mabery, J. Wolf, L. Xu and J. Watson** (2002). Characterization of a novel antibacterial agent that inhibits bacterial translation. *RNA*, **8:**1120-1128.

Böttger E. C., B. Springer, T. Prammananan, Y. Kidan and P. Sander (2001). Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO Rep*, 2:318-323.

Botto R. E. and B. Coxon (1983). Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy of neomycin B and related aminoglycosides. *J Am Chem Soc*, **105**:1021-1028.

**Bourne Y. and C. Cambillau.** (1993). The role of structural water molecules in proteinsaccharide complexes, p. 321-337. *Dans Water and biological macromolecules*. E. Westhof (ed.), 1<sup>st</sup> ed. The MacMillan Press Ltd, London.

**Bourne Y., P. Rouge and C. Cambillau** (1990). X-ray structure of a  $(\alpha$ -Man $(1-3)\beta$ -Man(1-4)GlcNAc)-lectin complex at 2.1 Å resolution. The role of water in sugar-lectin interaction. *J Biol Chem*, **265**:18161-18165.

Brodersen D. E., W. M. Clemons Jr, A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly and V. Ramakrishnan (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 103:1143-1154.

Brünger A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson and G. L. Warren (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst*, D54:905-921. **Budavari S., M. J. O'Neil, A. Smith and P. E. Heckelman** (1989). The Merck index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, *11<sup>th</sup> ed*. Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., U.S.A.

**Bujnicki J. M. and L. Rychlewski** (2001). Sequence analysis and structure prediction of aminoglycoside-resistance 16S rRNA:m7G methyltransferases. *Acta Microbiol Pol*, **50**:7-17.

Bundle D. R., E. Eichler, M. A. Gidney, M. Meldal, A. Ragauskas, B. W. Sigurskjold, B. Sinnott, D. C. Watson, M. Yaguchi and N. M. Young (1994). Molecular recognition of a *Salmonella* trisaccharide epitope by monoclonal antibody Se155-4. *Biochemistry*, 33:5172-5182.

Bürli R., Y. Ge, S. White, E. Baird, S. Touami, M. Taylor, J. Kaizerman and H. Moser (2002). DNA binding ligands with excellent antibiotic potency against drug-resistant gram-positive bacteria. *Bioorg Med Chem Lett*, **12:**2591.

Campochiaro P. A. and B. P. Conway (1991). Aminoglycoside toxicity-A survey of retinal specialists. Implications for ocular use. *Arch Ophthalmol*, **109**:946-950.

**Carbon C. and R. P. Bax** (1998). Regulating the use of antibiotics in the community. *Brit Med J*, **317**:663-665.

Carter A. P., W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly and V. Ramakrishnan (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**:340-348.

**Carter Jr C. W.** (1999). Experimental design, quantitative analysis, and the cartography of crystal growth, p. 75-120. *Dans Crystallization of nucleic acids and proteins*. A. Ducruix and R. Giegé (ed.), 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press.

Cate J. H., A. R. Gooding, E. Podell, K. Zhou, B. L. Golden, C. E. Kundrot, T. R. Cech and J. A. Doudna (1996). Crystal structure of a group I ribozyme domain : principles of RNA packing. *Science*, **273**:1678-1684.

**Cavusoglu N.** (2002). Apport de la spectrométrie de masse à l'étude de modifications posttraductionnelles et à la protéomique. *Thèse*. Université Louis Pasteur, Strasbourg.

**Chen X., B. Ramakrishnan, S. T. Rao and M. Sundaralingam** (1994). Binding of two distamycin A molecules in the minor groove of an alternating B-DNA duplex. *Nat Struct Biol*, **1**:169-175.

Chia J.-S., H.-L. Wu, H.-W. Wang, D.-S. Chen and P.-J. Chen (1997). Inhibition of hepatitis delta virus genomic ribozyme self-cleavage by aminoglycosides. *J Biomed Sci*, **4**:208-216.

**Chung L., G. Kaloyanides, R. McDaniel, A. McLaughlin and S. McLaughlin** (1985). Interaction of gentamicin and spermine with bilayer membranes containing negatively charged phospholipids. *Biochemistry*, **24**:442-452.

Clouet-d'Orval B., T. K. Stage and O. C. Uhlenbeck (1995). Neomycin inhibition of the hammerhead ribozyme involves ionic interactions. *Biochemistry*, **34**:11186-11190.

Coates A., Y. Hu, R. Bax and C. Page (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Rev Drug Disc*, 1:895-910.

**Correll C. C., A. Munishkin, Y. L. Chan, Z. Ren, I. G. Wool and T. A. Steitz** (1998). Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95:**13436-13441.

**Correll C. C., I. G. Wool and A. Munishkin** (1999). The two faces of the *Escherichia coli* 23S rRNA sarcin/ricin domain: the structure at 1.11 Å resolution. *J Mol Biol*, **292:**275-287.

Cox E. C., J. R. White and J. G. Flaks (1964). Streptomycin action and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, **51**:703-709.

Cox J. R., G. A. McKay, G. D. Wright and E. H. Serpersu (1996). Arrangement of substrates at the active site of an aminoglycoside antibiotic 3'-phosphotransferase as determined by NMR. *J Am Chem Soc*, **118**:1295-1301.

**Cox J. R. and E. H. Serpersu** (1997). Biologically important conformations of aminoglycoside antibiotics bound to an aminoglycoside 3'-phosphotransferase as determined by transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy. *Biochemistry*, **36**:2353-2359.

Crick F. H. (1966). Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol*, **19:5**48-555.

**Daigle D. M., D. W. Hughes and G. D. Wright** (1999). Prodigious substrate specificity of AAC(6')-APH(2"), an aminoglycoside antibiotic resistance determinant in enterococci and staphylococci. *Chem Biol*, **6**:99-110.

