

## Doctorat

Discipline : Sciences du Vivant

**Boris FRANCOIS**

# **Cristallographie de complexes entre site de décodage ribosomique et antibiotiques de la famille des aminoglycosides**

Soutenu le vendredi 14 octobre 2005

Jury :

Dr Jean-Pierre GUILLOTEAU

Dr Alberto D. PODJARNY

Pr Gabriele VARANI

Pr Eric WESTHOF

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Directeur de thèse



## **Remerciements**

Cette thèse représente non seulement trois ans de travail mais également la finalisation de mon parcours universitaire. C'est une étape importante à mes yeux et je tiens à remercier tous ceux qui m'ont soutenu, encouragé et conseillé durant toutes ces années.

Je suis reconnaissant au professeur Eric Westhof pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'intégrant à son équipe pour mon DEA puis ma thèse, et pour son exigence dans toute chose.

Un grand merci aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'examiner mon travail.

Les échanges que j'ai eu avec Pascal Auffinger, hormis ceux sur les intérêts combinés du yoga et du thé chinois, m'ont beaucoup apporté sur le plan humain et scientifique, qu'il soit ici remercié à sa juste valeur.

J'ai trouvé au sein de l'UPR 9002 et de l'IGBMC, un grand nombre de personnes disponibles et ouvertes, merci pour leurs conseils avisés (notamment en cristallographie) et leur aide souvent précieuse.

Merci à Aurélie, Michel, Simon, Aurélie, et tous ceux qui ont participé à nos déjeuners et nos joyeux débats : l'Almanach Vermot, le concombre de mer, les intégrales des Nuls, des Inconnus, Claude François et la Compagnie Créole.



Peu importe si ce que vous devez faire semble insignifiant.

Faites-le aussi bien que possible.

Mettez-y autant de soin et accordez-y autant  
d'attention qu'à ce qui vous paraît le plus important.

Car on vous jugera sur ces petites choses.

GANDHI



<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>13</b>
I IMPORTANCE DE LA RECHERCHE SUR LES ANTIBIOTIQUES .....	13
A. <i>Un peu d'histoire</i> .....	13
B. <i>Classification et modes d'action</i> .....	15
II LES AMINOGLYCOSIDES : GENERALITES .....	17
A. <i>Classification des aminoglycosides</i> .....	17
B. <i>Caractéristiques</i> .....	20
III PUBLICATION 1 : LE SITE A COMME CIBLE CELLULAIRE.....	23
IV RESISTANCES DES BACTERIES AUX AMINOGLYCOSIDES.....	41
A. <i>Intérêt des spectres d'activité antimicrobienne des antibiotiques</i> .....	41
B. <i>Mécanismes de résistances</i> .....	45
V PRESENTATION DES RESULTATS DE CE TRAVAIL DE THESE.....	49
<b>CHAPITRE 2 CRISTALLISATION DE COMPLEXES AMINOGLYCOSIDES / SITE A ..</b>	<b>53</b>
I PUBLICATION 2 : METHODOLOGIE .....	53
II PREPARATION D'OLIGORIBONUCLEOTIDES CONTENANT LE SITE A .....	71
III MISE EN ŒUVRE DES ESSAIS DE CRISTALLISATION.....	79
A. <i>Préparation des complexes aminoglycosides / sites A</i> .....	79
B. <i>« Criblage » des conditions de cristallisation</i> .....	80
C. <i>Optimisation des conditions de cristallisation</i> .....	85
D. <i>Cristallisation du site A bactérien</i> .....	85
E. <i>Cristallisation des sites A eucaryotes</i> .....	90
F. <i>Cristallisation du site A bactérien muté A1408G</i> .....	93
<b>CHAPITRE 3 STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DE COMPLEXES ENTRE</b>	
<b>  AMINOGLYCOSIDES NATURELS ET SITE A .....</b>	<b>99</b>
I PUBLICATION 3 : EFFETS DU NOMBRE DE CHARGES ET DE CYCLES .....	99
II PUBLICATION 4 : FIXATION D'AMINOGLYCOSIDES A DES RIBOSOMES MUTES	
COMPORTANT DES ALTERATIONS DU SITE A .....	131
<b>CHAPITRE 4 STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DE COMPLEXES ENTRE</b>	
<b>  AMINOGLYCOSIDES MODIFIEES ET SITE A .....</b>	<b>155</b>
I LES AMINOGLYCOSIDES MODIFIEES.....	155
A. <i>Identification d'analogues</i> .....	157
B. <i>Réactions de couplages sur aminoglycosides</i> .....	158
C. <i>Dimérisation d'aminoglycosides</i> .....	160
D. <i>Remplacement d'un sucre naturel</i> .....	163
E. <i>Cyclisation d'aminoglycosides naturels</i> .....	164
F. <i>Incorporation-substitution de groupements chimiques</i> .....	164
II ESSAIS DE CRISTALLISATIONS .....	169
III PUBLICATION 5 : STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DES COMPLEXES SITE A / JS4-11 ET	
JS5-39 .....	177
IV POURSUITE DES ESSAIS DE CRISTALLISATION .....	194
V STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DE TROIS NOUVEAUX COMPLEXES PAROMOMYCINES	
MODIFIEES / SITE A .....	204
A. <i>Données structurales</i> .....	204
B. <i>Superposition des différents aminoglycosides modifiés</i> .....	211
C. <i>Interactions moléculaires des différents aminoglycosides modifiés avec le site A</i>	
<i>bactérien</i> .....	214
<b>CHAPITRE 5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>219</b>
<b>CHAPITRE 6 BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>231</b>



## Abréviations

A	adénosine
A <sub>260</sub>	absorbance mesurée à 260 nm
AAC	aminoglycoside acétyltransférases
AAD	aminoglycoside adénylyltransférases
ACE	bis-(acétoxyéthoxy)-méthyle éther
AcOH	acide acétique
ADN	acide désoxyribonucléique
ANT	aminoglycoside adénylyltransférases
APH	aminoglycoside phosphotransférases
APS	peroxodisulfate d'ammonium
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
C	cytosine
DOS	déoxystreptamine
EDTA	acide éthylène diamine N, N, N', N'-tétracétique
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
G	guanosine
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HTS	High Throuput Screening
MIC	Minimal Inhibition Concentration
MPD	2,4-méthylpentanediol
Nt	nucléotide
qsp	quantité suffisante pour
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	Root Mean Square Deviation
rpm	rotation par minute
RRE	Rev Responsive Element
RX	Rayons X

SLS	Swiss Light Source
TBE	Tris-Borate-EDTA
TEMED	N, N, N', N'- tétraméthyléthylènediamine
TSS	Toxic Shock Syndrome
U	uridine
UV	Ultra-Violet
V/V	Volume / Volume

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION GENERALE**



# Chapitre 1 Introduction générale

## I Importance de la recherche sur les antibiotiques

**Antibiotique** : « toute substance chimique produite par un micro-organisme capable d'inhiber le développement et de détruire d'autres micro-organismes en solution diluée ». (Selman Waksman 1941)

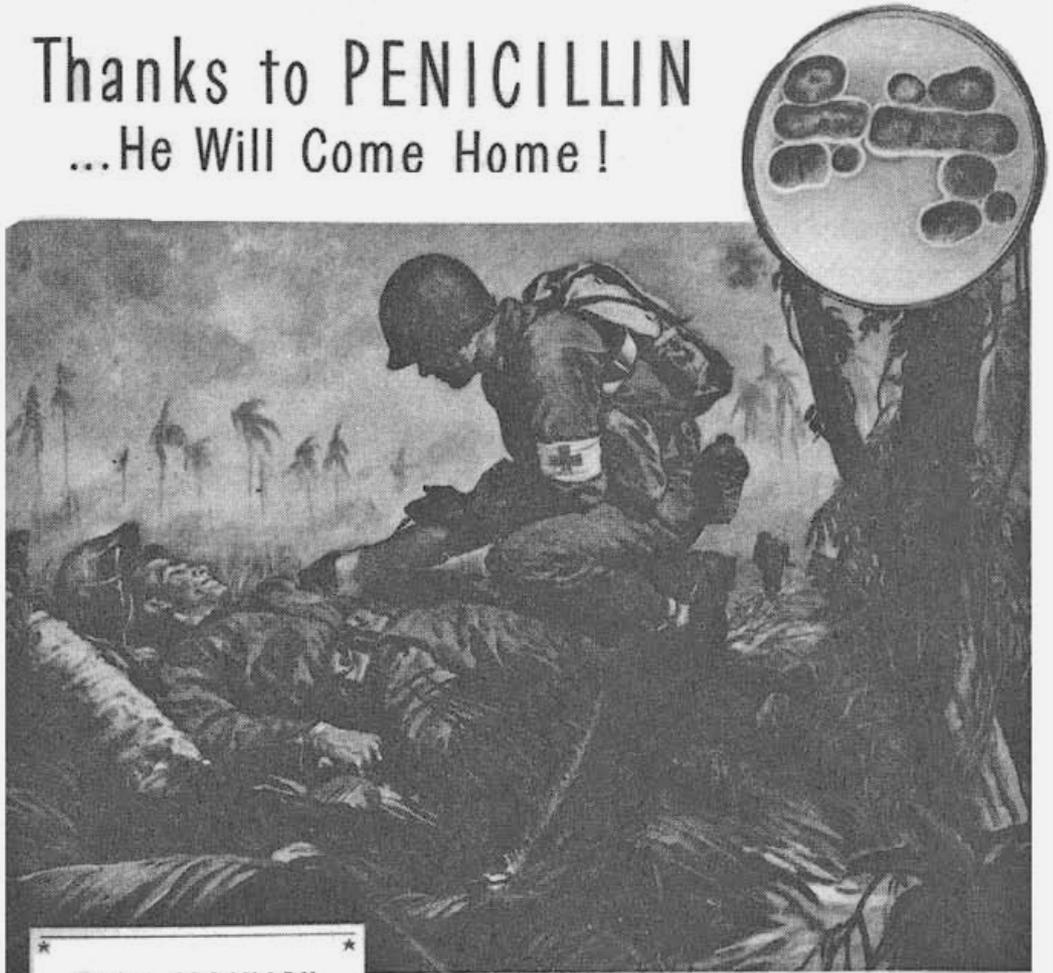
**380915** : Nombre de références Pubmed associées au terme de recherche « antibiotics » au 16 août 2005. Près de 23 % de ces références concernent la famille des aminoglycosides.

### A. Un peu d'histoire...

L'histoire des antibiotiques tels que nous les connaissons actuellement a débuté durant la seconde guerre mondiale avec la production industrielle aux Etats-Unis des premiers médicaments à base de pénicilline. Ces traitements ont permis de sauver plusieurs millions de personnes et la production de pénicilline a véritablement fait partie de l'effort de guerre (figure 1.1). Les laboratoires de recherche industriels et académiques ont alors engagé un processus à grande échelle pour découvrir de nouveaux principes actifs afin d'enrayer les autres infections bactériennes connues.

Au cours des décennies suivantes, les recherches entreprises ont permis de compléter l'arsenal antibactérien mis à la disposition des médecins et du grand public. La streptomycine fut isolée à partir de *Streptomyces griseus* (1943), le chloramphénicol à partir de *Streptomyces venezuelaela* (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, obtenus par ajout de divers substituants (voir l'exemple des aminoglycosides chapitre 4), et des antibiotiques entièrement synthétiques (par exemple l'azithromycine) ont été commercialisés. Cependant, les connaissances scientifiques n'ont permis la découverte que d'une seule nouvelle famille d'antibiotiques non-naturels, celle des oxazolidinones (Slee, Wuonola et al. 1987; Swaney, Aoki et al. 1998).

# Thanks to PENICILLIN ...He Will Come Home!



★ FROM ORDINARY MOLD—  
*the Greatest Healing Agent of this War!*

On the gaudy, green-and-yellow mold above, called *Penicillium notatum* in the laboratory, grows the miraculous substance first discovered by Professor Alexander Fleming in 1928. Named penicillin by its discoverer, it is the most potent weapon ever developed against many of the deadliest infections known to man. Because research on molds was already a part of Schenley enterprise, Schenley Laboratories were well able to meet the problem of large-scale production of penicillin, when the great need for it arose.

★

When the thunderous battles of this war have subsided to pages of silent print in a history book, the greatest news event of World War II may well be the discovery and development — *not* of some vicious secret weapon that *destroys* — but of a weapon that *saves* lives. That weapon, of course, is penicillin.

Every day, penicillin is performing some unbelievable act of healing on some far battlefield. Thousands of men will return home who otherwise would not have had a chance. Better still, more and more of this precious drug is now available for civilian use... to save the lives of patients of every age.

A year ago, production of penicillin was difficult, costly. Today, due to specially-devised methods of mass-production, in use by Schenley Laboratories, Inc. and the 20 other firms designated by the government to make penicillin, it is available in ever-increasing quantity, at progressively lower cost.

Listen to "THE DOCTOR FIGHTS" starring RAYMOND MASSEY. Tuesday evenings, 8 P.M. See your paper for time and station.

**SCHENLEY LABORATORIES, INC.**

Producers of PENICILLIN-Schenley



**Figure 1.1 :** « When the thunderous battles of this war have subsided to pages of silent print in a history book, the greatest news event of WW II may well be the discovery and development – *not* of some vicious secret weapon that *destroys* – but of a weapon that *saves* lives. That weapon, of course is penicillin ». Publicité pour la pénicilline des laboratoires Schenley parue le 14 août 1944 dans le magazine Life. Reproduit à partir de « the antibiotic paradox » de Stuart B. Levy (Levy 2002).

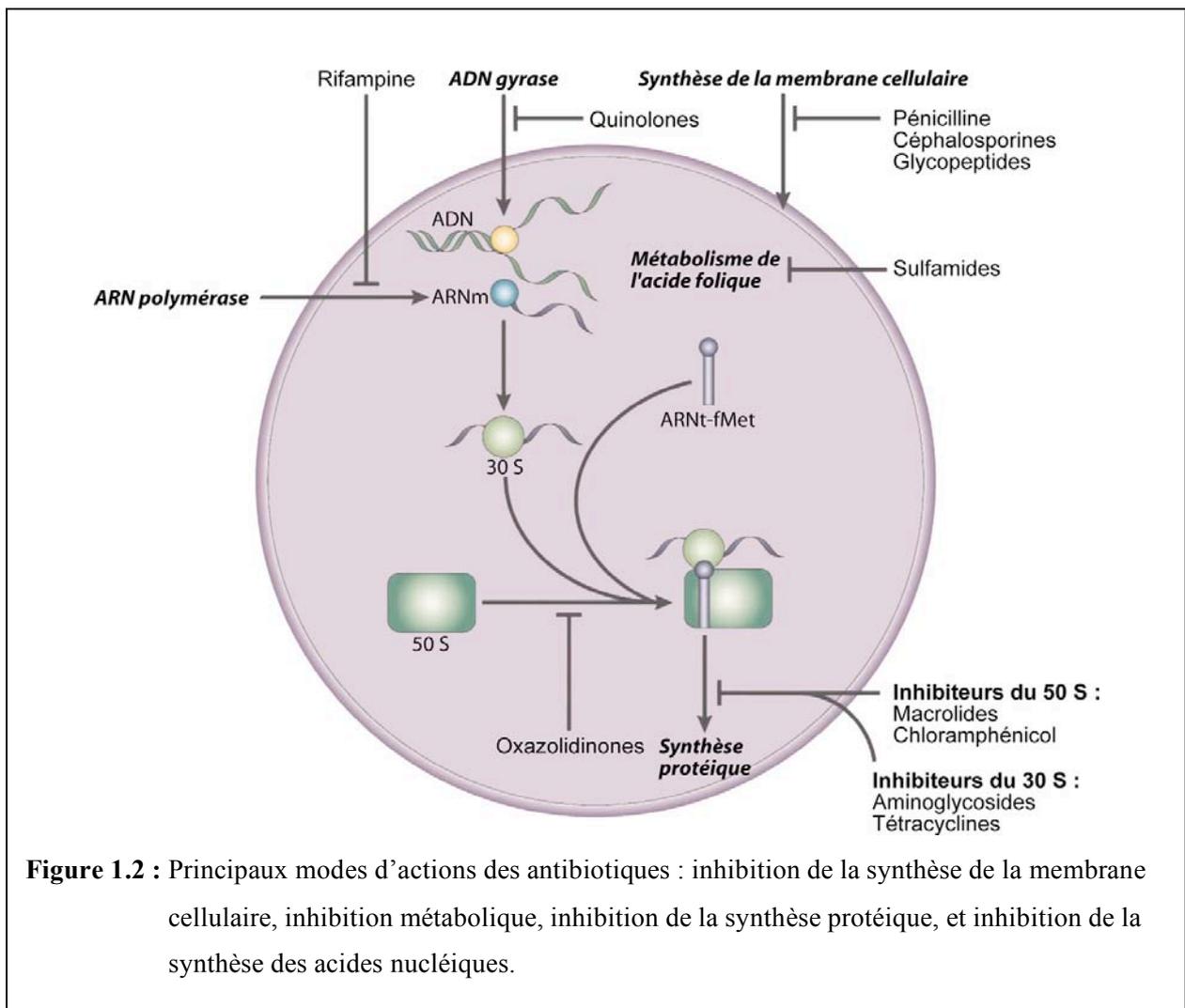
La vitesse de mise sur le marché de nouvelles molécules s'est peu à peu ralentie tandis que dans le même temps, le nombre de souches bactériennes résistantes aux traitements disponibles a augmenté. La conjugaison de ces deux phénomènes pose aujourd'hui un grave problème de santé publique.

Plusieurs ouvrages ont pour thème les antibiotiques (Chast 2002; Levy 2002) et retracent l'histoire de leur découverte ainsi que le contexte sociétal. En effet, les antibiotiques ont vu leur usage très rapidement détourné de la seule médecine curative et sont devenus de véritables arguments marketing dans une société d'après-guerre qui cherchait à se rassurer. Le marché des antibactériens représente aujourd'hui un chiffre d'affaires annuel global de 25 milliards de dollars, répartis entre médecine humaine, vétérinaire et l'ajout d'antibactériens dans des produits domestiques.

## **B. Classification et modes d'action**

Les antibiotiques ont fait l'objet d'une classification en familles, groupes et sous-groupes selon plusieurs critères : (i) leur mode d'action, (ii) leur origine, (iii) leur nature chimique, (iv) leur modalité d'action et (v) leur spectre d'action. Les quatre différents modes d'action (Walsh 2000; Ritter and Wong 2001) sont représentés dans la figure 1.2 :

- L'attaque de la paroi bactérienne (*bactéries gram +*) par les  $\beta$ -lactamines (pénicilline G), les glycopeptides (vancomycine) ou l'attaque de la membrane plasmique (*bactéries gram -*) par les polymixines et les céphalosporines.
- L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques par la rifamycine (*bactéries gram + / gram -*) et les quinolones (*bactéries gram -*).
- L'inhibition du métabolisme de l'acide folique par les sulfamides (*bactéries gram + / gram -*).
- Les interférences dans la synthèse protéique par la fixation à la sous-unité 30 S : aminoglycosides, tétracycline (*bactéries gram + / gram -*) ou par fixation à la sous-unité 50 S : macrolides et lincosamides (agissant sur les *bactéries gram +*) et phénicolé (*bactéries gram + / gram -*).



Cette thèse a pour objet l'étude structurale des mécanismes d'interférence de la synthèse protéique, au niveau de la sous-unité 30S du ribosome, induits par le groupe des aminoglycosides.

## II Les aminoglycosides : généralités

### A. Classification des aminoglycosides

En 1942 débutait la commercialisation de la pénicilline, premier traitement antibiotique disponible, mais qui était inactif contre *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent responsable de la tuberculose. Par criblage systématique de cultures bactériennes de *M. tuberculosis*, Selman Waksman a isolé en 1943 le premier agent anti-tuberculose, la streptomycine, à partir de *Streptomyces griseus*. Sa commercialisation a débuté en 1944, suivie par celle de la néomycine, de la kanamycine et des autres aminoglycosides naturels jusqu'en 1967. Au delà de cette date, les composés mis sur le marché comme l'amikacine sont semi-synthétiques (Busscher, Rutjes et al. 2005) (table 1.1).

La majorité des aminoglycosides naturels ont été obtenus à partir d'actinomycètes de type *Streptomyces* (ils prennent alors le suffixe « -mycine ») ou de type *Micromonospora* (le suffixe associé est alors « -micin »).

La principale caractéristique structurale des aminoglycosides réside dans le cycle 1,3-diaminocyclohexanetriol appelé streptamine ou, lorsque dans la majorité des cas ce cycle est privé de la fonction hydroxyle en position 2, le cycle 2-déoxystreptamine (2-DOS) (Kondo and Hotta 1999; Ritter and Wong 2001; Hermann 2005). Cette différence permet de classer les aminoglycosides en deux principales sous-familles (avec le cycle 2-DOS ou avec le cycle streptamine). Le deuxième niveau de classification repose sur le mode de substitution du cycle 2-DOS (Price and Godfrey 1974; Kondo and Hotta 1999) selon quatre combinaisons possibles (figure 1.3 et table 1.2) :

- Substitution en position 4 : exemple de l'apramycine (Han, Zhao et al. 2005)
- Substitution en position 5 : exemple de l'hygromycine B (Brodersen, Clemons et al. 2000)
- Substitution en positions 4 et 5 : composés 4,5-2-DOS tels que néomycine et paromomycine.
- Substitution en positions 4 et 6 : composés 4,6-2-DOS tels que kanamycine et tobramycine.

Le dernier niveau de classification est interne au groupe des 4,6-2-DOS selon la souche d'actinomycètes dont sont issus les aminoglycosides.

Chaque aminoglycoside se distingue des autres membres de son groupe ou sous-groupe par son nombre de cycles additionnels au 2-DOS (de un dans le cas de la néamine à quatre dans le cas de la lividomycine A) et par la nature des groupements fonctionnels (hydroxyles et ammoniums pour les aminoglycosides naturels) répartis sur ces cycles.

**Table 1.1 :** Historique de commercialisation des aminoglycosides en médecine humaine.

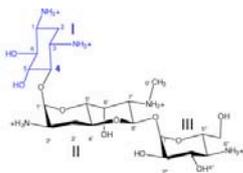
Aminoglycoside	Année	Souches sensibles	Pathologies associées au traitement
Streptomycine	1944	<i>M. tuberculosis</i> <i>E. histolytica</i> <i>C. parvum</i> <i>F. tularensis</i> <i>Y. pestis</i>	tuberculose diarrhées diarrhées tularémie peste
Néomycine	1949	<i>Enterobacteriaceae</i> ( <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> ) <i>Salmonella</i> <i>S. aureus</i>	infections septicémies diarrhées infections, septicémies TSS
Kanamycine	1957	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	infections, septicémies infections longue durée
Paromomycine	1959	<i>E. histolytica</i> <i>C. parvum</i>	diarrhées diarrhées
Spectinomycine	1962	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>P. aeruginosa</i>	gonorrhée infections, septicémies infections longue durée
Gentamicine	1963	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	infections, septicémies infections longue durée
Tobramycine (nébramycine 6)	1967	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	infections, septicémies infections longue durée
Sisomycine <sup>d</sup>	1970	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	infections, septicémies infections longue durée
Dibékacine	1971	-	-
Amikacine <sup>d</sup>	1972	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>Mycobacterium</i> <i>N. asteroides</i>	infections, septicémies infections longue durée tuberculose infections opportunistes infections opportunistes
Nétilmicine <sup>d</sup>	1975	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	infections intestinales infections longue durée
Isépamicine <sup>d</sup>	1978	-	pneumonie nosocomiale
Arbekacine <sup>d</sup>	1990	-	-

d = dérivés semi-synthétiques

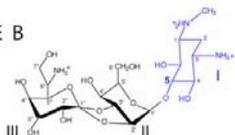
**Table 1.2 :** Classification des principaux aminoglycosides employés.

Diaminocyclitol Substitution	Sous-groupe	Exemple naturel	Exemple semi-synthétique
Streptidine	4	Streptomycine	Streptomycine
2-DOS	4	Apramycine Néamincine	Apramycine Néamincine
	5	Destomycine	Destomycine A Hygromycine B
	4,5	Néomycine	Néomycine Paromomycine Lividomycine Ribostamycine Butirosine
	4,6	Kanamycine	Kanamycine Békanamycine Tobramycine
		Gentamicine	Gentamicine C Gentamicine B Sisomicine Généticine
			Dibékacine Amikacine Arbékacine
			Nétilmicine Isépacimicine

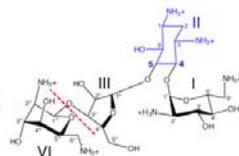
APRAMYCINE  
*Streptomyces tenebrarius*



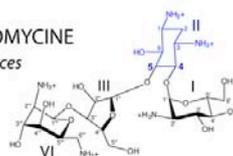
HYGROMYCINE B  
*Streptomyces hygroscopicus*



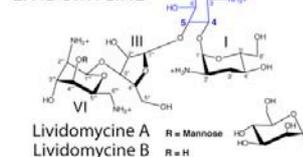
NEOMYCINE B  
*Streptomyces fradiae*  
RIBOSTAMYCINE  
*Streptomyces ribosidificus*



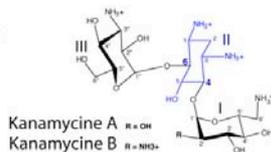
PAROMOMYCINE  
*Streptomyces rimosus*



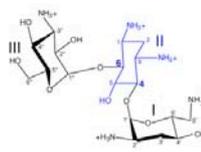
LIVIDOMYCINE



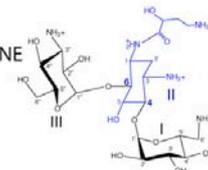
KANAMYCINE  
*Streptomyces kanamyceticus*



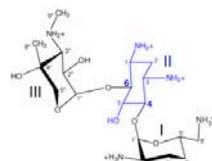
TOBRAMYCINE  
*Streptomyces tenebrarius*



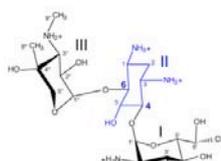
AMIKACINE



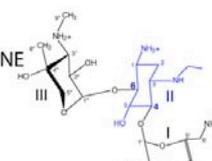
GENTAMICINE C1a  
*Micromonospora purpurea*



GENETICINE  
*Micromonospora rhodoranger*



NETILMICINE



**Figure 1.3 :** Représentation des différents aminoglycosides comportant un cycle 2-DOS (en bleu).

## **B. Caractéristiques**

### **B.1) Spectre d'action**

Les aminoglycosides sont des antibiotiques à large spectre, qui induisent la mort des bactéries en perturbant le bon fonctionnement du ribosome. Leur utilisation en médecine humaine a cependant été restreinte au milieu hospitalier du fait de leur toxicité (voir paragraphe B.2) et l'apparition de souches bactériennes résistantes (voir IV). Certains aminoglycosides, tels la paromomycine et la généticine, ont une activité anti-parasitique (Wagman, Testa et al. 1974; Waitz, Sabatelli et al. 1974), ce qui justifie leur emploi actuel contre certains parasites se développant chez des patients atteints du SIDA notamment dans le cas de leishmanioses cutanées (Dugue 2004; Ferreira, Ramaldes et al. 2004; Irajil and Sadeghinia 2005). Une autre approche thérapeutique possible employant des aminoglycosides pour cibler directement le VIH est en cours d'étude (Ennifar, Paillart et al. 2003). Le site d'initiation de la dimérisation du VIH (DIS) possède en effet la même structure tridimensionnelle que le site A bactérien et les auteurs de cette étude espèrent inhiber spécifiquement le DIS par l'emploi d'aminoglycosides modifiés.

### **B.2) Effets secondaires**

Les aminoglycosides tels que la gentamicine et l'amikacine sont employés pour le traitement d'infections abdominales et urinaires. Les effets secondaires observés, néphrotoxicité et ototoxicité, ont donné lieu à un grand nombre de travaux en pharmacologie pour optimiser leur mode de délivrance (Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999).

#### **Néphrotoxicité**

Les aminoglycosides ont une faible affinité pour les protéines et ne sont pratiquement pas métabolisés par le foie. La majeure partie de ces molécules administrées par voie intraveineuse se retrouvent inchangées dans l'urine du patient tandis qu'une part non négligeable (environ 10 %) s'accumule dans le cortex rénal (Nagai and Takano 2004) induisant des changements structuraux et des déficits fonctionnels au niveau de la membrane plasmique, des mitochondries et du lysosome (Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999). Il a été démontré par autoradiographie dès 1977 que les aminoglycosides sont

retenus au niveau de l'épithélium des cellules tubulaires proximales mais également au niveau de leur lysosome ce qui implique un mécanisme d'endocytose (Just, Erdmann et al. 1977; Hori, Okuda et al. 1992).

Dans les reins, les aminoglycosides sont exposés à des pH proches de 5,0 permettant une protonation de toutes leurs fonctions amines ; ils peuvent se lier par interactions électrostatiques avec les phospholipides acides de la membrane plasmique. Cette fixation est cependant saturable et sert seulement d'étape initiale à la prise en charge des aminoglycosides par les reins. La toxicité rénale peut être suivie par le dosage de créatine et d'enzymes des membranes cellulaires dans l'urine. En effet, le stockage progressif d'aminoglycosides dans les lysosomes induit une phospholipidose due à l'inhibition de phospholipases ce qui perturbe l'intégrité de la membrane (Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999; Nagai and Takano 2004). La toxicité est directement reliée à l'affinité de l'antibiotique pour la membrane cellulaire (néomycine > nétilmicine > tobramycine > gentamicine > amikacine > kanamycine) (Williams, Bennett et al. 1987).

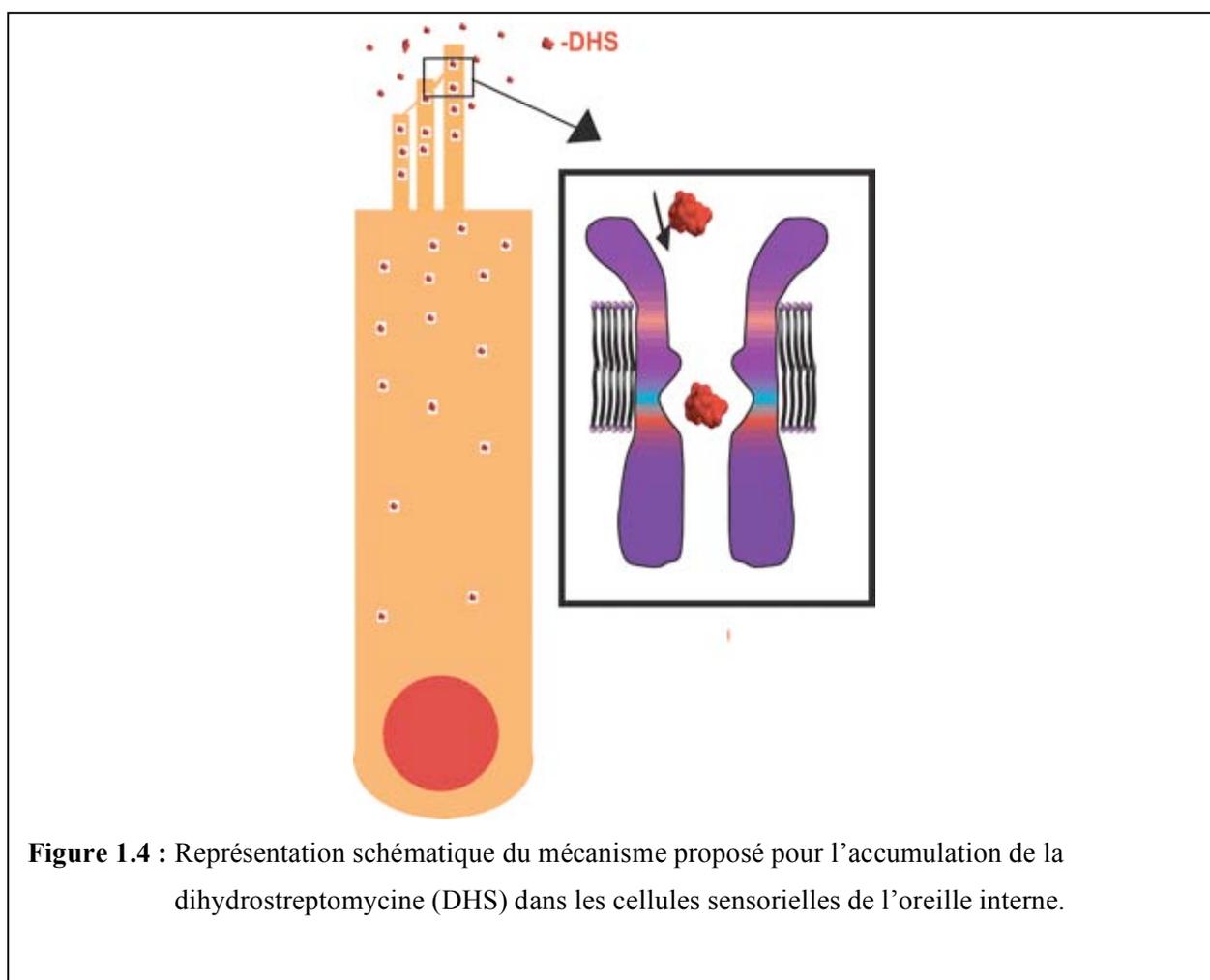
Les aminoglycosides, de par leur caractère polycationique, interagissent également avec la mégaline, un récepteur à endocytose, fortement exprimé dans les cellules tubulaires proximales (Moestrup, Cui et al. 1995). L'inhibition de la mégaline apparaît comme une piste prometteuse pour minimiser les effets néphrotoxiques (Nagai and Takano 2004). En attendant, le seul moyen consiste à administrer les aminoglycosides en une seule dose quotidienne au lieu de trois (Beauchamp and Labrecque 2001).