Das U., S. Chen, M. Fuxreiter, A. A. Vaguine, J. Richelle, H. M. Berman and S. J. Wodak (2001). Checking nucleic acid crystal structures. *Acta Crystallogr*, D57:813-828.

**Davies J.** (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, **264**:375-382.

**Davies J. and B. D. Davis** (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J Biol Chem*, **243**:3312-3316.

**Davies J., L. Gorini and B. D. Davis** (1965). Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol Pharmacol*, **1**:93-106.

**Davies J. and G. D. Wright** (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol*, **5**:234-240.

Davies J. E. (1964). Studies on the ribosomes of streptomycin-sensitive and resistant

strains of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA, 51:659-664.

**Davis B. D.** (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev*, **51:**341-350.

**Davis B. D., L. L. Chen and P. C. Tai** (1986). Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**:6164-6168.

**De Stasio E., D. Moazed, H. F. Noller and A. E. Dahlberg** (1989). Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic-RNA interactions. *EMBO J*, **8**:1213-1216.

**Delbaere L. T., M. Vandonselaar, L. Prasad, J. W. Quail, K. S. Wilson and Z. Dauter** (1993). Structures of the lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis b human blood group determinant at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*, **230**:950-965.

**Denis F., M. Privat de Garhile, P. Trieu-Cuot, P. Courvalin and M. C. Ploy.** (2001). Antibiotiques. *Dans Encyclopaedia Universalis*, France.

**Desnottes J. F.** (1998). Quels antibactériens pour après-demain ? *La Recherche*, **314:**70-73.

**Dieckmann T., E. Suzuki, G. K. Nakamura and J. Feigon** (1996). Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold. *RNA*, **2**:628-640.

**DiGiammarino E. L., K. A. Draker, G. D. Wright and E. H. Serpersu** (1998). Solution studies of isepamicin and conformational comparisons between isepamicin and butirosin A when bound to an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **37**:3638-3644.

**Doherty E. A., R. T. Batey, B. Masquida and J. A. Doudna** (2000). A universal mode of helix packing in RNA. *Nat Struct Biol*, **8:**339-343.

**Duan X. and F. A. Quiocho** (2002). Structural evidence for a dominant role of nonpolar interactions in the binding of a transport/chmosensory receptor to its highly polar ligands. *Biochemistry*, **41**:706-712.

Earnshaw D. J. and M. J. Gait (1999). Hairpin ribozyme cleavage catalyzed by aminoglycoside antibiotics and the polyamine spermine in the absence of metal ions. *Nucleic Acids Res*, 26:5551-5561.

**Ekman D. R., E. L. DiGiammarino, E. Wright, E. D. Witter and E. H. Serpersu** (2001). Cloning, overexpression, and purification of aminoglycoside antibiotic nucleotidyltransferase (2")-Ia: conformational studies with bound substrates. *Biochemistry*, **40**:7017-7024.

Ennifar E., A. Nikulin, S. Tishchenko, A. Serganov, N. Nevskaya, M. Garber, B. Ehresmann, C. Ehresmann, S. Nikonov and P. Dumas (2000). The crystal structure of UUCG tetraloop. *J Mol Biol*, **304**:35-42.

Ennifar E., P. Walter, B. Ehresmann, C. Ehresmann and P. Dumas (2001). Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol*, **8**:1064-1068.

**Faber C., H. Sticht, K. Schweimer and P. Rösch** (2000). Structural rearrangements of HIV-1 Tat-responsive RNA upon binding of neomycin B. *J Biol Chem*, **275**:20660-20666.

**Famulok M. and A. Hüttenhofer** (1996). *In vitro* selection analysis of neomycin binding RNAs with a mutagenized pool of variants of the rRNA decoding region. *Biochemistry*, **35:**4265-4270.

Fan P., A. K. Suri, R. Fiala, D. Live and D. J. Patel (1996). Molecular recognition in the FMN-RNA aptamer complex. *J Mol Biol*, **258**:480-500.

Feinberg H., D. A. Mitchell, K. Drickamer and W. I. Weis (2001). Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science*, **294**:2163-2166.

Ferguson A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs and W. Welte (1998). Siderophore-mediated iron transport : crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science*, **282**:2215-2220.

Ferré-D'Amaré A. R. and J. A. Doudna (1999). RNA FOLDS: insights from recent crystal structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struc*, 28:57-73.

Fisher-Wilson J. (2002). Renewing the fight against bacteria. The Scientist, 16:22-23.

Fong D. H. and A. M. Berghuis (2002). Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry. *EMBO J*, **21**:2323-2331.

Forge A. and J. Schacht (2000). Aminoglycoside antibiotics. Audiol Neurootol, 5:3-22.

Forst D., W. Welte, T. Wacker and K. Diederichs (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat Struct Biol*, **5**:37-46.

**Fourmy D., M. I. Recht, S. C. Blanchard and J. D. Puglisi** (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, **274**:1367-1371.

Fourmy D., M. I. Recht and J. D. Puglisi (1998a). Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A site of 16S rRNA. *J Mol Biol*, 277:347-362.

Fourmy D., S. Yoshizawa and J. D. Puglisi (1998b). Paromomycin binding induces a local conformational change in the A site of 16S rRNA. *J Mol Biol*, **277**:333-345.

Gale E. F., E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond and M. J. Waring (1981). The molecular basis of antibiotic action,  $2^{nd}$  ed. John Wiley & Sons, Inc., London.

Gallego J. and G. Varani (2001). Targeting RNA with small-molecule drugs: therapeutic

promise and chemical challenges. Acc Chem Res, 34:836-843.

**Garrod L. P. and F. O'Grady** (1968). Antibiotics and chemotherapy,  $3^{rd}$  ed. Livingstone, Edinburgh.

Gasparutto D., T. Livache, H. Bazin, A.-M. Duplaa, A. Guy, A. Khorlin, D. Molko, A. Roget and R. Téoule (1992). Chemical synthesis of a biologically active natural tRNA with its minor bases. *Nucleic Acids Res*, **20**:5159-5166.