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; Jezowska-Bojczuk, Karaczyn et al. 1998; Priuska, Clark-Baldwin et al. 1998; Forge and Schacht 2000). La liaison au site A des ribosomes cytoplasmiques (Bar-Nun, Shneyour et al. 1983; Lynch and Puglisi 2001) et des ribosomes des organites (microsomes et mitochondries) (Kurtz 1974; Ali 1995) a aussi été identifiée comme source de toxicité.

Un traitement préventif des effets néphrotoxiques de la gentamicine a été testé chez le rat (Vardi, Parlakpinar et al. 2005) et repose sur les propriétés anti-oxydantes du phénéthyl ester d'acide caféique (Caffeic Acid Phenethyl Ester, CAPE). L'administration de cet ester, pendant les deux jours précédant le traitement antibiotique, permet de diminuer la réaction de peroxydation des lipides de la membrane cellulaire et de préserver l'intégrité des cellules rénales.

## Ototoxicité

Les traitements à base d'aminoglycosides par voie locale ou intraveineuse induisent une toxicité pour l'oreille animale (Therese-Rio 2001) et humaine (Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2000; Kusunoki, Cureoglu et al. 2004; Matz, Rybak et al. 2004; East, Foweraker et al. 2005) qui conduit à la perte irréversible de l'ouïe pour 2-5 % des patients traités. Ce phénomène de toxicité vestibulaire et cochléaire, observé depuis très longtemps, s'explique par la pénétration des aminoglycosides dans les organes de l'oreille interne où se produit un phénomène d'accumulation comparable à celui observé dans les reins. De récents travaux (Waguespack and Ricci 2005) postulent que les aminoglycosides agissent au niveau des cellules ciliées de la cochlée en bloquant le canal *met* (mechanotransducer channel) rendant ainsi la cellule totalement perméable aux antibiotiques qui vont s'y accumuler (Gale, Marcotti et al. 2001) (figure 1.4). Cette hypothèse est confortée par la baisse de l'ototoxicité en présence d'agents bloquant des canaux *met*.



**Figure 1.4 :** Représentation schématique du mécanisme proposé pour l'accumulation de la dihydrostreptomycine (DHS) dans les cellules sensorielles de l'oreille interne.

Tous les aminoglycosides ne présentent pas la même toxicité : la streptomycine (et la dihydrostreptomycine) est plus toxique que la gentamicine > kanamycine > tobramycine > amikacine (Matz, Rybak et al. 2004) ce qui suppose que l'affinité de l'antibiotique pour le canal ne dépend pas de l'encombrement seul.

Des examens cliniques sur des patients souffrant de surdité ont révélé une hypersensitivité aux aminoglycosides d'origine génétique. Une mutation ponctuelle (A1555G) au niveau du site A de l'ARNr 12S mitochondrial a été isolée dans certaines populations arabes et israéliennes qui engendre une hypersensibilité aux aminoglycosides mais également des surdités non associées aux antibiotiques (Guan, Fischel-Ghodsian et al. 2000). Le site A mutant présente un nouveau site de fixation aux aminoglycosides ce qui augmente leur affinité pour le ribosome mitochondrial et provoquerait une synthèse erronée de protéines.

### **III Publication 1 : Le site A comme cible cellulaire**

Les aminoglycosides ont pour cible cellulaire principale la sous-unité 30S du ribosome et se fixent au site de décodage de l'ARN de transfert aminoacylé (site A) au niveau de l'ARN ribosomique 16S (Moazed and Noller 1987; Woodcock, Moazed et al. 1991).

Le mécanisme d'action des aminoglycosides a fait l'objet d'une précédente publication (Vicens and Westhof 2003). La publication 1 reprend ce sujet en insistant sur la dynamique de l'ARN du site A. <sup>1</sup> Les références bibliographiques incluses dans les publications n'ont pas été reprises dans le chapitre 6.

---

<sup>1</sup> Switchable RNA Motifs As Drug Targets, Eric Westhof, Boris François and Quentin Vicens  
Nucleic Acid Switches and Sensors, Editeur : Silverman, Scott K.

ISBN: 1-58706-092-2

Pub Date: 07, 2005

## CHAPTER 7

---

# Switchable RNA Motifs as Drug Targets

Eric Westhof, Quentin Vicens and Boris François

### Abstract

**R**NA molecules are highly negatively charged polymers that form intricate three-dimensional assemblies involving recurrent structural motifs. Therefore, in order to understand the molecular recognition of RNA, one of the key points to address is how RNA can be a specific target of natural or artificial antibiotics and drugs that are generally positively charged. Crystal structures of complexes between ribosomal particles from bacteria and antibiotics have pinned down very precisely the discrete binding sites of several classes of antibiotics that inhibit protein synthesis. These structures have unambiguously demonstrated that ribosomal RNAs, rather than ribosomal proteins, are overwhelmingly targeted. The comparative analyses of various aminoglycoside antibiotics bound to the same aminoacyl-transfer RNA (tRNA) decoding site (A site) have been used to decipher the contribution of each functional group to the RNA-aminoglycoside complex formation. In addition, various biochemical and microbiological data as well as some resistance and toxicity mechanisms could be rationalized at the molecular level. It was demonstrated that the binding of the aminoglycosides locks the A site into a conformation mimicking that adopted in presence of the cognate tRNA-codon association, thereby provoking a loss in translation fidelity by shunting a natural molecular switch. Similarly, although very high specificity might be difficult to achieve with oppositely charged molecules, targeting motifs that undergo dynamic exchange between alternative conformations (molecular switches) should improve the biological activity of antibacterial compounds.

### Introduction

The ribosome is the target of about half of the antibiotics characterized thus far.<sup>1-3</sup> For forty years, microbiological, pharmacological, and biochemical data have helped to decipher the mechanisms of action of various antibiotics, by providing clues about their binding sites (e.g., through footprinting experiments<sup>4</sup> and via identification of mutations<sup>5</sup>) as well as their mechanisms of action (e.g., by kinetic measurements<sup>6</sup>). A critical advance in the understanding of these mechanisms has recently been made with the high-resolution crystal structures (2.4 - 3.8 Å) of bacterial ribosomal particles complexed to several classes of protein synthesis inhibitors (aminoglycosides, macrolides, chloramphenicol, etc.).<sup>7-12</sup> These structures definitively show that antibiotics predominantly target ribosomal RNA molecules rather than ribosomal proteins. Crystal structures have also been solved (2.4 - 2.54 Å) for the A site, an isolated domain

---

\*Eric Westhof—Institut Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, Modélisation et simulations des Acides Nucléiques, UPR 9002, Université Louis Pasteur, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. Email: E.Westhof@ibmc.u-strasbg.fr

---

*Nucleic Acid Switches and Sensors*, edited by Scott K. Silverman. ©2005 Eurekah.com.

---

of the 16S ribosomal RNA, in complex with several antibiotics from the aminoglycoside family (paromomycin, tobramycin, geneticin).<sup>13-15</sup> The comparative analyses of these high-resolution structures aided in deciphering the contribution of each antibiotic functional group to the binding, and they offered a molecular basis to some resistance and toxicity mechanisms.<sup>16</sup>

Here, starting from the challenges that small molecules must face to target RNA and with our present understanding of the molecular recognition between rRNA and aminoglycosides used as a model system, we will stress the advantages of targeting RNA molecular switches, whose recurrence is now revealed in various RNA molecules. Some of those aspects were discussed in a previous minireview.<sup>17</sup>

### Constraints of RNA Folding on the Choice of RNA Target

Experimental and theoretical studies on the three-dimensional architecture of catalytic RNAs revealed the hierarchical folding of structured RNAs.<sup>18-20</sup> Secondary structure pairings join regions that are proximate in sequence, and these secondary structure elements subsequently stack end-to-end to form contiguous helices. Such preformed helical domains associate into bundles of helices to constitute the compact tertiary structure that is maintained via interactions between tertiary anchoring motifs.<sup>21</sup> Thus, RNA architecture can be visualized as the hierarchical assembly of preformed double-stranded helices defined by Watson-Crick base pairs and RNA modules principally maintained by non-Watson-Crick base pairs. This architectural hierarchy is coupled with an electrostatic hierarchy in which RNA folding occurs first with an electrostatic collapse to compact states, with most of the secondary structure elements induced by nonspecific ion binding.<sup>22</sup> Later, there is a cooperative transition to native states, with all tertiary contacts induced by specific ion binding, especially magnesium ions.<sup>23</sup> Similar arrangements of domains occur in smaller systems like the hammerhead,<sup>24,25</sup> the hairpin,<sup>26</sup> and the hepatitis delta virus ribozymes,<sup>27,28</sup> and some of these RNA motifs are also found in the large ribosomal RNAs.<sup>29</sup>

Therefore, although RNA does not appear to be a very promising drug target from its chemical structure (built on only four different kinds of negatively charged nucleotides possessing planar bases<sup>30</sup>), one could argue that the intricate architectures of RNA molecules can still lead to the formation of pockets and cavities where shape-specific rather than sequence-specific binding could be achieved.<sup>31</sup> However, several observations may be made regarding this argument.

First, the formation of RNA cavities necessitates turns of the sugar-phosphate backbone and thus a close proximity of phosphate groups. This leads to a heightened importance of electrostatic forces and increases the roles of tightly bound water molecules and ions that screen the repulsive charges. Divalent magnesium ions need special considerations. Although the roles of monovalent ions cannot be dismissed, magnesium ions are generally necessary for RNA to fold and function. In order to bind specifically to a geometrically restrained and molecularly crowded pocket, they must be partly dehydrated, which is energetically very costly because the enthalpy of hydration of a single magnesium ion is around 400 kcal/mole. The displacement of such tightly bound ions by another positively charged ligand, with the accompanying structural rearrangements, is thus not favorable.

Second, the formation of pockets or enlarged grooves requires the presence of non-Watson-Crick pairs and bulged residues. The associated sequence constraints are usually rather strong and the number of ways of embedding non-Watson-Crick pairs within helices is limited, which leads to a rather restricted number of RNA motifs that could be chosen as potential targets.<sup>29,32</sup> Indeed, RNA motifs strikingly appear like Russian dolls with smaller motifs associated into larger motifs. Biological function arises through the very diverse architectures that can result from the assembly of those recurrent but limited RNA motifs. The

modes of interaction between these motifs are very similar if not identical in the various architectures. The targeting of such RNA-RNA anchor motifs cannot readily lead to a drug that is specific for a particular site. Besides, this would require competition for binding during the folding and assembly processes, which normally involve several protein cofactors with possible ATP or GTP hydrolysis.

Finally, most of the energy content of a given folded RNA is contained in the secondary structure, which consists of regular double-stranded Watson-Crick paired helices. As in proteins, the free energy content of a three-dimensional RNA fold is between  $-5$  and  $-10$  kcal/mole.<sup>23</sup> Thus, a binding constant in the nanomolar range — which can be achieved by a small molecule — could in principle compete with the final steps of RNA folding. However, it should be kept in mind that the folding free energy is distributed throughout the RNA molecule and is not localized in a single region or interface, as is the binding free energy of a small ligand.

### Which RNA Dynamics Should be Targeted?

Like all molecules, RNA molecules spontaneously undergo dynamic motions and movements, the amplitude and frequency of which depend on the temperature (kT). Such Brownian motions are expected to lead to localized alternative conformational states of a folded RNA molecule. High resolution X-ray crystallography reveals such alternative conformations of the sugar-phosphate backbone. A particular example, relevant to the present topic, is seen in the crystal structure of the complex between the aminoglycoside geneticin and the A-site RNA fragment.<sup>15</sup> The types of mobilities extend from base rotations about the sugar or localized conformational fluctuations to disorder. Thus, mobility generally covers atomic, structural, segmental, or domain movements. Clearly, biological functional significance cannot be systematically assigned to these various types of dynamic processes. In proteins, hinge flexibility in immunoglobulins as well as the role of short-range fluctuations in the diffusion of oxygen in myoglobin have been documented, and the flexibility in both the ligands and protein binding sites have been stressed.<sup>34</sup> More often than not, only correlations between segmental mobility and biological function can be found, as was the case for example with antigen-antibody recognition.<sup>35,36</sup> During recognition and binding processes, fluctuations facilitate the interplay of the various physicochemical forces in the search for a minimum in free energy of binding. In other words, the fluctuations let the constraints potentially present in the attractive forces exercise their action effectively for the desolvation step and for the zipper-like propagation of the initial nucleation complex into the lock-and-key tight binding stage. A region targeted for drug binding should thus possess enough internal dynamics and undergo enough atomic fluctuations to allow these accommodation processes during complexation.

RNA molecules experience a vast range of alternative conformations. Dynamic equilibria with correlations between the conformers were noticed several years ago using NMR spectroscopy; e.g., in nucleosides.<sup>37</sup> A single bulged base can occupy various positions within the helical grooves as well as when flipped outside in the solvent, depending on local sequence and conditions.<sup>38,39</sup> Conditions leading to dramatic effects for the resulting tertiary fold can induce rearrangement of the secondary structure. For example, the S15 mRNA exists in an equilibrium between a state with two adjacent hairpins and a state in which these two hairpins have rearranged to a coaxially stacked pseudoknot.<sup>40,41</sup> Biologically, this equilibrium constitutes an important translational control for the protein S15.

Equilibria between alternative secondary structures are often observed after *in vitro* transcription of RNA molecules, which results in kinetic trapping of biologically nonnative conformers. This was particularly well analyzed in the central P3/P7 pseudoknot of group I introns.<sup>42-44</sup> Four-way junctions constitute a different and fascinating system for studying topological equilibria. Such equilibria occur because the two-by-two coaxially stacked helices

of the four-way junction can form a parallel or antiparallel X-like structure with either a right-handed or a left-handed chirality.<sup>45</sup> Recently, dynamic equilibria between parallel and antiparallel conformers<sup>46</sup> as well as between right- and left-handed conformers were observed.<sup>47</sup> Similarly, a dynamic equilibrium between an extended and a bent structure has recently been observed<sup>48</sup> for the recurrent kink-turn motif.<sup>49</sup>

What is the difference, if any, between a dynamic equilibrium and a switchable structure? Formally, it is difficult to find one. We consider here that a switchable RNA structure experiences a dynamic equilibrium between at least two main and conformationally characterizable states, such that biological function can be assigned to the existence of the switch. Thus, inherent structural fluctuations (of the order of  $kT$ ) contributing to RNA folding and ligand recognition are not considered functional RNA switches. This distinction between a dynamic equilibrium and a switchable structure implicitly includes the kinetics of the conformational change. Intuitively, one expects that a dynamic equilibrium has relatively fast exchange kinetics, whereas a switchable structure has relatively slow kinetics. For example, dynamic equilibria that affect ligand binding through allosteric effects do not always lead to conformationally characterizable molecular states, although they are certainly biologically relevant.

### Mechanisms of Action of Aminoglycosides

Antibiotics belonging to different families target various regions of ribosomal RNA. They bind in the shallow groove (spectinomycin)<sup>8</sup> or the deep groove (hygromycin B)<sup>7</sup> of a helix, at a three-adenine bulge (aminoglycosides),<sup>8,13</sup> or in the exit tunnel of the nascent polypeptide chain (macrolides).<sup>10,12</sup> Additionally, they interact in many ways with RNA: (i) only with phosphate groups (streptomycin),<sup>8</sup> (ii) mainly with bases (hygromycin B, spectinomycin),<sup>7,8</sup> (iii) with a mixture of both (paromomycin, tobramycin),<sup>8,13,14</sup> (iv) via magnesium ions (tetracycline, chloramphenicol, sparsomycin),<sup>11,12,50</sup> or (v) with a protein side chain (streptomycin).<sup>8</sup> The antibiotics can mimic base stacking (pactamycin)<sup>7</sup> or form pseudo-base pairing interactions with ribosomal bases (blasticidin S, paromomycin, and related aminoglycosides).<sup>8,13,14,50</sup> For clarity, here we concentrate on the aminoglycosides that bind to the decoding A site of the small ribosomal subunit.

Aminoglycoside antibiotics are oligosaccharides that contain several ammonium groups.<sup>51,52</sup> Different sub-classes are distinguished on the basis of their chemical structures (Fig. 1) and their mechanisms of action.<sup>53</sup> Aminoglycosides belonging to the paromomycin and tobramycin sub-classes interfere with translation<sup>54</sup> by binding to the A site on the 16S rRNA (Fig. 2).<sup>4</sup>

Kinetic analyses showed that during decoding, a correct tRNA-mRNA interaction induces a conformational change of the A site that permits translation.<sup>55</sup> Aminoglycosides disturb the fidelity of this tRNA selection step by stabilizing a similar conformation for near-cognate complexes.<sup>6,56-58</sup> The cognate tRNA is the single tRNA species with an anticodon that is precisely complementary to the codon exposed at the A site and is characterized by 1–2 GTP cleavages in the EF-Tu ternary complex per incorporation. Near-cognate aa-tRNAs possess an anticodon similar to the cognate tRNA (4–6 tRNA species) and are characterized by 3–6 GTP cleavages per incorporation. The 90% of noncognate aa-tRNAs that have an anticodon dissimilar to the cognate tRNA are never misincorporated and therefore do not show any GTP cleavages. Kinetic analyses have demonstrated that paromomycin stabilizes binding of both cognate and near-cognate aa-tRNAs in the A site and that GTP hydrolysis and peptide bond formation are accelerated by a factor of ten for the near-cognate complexes.<sup>6</sup> These effects lead to an increase in the level of near-cognate amino acid misincorporation. Simultaneously, paromomycin decreases directly the rate of codon recognition by a factor of three. The latter observation reinforces the model in which aminoglycosides provoke a structural rearrangement of the decoding site from a state in which it accepts the tRNA to a conformation which is produc-

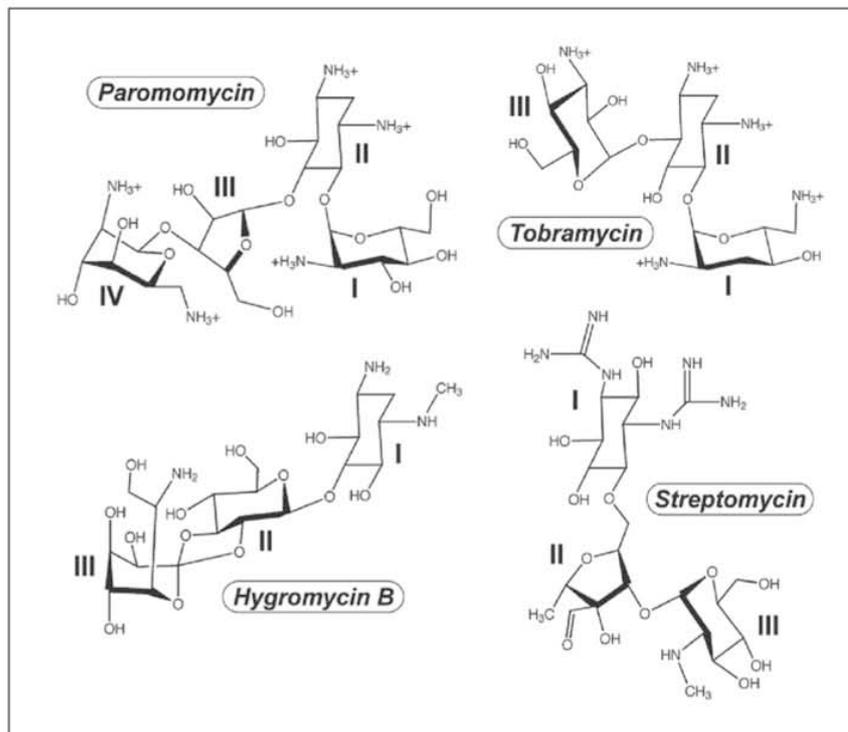


Figure 1. Chemical structures of representatives of common aminoglycosides that belong to four sub-classes.

tive for peptide bond synthesis.<sup>58</sup> Recently, by monitoring the rates of GTP hydrolysis by elongation factor Tu, it could be shown that the conformational steps affected by two aminoglycosides, streptomycin and paromomycin, that bind in close proximity on the 30S particle could be discriminated.<sup>59</sup> In contrast to streptomycin, in the presence of which the rates for GTP hydrolysis are decreased to similar values for cognate and noncognate codons, the rates for GTP hydrolysis are increased for noncognate codons without altering those for cognate codons in presence of paromomycin. Thus, paromomycin binding affects an early tRNA selection step, the specific recognition of the codon-anticodon interaction, whereas streptomycin affects the subsequent triggering of a conformational change.

Aminoglycosides have been shown to inhibit tRNA binding to the A site when the E site is occupied during the elongation cycle.<sup>60</sup> Binding of aminoglycosides would thus lead to a blockage of ribosomal function. Support for the effect of E site occupation on A-site fidelity was further indicated by the binding of edeine to the E site, which leads to misreading levels comparable to those observed with aminoglycosides.<sup>61</sup> Recently, it was also shown that aminoglycosides inhibit ribosomal subunit formation in *E. coli*<sup>62</sup> and *S. aureus*.<sup>63</sup> Additionally, aminoglycosides were shown to inhibit translocation,<sup>64,65</sup> although the nature and relative importance of this effect remain to be explained.<sup>66,67</sup> Because aminoglycosides have been shown to bind in vitro to various RNA molecules, it can be expected that they interfere with various RNA-dependent regulation pathways in vivo.<sup>52,68-70</sup> Consequently, it is not surprising that

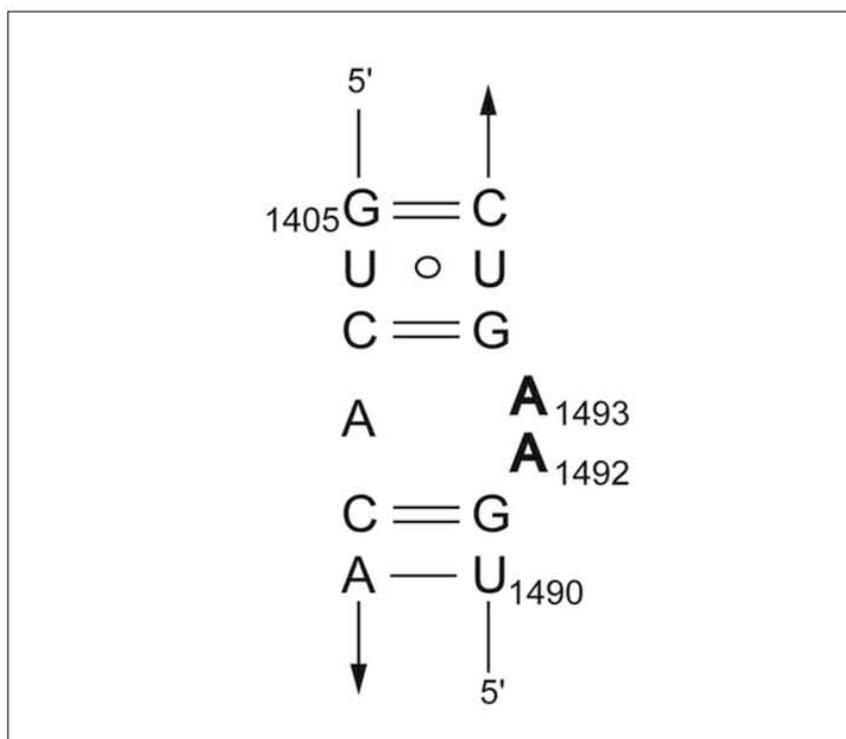


Figure 2. The secondary structure of the bacterial 16S rRNA A site with the *E. coli* nomenclature.

many studies revealed that the detailed mechanism of action of aminoglycosides is a complex and delicate balance between several processes.<sup>51</sup> However, binding of aminoglycosides to the A site constitutes the key in their mode of action, because rRNA point mutations that preclude aminoglycoside/A-site interactions confer strong resistance to aminoglycosides.<sup>17,71,72</sup>

### Mode of Binding of Aminoglycosides to the A Site: Stabilization of One Conformational State

Crystallographic structures of various 30S particle and minimal A-site complexes helped to visualize the mechanism of action of aminoglycosides at the ribosomal level in atomic detail. During decoding, the A site changes its conformation from an “off” conformation (with A1492 and A1493 folded into the shallow groove of the A site) to an “on” conformation (with A1492 and A1493 fully bulged out from the A site), as shown in (Fig. 3)<sup>56,73-75</sup> The electron density was inconsistent with a single conformation for both adenines A1492 and A1493 in the absence of aminoglycosides, implicating a dynamic equilibrium of that region.<sup>73</sup> Clear density was obtained after soaking an anticodon hairpin together with a single-stranded RNA into crystals of the 30S particle.<sup>56,74</sup> The observed conformational change is necessary to allow A1492 and A1493 to interact specifically with the first two of the three base pairs formed by the cognate codon:anticodon interaction.<sup>74</sup> This structural change also provokes the transition

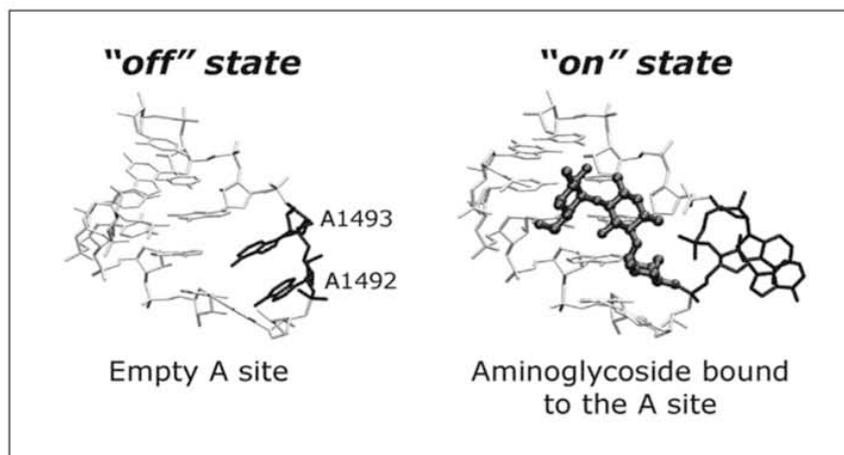


Figure 3. Views of two crystallographic states between which the A site is in dynamic equilibrium. Aminoglycosides block the A site in its "on" conformation, which is the state normally induced and stabilized by binding of cognate tRNA to a codon. The "off" state can be observed in multiple conformations (Vicens et al., in preparation). Coordinates of the two main states of the A site are extracted from PDB ID 1J5E (left) and PDB ID 1LC4 (right).

of the ribosome from an open to a closed form that is stabilized by contacts involving the cognate tRNA and the ribosome.<sup>56,57</sup> Aminoglycosides lock the A site in the open conformation (Fig. 3)<sup>8</sup> and, by doing so, they also pay for a part of the energetic cost associated with the tRNA-dependent ribosome closure.<sup>56,57</sup> As a consequence, the ribosome loses its ability to discriminate cognate versus noncognate tRNA-mRNA associations.<sup>56,58,74</sup>

The crystal structures of an RNA double helix containing two A sites in complex with paromomycin, tobramycin, and geneticin characterized the binding mode of aminoglycosides at high resolution.<sup>13-15</sup> The puckered sugar ring I is inserted into the A-site helix by stacking against a guanine residue and by forming a pseudo pair with two H-bonds to the Watson-Crick sites of the universally conserved adenine 1408. As was observed in the 30S particle, this particular interaction helps to maintain adenines 1492 and 1493 in the bulged-out conformation that induces misreading.<sup>74</sup> The conserved 2-deoxystreptamine ring (ring II) forms similar H-bonds in the three complexes, and its binding is made possible by the adaptability created by the universally conserved U1406•U1495 pair.<sup>72</sup> The additional rings contact different nucleotides of the A site, depending on the substitution type of ring II. One third of the total RNA-aminoglycoside contacts were shown to be mediated by water molecules.<sup>13,16</sup> Thus, overall tight packing of atoms in direct van der Waals contact is central and a prerequisite to specific recognition. Water molecules participate in the assembly by linking hydrophilic groups that belong to both components. The hydration shells around nucleic acid base pairs tend to be conserved and maintained regardless of the environment.

In recent crystal structures,<sup>76</sup> variable occupations of each of the two binding sites are observed (François et al., in preparation). Depending on the nature of the antibiotic, either zero, one, or two antibiotic molecules are bound per site. In these structures, when the A site is empty, only a single adenine (A1492) is bulged out whereas the other (A1493) pairs with A1408. A recent 1.7-Å crystal structure of the empty A site inserted into a different oligonucleotide shows two-state conformational disorder for A1492. In one conformation, A1492 forms

a *cis* Watson-Crick pair with A1408 (with A1493 bulged out), and in the other conformation, both A1492 and A1493 bulge out and stack together.<sup>75</sup> The strongest evidence for a dynamic equilibrium influenced by aminoglycosides was obtained by correlating the latter crystal structure<sup>75</sup> to fluorescence-induced changes of A-site fragments with the bulging adenines mutated to the fluorescent 2-aminopurine.<sup>77</sup> The congruence between the fluorescence-induced changes and the crystal structures clearly indicated that paromomycin displaces A1492 from the internal loop, after which A1492 stacks with A1493.<sup>75</sup>

### The Decoding Process by the Two Bulging Adenines of the a Site

Adenines 1492 and 1493 bulge out of the A-site helix to form A-minor contacts with the first two base pairs of the codon-anticodon.<sup>8</sup> The structures of the minimal A-site RNA complexed to various aminoglycosides display crystal packings with intermolecular contacts between the bulging adenines (equivalent to A1492 and A1493) and the shallow/minor groove of a neighboring helix, mimicking contacts that are seen in the 30S crystals.<sup>13-15</sup> In A-minor motifs, two adenines interact with the 3'-end of two adjacent helical Watson-Crick base pairs, such that the first A (A1492 in the A site) interacts in an antiparallel fashion with one base of the Watson-Crick pair, and the second (A1493) interacts in a parallel fashion with one base of the next Watson-Crick pair. Two important points are as follows: (1) A1493 interacts with both strands of the receptor helix, whereas A1492 interacts only with one strand; (2) A1493 forms more hydrogen bonds than A1492. For the decoding process, the general scheme is shown in (Fig. 4). The anticodon nucleotides, corresponding to positions 35 and 36 in the nomenclature of tRNA<sup>Phe</sup>, are denoted ac35 and ac36. The first and second positions of the codon are denoted c1 and c2. The type I and type II names correspond to the nomenclature of ref. 78<sup>78</sup> and the *trans* sugar-edge/sugar-edge or *cis* sugar-edge/sugar-edge to that of ref. 79.<sup>79</sup> The hydrogen bonding interactions are shown in (Fig. 5).

Interactions between adenines and shallow/minor grooves of RNA were first proposed during our modeling of group I introns.<sup>18</sup> On the basis of sequence analysis and during the three-dimensional modeling, it was noticed that the over-represented GNRA tetraloops were close to regular RNA helices, such that the last two residues (-RA-) could interact with two helically stacked base pairs r-y and G=C. The covariation was such that when R is an A, r-y would be G-C, and when R is a G, r-y would be A-U. From the modeling, it was clear that the interactions can only occur in the minor/shallow groove. This type of interaction was later demonstrated using chemical probing<sup>80,81</sup> and mutagenesis<sup>82</sup> and soon afterwards by X-ray crystallography of the hammerhead ribozyme.<sup>83,84</sup> Two years later, the crystal structure of the P4-P6 domain of the *Tetrahymena* group I intron revealed two more examples of interactions between adenines and the shallow/minor groove of RNA helices.<sup>85,86</sup> It revealed also a new type of RNA-RNA motif which had been previously identified by *in vitro* selection.<sup>87</sup> The universality and importance of the A-minor motifs for RNA structure were definitively established by the crystal structures of the ribosomal particles.<sup>8,78</sup>

Significantly for the decoding process, whereas GNRA tetraloops are able to distinguish between two consecutive helical base pairs (either G=C or A-U), two consecutive adenines in A-minor motifs bind to any combination of two stacked Watson-Crick pairs. The following two important points have been shown: (1) consecutive adenines recognize any two stacked Watson-Crick pairs without any strong bias;<sup>88</sup> (2) consecutive adenines have a strong preference for complementary Watson-Crick pairs as compared with noncomplementary pairs.<sup>89</sup> Ramakrishnan's group, using cocrystals of 30S particles in presence of codons with near-cognate tRNA anticodon stem loops (i.e., with GÖU either at the first or at the second position of the minihelix formed between codon and anticodon triplets) demonstrated those points in the case of the decoding process.<sup>56</sup> Crystal structures revealed that the first base of the codon interacts

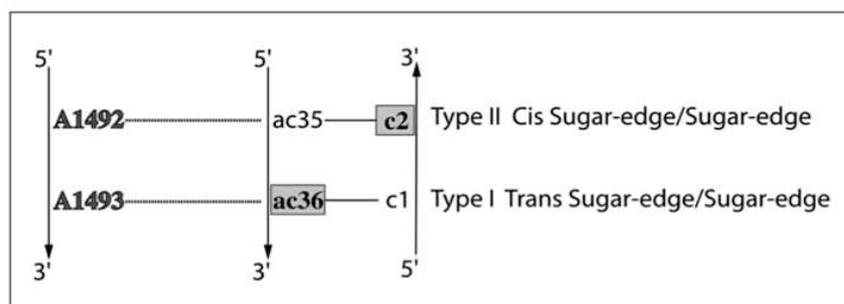


Figure 4. The schematic of the pairing scheme between A1492 and A1493 and the first two base pairs of the codon-anticodon minihelix.

only via its 2'-OH group with A1493 (because the U of the GÖU wobble moves into the major/deep groove). The situation for the second position of the codon was understandably much less defined, because most contacts between the codon nucleotide and A1492 are lost in case of a GÖU base pair, for which the U is moved away into the deep groove.

In conclusion, the most common and frequent RNA-RNA self-assembly motif is at the very core of the recognition of the codon-anticodon helix and is central to the fidelity of the ribosomal decoding process. Clearly, ribosomal RNAs do not constitute a passive platform for other active players; on the contrary, they take active part in the recognition processes that underlie translational fidelity. While the RNA parts of the 50S particle catalyze peptide bond formation,<sup>90</sup> the RNA parts of the 30S particle are directly and actively at the center of the recognition processes that guarantee correct codon-anticodon interactions, thereby constituting the primary factor contributing to translation fidelity. In short, the ribosome is a ribozyme<sup>90</sup> and, like all other known ribozymes, the ribosome uses RNA-based recognition motifs not only for catalysis and substrate release but also for decoding. These two conclusions support the RNA world hypothesis with the primordial appearance of RNA in the origin of life.<sup>91-93</sup> One can speculate that the observed frequent occurrence of the A-minor motif indicates an ancient, if not primordial, prevalence of those motifs in the RNA world. Therefore, it is not too surprising that this motif should be used for recognition of the codon-anticodon helix. And, following Crick's hypothesis of the frozen origin of the genetic code,<sup>94</sup> once such a recognition system was incorporated into the decoding process, it could not be replaced but could only be more finely tuned in the overall fidelity process.

### The Importance of Targeting a Molecular Switch

The A site exists as a dynamic equilibrium between an open form (with both bases A1492 and A1493 bulging out) and a closed form (with either or both bases within the internal loop). Upon binding of a cognate tRNA to the messenger codon, the equilibrium is displaced toward the open form, with the bulging adenines forming A-minor contacts with the first two base pairs of the codon-anticodon helix. With near-cognate tRNAs, the loss in hydrogen bonding prevents the stabilization of the productive state. The binding of aminoglycosides to the A site leads to a conformation that mimicks the conformation adopted by the A site in presence of cognate tRNA-mRNA codon association, which locks it into the open conformation. Thus, the binding of aminoglycosides shunts a natural molecular switch, resulting in a loss of translation fidelity.

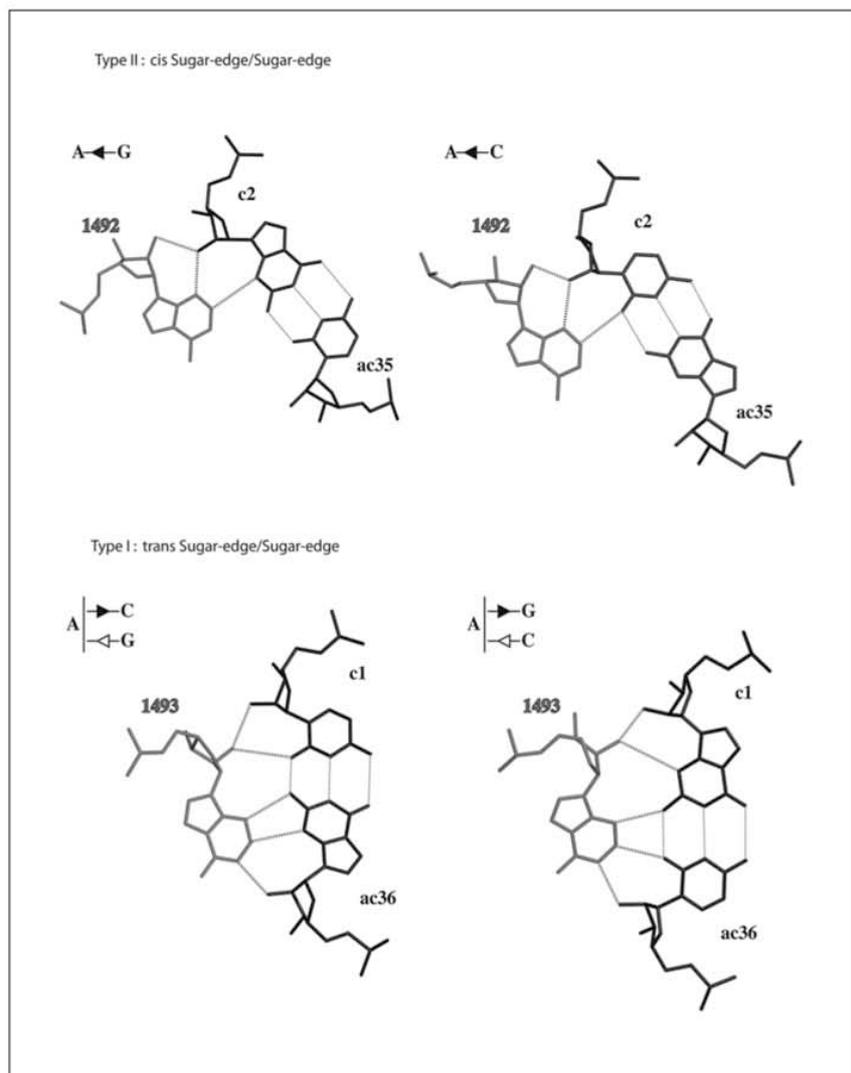


Figure 5. Atomic details of the hydrogen-bonding schemes between the bulging adenines A1492 and A1493 of the A site and the codon-anticodon helix formed between the messenger RNA and the tRNA. Notice the difference in the number of H-bonds formed between A1492 and A1493.

Similarly, recent results indicate that sparsomycin catalyzes ribosomal translocation by binding to the peptidyl-tRNA and the 23S rRNA,<sup>10,95</sup> a process normally performed by elongation factor G and guanosine triphosphate.<sup>67</sup> The effects of sparsomycin in the translocation process can be understood if sparsomycin binds preferentially to the translocated state, thereby shunting another type of control point in the translation process. Interestingly, the

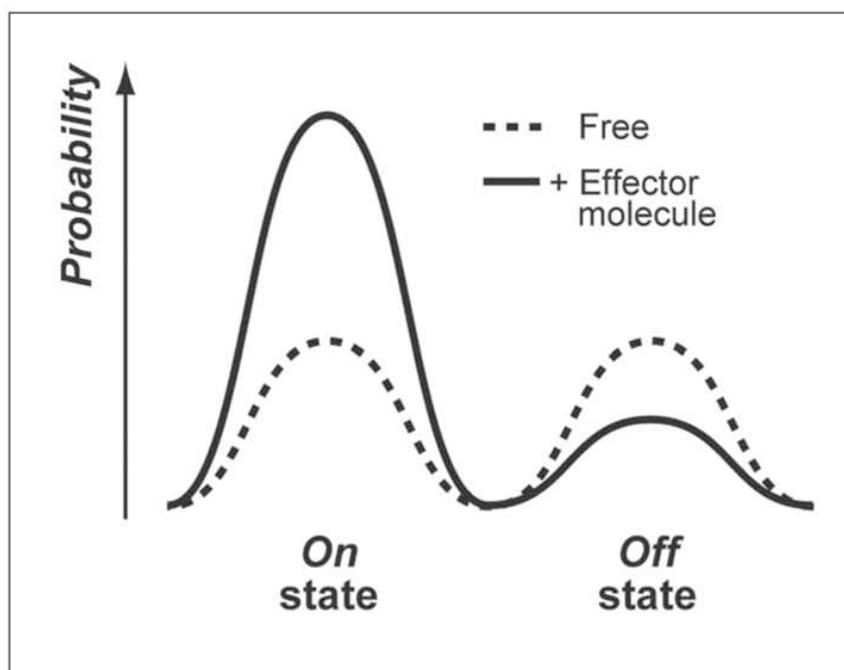


Figure 6. General scheme for the inhibition of RNA molecular switches by small molecules. The effector is shown here to stabilize the “on” state. The relative probability of occurrence of any state is proportional to  $\exp(-E/kT)/Q$ , where  $E$  is the energy of that state and  $Q$  the partition function.

aminoglycoside hygromycin B, which binds mainly at the level of the conserved U1406•U1495 pair and thus between the A and P sites, blocks ribosomal translocation without inducing misreading.<sup>72</sup> Because aminoglycosides such as paromomycin and tobramycin that bind to the A site also contact the U1406•U1495 pair, one would expect that they also hinder translocation, as shown by Fredrick and Noller.<sup>67</sup> The study of aminoglycoside variants that do not contact the U1406•U1495 pair would be helpful in the further understanding of these connected processes.

In short, although a strong specificity might be difficult to achieve with oppositely charged molecules, targeting motifs that undergo dynamic exchange between alternative conformations should improve the biological activity of antibacterial compounds. In analogy to the aminoglycoside and sparsomycin cases, RNA targets ought to be chosen in regions that switch between alternative states, where each state — referred to as an “on” or “off” state — leads to a different biological action. One of the two states would then predominate in the presence of the small molecule (Fig. 6). Such a situation was found for the inhibition of the yeast tRNA<sup>Asp</sup> aminoacylation reaction by aminoglycosides: the binding of tobramycin alters the native conformation of the tRNA so that binding of the synthetase becomes less favorable.<sup>96</sup>

This approach is likely to gain favor now that it is becoming apparent that several important biological mechanisms are similarly regulated by molecular switches that involve distinct RNA conformational states.<sup>50,97,98</sup> For example, small effectors promote up- or down-regulation of a particular protein’s expression by binding to the 5′-UTR regions of the corresponding

mRNA, thereby favoring a particular "on" or "off" conformation.<sup>97,99,100</sup> Recent bioinformatic algorithms enable the identification of potential conformational switches in mRNA and other regulatory RNA molecules.<sup>101,102</sup> Ultimately, identifying and understanding such control mechanisms in the bacterial ribosome as well as in other RNA molecules should help to discover new viral and bacterial targets for therapeutic intervention.

## Outlook

The standard approaches of designing drugs to target proteins have benefited from crystal structures of complexes between inhibitors and proteins for the last 20 years. In contrast, the first crystal structures of small molecules bound to RNA pockets were solved only a few years ago. The crystal structures of the ribosomal subunits from various organisms bound to antibiotics that have been used for decades gave a strong impetus to the antibiotic research field by revealing that most of the drugs bind to defined RNA motifs. It is now becoming apparent that antibiotics target translation fidelity by altering the kinetically controlled conformational changes that are at the heart of the ribosomal machinery. In several aspects, the 16S rRNA A site is a very special target: it is at the base of the almost terminal long helix 44, which is located at the interface between the two subunits in a region devoid of proteins. The A site is the key RNA element at the core of the RNA-controlled decoding process.<sup>57</sup> It presents its deep/major groove to the solvent face<sup>103</sup> and maintains its structural properties (such as its ability to interact with antibiotics) outside the context of the ribosome.<sup>104-106</sup> Most of the other binding surfaces for antibiotics are scattered among residues brought close by the tertiary folding but far apart in secondary structure. The hope to analyze them in isolation is therefore tenuous. Are there other unsuspected switchable RNA targets present in the ribosome? How could we search for them?

Normal mode analysis<sup>107,108</sup> has been used to locate regions important for open/closed transitions in proteins in order to develop new compounds that inhibit such molecular switches.<sup>109</sup> This technique, when combined with further understanding of the translation steps, should help identify new RNA switches as promising targets. However, the very fact that RNA self-assembly and recognition motifs are modular and recurrent constitutes a major drawback for drug designers, due to the difficulties that must be faced to achieve specificity and avoid resistance. The developments of future therapies will undoubtedly require the concerted efforts of microbiologists, biochemists, structural biologists, bio-informaticians and organic chemists.

## Acknowledgements

We thank Erik Böttger and Stephen Hanessian for numerous discussions. We are grateful to Aurélie Lescoute-Philipps for the help with Figures. E.W. acknowledges the Institut universitaire de France for support.

## References

1. Gale EF, Cundliffe E, Reynolds PE et al. The molecular basis of antibiotic action London: John Wiley & Sons Inc. 1981.
2. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000; 406:775-81.
3. Hermann T. Chemical and functional diversity of small molecule ligands for RNA. *Biopolymers* 2003; 70:4-18.
4. Moazed D, Noller HF. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 1987; 327:389-94.
5. De Stasio E, Moazed D, Noller HF et al. Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic-RNA interactions. *EMBO J* 1989; 8:1213-6.
6. Pape T, Wintermeyer W, Rodnina MV. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol* 2000; 7:104-7.

7. Brodersen DE et al. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 2000; 103:1143-1154.
8. Carter AP et al. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 2000; 407:340-8.
9. Auerbach T et al. Antibiotics targeting ribosomes: Crystallographic studies. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; 2:169-86.
10. Hansen JL et al. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol Cell* 2002; 10:117-28.
11. Pioletti M et al. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J* 2001; 20:1829-39.
12. Schlünzen F et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 2001; 413:814-21.
13. Vicens Q, Westhof E. Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure* 2001; 9:647-658.
14. Vicens Q, Westhof E. Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A-site. *Chem Biol* 2002; 9:747-755.
15. Vicens Q, Westhof E. Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J Mol Biol* 2003; 326:1175-1188.
16. Vicens Q, Westhof E. Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: An analysis of X-ray crystal structures. *Biopolymers* 2003, in press.
17. Vicens Q, Westhof E. RNA as a drug target: The case of aminoglycosides. *ChemBiochem* 2003; 4:1018-23.
18. Michel F, Westhof E. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol* 1990; 216:585-610.
19. Massire C, Jaeger L, Westhof E. Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis. *J Mol Biol* 1998; 279:773-93.
20. Tinoco Jr I, Bustamante C. How RNA folds. *J Mol Biol* 1999; 293:271-81.
21. Batey RT, Rambo RP, Doudna JA. Tertiary motifs in RNA structure and folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999; 38:2326-2343.
22. Rangan P, Masquida B, Westhof E et al. Assembly of core helices and rapid tertiary folding of a small bacterial group I ribozyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:1574-9.
23. Brion P, Westhof E. Hierarchy and dynamics of RNA folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1997; 26:113-37.
24. Hammann C, Lilley DM. Folding and activity of the hammerhead ribozyme. *ChemBiochem* 2002; 3:690-700.
25. Khvorova A, Lescoute A, Westhof E et al. Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat Struct Biol* 2003; 10:708-12.
26. Wilson TJ, Lilley DM. Metal ion binding and the folding of the hairpin ribozyme. *Rna* 2002; 8:587-600.
27. Doudna JA, Cech TR. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* 2002; 418:222-8.
28. FerreD'Amare AR, Doudna JA. Crystallization and structure determination of a hepatitis delta virus ribozyme: Use of the RNA-binding protein U1A as a crystallization module. *J Mol Biol* 2000; 295:541-56.
29. Leontis NB, Westhof E. Analysis of RNA motifs. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13:300-8.
30. Westhof E, Auffinger P. In: Meyers RA, ed. *Encyclopedia of analytical chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000:5222-5232.
31. Hermann T, Westhof E. Rational drug design and high-throughput techniques for RNA targets. *Comb Chem High Throughput Screen* 2000; 3:219-34.
32. Leontis NB, Westhof E. A common motif organizes the structure of multi-helix loops in 16 S and 23 S ribosomal RNAs. *J Mol Biol* 1998; 283:571-83.
33. Westhof E, Masquida B, Jaeger L. RNA tectonics: Towards RNA design. *Fold & Des* 1996; 1:R78-R88.
34. Karplus M, McCammon JA. The internal dynamics of globular proteins. *CRC Crit Rev Biochem* 1981; 9:293-349.

35. Westhof E et al. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* 1984; 311:123-6.
36. Tainer JA et al. The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature* 1984; 312:127-34.
37. Westhof E, Roder O, Croneiss I et al. Ribose conformations in the common purine(beta)ribosides, in some antibiotic nucleosides, and in some isopropylidene derivatives: A comparison. *Z Naturforsch [C]* 1975; 30:131-40.
38. Woodson SA, Crothers DM. Preferential location of bulged guanosine internal to a G.C tract by <sup>1</sup>H NMR. *Biochemistry* 1988; 27:436-45.
39. Woodson SA, Crothers DM. Proton nuclear magnetic resonance studies on bulge-containing DNA oligonucleotides from a mutational hot-spot sequence. *Biochemistry* 1987; 26:904-12.
40. Ehresmann C et al. A pseudoknot is required for efficient translational initiation and regulation of the *Escherichia coli* rpsO gene coding for ribosomal protein S15. *Biochem Cell Biol* 1995; 73:1131-40.
41. Benard L, Philippe C, Ehresmann B et al. Pseudoknot and translational control in the expression of the S15 ribosomal protein. *Biochimie* 1996; 78:568-76.
42. Pan J, Woodson SA. Folding intermediates of a self-splicing RNA: Mispairing of the catalytic core. *J Mol Biol* 1998; 280:597-609.
43. Pan J, Woodson SA. The effect of long-range loop-loop interactions on folding of the Tetrahymena self-splicing RNA. *J Mol Biol* 1999; 294:955-65.
44. Emerick VL, Woodson SA. Self-splicing of the Tetrahymena prerRNA is decreased by misfolding during transcription. *Biochemistry* 1993; 32:14062-7.
45. Lilley DM. Structures of helical junctions in nucleic acids. *Q Rev Biophys* 2000; 33:109-59.
46. Hohng S et al. Conformational flexibility of four-way junctions in RNA. *J Mol Biol* 2004; 336:69-79.
47. Goody TA, Lilley DM, Norman DG. The chirality of a four-way helical junction in RNA. *J Am Chem Soc* 2004; 126:4126-7.
48. Goody TA, Melcher SE, Norman DG et al. The kink-turn motif in RNA is dimorphic, and metal ion-dependent. *Rna* 2004; 10:254-64.
49. Klein DJ, Schmeing TM, Moore PB et al. The kink-turn: A new RNA secondary structure motif. *Embo J* 2001; 20:4214-21.
50. Bashan A et al. Structural basis of the ribosomal machinery for Peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol Cell* 2003; 11:91-102.
51. Wright GD, Berghuis AM, Mobashery S. In: Rosen BP, Mobashery S, eds. Resolving the antibiotic paradox: Progress in understanding drug resistance and development of new antibiotics. New York: Plenum Press, 1998:27-69.
52. Walter F, Vicens Q, Westhof E. Aminoglycoside-RNA interactions. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3:694-704.
53. Ritter TK, Wong CH. Carbohydrate-based antibiotics: A new approach to tackling the problem of resistance. *Angew Chem Int Ed* 2001; 40:3508-3533.
54. Davies J, Gorini L, Davis BD. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol Pharmacol* 1965; 1:93-106.
55. Pape T, Wintermeyer W, Rodnina M. Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J* 1999; 18:3800-7.
56. Ogle JM, Murphy FV, Tarry MJ et al. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 2002; 111:721-32.
57. Ogle JM, Carter AP, Ramakrishnan V. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci* 2003; 28:259-66.
58. Rodnina MV, Wintermeyer W. Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: Kinetic and structural mechanisms. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:415-35.
59. Gromadski KB, Rodnina MV. Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:316-22.
60. Hausner TP, Geigenmuller U, Nierhaus KH. The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. New insights into the inhibition mechanisms of aminoglycosides, thiostrepton, and viomycin. *J Biol Chem* 1988; 263:13103-11.

61. Dinos G, et al. Dissecting the ribosomal inhibition mechanisms of edeine and pactamycin: The universally conserved residues G693 and C795 regulate P-site RNA binding. *Mol Cell* 2004; 13:113-24.
62. Mehta R, Champney WS. 30S ribosomal subunit assembly is a target for inhibition by aminoglycosides in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1546-9.
63. Mehta R, Champney WS. Neomycin and paromomycin inhibit 30S ribosomal subunit assembly in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 2003; 47:237-43.
64. Cabanas MJ, Vazquez D, Modolell J. Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 83:991-7.
65. Davies J, Davis BD. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J Biol Chem* 1968; 243:3312-3316.
66. Phelps SS, Jerinic O, Joseph S. Universally conserved interactions between the ribosome and the anticodon stem-loop of A site tRNA important for translocation. *Mol Cell* 2002; 10:799-807.
67. Fredrick K, Noller HF. Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin. *Science* 2003; 300:1159-62.
68. Schroeder R, Waldsich C, Wank H. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* 2000; 19:1-9.
69. Tor Y. RNA and the small molecule world. *Angew Chem Int Ed* 1999; 38:1579-1582.
70. Michael K, Tor Y. Designing novel RNA binders. *Chem Eur J* 1998; 4:2091-2098.
71. Böttger EC, Springer B, Prammananan T et al. Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO Rep* 2001; 2:318-23.
72. Pfister P, Hobbie S, Vicens Q et al. The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: Relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *Chembiochem* 2003; 4:1078-88.
73. Wimberly BT et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 2000; 407:327-39.
74. Ogle JM et al. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* 2001; 292:897-902.
75. Shandrick S et al. Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43:3177-82.
76. Russell RJ, Murray JB, Lentzen G et al. The complex of a designer antibiotic with a model aminoacyl site of the 30S ribosomal subunit revealed by X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* 2003; 125:3410-1.
77. Kaul M, Barbieri CM, Pilch DS. Fluorescence-based approach for detecting and characterizing antibiotic-induced conformational changes in ribosomal RNA: Comparing aminoglycoside binding to prokaryotic and eukaryotic ribosomal RNA sequences. *J Am Chem Soc* 2004; 126:3447-53.
78. Nissen P, Ippolito JA, Ban N et al. RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: The A-minor motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:4899-903.
79. Leontis NB, Westhof E. Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *Rna* 2001; 7:499-512.
80. Murphy FL, Cech TR. An independently folding domain of RNA tertiary structure within the *Tetrahymena* ribozyme. *Biochemistry* 1993; 32:5291-300.
81. Murphy FL, Cech TR. GAAA tetraloop and conserved bulge stabilize tertiary structure of a group I intron domain. *J Mol Biol* 1994; 236:49-63.
82. Jaeger L, Michel F, Westhof E. Involvement of a GNRA tetraloop in long-range RNA tertiary interactions. *J Mol Biol* 1994; 236:1271-6.
83. Pley HW, Flaherty KM, McKay DB. Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 1994; 372:68-74.
84. Pley HW, Flaherty KM, McKay DB. Model for an RNA tertiary interaction from the structure of an intermolecular complex between a GAAA tetraloop and a n RNA helix. *Nature* 1994; 372:111-113.
85. Cate JH et al. Crystal structure of a group I ribozyme domain: Principles of RNA packing. *Science* 1996; 273:1678-85.
86. Cate JH et al. RNA tertiary structure mediation by adenosine platforms. *Science* 1996; 273:1696-9.
87. Costa M, Michel F. Frequent use of the same tertiary motif by self-folding RNAs. *Embo J* 1995; 14:1276-85.

88. Doherty EA, Batey RT, Masquida B et al. A universal mode of helix packing in RNA. *Nat Struct Biol* 2001; 8:339-43.
89. Battle DJ, Doudna JA. Specificity of RNA-RNA helix recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:11676-81.
90. Nissen P, Hansen J, Ban N et al. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 2000; 289:920-30.
91. Crick FH. The origin of the genetic code. *J Mol Biol* 1968; 38:367-79.
92. Orgel LE. Evolution of the genetic apparatus. *J Mol Biol* 1968; 38:381-93.
93. Gilbert W. The RNA world. *Nature* 1986; 319:618.
94. Crick FH. The genetic code—yesterday, today, and tomorrow. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1966; 31:1-9.
95. Hansen JL, Schmeing TM, Moore PB et al. Structural insights into peptide bond formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:11670-5.
96. Walter F, Pütz J, Giegé R et al. Binding of tobramycin leads to conformational changes in yeast rRNA<sup>Asp</sup> and inhibition of aminoacylation. *EMBO J* 2002; 21:760-8.
97. Nahvi A et al. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem Biol* 2002; 9:1043.
98. Mandal M, Boese J, Barrick JE et al. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* 2003; 113:577-586.
99. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 2002; 419:952-6.
100. Mandal M, Breaker RR. Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:451-63.
101. Barash D. Second eigenvalue of the Laplacian matrix for predicting RNA conformational switch by mutation. *Bioinformatics* 2004; 20:1861-9.
102. Voss B, Meyer C, Giegerich R. Evaluating the predictability of conformational switching in RNA. *Bioinformatics* 2004; 20:1573-82.
103. Yusupov MM et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 2001; 292:883-96.
104. Purohit P, Stern S. Interactions of a small RNA with antibiotics and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature* 1994; 370:659-662.
105. Recht MI, Fourmy D, Blanchard SC et al. RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J Mol Biol* 1996; 262:421-436.
106. Miyaguchi H, Narita H, Sakamoto K et al. An antibiotic-binding motif of an RNA fragment derived from the A-site related region of *Escherichia coli* 16S RNA. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:3700-3706.
107. Tama F, Sanejouand YH. Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. *Protein Eng* 2001; 14:1-6.
108. Tama F, Valle M, Frank J et al. Dynamic reorganization of the functionally active ribosome explored by normal mode analysis and cryo-electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:9319-23.
109. Delarue M, Sanejouand YH. Simplified normal mode analysis of conformational transitions in DNA-dependent polymerases: The elastic network model. *J Mol Biol* 2002; 320:1011-24.



## **IV Résistances des bactéries aux aminoglycosides**

L'utilisation massive des antibiotiques en médecine et comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale (Jones, Chappell et al. 2002; Lipsitch, Singer et al. 2002; Nayak and Kenney 2002; Wegener 2003; Tollefson and Karp 2004) sont les causes principales de l'apparition et de la multiplication de souches bactériennes résistantes. Ce phénomène est devenu extrêmement préoccupant au cours des dernières années comme en témoigne le nombre de publications scientifiques traitant du sujet (table 1.3).

Avant d'aborder les différents mécanismes de résistance élaborés par les bactéries, il paraît nécessaire d'explicitier les notions de résistance et de spectre d'activité.

### **A. Intérêt des spectres d'activité antimicrobienne des antibiotiques**

Le spectre d'activité antimicrobienne d'un antibiotique répartit les espèces bactériennes en trois classes en fonction de leur comportement vis-à-vis de l'antibiotique. La classification des espèces est fondée sur plusieurs éléments : la distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI ou MIC) de l'antibiotique vis-à-vis des populations de souches d'un échantillon représentatif de chaque espèce ; la présence d'éventuels mécanismes de résistance acquise ; la confrontation de ces données avec les caractéristiques pharmacocinétiques de l'antibiotique, ainsi qu'avec les résultats observés en clinique. La CMI exprimée en mg / l, représente l'activité antibactérienne intrinsèque *in vitro* de l'antibiotique ; la confrontation des CMI permet d'établir une échelle d'activité de chaque antibiotique vis-à-vis des différentes espèces bactériennes pathogènes, et de

**Table 1.3 :** Répartition annuelle des publications référencées sur la base de données Pubmed à la date du 16/08/2005.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Résistances aux aminoglycosides	560	569	520	581	564	204
Résistances aux antibiotiques	2715	2916	3080	3220	3331	1453
Modification d'aminoglycosides	33	44	45	43	34	20

comparer les antibiotiques entre eux vis à vis de la même espèce en fonction des valeurs critiques. Ce dernier point est très important car il valide les travaux des microbiologistes qui ont étudié le comportement des différents aminoglycosides face à des mutations du ribosome (chapitre 3).

Le spectre renseigne sur la résistance naturelle et sur la prévalence de la résistance acquise ; la résistance acquise des bactéries évolue dans le temps comme dans l'espace, de façon très variable selon les pays, mais aussi à l'intérieur d'un même pays selon les régions, les villes, les hôpitaux, les âges ou les pathologies ...

Le potentiel d'activité d'un antibiotique ainsi que ses limites sont accessibles et concourent à une meilleure information sur le médicament avec pour objectif d'orienter le choix du prescripteur vers une antibiothérapie adaptée.

La commission d'Autorisation de Mise sur le Marché (A.M.M), le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, et les autorités européennes ont édité en février 2004 la troisième version annuelle d'un fascicule contenant l'ensemble des spectres d'activité antibactérienne avec pour chacun d'eux :

- les concentrations critiques ( $S \leq x \text{ mg / l}$  et  $R > \text{mg / l}$ ), séparant les souches en trois catégories cliniques, sensible, intermédiaire et résistante,
- une information relative à la variabilité de la prévalence de la résistance acquise.