Giordano C., F. Pallotti, W. F. Walker, N. Checcarelli, O. Musumeci, F. Santorelli, G. d'Amati, E. A. Schon, S. DiMauro, M. Hirano and M. M. Davidson (2002). Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**:521-529.

**Gould I. M.** (1999). A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, **43**:459-465.

Greenberg W. A., E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S. C. Hung and C. H. Wong (1999). Design and synthesis of new aminoglycoside antibiotics containing neamine as an optimal core structure: correlation of antibiotic activity with in vitro inhibition of translation. *J Am Chem Soc*, **121**:6527-6541.

Griffey R. H., S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery, D. J. Ecker and S. T. Crooke (1999). Determinants of aminoglycoside-binding specifity for rRNA by using mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:10129-10133.

Griffiths J. K., R. Balakrishnan, G. Widmer and S. Tzipori (1998). Paromomycin and geneticin inhibit intracellular *Cryptosporidium parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implications for drug delivery. *Infect Immun*, **66**:3874-3883.

Haddad J., S. Vakulenko and S. Mobashery (1999). An antibiotic cloaked by its own resistance enzyme. *J Am Chem Soc*, **121**:11922-11923.

Hahner S., H. C. Ludemann, F. Kirpekar, E. Nordhoff, P. Roepstorff, H. J. Galla and F. Hillenkamp (1997). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI) of endonuclease digests of RNA. *Nucleic Acids Res*, **25**:1957-1964.

Hamasaki K., J. Killian, J. Cho and R. R. Rando (1998). Minimal constructs that specifically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities. *Biochemistry*, **37**:656-663.

Hamasaki K. and R. R. Rando (1997). Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry*, **36**:12323-12328.

Hamelryck T. W., R. Loris, J. Bouckaert, M. H. Dao-Thi, G. Strecker, A. Imberty, E. Fernandez, L. Wyns and M. E. Etzler (1999). Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. J Mol Biol, **286**:1161-1177.

Hermann T. and E. Westhof (1998). Aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme: a general model for the interaction of cationic antibiotics with RNA. *J Mol Biol*, **276:**903-912.

Hermann T. and E. Westhof (1999a). Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds. *J Med Chem*, **42**:1250-1261.

Hermann T. and E. Westhof (2000). Rational drug design and high-throughput techniques for RNA targets. *Comb Chem High Throughput Screen*, **3**:219-234.

Hermann T. and E. Westhof (1999b). Saccharide-RNA recognition. *Biopolymers*, 48:155-165.

Hirose K., D. M. Hockenbery and E. W. Rubel (1997). Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure *in vitro*. *Hear Res*, **104**:1-14.

Hogrefe R. I., A. P. McCaffrey, L. U. Borozdina, E. S. McCampbell and M. M. Vaghefi (1993). Effect of excess water on the desylilation of oligoribonucleotides using tetrabutylammonium fluoride. *Nucleic Acids Res*, **21**:4739-4741.

Holbrook S. R., C. Cheong, I. Tinoco and S. H. Kim (1991). Crystal structure of an RNA double-helix incorporating a track of non-Watson-Crick base pairs. *Nature*, **353**:579-581.

Holbrook S. R., E. L. Holbrook and H. E. Walukiewicz (2001). Crystallization of RNA. *Cell Mol Life Sci*, **58**:234-243.

Holbrook S. R. and S. H. Kim (1997). RNA crystallography. *Biopolymers*, 44:3-21.

Hutchin T. and G. Cortopassi (1994). Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*, **38**:2517-2520.

Hutchin T., I. Haworth, K. Higashi, N. Fischel-Ghodsian, M. Stoneking, N. Saha, C. Arnos and G. Cortopassi (1993). A molecular basis for human hypersensivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res*, **21**:4174-4179.

Hyun Ryu D., A. Litovchick and R. R. Rando (2002). Stereospecificity of aminoglycoside-ribosomal interactions. *Biochemistry*, **41**:10499-10509.

**Hyun Ryu D. and R. R. Rando** (2001). Aminoglycoside binding to human and bacterial A-site rRNA decoding region constructs. *Bioorg Med Chem*, **9**:2601-2608.

Hyun Ryu D. and R. R. Rando (2002). Decoding region bubble size and aminoglycoside antibiotic binding. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**:2241-2244.

Ida T., R. Okamoto, M. Nonoyama, K. Irinoda, M. Kurazono and M. Inoue (2002). Antagonism between aminoglycosides and  $\beta$ -Lactams in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate involves induction of an aminoglycoside-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**:1516-1521.

Jezowska-Bojczuk M., A. Karaczyn and H. Kozlowski (1998). Copper(II) binding to tobramycin: potentiometric and spectroscopic studies. *Carbohyd Res*, **313**:265-269.

Jiang F., R. Ajay Kumar, R. A. Jones and D. J. Patel (1996). Structural basis of RNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex. *Nature*, **382**:183-186.

Jiang L., A. K. Suri, R. Fiala and D. J. Patel (1997). Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex. *Chem Biol*, **4**:35-50.

Jiang L. C., A. Majumdar, W. D. Hu, T. J. Jaishree, W. K. Xu and D. J. Patel (1999). Saccharide-RNA recognition in a complex formed between neomycin B and an RNA aptamer. *Structure Fold Des*, **7**:817-827.

Jiang L. C. and D. J. Patel (1998). Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex. *Nature Struct Biol*, **5**:769-774.

Jossinet F. and E. Westhof (2001). How to fold RNA. Angew Chem Int Ed, 39:1139-1139.