## **Classification des espèces**

- Lorsque l'espèce est classée « **sensible** », elle est composée de souches naturellement sensibles à l'antibiotique, c'est-à-dire inhibées par les concentrations atteintes après administration du médicament aux posologies validées par l'A.M.M. .
- Lorsque l'espèce est classée « **modérément sensible** » (ou de **sensibilité intermédiaire**), l'antibiotique est modérément actif sur la majorité des souches appartenant à cette espèce : des résultats cliniques satisfaisants peuvent être observés lorsque les concentrations de l'antibiotique au site de l'infection sont supérieures à la CMI. Toutefois, l'activité de l'antibiotique vis à vis des espèces « sensibles » ou « modérément sensibles » peut être remise en cause du fait de l'acquisition, par certaines souches, de mécanismes de résistance. La

résistance acquise par une fraction des souches de l'espèce permet de comprendre que l'efficacité de l'antibiotique, prescrit de manière probabiliste, devient aléatoire. Pour une souche donnée de l'espèce, l'activité de l'antibiotique ne peut être affirmée qu'après isolement et antibiogramme. Dès lors ces espèces, qu'il faut considérer comme « inconstamment sensibles », font l'objet d'une information sous forme de pourcentage dans une colonne intitulée « fréquence de résistance acquise », située à droite dans le tableau des

<b><u>TOBRAMYCINE</u></b>	
Les concentrations critiques séparent les souches sensibles des souches de sensibilité intermédiaire et ces dernières, des résistantes :	
S ≤ 4 mg/l                      et                      R > 8 mg/l	
Catégories	Fréquence de résistance acquise en Europe (> 10%) (valeurs extrêmes)
<b><u>ESPÈCES SENSIBLES</u></b>	
<b>Aérobies à Gram positif</b>	
<i>Corynebacterium</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> méticilline-sensible	0 - 12 %
Staphylocoque coagulase-négative méticilline-sensible	0 - 20 %
<b>Aérobies à Gram négatif</b>	
<i>Acinetobacter</i>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0 - 40 %
<i>Branhamella catarrhalis</i>	
<i>Campylobacter</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>	0 - 16 %
<i>Citrobacter koseri</i>	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0 - 65 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	0 - 14 %
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Klebsiella</i>	0 - 11 %
<i>Morganella morganii</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	0 - 12 %
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 - 36 %
<i>Salmonella</i>	
<i>Serratia</i>	0 - 66 %
<i>Shigella</i>	
<i>Yersinia</i>	

**Figure 1.5 :** Fiche présentant le spectre d'activité antimicrobienne de la tobramycine (Edition de février 2004).

Catégories	Fréquence de résistance acquise en Europe (> 10%) (valeurs extrêmes)
<p><b>ESPÈCES MODÉRÉMENT SENSIBLES</b> (<i>in vitro</i> de sensibilité intermédiaire)</p> <p><b>Aérobies à Gram négatif</b> <i>Pasteurella</i></p>	
<p><b>ESPÈCES RÉSISTANTES</b></p> <p><b>Aérobies à Gram positif</b> Entérocoques * <i>Nocardia asteroides</i> <i>Staphylococcus méti-R</i> ** <i>Streptococcus</i></p> <p><b>Aérobies à Gram négatif</b> <i>Alcaligenes denitrificans</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Providencia stuartii</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i></p> <p><b>Anaérobies</b> Bactéries anaérobies strictes</p> <p><b>Autres</b> <i>Chlamydia</i> Mycoplasmes Rickettsies</p>	

\* Dans certaines indications, la tobramycine peut être utilisée en association, en particulier avec les bêta-lactamines (septicémies, endocardites) à l'exception des infections à *Enterococcus faecium*. Toutefois, la synergie est abolie lorsque les espèces impliquées (streptocoques, entérocoques) présentent une résistance acquise de haut niveau à la tobramycine.

\*\* La fréquence de résistance à la méticilline peut atteindre 50% de l'ensemble des staphylocoques dans certains pays européens et se rencontre surtout en milieu hospitalier.

**Figure 1.5 :** Fiche présentant le spectre d'activité antimicrobienne de la tobramycine (Edition de février 2004).

spectres (exemple de la tobramycine figure 1.5).

- Lorsque l'espèce est classée « **résistante** », l'échec thérapeutique doit être attendu car elle est constituée de souches naturellement résistantes à l'antibiotique ou d'une majorité de souches ayant acquis une résistance.

## B. Mécanismes de résistances

Les bactéries disposent de trois principales stratégies pour se protéger des aminoglycosides (Magnet and Blanchard 2005) (table 1.4) : (1) diminuer la quantité d'antibiotique à l'intérieur de la cellule, abaisser l'affinité de l'aminoglycoside pour sa cible en modifiant l'un ou l'autre par une mutation (2) ou une réaction enzymatique (3).

Les structures tridimensionnelles de complexes entre le site A bactérien et des aminoglycosides (Brodersen, Clemons et al. 2000; Vicens and Westhof 2001; Vicens and Westhof 2002; Vicens and Westhof 2003; Vourloumis, Winters et al. 2005) ont permis d'identifier les interactions moléculaires entre les aminoglycosides et le ribosome et de comprendre certains mécanismes de résistance au cours des dernières années (Kotra, Haddad et al. 2000; Walsh 2000; Magnet, Smith et al. 2003; Vakulenko and Mobashery 2003; Vicens and Westhof 2003; Magnet and Blanchard 2005).

**Table 1.4 :** Différents mécanismes de résistances développés par les bactéries avec pour chacun d'eux les antibiotiques ciblés et les protéines impliquées.

Mécanismes	Famille d'antibiotique	Protéines impliquées
<b>Imperméabilité</b>	$\beta$ -lactamines macrolides tetracyclines <b>Aminoglycosides</b> quinolones	Omp OprD2
<b>Efflux</b>	$\beta$ -lactamines macrolides <b>Aminoglycosides</b> tetracyclines	Mex, Mar, ABC LsA , TET(A)-(L)
<b>Inactivation</b>	$\beta$ -lactamines <b>Aminoglycosides</b>  Macrolides Lincosamides Streptogramines	$\beta$ -lactamases (>350) Phosphotransférases (APH) Nucléotidyltransférases (ANT) Acétyltransférases (AAC) Phosphotransférases ( <i>mphA</i> -C) Nucléotidyltransférases ( <i>linA</i> , <i>lnuA</i> ) Acétyltransférases ( <i>vatA</i> -E) Acétyltransférases (CAT)
<b>Affinité</b>	<b>Aminoglycosides</b> macrolides tetracyclines Quinolones	Protéines L22 Méthylases (Erm) Topoisomérasés TET (M)-(T)
<b>Substitution</b>	$\beta$ -lactamines Glycopeptides sulfamides	PLP2a Van Dihydrofolate réductase

## **B.1) Réduction de l'assimilation intracellulaire**

La réduction de la concentration intra-cellulaire d'aminoglycosides par réduction de la perméabilité membranaire ou augmentation de l'efflux d'antibiotiques est un processus qui affecte sans distinction toutes les familles d'aminoglycosides.

Le processus d'imperméabilisation de la membrane bactérienne implique l'adsorption par interactions électrostatiques de l'aminoglycoside (molécule cationique à pH physiologique) sur les liposaccharides (chargés négativement) de la membrane des bactéries gram -. Plus la charge de ces membranes est importante, plus élevé sera le niveau de résistance.

L'efflux des molécules est devenu la principale cause de résistance aux antibiotiques. C'est notamment le cas pour les souches multi-résistantes d'agents pathogènes « opportunistes » responsables de maladies nosocomiales. Ces bactéries sont en effet soumises en permanence à des doses croissantes d'antibiotiques et s'adaptent de manière étonnante à cette pression environnementale en exprimant un grand nombre de pompes d'efflux « multi-drogues » (Mingeot-Leclercq, Glupczynski et al. 1999; Magnet, Smith et al. 2003; Paulsen 2003; Magnet and Blanchard 2005). Ces pompes peuvent être divisées en deux classes (Putman, van Veen et al. 2000) selon leur mode de fonctionnement : (1) utilisation du gradient transmembranaire de protons ou d'ions sodium pour expulser les antibiotiques (Murakami, Nakashima et al. 2002), (2) hydrolyse d'une molécule d'ATP dans le cas des pompes ABC (ATP Binding Cassette).

## **B.2) Réduction de l'affinité par modification du site A**

### **Méthylation de l'ARNr 16S**

Les actinomycètes qui synthétisent les aminoglycosides se protègent de leur production en exprimant des méthylases de l'ARNr capables de modifier certaines positions clés pour la fixation des aminoglycosides (Magnet and Blanchard 2005). C'est ainsi que la guanine G1405 est méthylée en position N7 et l'adénine A1408 en N1 chez *Streptomyces tenebrarius* ce qui induit un encombrement plus important du groupement amine mais également une à deux charges positives au cœur du site A. Des gènes codant

pour des enzymes semblables ont été retrouvées dans certaines souches bactériennes (*P. aeruginosa*) laissant supposer un transfert d'information génétique inter-espèces par l'intermédiaire de plasmides. Ces enzymes confèrent à la bactérie une forte résistance aux aminoglycosides.

### **Mutations de l'ARNr 16S**

L'acquisition de résistance aux aminoglycosides par mutation de l'ARNr 16S n'est valable que pour *Mycobacterium tuberculosis* car c'est l'une des seules espèces de bactéries ne disposant que d'une seule copie des gènes codant pour le ribosome (gène *rrs*). Dans toutes les autres espèces, la mutation favorable à l'acquisition d'une résistance aux aminoglycosides devrait apparaître de manière simultanée dans toutes les copies, ce qui est statistiquement peu probable (Kotra, Haddad et al. 2000).

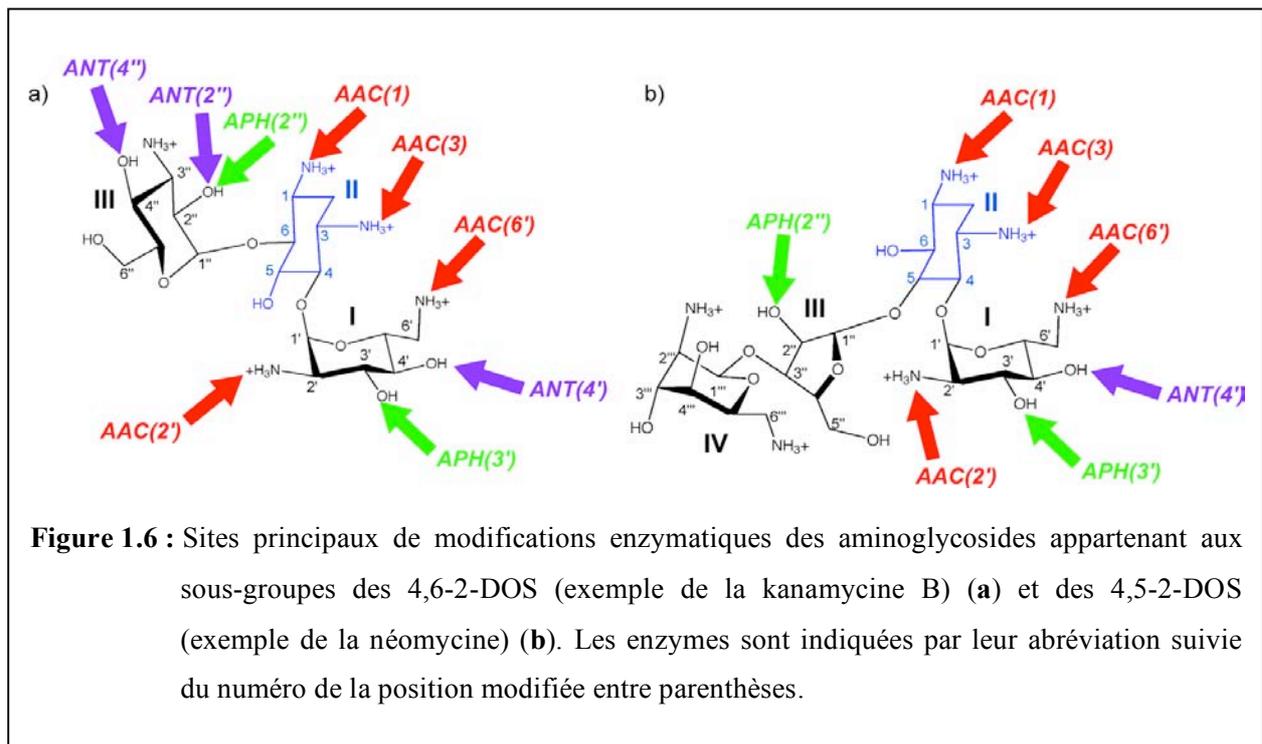
L'introduction d'un seul exemplaire du gène *rrs* muté dans *Mycobacterium smegmatis* (Sander, Meier et al. 1996; Sander, Prammananan et al. 1996) a permis de tester l'impact *in vivo* de mutations sur l'efficacité des aminoglycosides (par mesure et comparaison des MIC) (Pfister, Hobbie et al. 2003; Pfister, Risch et al. 2003; Pfister, Hobbie et al. 2005).

### **B.3) Inactivation de l'aminoglycoside par modification enzymatique**

La modification enzymatique des aminoglycosides par fixation covalente de groupements (adénylation, phosphorylation, acétylation) est le moyen le plus couramment employé par les bactéries pour se protéger. Les gènes codant pour ces enzymes étant intégrés dans des plasmides ou des transposons chez la plupart des souches *gram +* et *gram -*, ils sont facilement transmis d'une population à l'autre.

Les enzymes de modification des aminoglycosides sont répertoriées en trois classes selon la nature du groupement chimique rajouté mais toutes ont le même objectif : provoquer l'encombrement stérique de l'antibiotique et l'empêcher ainsi de s'insérer dans le site A (Kotra, Haddad et al. 2000; Magnet and Blanchard 2005) (figure 1.6).

- Les aminoglycoside-nucléotidyltransférases (ANT) catalysent le transfert d'un nucléotide triphosphate sur une fonction hydroxyle.



- Les aminoglycoside-acétyltransférases (AAC) catalysent le transfert du groupement acétyle de l'acétyl-coenzyme A sur une fonction amine ou hydroxyle (Vetting, Roderick et al. 2003).
- Les aminoglycoside-phosphotransférases (APH) catalysent le transfert du groupement phosphoryl d'une molécule d'ATP sur une fonction hydroxyle.

Cette résistance « enzymatique » ne pourra être combattue que de deux manières : trouver des inhibiteurs de ces enzymes ou développer des aminoglycosides modifiés qui ne soient plus reconnus comme substrat (voir chapitre 4).

## **V Présentation des résultats de ce travail de thèse**

Ce travail de thèse a porté sur l'étude par cristallographie aux rayons X (RX) de fragments d'ARN incluant le site A bactérien, complexés à des aminoglycosides. Six nouvelles structures de complexes formés avec des aminoglycosides naturels (néamine, gentamicine C1a, kanamycine A, néomycine B, lividomycine A et ribostamycine) ont été affinées dans le cadre d'une collaboration avec la société Ribotargets Ltd (Vernalis Ltd, Cambridge GB). L'étude des interactions entre les trois grands groupes d'aminoglycosides (4,5-2-DOS et les deux sous-groupes 4,6-2-DOS) et l'ARN du site A bactérien a mis en évidence la conservation des contacts impliquant les cycles I et II (partie néamine).

Mon travail a également porté sur l'étude structurale de nouveaux aminoglycosides dérivés de la paromomycine en collaboration avec l'équipe du professeur Stephen Hanessian (Montréal). Deux premières structures, présentant une modification du groupement hydroxyle en 3'' du cycle III, ont été obtenues à une résolution de 2,6 Å. Ces deux structures ont été validées par quatre autres dérivés (résolutions de 1,8 à 2,8 Å) qui ont permis de tester de nouvelles modifications en 3'', de vérifier l'impact de déhydroxylations du cycle I et de substitutions en position 1 du cycle 2-DOS. Les données de diffraction pour trois autres complexes ont été indexées et leur affinement est en progrès.



## **CHAPITRE 2**

### **CRISTALLISATION DE COMPLEXES**

#### **AMINOGLYCOSIDES / SITE A**



## Chapitre 2

## Cristallisation de complexes aminoglycosides / site A

### **VI Publication 2 : méthodologie.**

En 2004, dans le cadre d'un livre de méthodologie dédié à la biochimie des acides nucléiques, notre laboratoire a rédigé un chapitre traitant de la cristallisation des ARN, étape par étape, de la conception de fragments d'ARN et leur purification jusqu'à la mise en œuvre de stratégies de cristallisation.<sup>2</sup> Les références bibliographiques incluses dans les publications n'ont pas été reprises dans le chapitre 6.

La deuxième partie de ce chapitre de thèse reprend et complète par des exemples, les différentes étapes qui ont conduit à la cristallisation de complexes aminoglycosides / site A bactérien et humain.

---

<sup>2</sup> *Preparation and Handling of RNA Crystals Chap 27.* **Boris François**, Aurélie Lescoute-Phillips, Andreas Werner and Benoît Masquida. *Handbook of RNA biochemistry Vol 1* Editors : R.K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schon, E. Westhof  
WILEY-VCH ISBN: 3-527-30826-1 Pub Date: 02, 2005

Edited by Roland Karl Hartmann,  
Albrecht Bindereif, Astrid Schön, Eric Westhof

 WILEY-VCH

# Handbook of RNA Biochemistry

Volume 1



## 27

### Preparation and Handling of RNA Crystals

Boris François, Aurélie Lescoute-Phillips, Andreas Werner and  
Benoît Masquida

#### 27.1

##### Introduction

The crystal structures of prokaryotic ribosomal subunits [1–3], as well as sequence analysis coupled to molecular modeling, have demonstrated that RNA structure is modular [4, 5]; in other words, it can be decomposed in individual building blocks (modules), recurrently found in various RNA molecules, that are assembled together to form the overall RNA fold.

Because ribosomal subunits are the most abundant native particles of a growing cell, there is no need to use *in vitro* transcription or chemical synthesis to overproduce them. This is crucial since it 'reduces' molecular handling to biochemical purification of native particles. However, in most cases, overproduction techniques are needed and the biochemist faces subsequent RNA folding or protein–ligand/RNA association problems, unless the RNA is rather short. This partly explains why small RNA structures can be solved fairly quickly, whereas RNAs beyond 100 nt require time-consuming biochemical characterization before successful crystallization. In fact, except ribosomal subunits, only three RNA structures over 100 nt have been solved to date [6–8]. Thus, the folding of individual RNA motifs is apparently easier to control than the whole assemblies they are part of. Consequently, the structure of these motifs can be studied individually. Here, we focus on intermediate-size RNA motifs either produced by *in vitro* transcription or chemical synthesis (below 50 nt) [9–12].

The motifs of interest are extracted from a large RNA assembly and sequences are designed in order to favor a unique secondary structure. This can be assessed by using *in silico* folding programs [13–15] and native PAGE techniques. When the RNA has a substrate, further biochemical characterization might be required. Then the fragments are either cloned and *in vitro* transcribed or chemically synthesized. In this chapter we describe experimental procedures routinely used in the laboratory to obtain highly pure RNA molecules suitable for crystallization studies. Once the RNA has been synthesized, it has to be purified and concentrated. The correct length product is separated from contaminants by gel electrophoresis and/or chro-

matography. The RNA is then eluted, concentrated and desalted. Folding assays are performed prior to crystal screening.

## 27.2 Design of Short RNA Constructs

RNA structures can be seen as assemblies built from a construction set consisting of building blocks of various shape and complexity which obey conservation rules at the level of sequence and structure. In order to understand RNA architecture, it is therefore necessary to elucidate the structure of these building blocks. To achieve this goal, the motifs are analyzed in their wild-type contexts and, after alignment of the sequences, designed so as to ensure that they will conserve their original structure. It is worth to note that the best situation is when the secondary structure is well supported by biochemical data and that the edges of the motif (5' and 3' ends) are well located. Attention should be given to the design process in order to increase the probability for the structure to adopt the wild-type conformation. The stability of the constructs can be evaluated using UV-melting techniques under various ionic strengths (see Chapter 25).

Design of short RNA constructs is greatly helped by *in silico* folding programs [13–16]. They allow for testing modifications of the secondary structure upon modifications of the various base pairs. This step is crucial because apparently insignificant events such as the reversal of a GC pair can sometimes have major implications. A second point to think about is that the RNA motif may not reveal any propensity to pack and consequently to grow crystals. To address this problem it is advised to design constructs exhibiting various edges producing different situations regarding length and sequence that would eventually be more favorable for crystal growth.

## 27.3 RNA Purification

RNA molecules can be purified either by PAGE or liquid chromatography (HPLC or FPLC). These methods can even be coupled to improve the results. While PAGE is applicable to any RNA length, HPLC is dedicated to RNA up to about 35 nt long, but the latter method is always useful to cleanse RNA preparations purified on gels. Routine techniques mentioned in this chapter are described in more detail in [17].

### 27.3.1 HPLC Purification

When the RNA oligonucleotide is shorter than around 35 nt, it can be purified using FPLC or HPLC techniques. The best results are obtained using salt gradients

Tab. 27.1. ■■■■

	<i>Buffer A</i>	<i>Buffer B</i>
MES	20 mM pH 6.2	20 mM pH 6.2
Urea	4 M	4 M
NaClO <sub>4</sub>	1 mM	400 mM

A sodium perchlorate gradient is run over 70 min from 15 to 70% buffer B with a 1 ml/h flow rate [MES: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid]. In the lab we run these gradient on a Dionex system equipped with a Nucleopac-PA-100 ( $0.45 \times 25 \times \pi \text{ mm}^3$ ) column. After a wash step at 90% buffer B, the column is re-equilibrated in 15% of buffer A to prepare the next run.

on anion exchange columns bearing quaternary amines like mono-Q matrices. HPLC presents the advantage that the column can be heated in an oven to temperatures up to 90 °C, thus promoting the unfolding of the RNA and increasing the retention time on the column for a better separation. The addition of chaotropic agents like urea or formamide enhances the effect of heating the sample. However, formamide should be used with caution in the presence of RNA. Heat leads to formamide decomposition into carbon monoxide and ammonia – the latter can very quickly hydrolyze the RNA preparation. In such denaturing conditions, the RNA mix is fractionated according to the size of the present species, close to what can be achieved using gel electrophoresis. A typical protocol is described in Table 27.1. Other HPLC purification procedures for RNA have been described elsewhere [18].

Several pitfalls should nonetheless be avoided. If the RNA has been produced by *in vitro* transcription, proteins should be removed by phenol/chloroform extraction. Otherwise the column bed may get coated with proteins and the column will lose its loading capacity over time. The sample should be assayed for precipitation by mixing with the highest salt buffer that is going to be used for separation to avoid clogging the HPLC. Since the sample is going to be heated, divalent ion contamination should be avoided. Hence, the  $pK_a$  value of the buffer should be in the acidic range so as to minimize spontaneous hydrolysis of phosphodiester bonds in the case of a contamination with divalent cations. To achieve this, we recommend to use PEEK (poly-ether-ether-ketone)-coated pumps as well as peek tubing.

### 27.3.2

#### Gel Electrophoresis

RNAs of any size (up to 500 nt) can be purified efficiently using PAGE under denaturing, semi-denaturing or native conditions. Various urea concentrations can be tried at an analytical scale before going to preparative scale in order to identify the most appropriate protocol. A sequencing electrophoresis apparatus with an aluminum back to homogenize the glass plates' temperature allowing the use of  $30 \times 40 \text{ cm}^2$  gel plates is recommended. The running temperature is usually set between

50 and 60 °C. Of course, the gel thickness has to be significantly increased when going to preparative scale (use at least 1.5-mm thick spacers) to well separate the RNAs of different length in the sample. The volume of gel to be prepared is thus around 250 ml.

The following equipment is needed to set up the experimental procedure:

- PAGE equipment: electrophoresis apparatus, siliconized glass plates (around  $30 \times 40 \text{ cm}^2$ ), comb and spacers (at least 1.5-mm thick).
- Acrylamide 20%/urea 8 M stock solution (made from 500 ml acrylamide-bisacrylamide 38% (w/v) acrylamide, 2% (w/v) *N,N'*-methylene bisacrylamide mixed with 480.5 g urea and Millipore water to give a volume of 1 l).
- $10 \times$  TBE (Tris–borate–EDTA buffer [17]).
- 8 M Urea solution.

Once a gel of the appropriate acrylamide percentage has been prepared (see [17]), the RNA solution to be fractionated is mixed with one volume of 8 M urea and then loaded onto the gel. The preparative gel electrophoresis usually requires a power value around 25 W. Progress of the migration is followed by the course of the bromophenol and xylene cyanol dyes loaded in a lane containing no RNA. At the end of the migration, glass plates are removed, the gel is wrapped in plastic film, and the RNA bands are visualized by UV shadowing using a UV lamp and a silica plate as a screen (see Chapter 3 for details).

### 27.3.3

#### RNA Recovery

The RNA contained in the visualized bands has to be eluted from the gel and concentrated before subsequent experiments. To achieve this goal, the bands are first delineated with an indelible marker on the plastic wrap. Then, they are cut out of the gel using a sterile scalpel blade.

##### 27.3.3.1 Elution of the RNA from the Gel

The oligoribonucleotides are recovered by passive elution at 4 °C in Millipore water. The gel is crushed in a mill (A11 basic analysis mill; IKA) and poured in a 50 ml polypropylene conical tube with water (around 30 ml of gel under preparative conditions). The RNA-containing tube is placed in a “rock & roll” stirrer at 4 °C overnight. Finally, the eluted RNA solution is filtered on a 0.22- $\mu\text{m}$  sterile filtration unit (Nalgene) to get rid of the acrylamide particles.

##### 27.3.3.2 Concentration and Desalting

Whatever the technique employed to purify the RNA, it is necessary to desalt and concentrate it prior to use in crystallization trials. A very efficient way of achieving this is to use reverse-phase Sep-Pak columns that can be used on the bench (Waters Sep-Pak C<sub>18</sub> Classic short-body). These are operated by gravity or using a syringe.

A classical protocol consists of the following steps:

- (1) Plug the column inlet to the luer of a 10 ml syringe and fix it to a bench stand.
- (2) Equilibrate the column using 10 ml of methanol.
- (3) Pass through 10 ml of Millipore water.
- (4) Load the sample.
- (5) Wash the sample with 10 ml of Millipore water.
- (6) Elute the sample with 5 ml of water/acetonitrile (1:4) in 1 ml fractions.

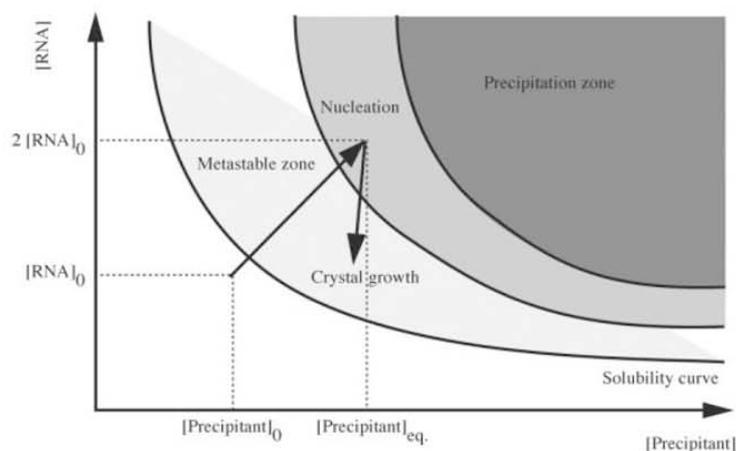
Three facts should be kept in mind when using Sep-Pak cartridges. The pH of the sample should not exceed 7 to guarantee efficient binding to the column bed. The loading step should not exceed 10 min to minimize loss of material due to driving by the mobile phase. If loading would take longer, the sample should be fractionated on more than one column. The column should never run dry to prevent the loss of the sample. Hence, the syringe luer should be removed with caution in intermediate steps. The next solution should be added when there is still a small volume (100  $\mu$ l) of the previous phase in the syringe.

The RNA-containing water/acetonitrile solution is then evaporated to dryness in a Speed Vac. The pellet can be resuspended in the solution of choice for further studies.

#### 27.4

##### Setting Crystal Screens for RNA

After purification of a sufficient amount of RNA, conditions for crystallization have to be found. An economical screening method should use the least possible amount of RNA. Therefore, it is recommended to start by screening a large number of combinations, and then switch to other methods to optimize crystal shape and size. For a broad general screen, specific crystallization sparse matrices for proteins or nucleic acids have been published [19–22] and some are commercially available ([www.hamptonresearch.com](http://www.hamptonresearch.com), [www.decode.com](http://www.decode.com), [www.nextalbiotech.com](http://www.nextalbiotech.com)). These have been designed based on extensive mining of previously published crystal-yielding conditions. Although the general considerations for crystal screens of proteins equally apply to RNA, some particularities have been identified. If no crystals have been obtained during the first trials, it is often more promising to vary the sequence instead of sampling a larger variety of combinations. In the crystallization process, sequence and shape of the molecules will drive the nucleation and subsequent crystal growth through a network of packing interactions mediated among symmetry-related molecules. Considering RNA, these factors have even more drastic effect than for proteins since the former are usually less globular in shape than the latter. Thus, various RNA constructs with different sequences and helix length, in other words with different shapes, should be tried when no crystals appear for a given construct [21, 23]. Chemical synthesis makes this process relatively straightforward for small RNAs (below 30 nt). Higher crystallization temper-



**Fig. 27.1.** Solubility diagram. During equilibration, the concentration of both precipitant and macromolecule increase until precipitation occurs. The formation of crystal nuclei reduces the amount of solvated macromolecule and allows the system to remain in the metastable zone where crystals can grow.

atures (37 °C) also seem to favor formation of RNA crystals. Finally, the choice of crystallization method (vapor diffusion or batch crystallization) may also influence the success.

Once suitable starting conditions have been found, the strategy consists of a rational variation of conditions. The crystallization process, as visualized in the phase diagram (Fig. 27.1), is influenced by numerous variables  $x_1, x_2, \dots$  (called *factors*), i.e. RNA sequence, crystallization temperature, buffer and pH, and kind and percentage of precipitant and salts. Each of these factors can be adjusted to different *levels* (for example, factor [LiCl] to 150 mM and factor [MPD] to 25%). In order to quantitate each observation (clear drop, precipitate, spherulites, microcrystals or crystals), an arbitrary score (*response*) is assigned to it and represented on a multi-dimensional *response surface*  $f(x_1, x_2, \dots)$ . The aim of the crystallization screen is to explore this surface (Fig. 27.2) where the expected summit would yield the optimal result (best crystals). Yet, in practice, only a limited number of all possible factor combinations can be tested. The simplest approach would be varying a single factor at a time, while keeping all others constant. While it is possible to reach the optimum by sheer luck, the response surface shows that the score will more likely converge to a plateau or local maximum. Furthermore, the results of each testing series cannot be generalized and interactions between different factors are neglected.