Joynson J. A., B. Forbes and R. J. W. Lambert (2002). Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. *J Appl Microbiol*, **93**:96-107.

**Kaul M. and D. S. Pilch** (2002). Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition: the binding of neomycin-class aminoglycosides to the A site of 16S rRNA. *Biochemistry*, **41:**7695-7706.

Kawaguchi H., T. Naito, S. Nakagawa and K. I. Fujisawa (1972). BB-K8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot*, **25**:695-708.

**Kawahara S., T. Wada and M. Sekine** (1995). A new method for removal of the 2'-TBDMS group under acidic conditions in chemical synthesis of RNA. *Nucleic Acids Symp Series*, **34**:29-30.

Kondo S. and K. Hotta (1999). Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: development and enzymatic modifications. *J Infect Chemother*, **5**:1-9.

Kondo S., K. Iinuma, H. Yamamoto, K. Maeda and H. Umezawa (1973). Syntheses of 1-n-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl)-kanamycin B and -3', 4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J Antibiot*, **26**:412-415.

Kopka M. L., C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura and R. E. Dickerson (1985a). Binding of an antitumor drug to DNA, Netropsin and CGCGAATT<sup>Br</sup>CGCG. *J Mol Biol*, **183:**553-563.

Kopka M. L., C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura and R. E. Dickerson (1985b). The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**:1376-1380.

Kotra L. P., J. Haddad and S. Mobashery (2000). Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob* 

Agents Chemother, 44:3249-3256.

**Kurtz D. I.** (1974). Fidelity of protein synthesis with chicken embryo mitochondrial and cytoplasmic ribosomes. *Biochemistry*, **13**:572-577.

Ladbury J. E. (1996). Just add water! The effect of water on the specificity of proteinligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem Biol*, **3**:973-980.

Larsen T. A., D. S. Goodsell, D. Cascio, K. Grzeskowiak and R. E. Dickerson (1989). The structure of DAPI bound to DNA. *J Biomol Struct Dyn*, **7**:477-491.

Lato S. M., A. R. Boles and A. D. Ellington (1995). *In vitro* selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution. *Chem Biol*, 2:291-303.

Lecchi P., H. M. T. Le and L. K. Pannell (1995). 6-Aza-2-thiothymine: a matrix for MALDI spectra oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 23:1276-1277.

Lemieux R. U. (1996). How water provides the impetus for molecular recognition in aqueous solution. *Acc Chem Res*, **29**:373-380.

Letavic M. A., B. S. Bronk, C. D. Bertsche, J. M. Casavant, H. Cheng, K. L. Daniel, D. M. George, S. F. Hayashi, B. J. Kamicker, N. L. Kolosko, L. J. L. Norcia, V. D. Oberton, M. A. Rushing and S. L. Santoro (2002). Synthesis and activity of a novel class of tribasic macrocyclic antibiotics: the triamilides. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**:2771-2774.

Lin C. H. and D. J. Patel (1997). Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamer complexed to AMP. *Chem Biol*, **4**:817-832.

Lipsitch M., R. S. Singer and B. R. Levin (2002). Antibiotics in agriculture: when is it time to close the barn door? *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:5752-5754.

Livingston P. O., S. Zhang and K. O. Lloyd (1997). Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. 1. Rationale. *Cancer Immunol Immunother*, **45**:1-9.

Loris R. (2002). Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta*, 1572:198-208.

Lynch S. R. and J. D. Puglisi (2001a). Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J Mol Biol*, **306**:1037-1058.

Lynch S. R. and J. D. Puglisi (2001b). Structure of a eukaryotic decoding region A-site RNA. *J Mol Biol*, **306**:1023-1035.

**Magnet S., P. Courvalin and T. Lambert** (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**:3375-3380.

Marcaurelle L. A. and P. H. Seeberger (2002). Combinatorial carbohydrate chemistry.

Curr Opin Chem Biol, 6:289-296.

Marky L. A. and K. J. Breslauer (1987). Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers*, **26**:1601-1620.

**Masquida B., C. Sauter and E. Westhof** (1999). A sulfate pocket formed by three G•U pairs in the 0.97 Å resolution X-ray structure of a nonameric RNA. *RNA*, **5**:1384-1395.

**Masquida B. and E. Westhof.** (1999). Crystallographic structures of RNA oligoribonucleotides and ribozymes, p. 533-565. *Dans Oxford Handbook of Nucleic Acid structure*. S. Neidle (ed.). Oxford University Press, Oxford.

**Massire C.** (1998). Développement de logiciels d'aide à la modélisation d'ARN. Application à la composante ribonucléique de la ribonucléase P bactérienne. *Thèse*. Université Louis Pasteur, Strasbourg.

McPike M. P., J. M. Sullivan, J. Goodisman and J. C. Dabrowiak (2002). Footprinting, circular dichroism and UV melting studies on neomycin B binding to the packaging region of human immunodeficiency virus type-1 RNA. *Nucleic Acids Res*, **30**:2825-2831.

Mei H.-Y., M. Cui, A. Heldsinger, S. M. Lemrow, J. A. Loo, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen and A. W. Czarnik (1998). Inhibitors of protein-RNA complexation that target the RNA: specific recognition of human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA by small organic molecules. *Biochemistry*, **37**:14204-14212.

Mei H.-Y., A. A. Galan, N. S. Halim, D. P. Mack, D. W. Moreland, K. B. Sanders, H. N. Truong and A. W. Czarnik (1995). Inhibition of an HIV-1 Tat-derived peptide binding to TAR RNA by aminoglycoside antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett*, **5**:2755-2760.

Mergny J. L. and L. Lacroix (2002). Des Tms, encore des Tms, toujours des Tms ! *Regard sur la Biochimie*, 2:36-52.

Michael K. and Y. Tor (1998). Designing novel RNA binders. Chem Eur J, 4:2091-2098.