These problems are avoided using *experimental design*, where multiple factors are varied simultaneously between different crystallization trials. Each experiment  $n$  represents a combination  $C_n = (x_1, x_2, \dots, x_k)$  of  $k$  factors. For each combination,

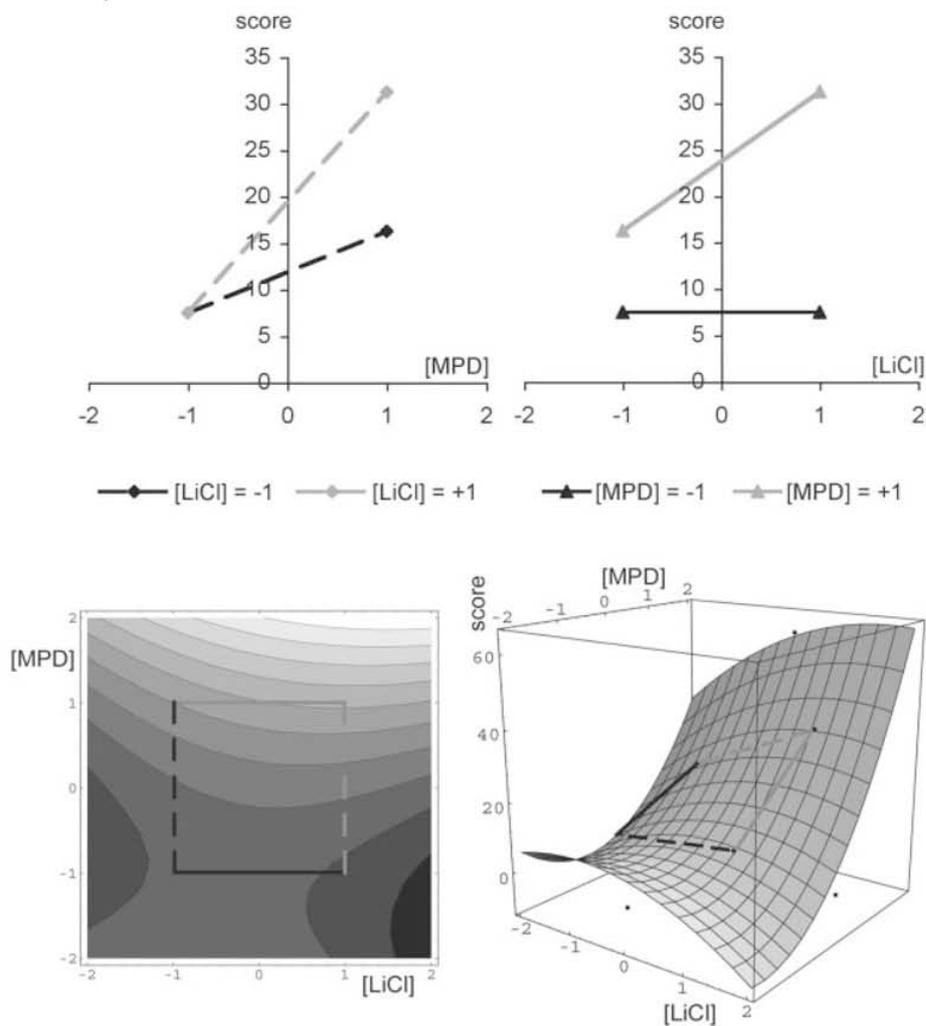


Fig. 27.2. (Top) Scoring of influence of two factors on crystal growth (see text, score in arbitrary units). (Bottom) response surface fitted to result, top view (left) and three-dimensional view (right).

multiple factors are changed simultaneously according to a predefined plan. A detailed exploration of this powerful technique is beyond the scope of this text and instead can be found in books on engineering statistics, or see references [24] and [25] for its application to crystallization. In general, at least two levels are defined for each factor at a chosen, equal distance around a central point, staking out a

well-balanced experimental space in which the response of the system (the quality of crystals) is noted. Rather than just trying out some extreme values, it is important to choose reasonable values within a well-known range to avoid veering towards some jagged region, or close to an asymptote. The different levels of each factor are coded in coefficients. In our two-factor example ( $k = 2$ ), both 50 mM/250 mM [LiCl] and 10%/40% MPD would be listed in an experimental design matrix and coded as  $+1/-1$ . Following scoring, the response surface spread out over all combinations indicates the direction where the best score is to be expected (Fig. 27.2). If  $k$  is not too large, one can also take into account possible interactions between factors. If factor  $x$  influences factor  $y$ , then the response surface  $f(x_1, x_2)$  is not only a polynomial of  $c_1 \cdot x_1$  and  $c_2 \cdot y_2$ , respectively, but the additional interaction term  $c_3 \cdot x_1 x_2$  also has to be considered. To help with the design process, several computer programs have been made available [26]. A number of different designs have been coined with the common goal of reducing the number of experiments without compromising the well-balanced exploration of the experimental space.

Initial screens can be distinguished between that are used to determine what factors are most important, and follow-up screens that allow optimization and improvement of crystal quality (Table 27.2). In experimental design, this is known

Tab. 27.2. Application of various experimental designs in crystallization.

Field of application	Experimental design	Factors and levels	No. of experiments	Comments
Initial screen: which factors are most important?	full 2-level factorial design	$k$ factors at 2 levels	$2^k$	accounts for interactions between factors, but too many experiments necessary if $k > 5$ factors
	incomplete 2-level factorial design		$2^{k-p}$	$p$ factors are confounded, effect of interactions cannot be evaluated, but less experiments necessary
	Plackett–Burman design		$k + 1$	greatly reduced number of experiments; interaction bias neglected
Optimization	steepest ascent	$k$ factors at 2 levels		follow-up on 2-level design: reduction of step size when approaching maximum
	central composite Box–Behnken; Hardin–Sloane	$k$ factors at 5 levels		follow-up on steepest ascent design, quadratic model, approach to optimum
	Randomized block designs	3–5 factors at 3–4 levels		one single factor of primary interest interaction bias neglected
	Simplex matrix	$k$ factors at 3 levels	initially $k + 1$	iterative triangulation towards optimum

as the “Box–Wilson strategy” [27]. The first group of screens is generally based on a so-called *factorial plan* which determines the polynomial coefficients of a function with  $k$  variables (factors) fitted to the response surface. It can be shown that the number of necessary experiments  $n$  increases with  $2^k$  if all interactions are taken into account. Instead of running an unrealistic large number of initial experiments, the full factorial matrix can be advantageously replaced by a fractional factorial matrix or a Plackett–Burman design [28]. Here, interactions between factors are partially or completely neglected. For example, if a multiplicative effect of salt concentration and MPD can be ruled out, the interaction between these factors can be neglected, thereby reducing the number of necessary experiments.

Based on the obtained response surface, a second round of optimization follows, using the *steepest ascent method* where the direction of the steepest slope indicates the position of the optimum. Alternatively, a quadratic model can be fitted around a region known to contain the optimum somewhere in the middle. This so-called *central composite design* contains an imbedded factorial design with center points, points at  $-1/+1$  and an additional group of outlying “star points”  $\alpha$  as upper and lower limits, which allows an estimation of the curvature (see Fig. 27.3 for an example with combinations of three factors). There are alternative designs, if the number of factors is small and optimization is the main goal. *Randomized block designs* (Latin Squares and Greco-Latin Squares) are useful if there is one main factor to consider. The design helps to separate it from the influence of *nuisance factors* that may affect the measured result, but are not of primary interest.

Finally, the simplex design has also been adopted for crystallization purposes [29]. This is an iterative approach starting with one more combination than factors under investigation. In an example with three factors at three equally spaced levels 0,  $p$  and  $q$ , the first set consists of combinations C0 (0, 0, 0), C1 ( $p$ ,  $q$ ,  $q$ ), C2 ( $q$ ,  $p$ ,  $q$ ) and C3 ( $q$ ,  $q$ ,  $p$ ) (Fig. 27.3). Combination C2 giving the worst result, it is replaced in the following round by combination C4 with coordinates exactly opposite to C2, where the mirror plane is defined by C0, C1 and C3. Comparing these

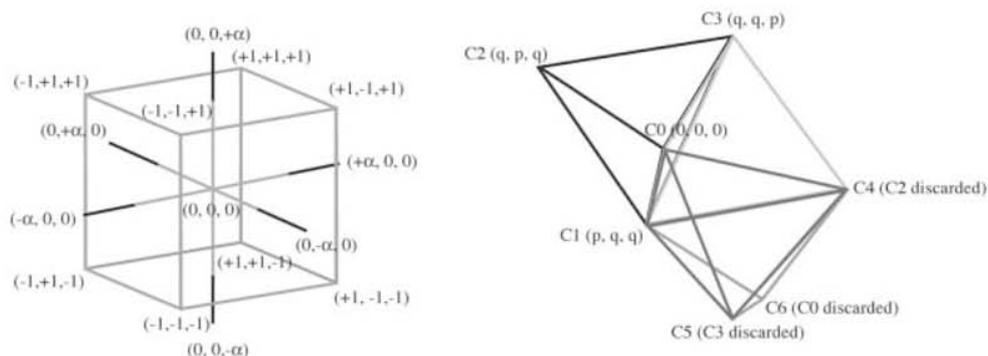


Fig. 27.3. Optimization designs. (Left) Centered composite design with three factors. (Right) Three factors optimized in four steps using a simplex design.

points with C4, the worst result is now C3 and therefore replaced by mirror point C5, and so forth. After several rounds of triangulation in the experimental space, the optimum is reached when no further improvements are observed. While multiple rounds of optimization are required, this extremely economical approach is especially useful when too little sample is available for extended factorial plans.

#### 27.4.1

##### **Renaturing the RNA**

Prior to setting up crystallization experiments, the concentrated RNA has to be properly folded in the native state. This is performed by a heating step in a heating-block for 1 min at 70–85 °C (depending on the melting temperature), in the presence of monovalent salts only. Then, the solution is left in the switched-off heating-block to cool down slowly until room temperature is reached. In order to avoid self-cleavage of the RNA, the pH is usually chosen slightly acidic, and divalent cations are added only around 35 °C.

#### 27.4.2

##### **Setting-up Crystal Screens**

The main technique employed to setup crystal screens is the vapor diffusion method either in the hanging drop or sitting drop setup. This method is based on slowly concentrating the droplet solution against a reservoir solution of infinite volume (milliliter scale) compared to the volume of the droplet (microlitre scale, see Fig. 27.1). The choice between the various plastic-ware commercially available will be driven by the amount of RNA sample and the number of crystallization conditions to be tested. Nowadays, more and more laboratories have the opportunity to use crystallization robots that permit to decrease the drop volume to hundreds of nanoliters and, with the same amount of material, to set up thousands of trays on very short time scales.

The different crystallization screens are set up by adding the biomolecule solution to the crystallization solution. Once a first hit has been obtained, one needs to optimize the conditions. In the example of the aminoglycoside/ribosomal A site complexes (see below), crystals were optimized using different crystallization solutions to test various glycerol/MPD ratios (see Table 27.3). All trials are done at 37 °C using the hanging drop vapor diffusion method: 1 µl of RNA-antibiotic complex solution is added to 1 µl crystallization solution and equilibrated over a reservoir containing 500 µl of 40% MPD.

#### 27.4.3

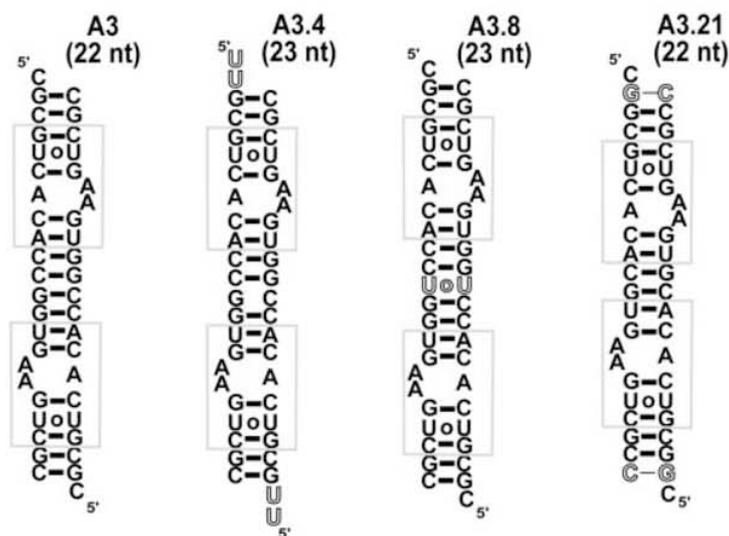
##### **Forming Complexes with Organic Ligands: The Example of Aminoglycosides**

RNA molecules bind various organic ligands. Different RNA fragments based on the *Escherichia coli* A site located in the penultimate helix of the 16S ribosomal RNA [10–12, 30] have been tested in the presence of their natural ligands, anti-

Tab. 27.3. Crystallization conditions testing various glycerol/MPD ratios.

Crystallization condition (reservoir)	1	2	3	4	5	6	
	<b>Stock</b>						
MPD (%)	60	1	2	2	2	1.5	2
Glycerol (%)	100	5	4	2	1.5	1	1
Na cacodylate pH 6.4 (M)	0.85	0.05					
KCl (M)	3	0.15					
Glycerol/MPD ratio	5	2	1	0.75	0.67	0.5	

biotics of the aminoglycoside family. The RNA construct was designed as a self-complementary oligonucleotide so as to incorporate two A sites in a head-to-head manner (Fig. 27.4). This choice eliminates two drawbacks. First, since the internal loop is asymmetric, one would otherwise need to synthesize, purify and mix 1:1 two different RNA strands in order to obtain a single site. Second, one could also use a single site capped by a stable hairpin of the GNRA family, for example. However, in such cases, it is frequently observed that the crystallized structure reveals a full duplex with several non-Watson–Crick pairs [31]. In order to monitor the effect

Fig. 27.4. Four self-complementary RNA fragments containing a tandem array of two *E. coli* 16S ribosomal A site modules.

of sequence variations for the crystallization of these complexes, various modifications have been performed such as addition of a 5' UU overhang, insertion of a UU pair or moving the two A sites closer to one another (Fig. 27.4).

Routinely, the purified oligoribonucleotides are solubilized in a solution containing 2 mM RNA, 25 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub> and 100 mM sodium cacodylate buffer, pH 6.4. This solution is first heated to 85 °C for 2 min and then slowly cooled until a temperature of 37 °C is reached. One volume of a 4 mM aminoglycoside solution is added to the RNA solution and incubated for 2 h at 21 °C. The two solutions should be at the same temperature. Since the RNA fragments contain two antibiotic-binding sites, the aminoglycoside concentration is twice the RNA concentration. A general rule is that the organic ligand concentration should be 100 times higher than its dissociation constant ( $K_D$ ) to ensure binding site saturation which is usually easily achieved in the millimolar range.

In the example of the aminoglycoside/A Site complexes, different crystallization solutions were prepared to test various glycerol/MPD ratios: 5, 2, 1, 0.75, 0.67 and 0.5 (Table 27.3). All trials are performed at the optimal temperature of 37 °C using the vapor diffusion method in the hanging drop setup: 1 µl RNA-antibiotic complex solution is added to 1 µl crystallization solution and equilibrated over a 40% MPD reservoir.

#### 27.4.4

##### Evaluate Screening Results

Since first crystallization attempts will not automatically yield crystals or they may be of too poor quality for X-ray diffraction experiments, evaluating screening results is required prior to proceed to crystallization optimization. This is performed by using a binocular microscope hooked up to a digital camera to record observations. A numerical scoring value describing the content of the droplet (Fig. 27.5) is reported on a paper scoring sheet (Table 27.4).

Two weeks are enough for droplets of about 3 µl to equilibrate under any conditions [32]. During this period, droplets should be inspected daily to follow up the appearance of crystals. Crystals may still form after 2 weeks, but this is less likely in the case of oligonucleotides. Crystals can then be cryo-protected and frozen or capillary mounted to be tested.

#### 27.4.5

##### The Optimization Process

Here are provided non-exhaustive guidelines to interpret the droplet content of crystallization screenings (Table 27.4) and possible ways to optimize positive hits. See also [33] for more details.

- *Clear drops* – indicates that the RNA supersaturation state has not been reached, the RNA concentration is outside the nucleation zone (Fig. 27.1). These experi-

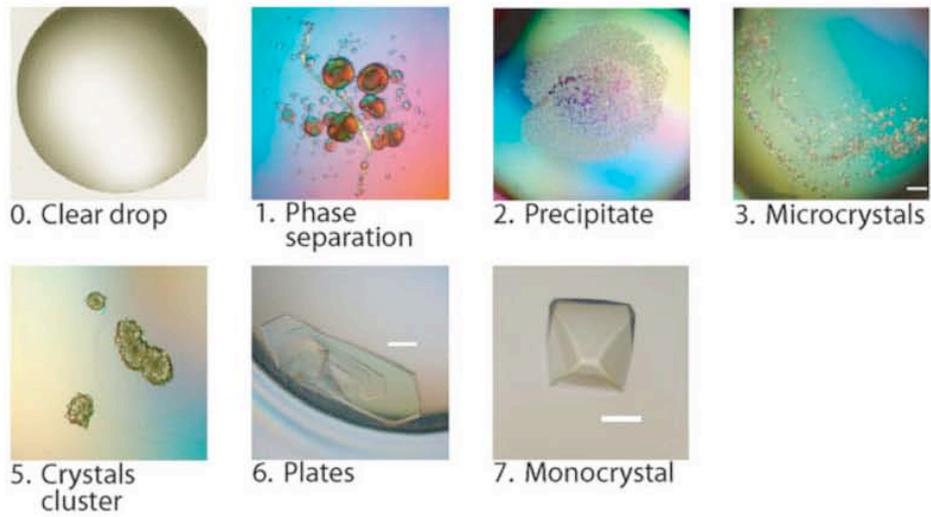


Fig. 27.5. Numerical scoring terms.

Tab. 27.4. Scoring sheet for rows A and B from a 24-well LINBRO crystallization plate.

CRYSTALLIZATION PLATE NUMBER: _____										
SAMPLE & ADDITIVES: _____										
DATE OF SETTING: _____										
TEMPERATURE: _____										
<b>DATE</b>										
<b>A</b>	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
<b>B</b>	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									

ments must be repeated with higher sample and/or salt concentrations. The temperature can also be lowered.

- *Phase separation* – indicates a need to increase the monovalent salt concentration and/or to test a smaller precipitant concentration (MPD, PEG) to make the RNA sample more soluble.
- *Light precipitates* – indicates that the relative supersaturation between sample and reagent is too high. Prepare new tests with a decreased RNA and/or precipitant concentration or dilute the droplet by vapor diffusion by adding water into the reservoir.
- *Strong precipitates* – indicates that the sample has been partially denatured. The sample must be tested at a lower concentration or less salt should be used. Note that a fresh test should be prepared in this case.
- *Small precipitates* – must be carefully inspected using polarized light because it may contain a microcrystalline shower. A microscope with a magnification factor greater than 100-fold can be useful in this case.
- *Cluster of homogenous crystals* – try to slow down the nucleation; test the conditions at lower temperature, cover the reservoir solution with oil to slow down the water diffusion.

Different parameters can be tested to optimize the growth of single monocrystals: salt type, additives, temperature. Finally, if no crystal can be obtained with a given construct, new RNA sequences have to be designed so as to provide new potential scaffoldings to help crystal packing.

## 27.5 Conclusions

Protocols to purify and concentrate large amounts of RNA under controlled buffer and salt conditions for crystallization experiments have been described. The crucial points to preserve the RNA sample are: the use of slightly acidic pH and the avoidance of divalent cations. Usually RNases, feared by most RNA scientists, are introduced into the solution by an upstream experiment such as plasmid and protein preparations (e.g. T7 RNA polymerase). It is, thus, strictly recommended to assess the RNase activity of a solution before using it on the whole RNA sample by incubating an aliquot in the presence of the RNA for few hours and check the extent of the digestion by PAGE. Then strategies to crystallize RNA oligonucleotides in the presence or absence of ligands have been presented. A peculiarity of crystallization experiments is the absence of a negative control. To circumvent this, we advise to attempt to crystallize simultaneously several related RNA sequences in the same well. Only one or few RNAs, if any, will crystallize if any, leading to the conclusion that RNA crystals instead of salt crystals have been obtained. In cases where no crystal is observed, it is recommended to design a new set of oligonucleotides bearing slight sequence changes in order to enhance interactions between symmetry-related molecules that lead to regular crystal packing interactions.

## References

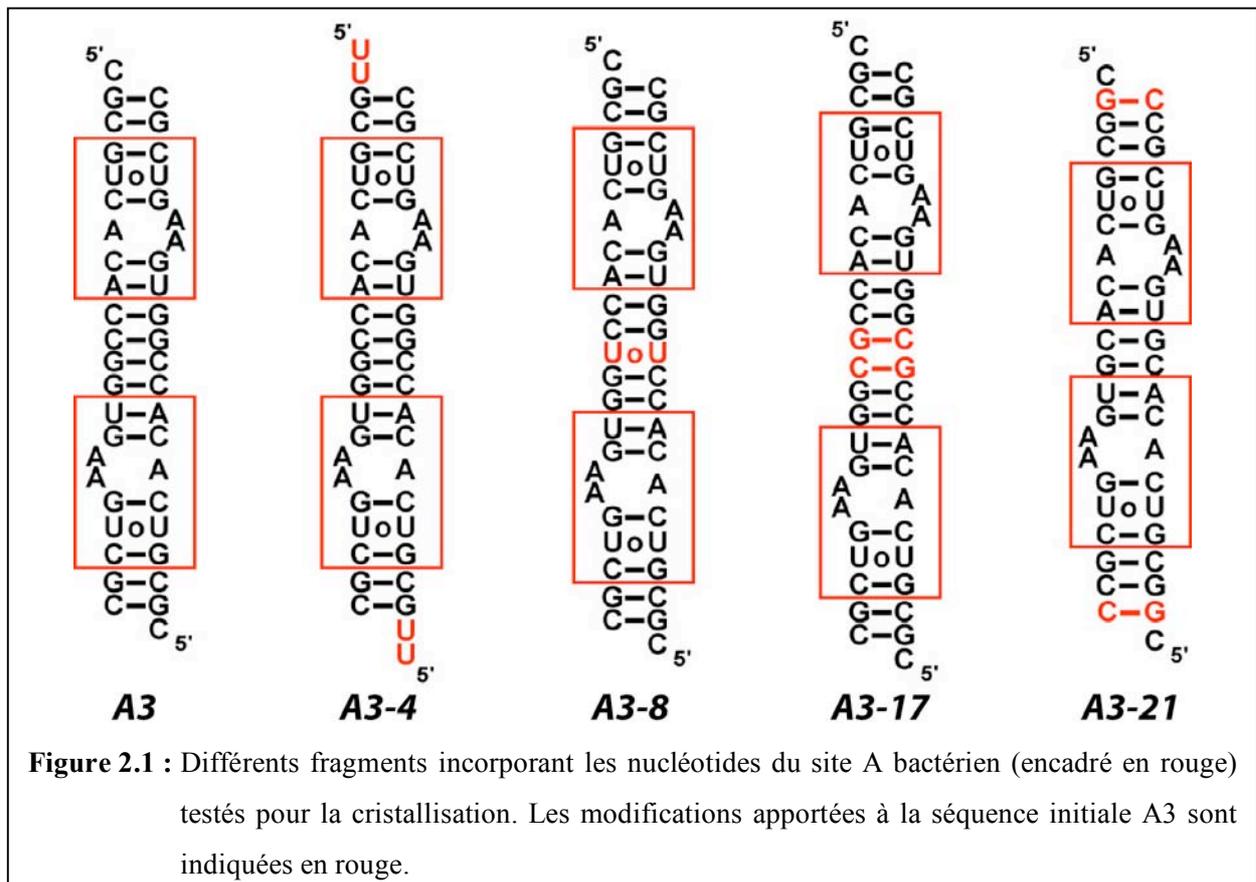
- 1 N. BAN, P. NISSEN, J. HANSEN, P. B. MOORE, T. A. STEITZ, *Science* **2000**, *289*, 905–920.
- 2 W. M. CLEMONS, JR, D. E. BRODERSEN, J. P. McCUTCHEON, J. L. MAY, A. P. CARTER, R. J. MORGAN-WARREN, B. T. WIMBERLY, V. RAMAKRISHNAN, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 827–843.
- 3 M. M. YUSUPOV, G. Z. YUSUPOVA, A. BAUCOM, K. LIEBERMAN, T. N. EARNEST, J. H. CATE, H. F. NOLLER, *Science* **2001**, *292*, 883–896.
- 4 N. B. LEONTIS, J. STOMBAUGH, E. WESTHOF, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3497–3531.
- 5 N. B. LEONTIS, J. STOMBAUGH, E. WESTHOF, *Biochimie* **2002**, *84*, 961–973.
- 6 J. H. CATE, A. R. GOODING, E. PODELL, K. ZHOU, B. L. GOLDEN, C. E. KUNDROT, T. R. CECH, J. A. DOUDNA, *Science* **1996**, *273*, 1678–1684.
- 7 B. L. GOLDEN, A. R. GOODING, E. R. PODELL, T. R. CECH, *Science* **1998**, *282*, 259–264.
- 8 A. S. KRASILNIKOV, X. YANG, T. PAN, A. MONDRAGON, *Nature* **2003**, *421*, 760–764.
- 9 B. MASQUIDA, C. SAUTER, E. WESTHOF, *RNA* **1999**, *5*, 1384–1395.
- 10 Q. VICENS, E. WESTHOF, *Structure* **2001**, *9*, 647–658.
- 11 Q. VICENS, E. WESTHOF, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 747–755.
- 12 Q. VICENS, E. WESTHOF, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1175–1188.
- 13 M. ZUKER, A. B. JACOBSON, *RNA* **1998**, *4*, 669–679.
- 14 H. ISAMBERT, E. D. SIGGIA, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6515–6520.
- 15 Y. DING, C. E. LAWRENCE, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 7280–7301.
- 16 M. ZUKER, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415.
- 17 J. SAMBROOK, D. W. RUSSELL, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **2001**.
- 18 A. C. ANDERSON, S. A. SCARINGE, B. E. EARP, C. A. FREDERICK, *RNA* **1996**, *2*, 110–117.
- 19 J. A. DOUDNA, C. GROSSHANS, A. GOODING, C. E. KUNDROT, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7829–7833.
- 20 I. BERGER, C. H. KANG, N. SINHA, M. WOLTERS, A. RICH, *Acta. Crystallogr. D* **1996**, *52*, 465–468.
- 21 W. G. SCOTT, J. T. FINCH, R. GRENFELL, J. FOGG, T. SMITH, M. J. GAIT, A. KLUG, *J. Mol. Biol.* **1995**, *250*, 327–332.
- 22 J. H. CATE, J. A. DOUDNA, *Methods Mol. Biol.* **1997**, *74*, 379–386.
- 23 A. C. ANDERSON, B. E. EARP, C. A. FREDERICK, *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 696–703.
- 24 H. PETERSEN, *Grundlagen der Statistik und der statistischen Versuchsplanung*. Ecomed, Landsberg/Lech, **1991**.
- 25 C. W. J. CARTER, in: *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*, 2nd edn, A. DUCRUIX, R. GIEGÉ (eds), IRL Press, Oxford, **1999**, pp. 75–120.
- 26 C. D. POTTER, *The Scientist* **1994**, *8*, 18.
- 27 G. E. P. BOX, W. G. HUNTER, J. S. HUNTER, *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*, Wiley, New York, **1978**.
- 28 R. L. PLACKETT, J. P. BURMAN, *Biometrika* **1946**, *33*, 305–325.
- 29 B. D. PRATER, S. C. TULLER, L. J. WILSON, *J. Crystal Growth* **1999**, *196*, 674–684.
- 30 F. WALTER, Q. VICENS, E. WESTHOF, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 694–704.
- 31 V. KACER, S. A. SCARINGE, J. N. SCARSDALE, J. P. RIFE, *Acta. Crystallogr. D* **2003**, *59*, 423–432.
- 32 V. MIKOL, J.-L. RODEAU, R. GIEGÉ, *Anal. Biochem.* **1990**, *186*, 332–339.
- 33 A. DUCRUIX, R. GIEGÉ, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*, 2nd edn, IRL Press, Oxford, **1999**.



## VII Préparation d'oligoribonucléotides contenant le site A.

Les séquences d'oligoribonucléotides contenant le site A et utilisées pour les expériences de cristallisation ont été sélectionnées par Quentin Vicens lors de son doctorat. Ces oligoribonucléotides, formés de deux brins identiques, s'apparient pour constituer deux sites A. Les différentes séries testées comportent toutes les nucléotides constitutifs du site A, et ne diffèrent que par leur longueur (de 21 à 24 nucléotides), la nature de la partie centrale du duplexe (paires G=C ou G=C et paire UoU) et la nature de l'extrémité 5' utilisée (C5' ou UU5') (figure 2.1).

Les variations dans la longueur des fragments modifient le positionnement relatif des adénines 1492 et 1493 des deux sites A du duplexe l'un par rapport à l'autre, et influent sur l'empilement cristallin des complexes aminoglycosides / ARN. Le rôle des extrémités 5' est plus difficile à justifier car ces nucléotides n'apparaissent pas dans les structures cristallographiques obtenues. Les essais de cristallisation présentés par la suite montreront de manière empirique que ces extrémités sont importantes dans le processus de nucléation des complexes.



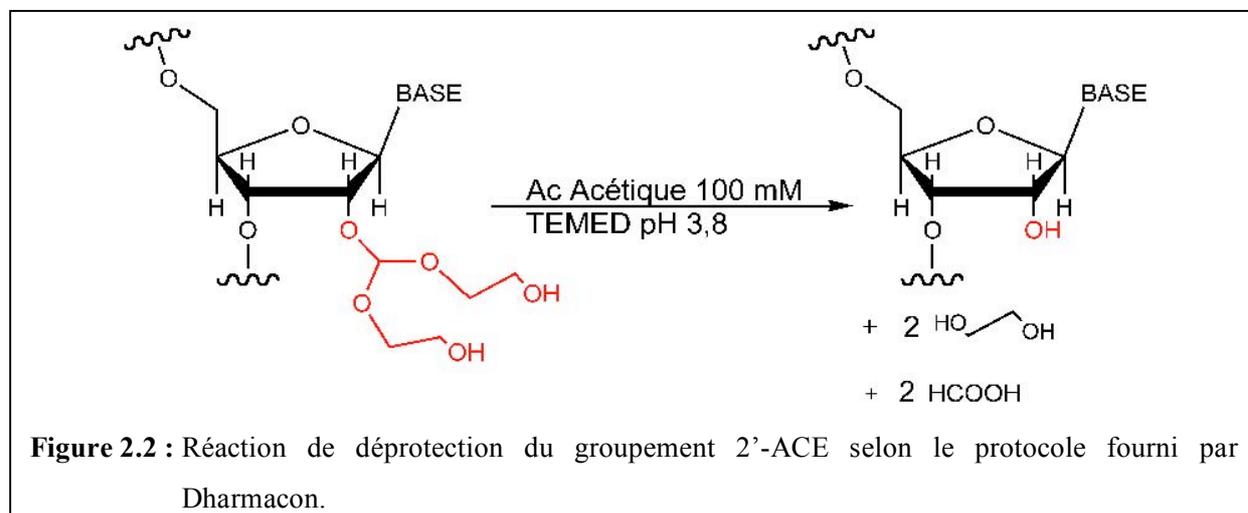
Tous les ARN utilisés lors de mes travaux ont été synthétisés par Dharmacon Research Inc. ([www.dharmacon.com](http://www.dharmacon.com)) selon une méthode de synthèse chimique sur support solide, et fournis avec une protection 2'-ACE (2'-bis-(acétoxyéthoxy)-méthyle éther) (Scaringe 2001) afin de limiter les risques de dégradation de l'ARN. La préparation des solutions stock d'ARN nécessite plusieurs étapes : déprotection de la fonction hydroxyle en 2', puis purification du fragment d'intérêt par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou par HPLC, dessalage et enfin dosage final.

## Déprotection

La déprotection se fait par hydrolyse en milieu acide selon le protocole établi par Dharmacon : 400  $\mu$ l de tampon commercial (acide acétique 100 mM, TEMED pH 3,8) sont ajoutés à chaque tube d'ARN fourni (contenant approximativement 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 2.2), sont évaporés sous vide puis les culots d'oligoribonucléotides sont solubilisés dans 30  $\mu$ l d'urée 8 M dans le cas d'une séparation sur gel PAGE et 450  $\mu$ l d'urée 8 M dans le cas d'une purification par HPLC préparative.

## Electrophorèse préparative sur gel dénaturant

Les gels sont préparés à partir d'un tampon acrylamide 20 % : 280 ml de tampon acrylamide / bisacrylamide (19 : 1) / urée 8 M, 14 ml de tampon commercial TBE 10X (tris 890 mM, acide borique 890 mM, EDTA 20 mM pH 8,3 Qbiogene<sup>®</sup>), 0,5 % d'ammonium peroxodisulfate (APS, Merck<sup>®</sup>) et 0,3 % de tétraméthyléthylènediamine (TEMED, Sigma<sup>®</sup>).



Chaque puits est rincé à l'aide de tampon de migration (TBE 0,5 X pH 8,3), puis les ARN dénaturés sont déposés. Les témoins de migration utilisés, le bleu de bromophénol et le xylène cyanol, migrent respectivement comme des fragments de 8 et 28 nucléotides pour une teneur en acrylamide de 20 %, permettant de repérer la migration des échantillons comportant 22 à 24 nucléotides. Après migration pendant 4h à 50 W, le gel est démoulé et l'ARN visualisé sous éclairage UV à 260 nm.

### **Extraction et précipitation de l'ARN**

La bande correspondant à l'ARN est découpée, broyée à l'aide d'un broyeur électrique ika A11 (<http://www.ika.net>), recouverte de 4 ml de tampon d'élution (NaCl 200 mM, tris pH 7,5 10 mM, Na EDTA 0,5 mM) et soumise à une agitation mécanique pendant 15h à 4°C. Le tampon est renouvelé une fois. Après élution, le tampon contenant l'ARN est récupéré à l'aide d'une unité de filtration stérile Nalgène® possédant un seuil de filtration à 0,2 µm. Le filtre est ensuite rincé avec 1 ml d'eau milliQ. Le filtrat est précipité à - 20°C par ajout de 100 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 2,5 fois son volume d'éthanol pur. Après homogénéisation, le mélange est placé 2h à - 20°C puis centrifugé pendant 30 minutes à 8000 rpm à 4°C. Le culot d'ARN est rincé deux fois avec une solution d'éthanol à 95 %, avant d'être évaporé sous vide puis resolubilisé dans 100 µl d'eau milliQ.

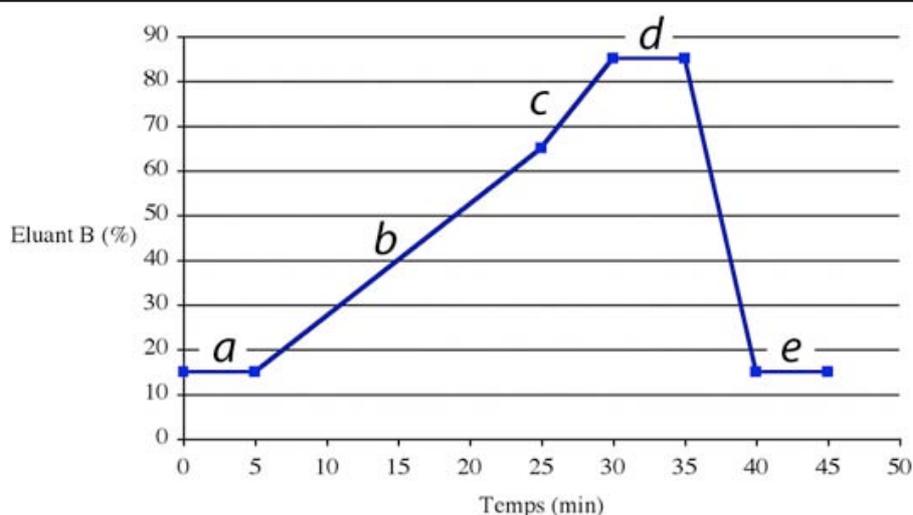
### **Purification par HPLC préparative**

L'appareillage HPLC Dionex® (<http://www.dionex.com>) utilisé est constitué d'une pompe à gradient GP50, d'un détecteur d'absorbance AD20 et d'une colonne DNA PAC 100 (0,45 x 25 x π mm<sup>3</sup>) échangeuse d'anions (billes de résine fonctionnalisées par des groupements ammonium quaternaire). La colonne est maintenue à 55°C à l'aide d'un four CROCO-CIL®. Les logiciels de gestion et d'analyse des données sont Peak Net Run et Peak Net 5.11 1999 (Dionex® Corp).

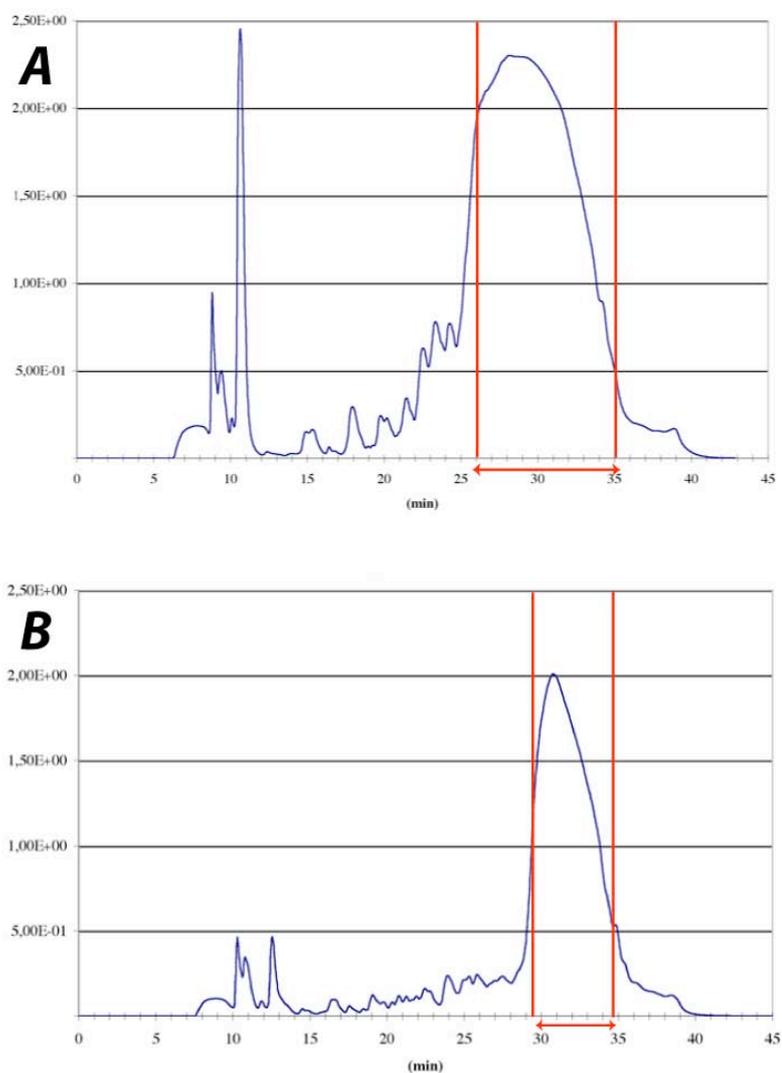
La méthode emploie un gradient court de perchlorate de sodium (Figure 2.3) : une solution A (NaClO<sub>4</sub> 1 mM, urée 8 M, acétonitrile 10 %, Mes pH 6,5 20 mM) est progressivement remplacée par une solution B (NaClO<sub>4</sub> 400 mM, urée 8 M, acétonitrile 10 %, Mes pH 6,5 20 mM) qui passe ainsi de 15 à 75 % en 30 minutes. L'urée des deux tampons se dégrade dans le temps et ces derniers atteignent alors des pH basiques lorsqu'ils sont chauffés. Il est donc prudent de préparer des solutions avant chaque expérience ou de contrôler leur « fraîcheur » en mesurant leur pH.

Les oligoribonucléotides déprotégés en solution dans l'urée 8 M sont chauffés à 80°C avant leur injection dans la colonne HPLC. Cette étape permet de s'assurer de la bonne dénaturation des fragments et évite de trop chauffer la colonne limitant ainsi son usure prématurée (la qualité de la séparation est directement dépendante du bon état de la colonne). En l'absence de chauffage, le profil des ARN est beaucoup moins « lisse » et le pic principal a un aspect dédoublé. Une vérification des composants ARN de ces deux pics par spectrographie de masse a démontré qu'il s'agit du même fragment. Cette manœuvre de dénaturation présente un inconvénient minime : la présence d'un pic d'injection sur le chromatogramme (figure 2.4).

Le débit habituellement utilisé est de 1 ml / minute. Environ 20 minutes après injection, dès l'augmentation de l'A260, des fractions de 1 ml sont collectées en sortie de colonne. Celles-ci ne seront rassemblées en une fraction unique qu'en fin de gradient, avant l'étape de dessalage. La figure 2.4 présente le profil chromatographique de deux fragments (A3 et A3mut) et la sélection des fractions qui seront conservées est présentée en rouge.



**Figure 2.3** : Profil du gradient utilisé en HPLC préparative, seul le pourcentage de l'éluant B est mentionné en ordonnée. (a) phase initiale (b) gradient d'éluant (c) gradient d'éluant plus rapide (d) nettoyage de la colonne (e) retour à la phase initiale.



**Figure 2.4** : Chromatogrammes préparatifs de deux oligoribonucléotides A3 (**A**) et A3mut (**B**). Les échelles de synthèse sont respectivement de 1  $\mu$ mole et 0,4  $\mu$ mole. L' $A_{260}$  figure en ordonnée, le temps (en minutes) figure en abscisse. Les fractions conservées sont indiquées en rouge.

### Dessalage des oligoribonucléotides

Cette étape permet d'éliminer les sels apportés par les tampons de HPLC ou de migration. Pour cela une chromatographie à phase inverse utilisant des colonnes Sep-pak C18 (<http://www.waters.com>) est mise en œuvre. Les colonnes sont équilibrées avec 10 ml de méthanol, puis rincées avec le même volume d'eau milliQ en prenant garde d'éviter la formation d'une bulle d'air à l'interface des deux liquides. L'échantillon d'ARN, dont le

volume ne doit pas excéder 10 ml, est préalablement acidifié par ajout de tampon MES pH 6,5 (qsp 50 mM) puis déposé sur la colonne. Après élution, 10 ml d'eau milliQ sont utilisés pour rincer tous les sels et autres contaminants non retenus par les domaines hydrophobes. L'élution de l'ARN se fait avec 5 ml d'une solution aqueuse d'acétonitrile à 80 % v/v et 5 fractions d'1 ml sont collectées puis évaporées à sec afin d'éliminer toute trace de solvant.

### **Dosage de l'ARN**

Le résultat quantitatif de la purification s'obtient par mesure de l'absorbance de chaque échantillon à 260 nm et application de la loi de Beer Lambert. Les coefficients d'extinction molaire de chaque séquence sont fournis par Dharmacon. Les échantillons sont évaporés puis resolubilisés dans l'eau milliQ afin d'obtenir des solutions stock de concentrations bien définies (entre 5 et 7 mM).

### **Rendements de purification**

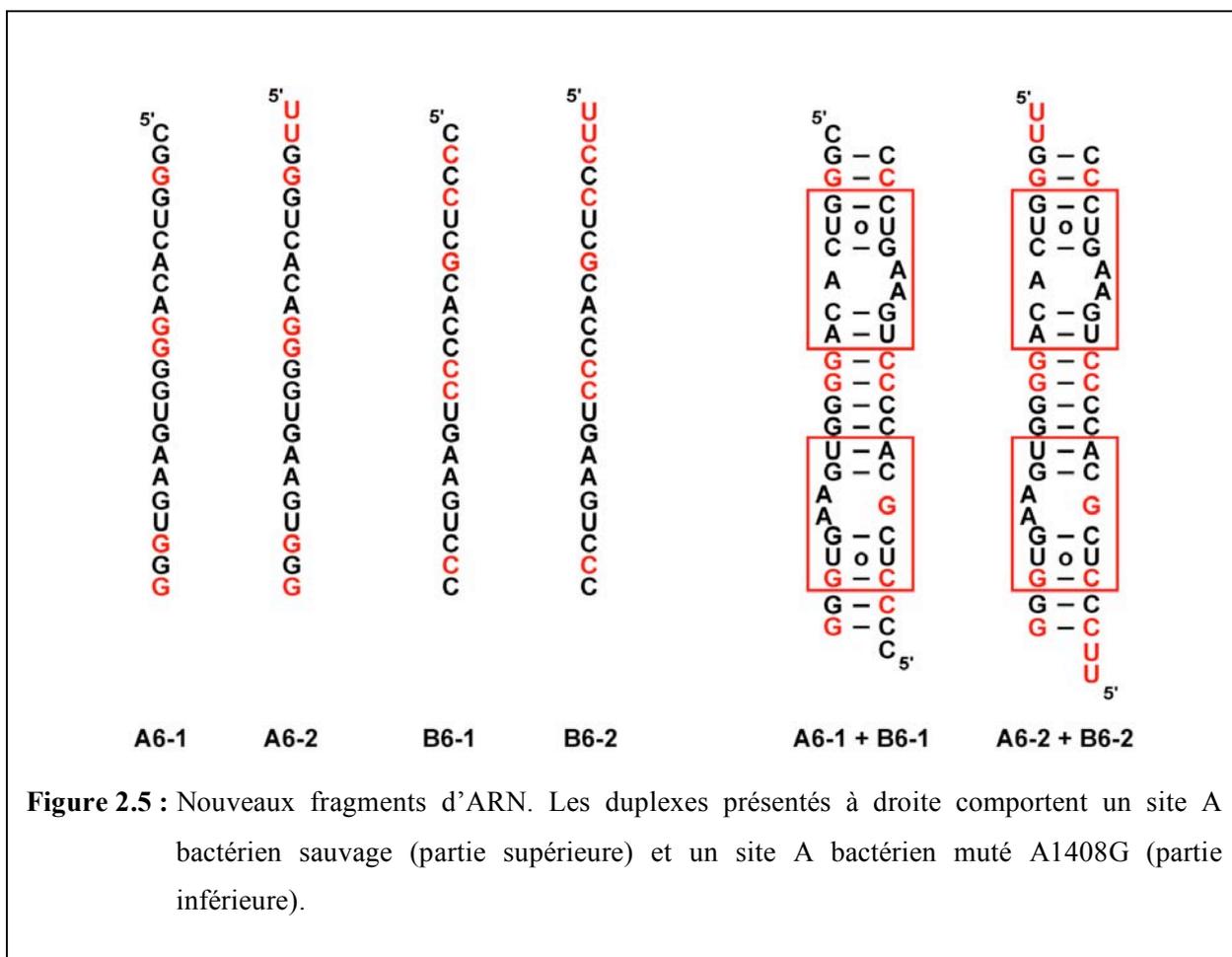
A mon arrivée en thèse, les ARN étaient séparés sur gel PAGE, les bandes étaient broyées manuellement et après extraction, les fragments étaient dessalés par précipitation éthanolique. Le rendement moyen était d'environ 25-30 %. L'ajout d'un broyage mécanique, qui permet d'extraire plus d'ARN du réseau de polyacrylamide, et d'une étape de dessalage sur colonne Sep-pak, qui évite les risques de perte lors des rinçages à l'éthanol, ont permis de porter ce rendement à 35 %. Les meilleurs résultats de purification ont été finalement obtenus en employant une séparation par HPLC suivie d'un dessalage sur Sep-pak, le rendement avoisinant alors les 40-45 %. Ce protocole est désormais employé en routine.

### **Conception de nouvelles séquences**

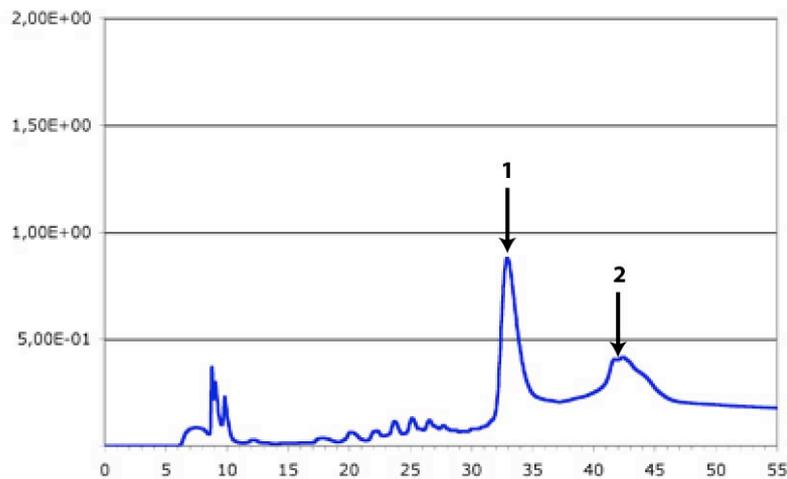
De nouvelles séquences ont été élaborées afin de tester certaines des mutations d'intérêt qui affectent le site A bactérien rendant les souches porteuses résistantes aux aminoglycosides ; c'est le cas par exemple de la mutation A1408G. Le remplacement de l'adénine 1408 par une guanine dans les deux sites A risque cependant de rendre la cristallisation des complexes difficiles. En effet, si l'affinité des aminoglycosides pour le site A muté est moindre, la probabilité de voir un antibiotique bloquer les adénines 1492 et 1493 à l'extérieur de l'hélice diminue, ce qui défavorise l'empilement cristallin. Pour conserver une partie des contacts intermoléculaires dans le cristal, une solution simple

consiste à ne modifier qu'un seul site A bactérien à la fois. Pour cela il a fallu repenser de nouvelles paires de fragments d'ARN, qui en s'appariant génèrent un site A bactérien sauvage et un site A bactérien porteur de la mutation A1408G. La structure secondaire de ces fragments d'ARN a été calculée à l'aide du logiciel mfold 3.1 développé par Zuker et Turner (Zuker 2003) et utilisé en ligne sur le serveur <http://www.bioinfo.rpi.edu/>. Les quatre fragments sélectionnés (figure 2.5) ont été commandés chez Dharmacon avec une échelle de synthèse de 0,4  $\mu\text{mol}$ .

Le protocole de purification combinant HPLC et colonne Sep-pak a été appliqué aux fragments A6-1 et B6-1 mais plusieurs problèmes inhérents à ces nouvelles séquences sont apparus. Les chromatogrammes HPLC (figure 2.6) ont présenté un dédoublement des pics dans la zone d'éluion du fragment : un premier pic très important (1) suivi 10 minutes plus tard d'un second pic (2) de moindre importance et ce malgré les conditions très dénaturantes employées (60°C et urée 8 M). Le spectre de masse de ces deux pics a révélé une composition identique conforme à la masse attendue pour l'oligoribonucléotide.



**Figure 2.5 :** Nouveaux fragments d'ARN. Les duplexes présentés à droite comportent un site A bactérien sauvage (partie supérieure) et un site A bactérien muté A1408G (partie inférieure).



**Figure 2.6 :** Chromatogramme en HPLC préparative d'un nouveau fragment riche en G et C présentant deux pics d'éluion (1) et (2).

Cependant, il a été décidé de ne conserver que le plus important des deux pics (1). Lors de l'étape de dessalage de l'ARN sur colonne Sep-pak, les fragments ont présenté une très mauvaise rétention sur colonne et il y a vraisemblablement eu de grosses pertes de matériel lors de l'étape de rinçage à l'eau milliQ. Les rendements finaux de purification obtenus ont été très médiocres. Une explication possible à ces comportements serait la formation d'appariements quadruples entre G et C de plusieurs fragments malgré les conditions dénaturantes. De plus, les parties centrales des fragments sont des domaines riches en G ou C qui induisent la formation de zones hydrophobes incompatibles avec la résine C18 d'où la mauvaise rétention des oligoribonucléotides sur les colonnes Sep-pak.

La purification des fragments A6-2 et B6-2 a été réalisée selon le protocole de chromatographie sur gel PAGE. La bande du premier gel contenant A6-2 est bien définie, mais le second gel contenant B6-2 présente une bande d'intérêt fine suivie d'une série de bandes très fines espacées de manière très régulière et correspondant vraisemblablement aux produits d'une dégradation de l'ARN. Les quantités finales à l'issue des deux purifications n'ont pas été suffisantes pour permettre des essais de cristallisation.

## **VIII Mise en œuvre des essais de cristallisation**

### **A. Préparation des complexes aminoglycosides / sites A**

La première étape dans la mise en œuvre des essais de cristallisation est la préparation des solutions stock d'aminoglycosides qu'ils soient naturels ou chimiquement modifiés. Ces substances sont très bien solubles dans l'eau milliQ jusqu'à une concentration de 50 mM, les solutions obtenues ont généralement une coloration jaune.

Les solutions ont toutes été préparées à une concentration stock de 30 mM dans de l'eau milliQ puis filtrées à 0,22 µm pour éviter toute contamination. A partir de ces stocks, une seconde série de solutions à 4 mM a été préparée contenant un tampon légèrement acide et des sels (composition présentée dans la table 2.1).

- Pour assurer un bon repliement des ARN lors de la formation des duplexes, le protocole suivant de renaturation a été employé :
- préparation d'une solution d'ARN contenant 2 mM d'oligoribonucléotides, 25 mM de NaCl, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> et 100 mM de tampon Na cacodylate pH 6,4 (table 2.1).
- chauffage de la solution à 75-80°C pendant deux minutes,
- lent refroidissement jusqu'à 37°C,
- ajout de la solution d'aminoglycoside à 4 mM, préalablement chauffée à 37°C, de sorte à avoir un ratio ARN / aminoglycoside minimal de 1 : 2,
- incubation du complexe pendant trois minutes à 37°C,
- lent refroidissement jusqu'à température ambiante pour la mise en œuvre des essais de cristallisation.

Ce protocole permet d'éviter l'apparition de précipités lors de la formation du complexe. La composition de la solution de renaturation de l'ARN a fait l'objet de variations : modification de la nature des sels (concentration plus élevée en MgCl<sub>2</sub>) ou ajout de polyamines (spermine, spermidine ou thermine) pour tester leur impact sur la cristallisation de l'ARN (en présence ou non d'aminoglycoside).

**Table 2.1 :** Composition des solutions d'aminoglycosides (*A*) et des solutions de renaturation des ARN (*B*).

<b>A</b>	Stock (M)	Concentration finale (mM)
Aminoglycoside	0,030	4
NaCl	2,500	25
Tris Na Cacodylate pH 6,4	0,850	100

<b>B</b>	Stock (M)	Concentration finale (mM)
ARN	0,007	2
MgSO <sub>4</sub>	0,050	5
NaCl	0,250	25
Tris Na Cacodylate pH 6,4	0,850	100

## **B. « Criblage » des conditions de cristallisation**

### **B.1) Techniques employées**

La principale technique mise en oeuvre a été celle de la goutte suspendue : les premiers essais de cristallisation ont été effectués manuellement en employant des boîtes Limbro 24 puits avec lamelles en verre silanisées de chez Hampton Research® (<http://www.hamptonresearch.com>). Ces boîtes ont été remplacées par les boîtes Nextal® ([www.nextalbiotech.com](http://www.nextalbiotech.com)) dont les 24 puits sont fermés par des bouchons plastiques vissables. Le volume minimal des gouttes est limité par la précision du pipetage à 0,5 µl + 0,5 µl.

L'unité propre de recherche 9002 du CNRS, à laquelle notre laboratoire appartient, a fait l'acquisition en 2004 d'un robot de cristallisation Mosquito®. Cet appareil permet d'utiliser des microplaques de cristallisation 96 puits, pour tester des kits commerciaux ou des conditions « maison ». Le volume des gouttes est considérablement réduit puisque le robot peut prélever un volume minimal de 100 nl (soient des gouttes de cristallisation de 200 nl, 5 fois plus petites que les gouttes réalisées manuellement). Un tel facteur d'échelle permet de tester un grand nombre de conditions avec une faible quantité de complexe

aminoglycoside / ARN. La cristallisation se fait en goutte assise, le volume testé est si faible que l'équilibre de vapeur est très rapidement atteint.

### **B.2) « Crible » personnel**

Les premières conditions permettant d'obtenir des cristaux du complexe paromomycine / fragment A3 ont été publiées en 2001 (Vicens and Westhof 2001). Les principaux agents précipitants sont le MPD (2,4-méthylpentanediol) et le glycérol, les autres composants étant un tampon acide (Na cacodylate pH 6,4) identique à celui des solutions de renaturation de l'ARN, et un sel monovalent (KCl). Mes travaux de DEA sur la cristallisation du complexe apramycine / site A bactérien (non présentés ici), ont mis en évidence que ce n'est pas la quantité d'agent précipitant qui est déterminante mais plutôt le rapport entre les pourcentages de MPD et de glycérol. C'est pourquoi les premières conditions testent une gamme de rapports entre MPD et glycérol à faibles concentrations (table 2.2).

### **B.3) « Cribles » commerciaux**

Plusieurs kits de cristallisation pré-conditionnés dans des boîtes 96 puits sont disponibles commercialement. Trois d'entre eux ont été retenus pour la cristallisation des complexes aminoglycosides / ARN lorsque le crible « maison » n'a pas donné de résultats probants. Ils permettent de tester plusieurs variables de manière rapide grâce au robot : nature des sels, nature de l'agent précipitant, influence du pH. La composition des solutions est détaillée dans les tables 2.3, 2.4 et 2.5.

L'étanchéité du film adhésif utilisé pour sceller les plaques de cristallisation n'étant pas garantie à 37°C, les essais de cristallisation utilisant les kits commerciaux ont été effectués à 20°C.

**Table 2.2 :** Composition des solutions de cristallisation employées en première approche.

MPD (%)	1 - 6
Glycérol (%)	1 - 6
aminoglycoside (M)	0,002
Na cacodylate pH 6,4 (M)	0,050
KCl (M)	0,1 - 0,3

**Table 2.3 :** Crible de cristallisation « MPDs » disponible auprès de Nextal.

Numéro de puit	Sel	Tampon	Agent précipitant
1	0.2 M Cadmium chloride		40 % (v/v) MPD
2	0.2 M Potassium fluoride		40 % (v/v) MPD
3	0.2 M Ammonium fluoride		40 % (v/v) MPD
4	0.2 M Lithium chloride		40 % (v/v) MPD
5	0.2 M Magnesium chloride		40 % (v/v) MPD
6	0.2 M Sodium chloride		40 % (v/v) MPD
7	0.2 M Calcium chloride		40 % (v/v) MPD
8	0.2 M Potassium chloride		40 % (v/v) MPD
9	0.2 M Ammonium chloride		40 % (v/v) MPD
10	0.2 M Sodium iodide		40 % (v/v) MPD
11	0.2 M Potassium iodide		40 % (v/v) MPD
12	0.2 M Ammonium iodide		40 % (v/v) MPD
13	0.2 M Sodium thiocyanate		40 % (v/v) MPD
14	0.2 M Potassium thiocyanate		40 % (v/v) MPD
15	0.2 M Lithium nitrate		40 % (v/v) MPD
16	0.2 M Magnesium nitrate		40 % (v/v) MPD
17	0.2 M Sodium nitrate		40 % (v/v) MPD
18	0.2 M Potassium nitrate		40 % (v/v) MPD
19	0.2 M Ammonium nitrate		40 % (v/v) MPD
20	0.2 M Zinc sulfate		40 % (v/v) MPD
21	0.2 M Sodium formate		40 % (v/v) MPD
22	0.2 M Potassium formate		40 % (v/v) MPD
23	0.2 M Ammonium formate		40 % (v/v) MPD
24	0.2 M Lithium acetate		40 % (v/v) MPD
25	0.2 M Magnesium acetate		40 % (v/v) MPD
26	0.2 M Sodium malonate		40 % (v/v) MPD
27	0.2 M Sodium acetate		40 % (v/v) MPD
28	0.2 M Calcium acetate		40 % (v/v) MPD
29	0.2 M Potassium acetate		40 % (v/v) MPD
30	0.2 M Ammonium acetate		40 % (v/v) MPD
31	0.2 M Lithium sulfate		40 % (v/v) MPD
32	0.2 M Magnesium sulfate		40 % (v/v) MPD
33	0.2 M Cesium chloride		40 % (v/v) MPD
34	0.2 M Nickel chloride		40 % (v/v) MPD
35	0.2 M Ammonium sulfate		40 % (v/v) MPD
36	0.2 M di-Sodium tartarate		40 % (v/v) MPD
37	0.2 M K/Na tartrate		40 % (v/v) MPD
38	0.2 M di-Ammonium tartrate		40 % (v/v) MPD
39	0.2 M Sodium phosphate		40 % (v/v) MPD
40	0.2 M Potassium bromide		40 % (v/v) MPD
41	0.2 M Sodium bromide		40 % (v/v) MPD
42	0.2 M di-Potassium phosphate		40 % (v/v) MPD
43	0.2 M Ammonium phosphate		40 % (v/v) MPD
44	0.2 M di-Ammonium phosphate		40 % (v/v) MPD
45	0.2 M tri-Lithium citrate		40 % (v/v) MPD
46	0.2 M tri-Sodium citrate		40 % (v/v) MPD
47	0.2 M tri-Potassium citrate		40 % (v/v) MPD
48	0.2 M di-Ammonium citrate		40 % (v/v) MPD
49		0.1 M Citric acid pH 4.0	10 % (v/v) MPD
50		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	10 % (v/v) MPD
51		0.1 M MES pH 6.0	10 % (v/v) MPD
52		0.1 M HEPES pH 7.0	10 % (v/v) MPD
53		0.1 M TRIS pH 8.0	10 % (v/v) MPD
54		0.1 M BICINE pH 9.0	10 % (v/v) MPD
55		0.1 M Citric acid pH 4.0	20 % (v/v) MPD
56		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	20 % (v/v) MPD
57		0.1 M MES pH 6.0	20 % (v/v) MPD
58		0.1 M HEPES pH 7.0	20 % (v/v) MPD
59		0.1 M TRIS pH 8.0	20 % (v/v) MPD
60		0.1 M BICINE pH 9.0	20 % (v/v) MPD
61		0.1 M Citric acid pH 4.0	40 % (v/v) MPD
62		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	40 % (v/v) MPD
63		0.1 M MES pH 6.0	40 % (v/v) MPD
64		0.1 M HEPES pH 7.0	40 % (v/v) MPD
65		0.1 M TRIS pH 8.0	40 % (v/v) MPD
66		0.1 M BICINE pH 9.0	40 % (v/v) MPD
67		0.1 M Sodium acetate pH 4.0	65 % (v/v) MPD
68		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	65 % (v/v) MPD
69		0.1 M MES pH 6.0	65 % (v/v) MPD
70		0.1 M HEPES pH 7.0	65 % (v/v) MPD
71		0.1 M TRIS pH 8.0	65 % (v/v) MPD
72		0.1 M BICINE pH 9.0	65 % (v/v) MPD
73	0.1 M tri-Sodium citrate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	10 % (w/v) MPD
74	0.05 M Magnesium chloride	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	12 % (w/v) MPD
75	0.02 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	15 % (w/v) MPD
76		0.1 M Imidazole.HCl pH 8.0	15 % (w/v) MPD, 5 % (w/v) PEG 4000
77	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.6	15 % (w/v) MPD
78	0.2 M Magnesium acetate	0.1 M MES sodium salt pH 6.5	15 % (w/v) MPD
79	0.2 M tri-Sodium citrate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	15 % (w/v) MPD
80	0.1 M tri-Sodium citrate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	20 % (w/v) MPD
81		0.1 M Imidazole.HCl pH 8.0	20 % (w/v) MPD
82	0.2 M Sodium chloride		20 % (w/v) MPD, 4 % (w/v) Glycerol
83	0.02 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30 % (w/v) MPD
84	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.6	30 % (w/v) MPD
85	0.2 M Magnesium acetate	0.1 M MES sodium salt pH 6.5	30 % (w/v) MPD
86	0.5 M Ammonium sulfate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	30 % (w/v) MPD
87	0.2 M tri-Sodium citrate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	30 % (w/v) MPD
88		0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	30 % (w/v) MPD, 5 % (w/v) PEG 4000
89		0.1 M Imidazole.HCl pH 8.0	30 % (w/v) MPD, 10 % (w/v) PEG 4000
90			30 % (w/v) MPD, 20 % (w/v) Ethanol
91			35 % (w/v) MPD
92		0.1 M Imidazole.HCl pH 8.0	35 % (w/v) MPD
93		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	40 % (w/v) MPD
94		0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	47 % (w/v) MPD
95			47 % (w/v) MPD, 2 % (w/v) tert-Butanol
96			50 % (w/v) MPD