Michel F. and E. Westhof (1990). Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol*, **216**:585-610.

Mikkelsen N. E., M. Brännvall, A. Virtanen and L. A. Kirsebom (1999). Inhibition of RNase P cleavage by aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:6155-6160.

Mikkelsen N. E., K. Johansson, A. Virtanen and L. A. Kirsebom (2001). Aminoglycoside binding displaces a divalent metal ion in a tRNA-neomycin B complex. *Nat Struct Biol*, 8:510-514.

Miller D. C., J. S. Olson, J. W. Pflugrath and F. A. Quiocho (1983). Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J Biol Chem*, **258**:13665-13672.

Mingeot-Leclercq M. P., Y. Glupczynski and P. M. Tulkens (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**:727-737.

Mingeot-Leclercq M. P. and P. M. Tulkens (1999). Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**:1003-1012.

Mingeot-Leclercq M. P., A. Van Schepdael, R. Brasseur, R. Busson, H. J. Vanderhaeghe, P. J. Claes and P. M. Tulkens (1991). New derivatives of kanamycin B obtained by modifications and substitutions in position 6". 2. *In vitro* and computer-aided toxicological evaluation with respect to interactions with phosphatidylinositol. *J Med Chem*, **34**:1476-1482.

Miyaguchi H., H. Narita, K. Sakamoto and S. Yokoyama (1996). An antibiotic-binding motif of an RNA fragment derived from the A-site related region of *Escherichia coli* 16S RNA. *Nucleic Acids Res*, **24:**3700-3706.

**Moazed D. and H. F. Noller** (1990). Binding of tRNA to the ribosomal A and P sites protects two distinct sets of nucleotides in 16S rRNA. *J Mol Biol*, **211**:135-145.

**Moazed D. and H. F. Noller** (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*, **327**:389-394.

Mobashery S. and E. F. Azucena Jr. (1999). Bacterial antibiotic resistance. *Encyclopedia of Life Sciences*, www.els.net.

**Molinaro M. and I. Tinoco, Jr.** (1995). Use of ultra stable UNCG tetraloop hairpins to fold RNA structures: thermodynamic and spectroscopic applications. *Nucleic Acids Res*, **23:**3056-3063.

Moore P. B. (1999). Structural motifs in RNA. Annu Rev Biochem, 67:287-300.

Moore P. B. and T. A. Steitz (2002). The involvement of RNA in ribosome function. *Nature*, **418**:229-235.

Moore R. A., D. DeShazer, S. Reckseidler, A. Weissman and D. E. Woods (1999). Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**:465-470.

Murray J. B., A. K. Collier and J. R. P. Arnold (1994). A general procedure for chemically synthesized oligoribonucleotides. *Anal Biochem*, **218**:177-184.

Naismith J. H. and R. A. Field (1996). Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. *J Biol Chem*, **271**:972-976.

Neidle S. and H. M. Berman (1983). X-ray crystallographic studies of nucleic acids and nucleic acid-drug complexes. *Prog Biophys Mol Biol*, **41**:43-66.

**Neidle S., L. H. Pearl and J. V. Skelly** (1987). DNA structure and perturbation by drug binding. *Biochem J*, **243**:1-13.

Neu H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. Science, 257:1064-1073.

Nissen P., J. A. Ippolito, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98:**4899-4903.

**Noah J. W. and P. Wollenzien** (1998). Dependence of the 16S rRNA decoding region structure on Mg<sup>2+</sup>, subunit association, and temperature. *Biochemistry*, **37:**15442-15448.

Noller H. F. (1991). Ribosomal RNA and translation. Annu Rev Biochem, 60:191-227.

Ogle J. M., D. E. Brodersen, W. M. Clemons Jr, M. J. Tarry, A. P. Carter and V. Ramakrishnan (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, **292**:897-902.

**Otwinowski Z. and W. Minor.** (1996). Processing of X-Ray diffraction data collected in oscillation mode. *Dans Methods in Enzymology*. C. W. J. Carter and R. M. Sweet (ed.), vol. 276. Academic Press.

**Oubridge C., A. Kuglstatter, L. Jovine and K. Nagai** (2002). Crystal structure of SRP19 in complex with the S domain of SRP RNA and its implication for the assembly of the signal recognition particle. *Mol Cell*, **9**:1251-1261.

**Owston M. A. and E. H. Serpersu** (2002). Cloning, overexpression, and purification of aminoglycoside antibiotic 3-acetyltransferase-IIIb: conformational studies with bound substrates. *Biochemistry*, **41**:10764-10770.

Pace N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276:**734-740.

**Pape T., W. Wintermeyer and M. V. Rodnina** (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol*, **7**:104-107.

**Pedersen L. C., M. M. Benning and H. M. Holden** (1995). Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase. *Biochemistry*, **34:**13305-13311.

**Pelt J. M.** (2001). Quel avenir pour les antibiotiques ?, p. 35-57. *Dans Les remèdes naturels*. Librairie A. Fayard, Paris.

Perz J. F., A. S. Craig, C. S. Coffey, D. M. Jorgensen, E. Mitchel, S. Hall, W. Schaffner and M. R. Griffin (2002). Changes in antibiotic prescribing for children after a community-wide campaign. *JAMA*, **287**:3103-3109.

Pjura P. E., K. Grzeskowiak and R. E. Dickerson (1987). Binding of Hoechst 33258 to the minor groove of B-DNA. *J Mol Biol*, **197:**257-271.

**Prammananan T., P. Sander, B. A. Brown, K. Frischkorn, G. O. Onyi, Y. Zhang, E. C. Böttger and R. J. Wallace, Jr.** (1998). A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae. J Infect Dis*, **177**:1573-1581.

Prater B. D., S. C. Tuller and L. J. Wilson (1999). Simplex optimization of protein crystallization conditions. *J Cryst Growth*, **196:**674-684.