**Table 2.4 : Crible de cristallisation « Anions » disponible auprès de Nextal.**

Numéro de puit	Tampon	Agent précipitant
1	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.5 M Sodium acetate
2	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.25 M Sodium acetate
3	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.2 M tri-Sodium citrate
4	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.6 M tri-Sodium citrate
5	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.6 M Sodium fluoride
6	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.3 M Sodium fluoride
7	0.1 M MES pH 6.5	2.5 M Sodium acetate
8	0.1 M MES pH 6.5	1.25 M Sodium acetate
9	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M tri-Sodium citrate
10	0.1 M MES pH 6.5	0.6 M tri-Sodium citrate
11	0.1 M MES pH 6.5	0.6 M Sodium fluoride
12	0.1 M MES pH 6.5	0.3 M Sodium fluoride
13	0.1 M HEPES pH 7.5	2.5 M Sodium acetate
14	0.1 M HEPES pH 7.5	1.25 M Sodium acetate
15	0.1 M HEPES pH 7.5	1.2 M tri-Sodium citrate
16	0.1 M HEPES pH 7.5	0.6 M tri-Sodium citrate
17	0.1 M HEPES pH 7.5	0.6 M Sodium fluoride
18	0.1 M HEPES pH 7.5	0.3 M Sodium fluoride
19	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.5 M Sodium acetate
20	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.25 M Sodium acetate
21	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M tri-Sodium citrate
22	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.6 M tri-Sodium citrate
23	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.6 M Sodium fluoride
24	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.3 M Sodium fluoride
25	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	3.5 M Sodium formate
26	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.75 M Sodium formate
27	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	3.5 M Sodium bromide
28	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.75 M Sodium bromide
29	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.4 M Sodium malonate
30	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.2 M Sodium malonate
31	0.1 M MES pH 6.5	3.5 M Sodium formate
32	0.1 M MES pH 6.5	1.75 M Sodium formate
33	0.1 M MES pH 6.5	3.5 M Sodium bromide
34	0.1 M MES pH 6.5	1.75 M Sodium bromide
35	0.1 M MES pH 6.5	2.4 M Sodium malonate
36	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M Sodium malonate
37	0.1 M HEPES pH 7.5	3.5 M Sodium formate
38	0.1 M HEPES pH 7.5	1.75 M Sodium formate
39	0.1 M HEPES pH 7.5	3.5 M Sodium bromide
40	0.1 M HEPES pH 7.5	1.75 M Sodium bromide
41	0.1 M HEPES pH 7.5	2.4 M Sodium malonate
42	0.1 M HEPES pH 7.5	1.2 M Sodium malonate
43	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	3.5 M Sodium formate
44	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.75 M Sodium formate
45	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	3.5 M Sodium bromide
46	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.75 M Sodium bromide
47	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.4 M Sodium malonate
48	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M Sodium malonate
49	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	3.5 M Sodium nitrate
50	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.75 M Sodium nitrate
51	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.9 M Sodium phosphate, 0.9 Potassium phosphate
52	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.45 M Sodium phosphate 0.45 Potassium phosphate
53	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.0 M Sodium succinate
54	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.5 M Sodium succinate
55	0.1 M MES pH 6.5	3.5 M Sodium nitrate
56	0.1 M MES pH 6.5	1.75 M Sodium nitrate
57	0.1 M MES pH 6.5	0.9 M Sodium phosphate, 0.9 Potassium phosphate
58	0.1 M MES pH 6.5	0.45 M Sodium phosphate 0.45 Potassium phosphate
59	0.1 M MES pH 6.5	1.0 M Sodium succinate
60	0.1 M MES pH 6.5	0.5 M Sodium succinate
61	0.1 M HEPES pH 7.5	3.5 M Sodium nitrate
62	0.1 M HEPES pH 7.5	1.75 M Sodium nitrate
63	0.1 M HEPES pH 7.5	0.9 M Sodium phosphate, 0.9 Potassium phosphate
64	0.1 M HEPES pH 7.5	0.45 M Sodium phosphate 0.45 Potassium phosphate
65	0.1 M HEPES pH 7.5	1.0 M Sodium succinate
66	0.1 M HEPES pH 7.5	0.5 M Sodium succinate
67	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	3.5 M Sodium nitrate
68	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.75 M Sodium nitrate
69	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.9 M Sodium phosphate, 0.9 Potassium phosphate
70	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.45 M Sodium phosphate 0.45 Potassium phosphate
71	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.0 M Sodium succinate
72	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.5 M Sodium succinate
73	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.75 M Sodium sulfate
74	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.37 M Sodium sulfate
75	0.1 M Sodium tartrate pH 5.6	1.2 M K/Na tartrate
76	0.1 M Sodium tartrate pH 5.6	0.6 M K/Na tartrate
77	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.4 M Sodium thiocyanate
78	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.2 M Sodium thiocyanate
79	0.1 M MES pH 6.5	0.75 M Sodium sulfate
80	0.1 M MES pH 6.5	0.37 M Sodium sulfate
81	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M K/Na tartrate
82	0.1 M MES pH 6.5	0.6 M K/Na tartrate
83	0.1 M MES pH 6.5	2.4 M Sodium thiocyanate
84	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M Sodium thiocyanate
85	0.1 M HEPES pH 7.5	0.75 M Sodium sulfate
86	0.1 M HEPES pH 7.5	0.37 M Sodium sulfate
87	0.1 M HEPES pH 7.5	1.2 M K/Na tartrate
88	0.1 M HEPES pH 7.5	0.6 M K/Na tartrate
89	0.1 M HEPES pH 7.5	2.4 M Sodium thiocyanate
90	0.1 M HEPES pH 7.5	1.2 M Sodium thiocyanate
91	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.75 M Sodium sulfate
92	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.37 M Sodium sulfate
93	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M K/Na tartrate
94	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.6 M K/Na tartrate
95	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.4 M Sodium thiocyanate
96	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M Sodium thiocyanate

**Table 2.5 : Crible de cristallisation « Cations » disponible auprès de Nextal.**

The Cations Suite

Numéro de puit	Tampon	Agent précipitant
1	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	3.5 M Ammonium chloride
2	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.75 M Ammonium chloride
3	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	4.0 M Lithium chloride
4	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.0 M Lithium chloride
5	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.5 M Magnesium chloride
6	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.75 M Magnesium chloride
7	0.1 M MES pH 6.5	3.5 M Ammonium chloride
8	0.1 M MES pH 6.5	1.75 M Ammonium chloride
9	0.1 M MES pH 6.5	4.0 M Lithium chloride
10	0.1 M MES pH 6.5	2.0 M Lithium chloride
11	0.1 M MES pH 6.5	1.5 M Magnesium chloride
12	0.1 M MES pH 6.5	0.75 M Magnesium chloride
13	0.1 M HEPES pH 7.5	3.5 M Ammonium chloride
14	0.1 M HEPES pH 7.5	1.75 M Ammonium chloride
15	0.1 M HEPES pH 7.5	4.0 M Lithium chloride
16	0.1 M HEPES pH 7.5	2.0 M Lithium chloride
17	0.1 M HEPES pH 7.5	1.5 M Magnesium chloride
18	0.1 M HEPES pH 7.5	0.75 M Magnesium chloride
19	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	3.5 M Ammonium chloride
20	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.75 M Ammonium chloride
21	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	4.0 M Lithium chloride
22	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.0 M Lithium chloride
23	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.5 M Magnesium chloride
24	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.75 M Magnesium chloride
25	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	4.5 M Ammonium acetate
26	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.25 M Ammonium acetate
27	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.5 M Lithium acetate
28	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.25 M Lithium acetate
29	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.0 M Magnesium acetate
30	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.0 M Magnesium acetate
31	0.1 M MES pH 6.5	4.5 M Ammonium acetate
32	0.1 M MES pH 6.5	2.25 M Ammonium acetate
33	0.1 M MES pH 6.5	2.5 M Lithium acetate
34	0.1 M MES pH 6.5	1.25 M Lithium acetate
35	0.1 M MES pH 6.5	2.0 M Magnesium acetate
36	0.1 M MES pH 6.5	1.0 M Magnesium acetate
37	0.1 M HEPES pH 7.5	4.5 M Ammonium acetate
38	0.1 M HEPES pH 7.5	2.25 M Ammonium acetate
39	0.1 M HEPES pH 7.5	2.5 M Lithium acetate
40	0.1 M HEPES pH 7.5	1.25 M Lithium acetate
41	0.1 M HEPES pH 7.5	2.0 M Magnesium acetate
42	0.1 M HEPES pH 7.5	1.0 M Magnesium acetate
43	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	4.5 M Ammonium acetate
44	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.25 M Ammonium acetate
45	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.5 M Lithium acetate
46	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.25 M Lithium acetate
47	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.0 M Magnesium acetate
48	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.0 M Magnesium acetate
49	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.2 M Calcium chloride
50	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.1 M Calcium chloride
51	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	3.2 M Sodium chloride
52	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.6 M Sodium chloride
53	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.6 M Zinc sulfate
54	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.8 M Zinc sulfate
55	0.1 M MES pH 6.5	2.2 M Calcium chloride
56	0.1 M MES pH 6.5	1.1 M Calcium chloride
57	0.1 M MES pH 6.5	3.2 M Sodium chloride
58	0.1 M MES pH 6.5	1.6 M Sodium chloride
59	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	1.6 M Zinc sulfate
60	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	0.8 M Zinc sulfate
61	0.1 M HEPES pH 7.5	2.2 M Calcium chloride
62	0.1 M HEPES pH 7.5	1.1 M Calcium chloride
63	0.1 M HEPES pH 7.5	3.2 M Sodium chloride
64	0.1 M HEPES pH 7.5	1.6 M Sodium chloride
65	0.1 M Imidazole pH 7.5	1.6 M Zinc sulfate
66	0.1 M Imidazole pH 7.5	0.8 M Zinc sulfate
67	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.2 M Calcium chloride
68	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.1 M Calcium chloride
69	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	3.2 M Sodium chloride
70	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.6 M Sodium chloride
71	0.1 M BICINE pH 8.5	1.6 M Zinc sulfate
72	0.1 M BICINE pH 8.5	0.8 M Zinc sulfate
73	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	4.0 M Potassium acetate
74	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.0 M Potassium acetate
75	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.2 M Potassium chloride
76	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.1 M Potassium chloride
77	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.2 M Zinc acetate
78	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	0.6 M Zinc acetate
79	0.1 M MES pH 6.5	4.0 M Potassium acetate
80	0.1 M MES pH 6.5	2.0 M Potassium acetate
81	0.1 M MES pH 6.5	2.2 M Potassium chloride
82	0.1 M MES pH 6.5	1.1 M Potassium chloride
83	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M Zinc acetate
84	0.1 M MES pH 6.5	0.6 M Zinc acetate
85	0.1 M HEPES pH 7.5	4.0 M Potassium acetate
86	0.1 M HEPES pH 7.5	2.0 M Potassium acetate
87	0.1 M HEPES pH 7.5	2.2 M Potassium chloride
88	0.1 M HEPES pH 7.5	1.1 M Potassium chloride
89	0.1 M Imidazole pH 7.5	1.2 M Zinc acetate
90	0.1 M Imidazole pH 7.5	0.6 M Zinc acetate
91	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	4.0 M Potassium acetate
92	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.0 M Potassium acetate
93	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.2 M Potassium chloride
94	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.1 M Potassium chloride
95	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M Zinc acetate
96	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.6 M Zinc acetate

## C. Optimisation des conditions de cristallisation

Les premiers cristaux obtenus ne sont pas toujours exploitables (trop petits, fragiles, agglomérats ou poly-cristallins) et il est nécessaire d'optimiser les conditions de cristallisation. La première étape consiste à se déplacer dans la gamme d'agents précipitants en modifiant le rapport MPD / glycérol, cette simple manœuvre a souvent permis d'obtenir de bien meilleurs cristaux.

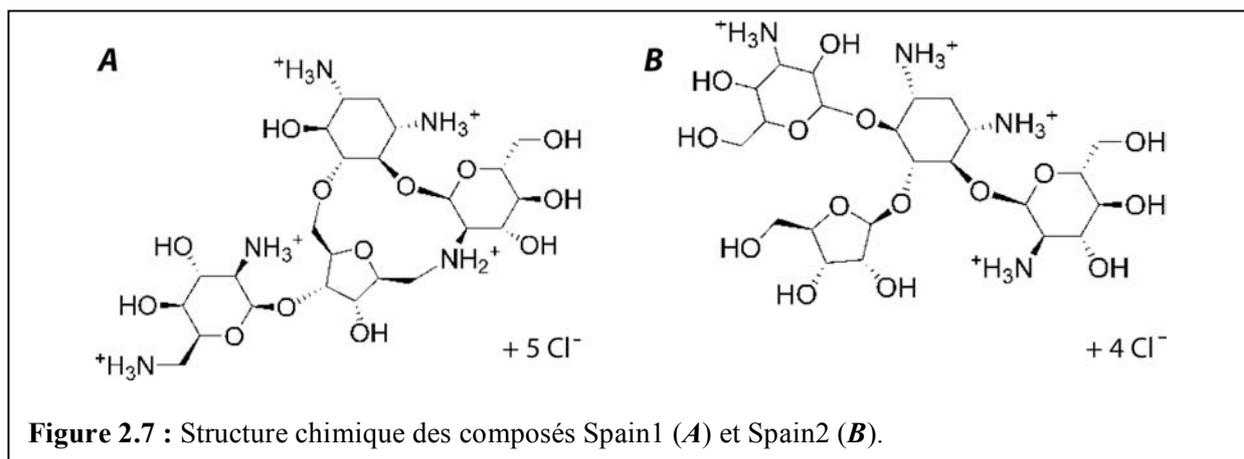
Un autre paramètre aisément modifiable est la température de cristallisation, en effet dans le cas de rapports MPD / glycérol élevés, un phénomène de séparation de phase se produit à 37°C : l'ARN complexé se rassemble en globules à l'intérieur desquels un précipité se forme. Lorsqu'un tel phénomène se produit, les conditions de cristallisations sont reproduites à 20°C.

Il est parfois nécessaire de modifier la nature des sels en échangeant le KCl par du CaCl<sub>2</sub>, ou des sels capables de diffracter de manière anormale : NiCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> ou CrCl<sub>2</sub>. L'impact de ces sels est très important sur l'ARN et leur concentration doit rester assez faible (50-100 mM) sous peine de voir les molécules d'ARN précipiter.

Une dernière méthode d'optimisation utilise un gel d'agarose (Sica, Demasi et al. 1994; Thiessen 1994; Biertumpfel, Basquin et al. 2002; Kadri, Lorber et al. 2005; Moreno, Theobald-Dietrich et al. 2005). Cette méthode permet de diminuer les phénomènes de convection à l'intérieur de la goutte de cristallisation et améliore la qualité des cristaux. Dans le cas des complexes aminoglycosides / site A, cette technique a été employée pour diminuer la vitesse d'apparition et de croissance des cristaux afin d'obtenir des monocristaux.

## D. Cristallisation du site A bactérien

En octobre 2004, Juan Luis Asensio du laboratoire de chimie organique de Madrid nous a fourni deux dérivés de paromomycine : Spain1 (paromomycine cyclisée) et Spain2 (hybride paromomycine – tobramycine) (figure 2.7). Les essais de cristallisation de ces deux composés complexés au site A bactérien sont décrits ci-après.



Dans un premier temps, seuls les fragments A3 et A3-4 ont été utilisés pour cristalliser les composés Spain1 et Spain2. Les deux premières séries (table 2.6) n'étaient pas suffisamment concentrées et les gouttes sont restées claires.

La troisième série (table 2.7) a testé un fragment d'ARN supplémentaire A3-17 en plus d'une augmentation des rapports MPD / glycérol et a permis l'obtention de premiers cristaux des complexes Spain1 / A3-17 et Spain2 / A3-17.

**Table 2.6** : Premières séries de conditions testées pour la cristallisation des composés Spain1 et Spain2.

MPD (%)	1	2	2	1,5	2,5	3,5
Glycérol (%)	5	4	2	1	1	1,5
Dérivés de Paromomycine (M)	0,002					
Na cacodylate pH 6,4 (M)	0,050					
KCl (M)	0,2 - 0,3					

**Table 2.7** : Troisième série de conditions testées pour la cristallisation des composés Spain1 et Spain2 (*A*) et les résultats obtenus (*B*).

*A*

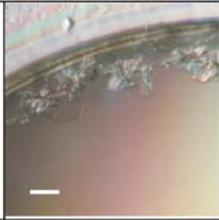
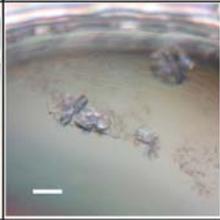
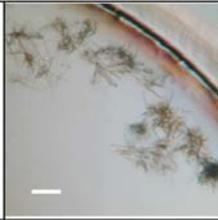
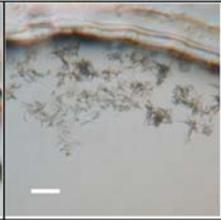
MPD (%)	3,5	4,5	5,5	6,5	8,5	11
Glycérol (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2
Dérivés de Paromomycine (M)	0,002					
Na cacodylate pH 6,4 (M)	0,050					
KCl (M)	0,300					

*B*

	A3	A3-4	A3-17
Spain1	gouttes claires	gouttes claires	micro-cristaux
Spain2	gouttes claires	gouttes claires	micro-cristaux

Les deux composés n'ont formé de cristaux qu'avec le fragment A3-17 (table 2.8). Cet exemple illustre l'influence de la séquence d'ARN et la nécessité d'explorer plusieurs systèmes afin d'optimiser la cristallisation des complexes. La taille et l'aspect des premiers cristaux a nécessité une optimisation qui a testé de nouveaux rapports MPD / glycérol mais également l'ajout de spermine (table 2.9). En effet, l'ajout d'une faible quantité de polyamine (10 mM) a déjà permis d'améliorer la qualité des cristaux (résultats non présentés ici). Les cristaux obtenus dans ces conditions n'ont pas été meilleurs (table 2.10) : le composé Spain1 a formé des sphérulites et le composé Spain2 a quant à lui produit des micro-baguettes mal définies. Les mêmes conditions reproduites à 20°C n'ont donné aucun résultat. Après ces résultats d'optimisation décevants, il a été décidé d'utiliser

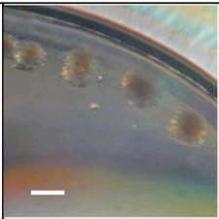
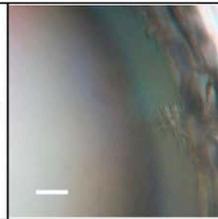
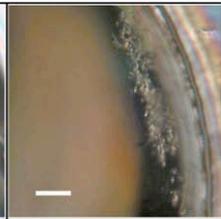
**Table 2.8 :** Résultats des essais de cristallisation réalisés avec le fragment A3-17.

<b>Spain1</b>			<b>Spain2</b>		
	A3-17	A3-17		A3-17	A3-17
MPD	5,5	7,5	MPD	2,5	3,5
Glyc	1,5	1,5	Glyc	1,5	1,5

**Table 2.9 :** Conditions d'optimisation.

MPD (%)	3,5	4,5	5,5	6,5	8,5	11
Glycérol (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2
Dérivés de Paromomycine (M)	0,002					
Na cacodylate pH 6,4 (M)	0,050					
KCl (M)	0,300					
Spermine (M)	0,010					

**Table 2.10 :** Cristaux obtenus lors de l'optimisation.

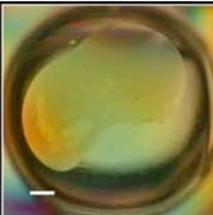
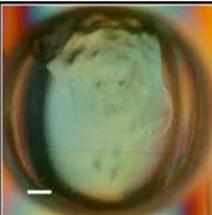
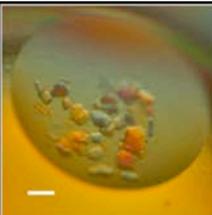
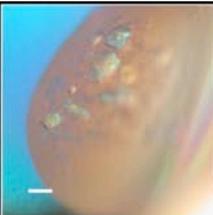
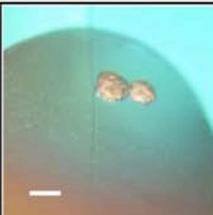
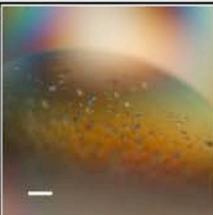
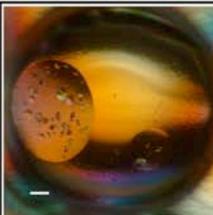
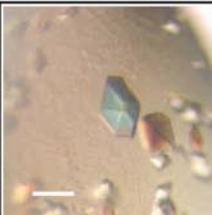
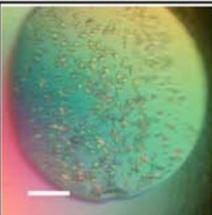
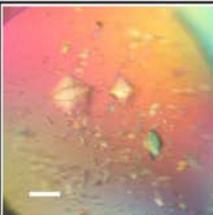
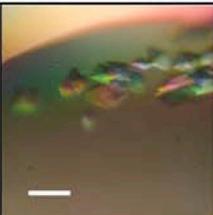
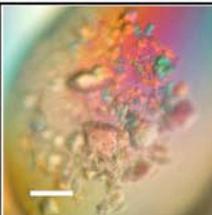
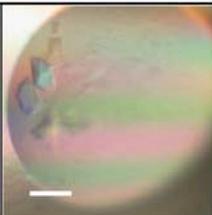
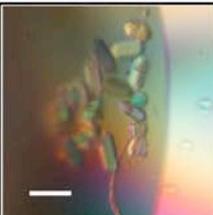
<b>Spain1</b>			<b>Spain2</b>			
	A3-17	A3-17		A3-17	A3-17	
MPD	4,5	6,5	MPD	4,5	6,5	
Glyc	1,5	1,5	Glyc	1,5	1,5	
SPM	10 mM					

le robot Mosquito pour cribler de nouvelles conditions de cristallisation à l'aide du kit MPD de Nextal (composition dans table 2.3). Les boîtes Emerald® pré-remplies utilisent la technique de la goutte assise et permettent de tester trois complexes par puits. 230 nl des complexes A3, A3-4 et A3-17 / dérivés de paromomycine ont été additionnés à 230 nl de solution de cristallisation. Les boîtes ont ensuite été scellées et placées à 20°C.

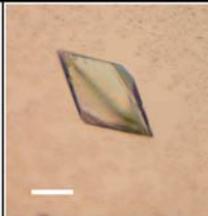
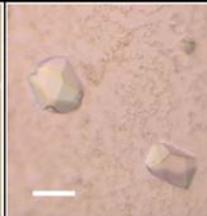
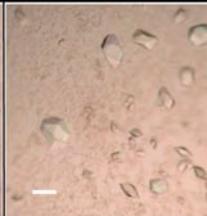
Les premiers cristaux sont apparus après cinq jours pour les deux dérivés complexés au fragment A3-17. Quelques nucléations ont été observées après neuf jours avec le fragment A3-4 (table 2.11). L'aspect général des cristaux obtenus est bien meilleur que celui jusqu'alors obtenu, mais leur taille et l'ergonomie des boîtes de cristallisation employées ne permettent pas leur récupération en vue d'une congélation.

Les six meilleures conditions observées pour la cristallisation du complexe Spain2 / A3-17 ont été reprises à plus grande échelle (2 µl de complexe + 2 µl de solution provenant directement du kit Nextal) avec un réservoir de 1 ml d'une solution aqueuse de MPD 50 %. Sur les six conditions, quatre ont induit la formation d'un précipité à 20 °C, ceci peut être dû au facteur d'échelle très important entre la boîte effectuée par le robot et la présente optimisation. Deux conditions ont toutefois permis d'augmenter la taille des cristaux (table 2.12) et ces derniers ont été congelés puis testés sur la ligne ID29 de l'ESRF (Grenoble). La diffraction des deux complexes s'est limitée à une résolution insuffisante de 4,5 Å. De nouveaux essais qui apporteront de légères modifications à ces conditions devraient permettre d'obtenir des cristaux diffractant mieux.

**Table 2.11** : Résultats des kits de cristallisations pour les composés Spain1 et Spain2.

<b>Spain1</b>					
	A3	A3-4	A3-17	A3-17	
	MPD	40		40	
		Ca Cl <sub>2</sub> 200 mM		K F 200 mM	
<b>Spain1</b>					
	A3-4	A3-4	A3-17	A3-17	
	MPD	40	40	40	
		Mg Cl <sub>2</sub> 200 mM	DiAmmonium hydrogen phosphate 0,2 M	DiAmmonium hydrogen phosphate 0,2 M	Tri-lithium citrate tetraacétate 0,2 M
<b>Spain2</b>					
	A3-17	A3-17	A3-17	A3-4	
	MPD	40	40	40	
		K F 200 mM	NH <sub>3</sub> F 200 mM	Na malonate 200 mM	DiAmmonium tartrate 200 mM
<b>Spain2</b>					
	A3-17	A3-17	A3-17	A3-17	
	MPD	40	30	30	40
		Potassium - sodium tartrate 200 mM	Mg OAc <sub>2</sub> 200 mM	Tri sodium citrate 200 mM	
		MES pH 6,5 0,1 M	HEPES pH 7,5 0,1 M	TRIS pH 8,5 0,1 M	

**Table 2.12** : Résultats du changement d'échelle des volumes de cristallisation.

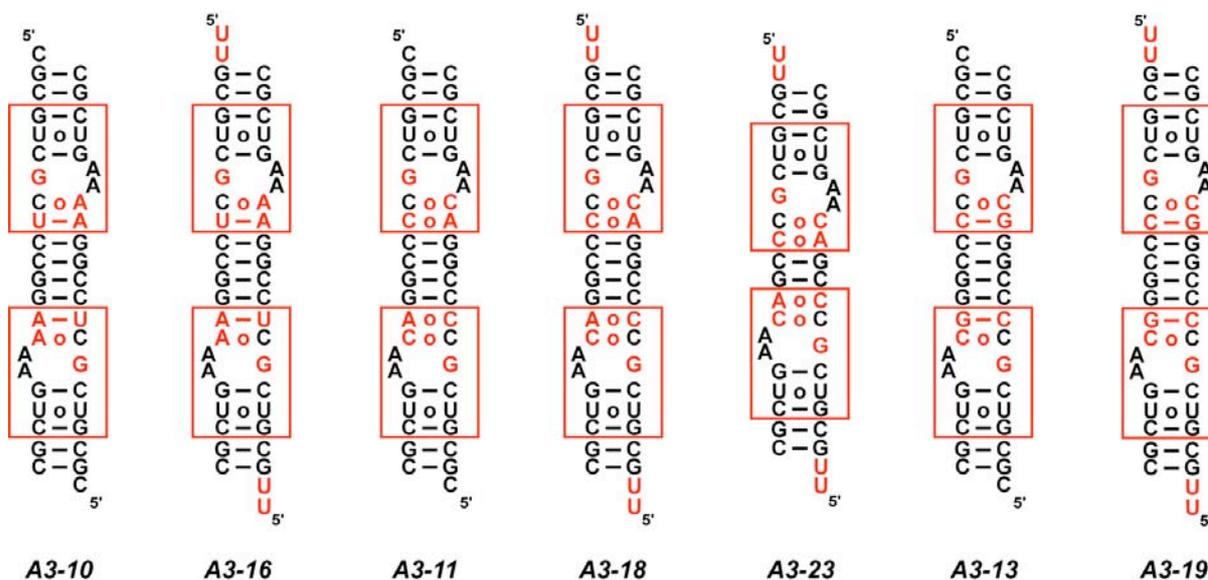
<b>Spain2</b>				
	A3-17		A3-17	
	MPD	40		40
		NH <sub>3</sub> F 200 mM		
		TRIS pH 8,5 0,1 M		

## E. Cristallisation des sites A eucaryotes

La plupart des aminoglycosides induisent des effets secondaires chez l'homme (table 2.13) ce qui permet de supposer qu'il y a une interaction possible entre ces antibiotiques et le site A humain. Partant de cette hypothèse, plusieurs séquences d'oligoribonucléotides (figure 2.8) comportant les sites A eucaryote humain cytoplasmique (A3-10, A3-16) ou mitochondrial (A3-11, A3-18 et A3-23) ou mitochondrial muté A1555G (A3-13 et A3-19) ont été testé en présence de divers aminoglycosides (apramycine, paromomycine, généticine, gentamicine, tobramycine, amikacine et kanamycine). Les conditions de cristallisation riches en MPD ont induit la formation de

**Table 2.13 :** Effets secondaires sur l'audition relevés pour différents aminoglycosides.  
(source : <http://www.biam2.org>)

Aminoglycoside	Syndrôme vestibulaire	Atteinte cochléaire	Toxicité auditive	Surdité
Streptomycine	oui	oui	?	oui
Néomycine	oui	oui	?	oui
Ribostamycine	?	oui	oui	oui
Lividomycine	?	oui	oui	oui
Gentamicine	oui	oui	?	oui
Tobramycine	oui	oui	oui	oui
Amikacine	oui	oui	?	oui
Kanamycine	oui	oui	?	oui



**Figure 2.8 :** Différents fragments incorporant les nucléotides du site A eucaryote humain (encadré en rouge) testés pour la cristallisation.

séparations de phases dans la plupart des essais (table 2.14), seule la lividomycine a présenté des gouttes claires dans tous les cas de figure.

La tobramycine, complexée au site A eucaryote mitochondrial, a cristallisé sous forme de baguettes ou de plaquettes très fines (table 2.15) malgré la présence de petites bulles de séparation de phase (voir photo de droite). Les deux autres membres de la famille de la tobramycine testés, amikacine et kanamycine ont cristallisé sous forme de sphérulites au milieu d'importantes séparations de phase (table 2.15). La qualité de ces trois complexes n'a pas permis leur congélation pour des expériences de diffraction aux rayons X.

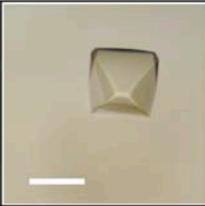
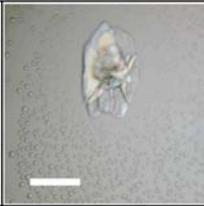
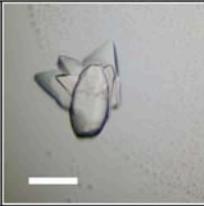
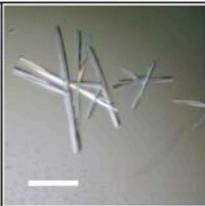
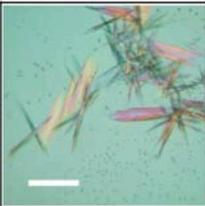
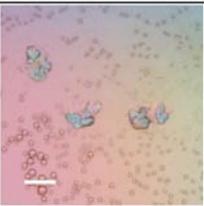
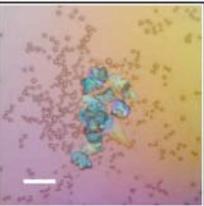
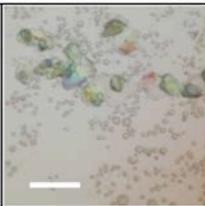
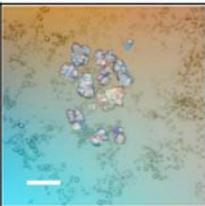
Les complexes apramycine / site A cytoplasmique ont cristallisé sous forme de petits rubis (table 2.15) polarisant fortement la lumière ; après trempage dans une solution cryoprotectrice (60 % MPD, 15 % glycérol) ces cristaux ont été congelés dans de l'éthane puis testés sur la ligne ID14-4 de l'ESRF (Grenoble). Un jeu de données complet a pu être enregistré, puis indexé (les statistiques figurent dans la table 2.16).

Le complexe paromomycine / site A eucaryote mitochondrial muté a cristallisé dans deux uniques conditions (table 2.15) en formant des amas de plaquettes mal définies ou de cristaux en forme de « silex ». et une « pointe » mono-cristalline a été détachée à

**Table 2.14** : Résultats des essais de cristallisations des sites A eucaryotes humains.

	Cytoplasmique		Mitochondrial		Mitochondrial muté	
	A3-10	A3-16	A3-11	A3-18	A3-13	A3-19
<b>Apramycine</b>	Précipité	<b>Cristaux</b>	gouttes claires	séparation de phase	séparation de phase	séparation de phase
<b>Paromomycine</b>	séparation de phase	gouttes claires	gouttes claires	gouttes claires	<b>Cristaux</b>	séparation de phase
<b>Lividomycine</b>	gouttes claires					
<b>Généticine</b>	séparation de phase	séparation de phase	séparation de phase	gouttes claires	gouttes claires	séparation de phase
<b>Gentamicine</b>	séparation de phase	gouttes claires	gouttes claires	séparation de phase	séparation de phase	Précipité
<b>Tobramycine</b>	Précipité	Précipité	gouttes claires	<b>Cristaux</b>	gouttes claires	Précipité
<b>Amikacine</b>	Précipité	Précipité	Précipité	<b>Cristaux</b>	Précipité	Précipité
<b>Kanamycine</b>	Précipité	Précipité	Précipité	<b>Cristaux</b>	Précipité	Précipité

**Table 2.15** : Complexes aminoglycosides / sites A eucaryotes humains cristallisés.

A p r a m y c i n e			P a r o m o m y c i n e		
	A3-16	A3-16		A3-13	A3-13
	MPD	1		1,5	MPD
Glyc	5	3	Glyc	1,5	1,5
T o b r a m y c i n e			A m i k a c i n e		
	A3-18	A3-18		A3-18	A3-18
	MPD	1		2,5	MPD
Glyc	5	2	Glyc	3	4
K a n a m y c i n e					
	A3-18	A3-18			
	MPD	5	15		
Glyc	4	5			

l'aide d'une aiguille puis congelée et testée sur la ligne PX du SLS (Villigen, suisse). Un jeu de données complet à 2,7 Å a été enregistré puis indexé (table 2.16).