Price K. E. (1986). Aminoglycoside research 1975-1985: prospects for development of improved agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **29:**543-548.

**Price K. E. and J. C. Godfrey** (1974). Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. *Adv Appl Microbiol*, **18**:191-307.

**Price S. R., P. R. Evens and K. Nagai** (1998). Crystal structure of the spliceosomal U2B"-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature*, **394:**645-650.

**Priuska E. M., K. Clark-Baldwin, V. L. Pecoraro and J. Schacht** (1998). NMR studies of iron-gentamicin complexes and the implications for aminoglycoside toxicity. *Inorganica Chimica Acta*, **273:**85-91.

**Puglisi J. D. and I. Tinoco Jr.** (1989). Absorbance melting curves of RNA, p. 304-325. *Dans Methods in enzymology*, vol. 180. Academic Press, London.

**Purohit P. and S. Stern** (1994). Interactions of a small RNA with antibiotics and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature*, **370**:659-662.

Quintana J. R., A. A. Lipanov and R. E. Dickerson (1991). Low-temperature crystallographic analyses of the binding of Hoechst 33258 to the double-helical DNA dodecamer CGCGAATTCGCG. *Biochemistry*, **30**:10294-10306.

Quiocho F. A. and N. K. Vyas (1984). Novel stereospecificity of the L-arabinose-binding protein. *Nature*, **310**:381-386.

Quiocho F. A., D. K. Wilson and N. K. Vyas (1989). Substrate specificity and affinity of a protein modulated by bound water molecules. *Nature*, **340**:404-407.

Ramakrishnan V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108:557-572.

Ramakrishnan V. and P. B. Moore (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol*, **11**:144-154.

Rather P. N. (1998). Origins of the aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Discov Today*, 1:285-291.

**Recht M. I., S. Douthwaite and J. D. Puglisi** (1999). Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*, **18**:3133-3138.

**Recht M. I., D. Fourmy, S. C. Blanchard, K. D. Dahlquist and J. D. Puglisi** (1996). RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J Mol Biol*, **262**:421-436.

**Recht M. I. and J. D. Puglisi** (2001). Aminoglycoside resistance with homogeneous and heterogeneous populations of antibiotic-resistant ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**:2414-2419.

**Rinehart K. L., Jr.** (1969). Comparative chemistry of the aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics. *J Infect Dis*, **119:**345-350.

**Ritter T. K. and C. H. Wong** (2001). Carbohydrate-based antibiotics: a new approach to tackling the problem of resistance. *Angew Chem Int Ed*, **40**:3508-3533.

**Robyt J. F.** (1998). Essentials of carbohydrate chemistry,  $1^{st}$  ed. Springer-Verlag, New York.

Rodnina M. V., T. Daviter, K. Gromadski and W. Wintermeyer (2002). Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie*, **84**:745-754.

Rodnina M. V. and W. Wintermeyer (2001). Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends Biochem Sci*, **26**:124-130.

**Rogers J., A. H. Chang, U. von Ahsen, R. Schroeder and J. Davies** (1996). Inhibition of the self-cleavage reaction of the human hepatitis delta virus ribozyme by antibiotics. *J Mol Biol*, **259**:916-925.

**Rubin J. and M. Sundaralingam** (1984). An unexpected major groove binding of netropsin and distamycin A to tRNA<sup>phe</sup>. *J Biomol Struct Dyn*, **2**:165-174.

Sakon J., H. H. Liao, A. M. Kanikula, M. M. Benning, I. Rayment and H. M. Holden (1993). Molecular structure of kanamycin nucleotidyltransferase determined to 3.0 Å resolution. *Biochemistry*, **32**:11977-11984.

**Sambrook J. and D. W. Russell** (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Sander P., T. Prammanana and E. C. Böttger** (1996). Introducing mutations into a chromosomal rRNA gene using a genetically modified eubacterial host with a single rRNA operon. *Mol Microbiol*, **22**:841-848.

Sannes-Lowery K. A., R. H. Griffey and S. A. Hofstadler (2000). Measuring dissociation constants of RNA and aminoglycoside antibiotics by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, **280**:264-271.

Saul F. A., P. Rovira, G. Boulot, E. J. Damme, W. J. Peumans, P. Truffa-Bachi and G. A. Bentley (2000). Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II. *Structure*, **8**:593-603.

Scaringe S. A., F. E. Wincott and M. H. Caruthers (1998). Novel RNA synthesis method using 5'-O-silyl-2'-O-orthoester protecting groups. *J Am Chem Soc*, **120**:11820-11821.

Schroeder R., C. Waldsich and H. Wank (2000). Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*, **19:**1-9.

Schuch R., D. Nelson and V. A. Fischetti (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, **418**:884-889.

Sciotti R. J., M. Pliushchev, P. E. Wiedeman, D. Balli, R. Flamm, A. M. Nilius, K. Marsh, D. Stolarik, R. Jolly, R. Ulrich and S. W. Djuric (2002). The synthesis and biological evaluation of a novel series of antimicrobials of the oxazolidinone class. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**:2121-2123.

Sears P. and C. H. Wong (1996). Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:12086-12093.

Sears P. and C. H. Wong (1998). Mechanism-based inhibition of carbohydrate-mediated biological recognitions. *Chem Commun*, 1161-1169.

Sharff A. J., L. E. Rodseth and F. A. Quiocho (1993). Refined 1.8 Å structure reveals the mode of binding of beta-cyclodextrin to the maltodextrin binding protein. *Biochemistry*, **32**:10553-10559.

Shaw K. J., P. N. Rather, R. S. Hare and G. H. Miller (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*, **57**:138-163.

Shieh H.-S., H. M. Berman, S. Neidle, G. Taylor and M. Sanderson (1982). The structure of a hydrated 1:2 complex of adenylyl(3'-5')adenosine-proflavine hemisulphate. *Acta Cryst*, **B38**:523-531.

Sievert D. M., M. L. Boulton, G. Stoltman, D. Johnson, M. G. Stobierski, F. P. Downes, P. A. Somsel, J. T. Rudrik, W. Brown, W. Hafeez, T. Lundstrom, E. Flanagan, R. Johnson, J. Mitchell and S. Chang (2002). *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin - United States, 2002. *MMWR*, 51:565-567.

Slee A. M., M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory and M. Forbes (1987). Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: *in vitro* and *in vivo* activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agents Chemother*, **31**:1791-1797.

Smith D. L., A. D. Harris, J. A. Johnson, E. K. Silbergeld and J. G. Morris, Jr. (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:6434-6439.

**Soukup J. K., N. Minakawa, A. Matsuda and S. A. Strobel** (2002). Identification of Aminor tertiary interactions within a bacterial group I intron active site by 3-deazaadenosine interference mapping. *Biochemistry*, **41**:10426-10438.

Spickler C., M.-N. Brunelle and L. Brakier-Gingras (1997). Streptomycin binds to the decoding center of 16S ribosomal RNA. *J Mol Biol*, 273:586-599.

Stage T. K., K. J. Hertel and O. C. Uhlenbeck (1995). Inhibition of the hammerhead ribozyme by neomycin. *RNA*, 1:95-101.

**Stahl G., G. P. McCarty and P. J. Farabaugh** (2002). Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends Biochem Sci*, **27**:178-183.

Sucheck S. J. and Y. K. Shue (2001). Combinatorial synthesis of aminoglycoside libraries. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **4**:462-470.

Sucheck S. J., A. L. Wong, K. M. Koeller, D. D. Boehr, K. Draker, P. S. Sears, G. D. Wright and C. H. Wong (2000). Design of bifunctional antibiotics that target bacterial rRNA and inhibit resistance-causing enzymes. *J Am Chem Soc*, **122**:5230 - 5231.

Sullivan J. M., J. Goodisman and J. C. Dabrowiak (2002). Absorption studies on aminoglycoside binding to the packaging region of human immunodeficiency virus type-1. *Bioorg Med Chem Lett*, **12:**615-618.

Swaminathan P., E. Westhof and M. Sundaralingam (1982). Structure of a 1:2 sandwich complex of proflavine and adenosine with an unusual puckering disorder and a site shared by sulfate and water molecules. *Acta Cryst*, **B38**:515-522.

Swaminathan S. and S. Eswaramoorthy (2000). Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol*, **7**:693-699.

Swaney S. M., H. Aoki, M. C. Ganoza and D. L. Shinabarger (1998). The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**:3251-3255.

Szábó L., S. Jamal, H. Xie, S. J. Charnock, D. N. Bolam, H. J. Gilbert and G. J. Davies (2001). Structure of a family 15 carbohydrate-binding module in complex with xylopentaose. Evidence that xylan binds in an approximate 3-fold helical conformation. *J Biol Chem*, **276**:49061-49065.

**Takumida M. and M. Anniko** (2001). Nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells following gentamicin exposure *in vitro*. *Acta Otolaryngol*, **121**:346-350.

Tan Y. T., D. J. Tillett and I. A. McKay (2000). Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol Med Today*, **6**:309-314.

Taniguchi H., B. Chang, C. Abe, Y. Nikaido, Y. Mizuguchi and S. I. Yoshida (1997). Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J Bacteriol*, **179:**4795-4801.

**Tok J. B.-H., J. H. Cho and R. R. Rando** (1999). Aminoglycoside antibiotics are able to specifically bind the 5 '-untranslated region of thymidylate synthase messenger RNA. *Biochemistry*, **38**:199-206.

Tuerk C., P. Gauss, C. Thermes, D. R. Groebe, M. Gayle, N. Guild, G. Stormo, Y. d'Aubenton-Carafa, O. C. Uhlenbeck, I. Tinoco, Jr. and et al. (1988). CUUCGG

hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**:1364-1368.

Tung C. S., J. Simpson and K. Y. Sanbonmatsu (2002). All-atom homology model of the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit. *Nat Struct Biol*, **9**:750-755.

**Uphoff K. W., S. D. Bell and A. D. Ellington** (1996). *In vitro* selection of aptamers: the dearth of pure reason. *Curr Op Struct Biol*, **6**:281-288.

Varani L., M. G. Spillantini, M. Goedert and G. Varani (2000). Structural basis for recognition of the RNA major groove in the tau exon 10 splicing regulatory element by aminoglycoqide antibiotics. *Nucleic Acids Res*, **28**:710-719.

**Vetting M. W., S. S. Hegde, F. Javid-Majd, J. S. Blanchard and S. L. Roderick** (2002). Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with coenzyme A and aminoglycoside substrates. *Nat Struct Biol*, **9**:653-658.

Villeneuve S., H. Souchon, M. M. Riottot, J. C. Mazié, P. Lei, C. P. Glaudemans, P. Kovác, J. M. Fournier and P. M. Alzari (2000). Crystal structure of an anti-carbohydrate antibody directed against *Vibrio cholerae* O1 in complex with antigen: molecular basis for serotype specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**:8433-8438.

Voet D. and J. G. Voet (1998). Biochimie, 2<sup>e</sup> ed. De Boek Université.

**Vyas N. K., M. N. Vyas and F. A. Quiocho** (1988). Sugar and signal-transducer binding sites of the *Escherichia coli* galactose chemoreceptor protein. *Science*, **242**:1290-1295.

**Wagman G. H., R. T. Testa, J. A. Marquez and M. J. Weinstein** (1974). Antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: fermentation, isolation, and preliminary characterization. *Antimicrob Agents Chemother*, **6**:144-149.

Waitz J. A., F. Sabatelli, F. Menzel and E. L. Moss Jr. (1974). Biological activity of antibiotic G-418, a new Micromonospora-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths. *Antimicrob Agents Chemother*, **6**:579-581.

**Waldsich C., K. Semrad and R. Schroeder** (1998). Neomycin B inhibits splicing of the *td* intron indirectly by interfering with translation and enhances missplicing *in vivo*. *RNA*, **4**:1653-1663.

Wallis M. G., U. von Ahsen, R. Schroeder and M. Famulok (1995). A novel RNA motif for neomycin recognition. *Chem Biol*, **2**:543-552.

Walsh C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, **406:**775-781.

Wang A. H., G. Ughetto, G. J. Quigley, T. Hakoshima, G. A. van der Marel, J. H. van Boom and A. Rich (1984). The molecular structure of a DNA-triostin A complex. *Science*, **225**:1115-1121.

Wang A. H., G. Ughetto, G. J. Quigley and A. Rich (1987). Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2 Å resolution. *Biochemistry*, **26**:1152-1163.

Wang A. H., G. Ughetto, G. J. Quigley and A. Rich (1986). Interactions of quinoxaline antibiotic and DNA: the molecular structure of a triostin A-d(GCGTACGC) complex. *J Biomol Struct Dyn*, **4**:319-342.

Wang S., P. W. Huber, M. Cui, A. W. Czarnik and H.-Y. Mei (1998). Binding of neomycin to the TAR element of HIV-1 RNA induces dissociation of Tat protein by an allosteric mechanism. *Biochemistry*, **37**:5549-5557.

**Wang Y., K. Hamasaki and R. R. Rando** (1997). Specificity of aminoglycoside binding to RNA constructs derived from the 16S rRNA decoding region and the HIV-RRE activator region. *Biochemistry*, **36:**768-779.

Wang Y., J. Killian, K. Hamasaki and R. R. Rando (1996). RNA molecules that specifically and stoichiometrically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities. *Biochemistry*, **35**:12338-12346.

**Wang Y. and R. R. Rando** (1995). Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA. *Chem Biol*, **2**:281-290.

Westhof E. (1999). Chemical diversity in RNA cleavage. Science, 286:61-62.

**Westman E. and R. Strömberg** (1994). Removal of *t*-butyldimethylsilyl protection in RNA-synthesis. Triethylamine trihydrofluoride (TEA, 3HF) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride (TBAF). *Nucleic Acids Res*, **22**:2430-2431.

Wijkmans J. C. and R. P. Beckett (2002). Combinatorial chemistry in anti-infectives research. *Drug Discov Today*, **7:**126-132.

Williams S. J. and G. J. Davies (2001). Protein-carbohydrate interactions: learning lessons from nature. *Trends Biotechnol*, **19:**356-362.

Wimberly B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch and V. Ramakrishnan (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, **407**:327-339.

Woese C. R., S. Winker and R. R. Gutell (1990). Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**:8467-8471.

Wong C.-H., M. Hendrix, E. S. Priestley and W. A. Greenberg (1998). Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chem Biol*, **5**:397-406.

Woodcock J., D. Moazed, M. Cannon, J. Davies and H. F. Noller (1991). Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *EMBO J*, **10**:3099-3103.

Wright G. D., A. M. Berghuis and S. Mobashery. (1998). Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance, p. 27-69. *Dans Resolving the antibiotic paradox: progress in understanding drug resistance and development of new antibiotics*. B. P. Rosen and S. Mobashery (ed.). Plenum Press, New York.

Wu W. J., S. H. Sha and J. Schacht (2002). Recent advances in understanding aminoglycoside ototoxicity and its prevention. *Audiol Neurootol*, **7**:171-174.

Yang Y., M. Kochoyan, P. Burgstaller, E. Westhof and M. Famulok (1996). Structural basis of ligand discrimination by two related RNA aptamers resolved by NMR spectroscopy. *Science*, **272**:1343-1347.

Yoshida M., T. Shintani, M. Hirao, T. Himi, A. Yamaguchi and K. Kikuchi (2001). Aminoglycoside-induced hearing loss in a patient with the 961 mutation in mitochondrial DNA. *ORL*, **64**:219-222.

**Yoshizawa S., D. Fourmy and J. D. Puglisi** (1999). Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science*, **285**:1722-1725.

**Yoshizawa S., D. Fourmy and J. D. Puglisi** (1998). Structural origins of gentamicin antobiotic action. *EMBO J*, **17**:6437-6448.

**Zapp M. L., S. Stern and M. R. Green** (1993). Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production. *Cell*, **74**:969-978.

Zhang L. and J. A. Doudna (2002). Structural insights into group II intron catalysis and branch-site selection. *Science*, **295**:2084-2088.

**Zhu C. B., A. Sunada, J. Ishikawa, Y. Ikeda, S. Kondo and K. Hotta** (1999). Role of aminoglycoside 6'-acetyltransferase in a novel multiple aminoglycoside resistance of an actinomycete strain #8: inactivation of aminoglycosides with 6'-amino group except arbekacin and neomycin. *J Antibiot*, **52**:889-894.

Zimmermann G. R., R. D. Jenison, C. L. Wick, J.-P. Simorre and A. Pardi (1997). Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA. *Nature Struct Biol*, **4**:644-649.

Zuker M. (2000). Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr Opin Struct Biol*, 10:303-310.

## Erratum

La référence correspondant à la citation "(Aggarwal *et al.* 1984)" insérée dans le tableau 2.7 à la page 84 a été omise par erreur de la bibliographie lors de l'impression. Elle est indiquée ci-dessous :

Aggarwal, A., S. A. Islam, R. Kuroda and S. Neidle (1984). X-ray crystallographic analysis of a ternary intercalation complex between proflavine and the dinucleoside monophosphates CpA and UpG. *Biopolymers*, 23:1025-1041.