Les essais de remplacement moléculaire utilisant le logiciel AmoRe (Navaza and Saludjian 1996) n'ont pas abouti dans un premier temps. Ce travail a été repris par Jiro Kondo, en séjour post-doctoral au laboratoire, en collaboration avec Alexander Ourjountsev de l'université de Nancy.

**Table 2.16 :** Statistiques d'indexation des complexes apramycine / site A eucaryote cytoplasmique et paromomycine / site A eucaryote mitochondrial.

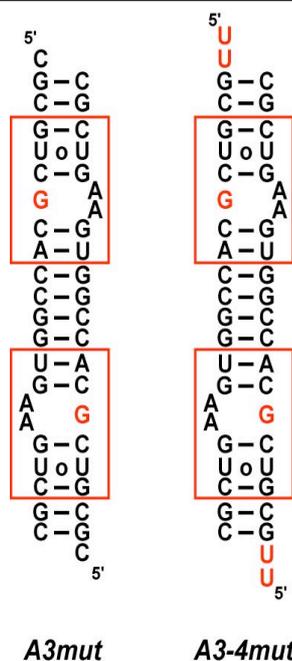
	<b>Apramycine cytolasmique</b>	<b>Paromomycine mitochondrial</b>
Groupe d'espace	P3 <sub>1</sub> ou P3 <sub>2</sub>	P3 <sub>1</sub> 21
Paramètres de maille (Å)	a = b = 33,1 c = 116,4	a = b = 66,4 c = 57,4
Longueur d'onde (Å)	0,9793	0,9801
Gamme de résolution utilisée pour l'affinement (Å) <sup>a</sup>	28 - 2,8 (2,9 - 2,8)	41 - 2,7 (2,8 - 2,7)
Nombre de réflexions uniques utilisées pour l'affinement	3529	4215
Redondance	5,6 (5,8)	9,9 (10,2)
I/σ moyen <sup>a</sup>	8,2 (1,9)	22,0 (3,9)
Complétude (%) <sup>a</sup>	100 (100)	99,5 (100)
R merge (%) <sup>a</sup>	5,6 (39,6)	6,5 (36,2)

<sup>a</sup> les valeurs pour la dernière couche de résolution sont données entre parenthèses.

## F. Cristallisation du site A bactérien muté A1408G

La cristallisation de complexes aminoglycosides / site A eucaryote humain comportant une guanine en position 1408 (numérotation selon *E. coli*) a laissé entrevoir la possibilité de cristalliser le site A bactérien altéré par la mutation A1408G. Deux fragments ont été testés : A3mut et A3-4mut (figure 2.9) complexés à la paromomycine et la généticine. Ces deux aminoglycosides comportent un groupement hydroxyle en position 6' du cycle I et sont moins affectés par la mutation A1408G que les aminoglycosides comportant un groupement ammonium (néomycine B, ribostamycine, tobramycine) (voir chapitre 3).

La première série de conditions à 20°C a testé les fragments A3mut et A3-4mut complexés à la paromomycine et la généticine à plusieurs pH (5,5 ; 6,0 et 6,4) en présence de 2 mM de cobalt hexamine (Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>). Dans ces conditions, le fragment A3mut a systématiquement produit de petites bulles (séparation de phases). Le complexe A3-4mut complexé à la généticine a cristallisé sous forme de sphérulites à pH 6,0 et pH 6,4 (table 2.17).



**Figure 2.9 :** Fragments d'ARN comportant le site A bactérien (encadré en rouge) affecté de la mutation A1408G.

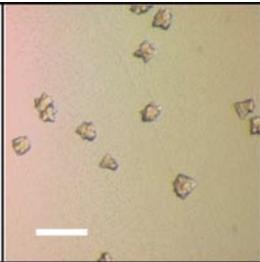
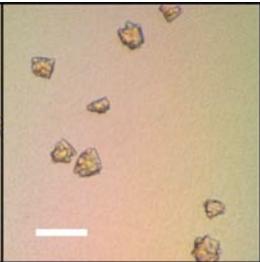
Une seconde série a tenté d'optimiser ces premiers cristaux en modifiant la concentration de MPD dans le réservoir (35, 45 et 55 %) mais il n'a pas été possible d'obtenir de cristaux. Un screen Nextal « MPDs » a été utilisé pour identifier de nouvelles conditions de cristallisation des fragments A3mut et A3-4mut complexés à la généticine et à la paromomycine. Des microcristaux du complexe généticine / A3-4mut de taille plus ou moins importante ont été obtenus dans près de 19 conditions (table 2.18).

Les solutions du kit Nextal « MPDs » ont été utilisées pour reproduire à plus grande échelle les conditions favorables à la cristallisation du complexe généticine / A3-4mut. Par simple dilution dans de l'eau milliQ, la concentration en sel et en MPD a été diminuée de 25 et 50 % afin de favoriser l'apparition de cristaux plus gros. La nucléation n'a pu être reproduite que dans huit conditions et une amélioration de la taille des cristaux dans cinq d'entre elles (table 2.19). Aucune diffraction aux RX n'a été obtenue avec ces cristaux.

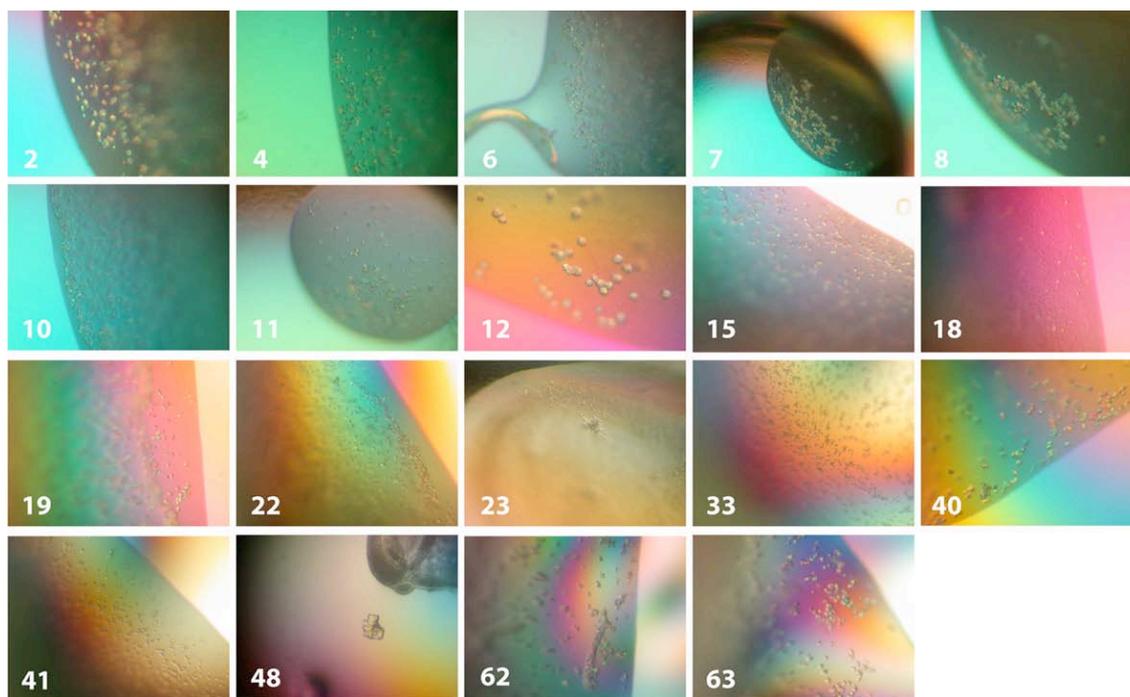
Le complexe paromomycine / A3mut a également été testé par un kit Nextal « MPDs » mais dans ce cas seules quatre conditions ont permis l'obtention de cristaux. Les très fines plaquettes obtenues avec la solution 44 ont été optimisées avec succès en suivant le même protocole que celui appliqué au complexe généticine / A3-4mut. Les cristaux

obtenus ont également été testés sur une source synchrotron sans résultat (rares tâches à basse résolution).

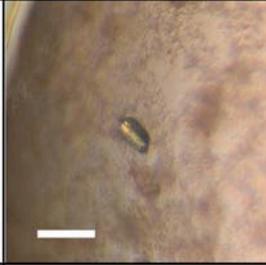
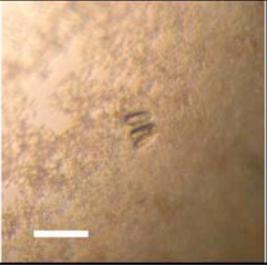
**Table 2.17** : Résultats des premiers essais de cristallisation du complexe généticine / A3-4mut.

G é n é t i c i n e		
	A3-4mut	A3-4mut
MPD	2	2
Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>	2 mM	2 mM
pH	6,0	6,5

**Table 2.18** : Résultats du kit Nextal « MPDs » pour le complexe généticine / A3-4mut. Les numéros en blanc se réfèrent aux solutions de la **table 2.3**.



**Table 2.19** : Cristaux du complexe généticine / A3-4mut obtenus après optimisation.

		
	A3-4mut	A3-4mut
MPD	20	20
Sel	Ca Cl <sub>2</sub> 100 mM	Ca OAc <sub>2</sub> 100 mM

## **CHAPITRE 3**

# **STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DE COMPLEXES ENTRE AMINOGLYCOSIDES NATURELS ET SITE A**



## Chapitre 3 Structures cristallographiques de complexes entre aminoglycosides naturels et site A

### I Publication 3 : effets du nombre de charges et de cycles.

Dans le cadre d'une collaboration scientifique avec la société Ribotargets Ltd (actuellement Vernalis Ltd, Cambridge RU), plusieurs aminoglycosides naturels ont été cristallisés afin de confirmer l'efficacité du système biologique en vue de son utilisation pour l'étude de nouvelles molécules. Six complexes ont ainsi été obtenus puis testés à l'ESRF de Grenoble. Les jeux de données indexés nous ont été fournis par James Murray pour la résolution des structures.

Ces structures apportent un complément d'information sur les interactions entre l'ARN du site A bactérien et les aminoglycosides naturels appartenant à différentes sous-classes. Un article présente les données obtenues en s'attachant tout particulièrement aux points communs entre ces six complexes.<sup>3</sup>

Les structures cristallographiques de six complexes entre des aminoglycosides naturels (néamine, gentamicine C1a, kanamycine A, ribostamycine, lividomycine A et néomycine B) et des oligoribonucléotides contenant le site A du ribosome bactérien sont présentés avec des résolutions entre 2,2 et 3,0 Å. Malgré le fait que le nombre de contacts entre l'ARN et les aminoglycosides oscille entre 20 et 31 (en fonction de la taille de l'aminoglycoside et de la résolution du complexe), huit contacts directs par liaison hydrogène entre les cycles I et II de la partie néamine ont été relevés dans chaque complexe observé. Le cycle I est inséré dans le site A par empilement sur la guanine G1491 et forme une pseudo paire de base par l'intermédiaire de deux liaisons hydrogène avec la face Watson-Crick de l'adénine A1408 universellement conservée. Cette

---

<sup>3</sup> Crystal structure of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides : role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding  
**B.François**, R.J.M. Russell, J.B.Murray, F.Aboul-ela, B.Masquida, Q. Vicens and Eric Westhof.  
NAR, 2005, vol.33, No. 17, 5677-5690.

interaction centrale permet de maintenir les adénines A1492 et A1493 protubérantes à l'extérieur de l'hélice.

Toutes les structures de complexes entre le site A bactérien minimal et des aminoglycosides possèdent un empilement cristallin dans lequel ces deux adénines A1492 et A1493 établissent des contacts intermoléculaires avec le sillon large formé par des paires Watson-Crick d'une hélice symétrique. Dans un cristal, un site A vide a été observé tandis que deux autres cristaux ont présenté une double occupation pour un même site A : un premier aminoglycoside est lié de manière spécifique tandis qu'un second interagit de manière différente avec le sillon profond de l'ARN.

Les références bibliographiques incluses dans la publication n'ont pas été reprises dans le chapitre 6.

# **Crystal structure of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides : role of the number of rings and positive charges in specific binding leading to miscoding.**

Boris François<sup>1</sup>, Rupert J.M. Russell<sup>2</sup>, James B. Murray<sup>2</sup>, Fareed Aboul-ela<sup>2,3</sup>, Benoît Masquida<sup>1</sup>, Quentin Vicens<sup>1,4</sup> and Eric Westhof<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de biologie moléculaire et cellulaire du CNRS, UPR9002 'Architecture et réactivité de l'ARN', Université Louis Pasteur, F-67084 Strasbourg, France.

<sup>2</sup>Vernalis, Granta Park, Cambridge CB1 6GB, UK.

<sup>3</sup>Current address:  
Department of Biological Sciences  
Louisiana State University  
Baton Rouge 70803 (USA)

<sup>4</sup>Current address:  
Howard Hughes Medical Institute  
University of Colorado  
Department of Chemistry and Biochemistry  
Boulder, CO 80309-0215 (USA)

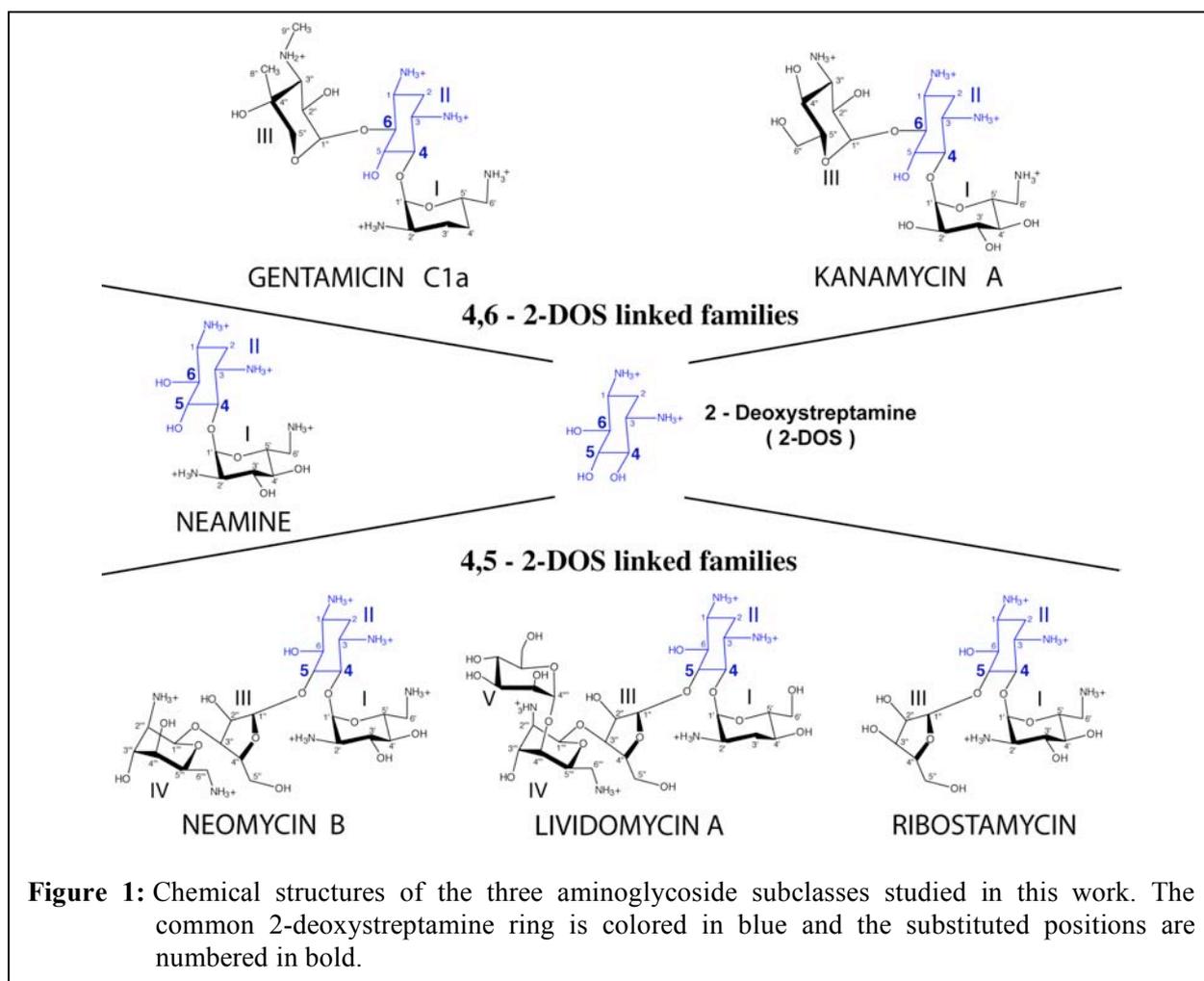
\* Corresponding author (e.westhof@ibmc.u-strasbg.fr)

## **Abstract**

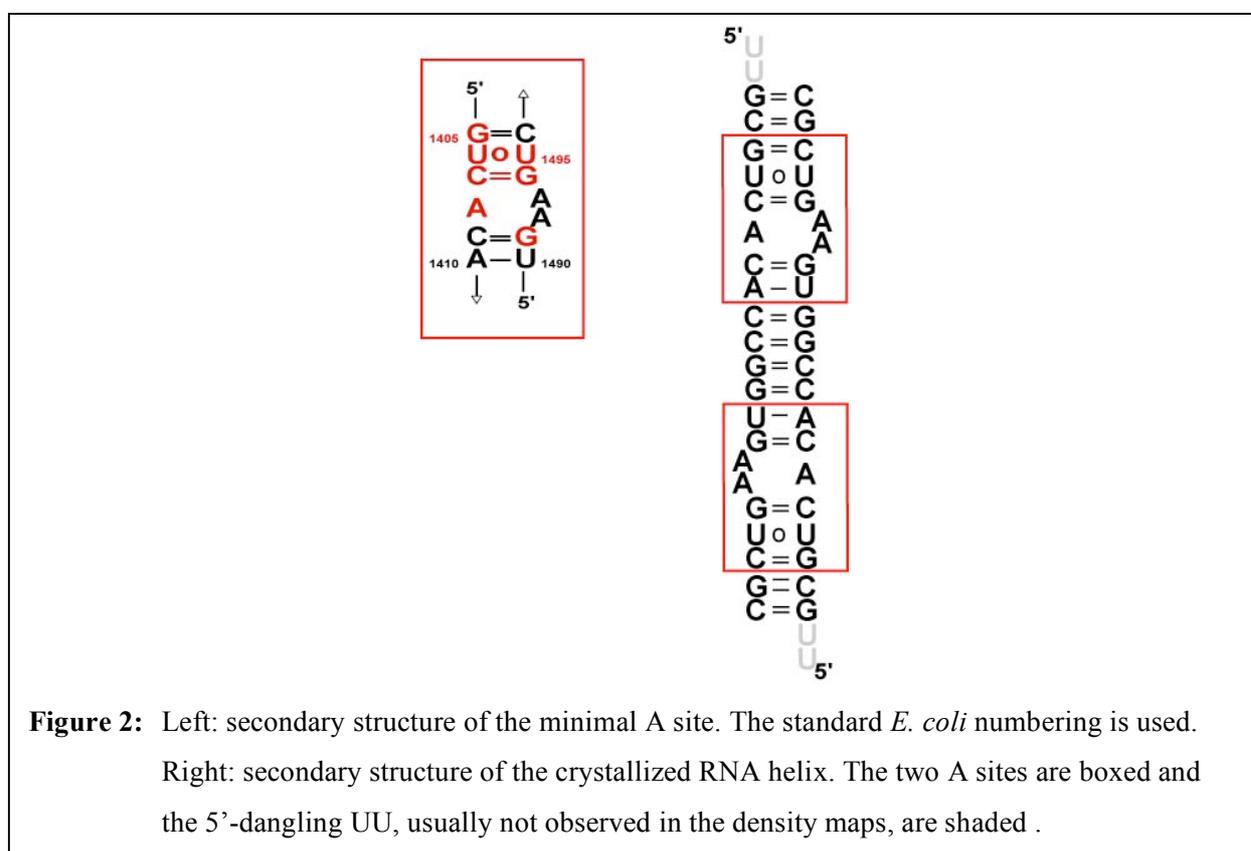
The crystal structures of six complexes between aminoglycoside antibiotics (neamine, gentamicin C1A, kanamycin A, ribostamycin, lividomycin A, and neomycin B) and oligonucleotides containing the decoding A site of bacterial ribosomes are reported at resolutions between 2.2 and 3.0 Å. Although the number of contacts between the RNA and the aminoglycosides varies between 20 and 31, up to eight direct hydrogen bonds between rings I and II of the neamine moiety are present in all the observed complexes. The puckered sugar ring I is inserted into the A-site helix by stacking against G1491 and forms a pseudo base pair with two H-bonds to the Watson-Crick sites of the universally conserved A1408. This central interaction helps to maintain A1492 and A1493 in a bulged-out conformation. All those structures of the minimal A-site RNA complexed to various aminoglycosides display crystal packings with intermolecular contacts between the bulging A1492 and A1493 and the shallow/minor groove of Watson-Crick pairs in a neighboring helix. In one crystal, one empty A site is observed. In two crystals, two aminoglycosides are bound to the same A site with one bound specifically and the other bound in various ways in the deep/major groove at the edge of the A sites.

## Introduction

Aminoglycosides are broad spectrum bactericidal antibiotics which are used against Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* and some Gram-positive bacteria such as those of the *Staphylococcus* family. They disturb the fidelity of the tRNA selection step during protein synthesis by binding to the A site on the bacterial ribosomal 16S rRNA (1,2). The aminoglycoside antibiotics are oligosaccharides containing variable numbers of sugar rings and ammonium groups (3). They all contain a central 2-deoxystreptamine (2-DOS or ring II) with an ammonium group on either side of the deoxy carbon and attached at position 4 to ring I, forming the neamine molecule. The different sub-classes can be distinguished on the basis of the chemical linkages to ring II: in the neomycin family (containing paromomycin, neomycin B, lividomycin A, and ribostamycin), ring II is 4,5-disubstituted and, in the kanamycin and gentamicin families (to which tobramycin, geneticin and gentamicin C1A belong), ring II is 4,6-disubstituted (Figure 1).



A critical advance in the understanding of molecular recognition and the mechanisms of action has recently been made with the high-resolution crystal structures (3.1 Å) of bacterial ribosomal 30S particles complexed to aminoglycosides (4-7). In addition, crystal structures were solved for the decoding-aminoacyl site (A site) (2.4 - 2.54 Å), isolated from the bacterial 16S ribosomal RNA, and complexed with several antibiotics from the aminoglycoside family (8-10). The crystalline complexes between RNA oligonucleotides containing two A sites (Figure 2) and paromomycin, tobramycin or geneticin characterized the binding mode of aminoglycosides at high resolution. The puckered sugar ring I is inserted into the A-site helix by stacking against a guanine residue (G1491) and by forming a pseudo pair with two H-bonds to the Watson-Crick sites of an universally conserved adenine (A1408). This particular interaction helps to maintain adenines A1492 and A1493 in the bulged-out conformation which allows those two adenines to make A-minor contacts with two Watson-Crick base pairs. In the 30S particle, the two contacted Watson-Crick base pairs belong to the first two pairs of the codon-anticodon minihelix (4-6). In the co-crystal structures, the two contacted Watson-Crick base pairs belong to a neighbouring complex, mimicking the situation occurring in the 30S particle (8,11). This locked conformation of the bulging A1492 and A1493 in the docked



complex forms the molecular basis for the aminoglycoside induced misreading (5,12). The conserved 2-deoxystreptamine ring (ring II) forms similar H-bonds in the three complexes and its binding is made possible by the adaptability created by the universally conserved U1406•U1495 pair. The additional rings contact different nucleotides of the A site, depending on the substitution type of ring II. Thus, overall tight packing of atoms in direct van der Waals contact is central and a prerequisite to specific recognition. About one third of the total RNA-aminoglycoside contacts were shown to be mediated by water molecules (11). Water molecules participate in the assembly by linking hydrophilic groups that belong to both components. The hydration shells around nucleic acid base pairs tend to be conserved and maintained regardless of the environment (13,14).

Here, we present six crystal structures of complexes between A-site oligonucleotides and aminoglycoside antibiotics containing between two and five aminosugar rings: neamine (2.5 Å), ribostamycin (2.2 Å), kanamycin A (3.0 Å), gentamicin C1A (2.8 Å), neomycin B (2.4 Å), and lividomycin A (2.2 Å) (Table I in supplementary material). Those crystal structures fully confirm the conservation of contacts between aminoglycosides and A-site nucleotides despite the great molecular variety: eight direct contacts between the neamine rings and the A-site nucleotides are present in every single crystal structure. In addition and following the molecular diversity, the complexes display various additional contacts, either direct or water-mediated to the neamine moiety as well as to the additional rings. The crystal structures show also that the occupancy at the binding site can be variable. Thus, in the neamine crystal structure, one of the two A sites is empty; in the kanamycin complex, one A site contains two bound antibiotics; and, in the ribostamycin complex, both A sites contain two bound antibiotics. Overall, the stoichiometry of aminoglycoside binding is observed to vary between zero and two per A site, an important fact which needs to be incorporated in the appreciation of the measured binding constants on model oligonucleotide systems and in their comparisons with structural data.

## Materials and methods

Crystallisation procedures are essentially the same as previously published (8-10). Two RNA constructs were used for crystallisation trials: 5'CGCGUCACACCGGUGAAGUCGC3' and 5'UUGCGUCACACCGGUGAAGUCGC 3'. These were purchased from Dharmacon Research, Inc. (Boulder, CO, USA) and purified by denaturing gel electrophoresis (20 %(w/v) acrylamide/bisacrylamide (19:1), 8 M urea) using TBE buffer (9 mM Tris-borate (pH 8.3), 0.2 mM EDTA) at 50–55 °C. The appropriate band was excised, eluted into 300 mM Sodium Acetate pH 5.2 and recovered by precipitation with iso-propanol. The RNA was exchanged and concentrated to 2.0 mM into 100 mM Sodium Cacodylate pH 6.4, 50 mM Sodium Chloride, 5.125 mM Magnesium Sulphate and 0.125 mM EDTA. Prior to crystallisation the RNA was annealed by heating to 90 °C for 2 min and then slowly cooled to 37 °C. Antibiotics were purchased from Sigma, and made up to 4 mM in 200 mM Sodium Cacodylate pH 6.4 and 300 mM Potassium Chloride. Equal volumes of RNA and antibiotic solution were combined and incubated at 37 °C for 10 mins prior to crystallisation. Crystallisation was performed by the hanging drop method as follows, 1 µL of RNA/antibiotic solution was combined with 1 µL of crystallisation solution (1-5 % MPD and 1-5 % glycerol) and equilibrated over a 50 % MPD (Fluka) reservoir.

The best crystals were recovered and vitrified in liquid ethane (110 K) or nitrogen (77 K) after soaking briefly in 12.5 mM Sodium Chloride, 125 mM Sodium Cacodylate pH 6.4, 150 mM Potassium Chloride, 2 mM Antibiotic and 40 % MPD.

Data collection was performed on the Structural Biology Beamline ID29 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF; Grenoble, France). Data were processed with the HKL2000 suite (15) and a correct solution was found for each structure by the molecular replacement program Molrep (16) using the coordinates of the RNA from PDB code 1J7T (paromomycin). Refinement was done using CNS version 1.1 (17). The parameter and topology files for the antibiotic molecules were obtained on the Hetero-compound Information Centre - Uppsala server (18) (University of Uppsala, Sweden). The data pertaining to data collection and refinement are given in Table I (supplementary

material). Each crystallized duplex contains two identical but independent A sites. In all complexes, one of the two A sites is always better defined structurally (lower temperature factors, more identified solvent peaks). The structure of the complex with neamine has been refined at 2.8 Å as well as in presence of modified neamine molecules (Murray et al., submitted)(19). Here we extended the refinement to 2.5 Å. In all figures below, only the better defined A site is used for representation. All figures were drawn using The PyMOL Molecular Graphics system (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA (<http://www.pymol.org>)

## Results

First, the complexes that display the same main characteristics as the previously published ones will be described. That section will be followed by the complexes displaying non-specifically bound antibiotics. The crystal structure of the complex between neamine and the RNA oligonucleotide is discussed separately owing to its peculiarities. Finally, there is a description of the crystal packing contacts and of their importance.

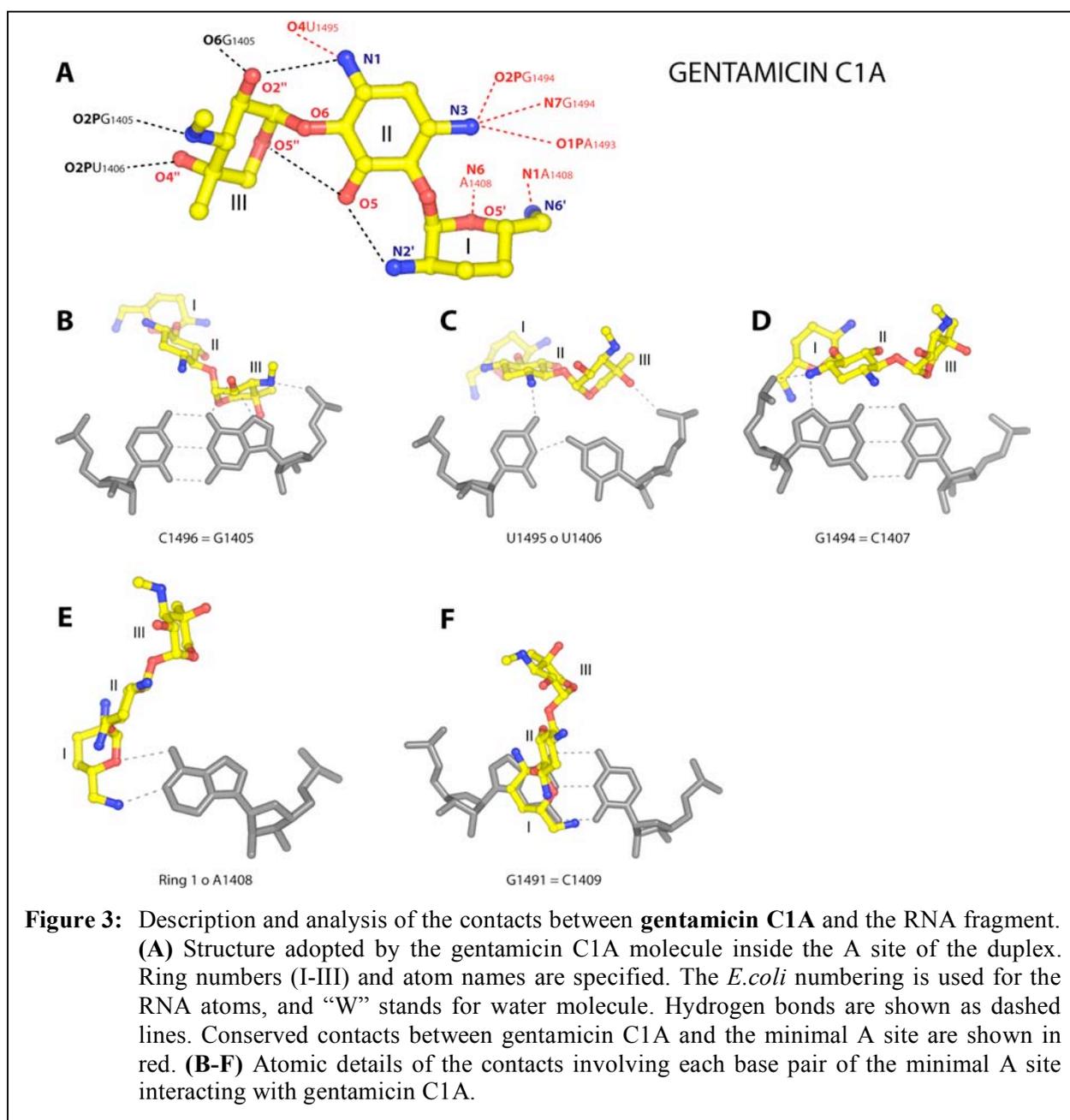
### Standard complexes

The complexes are described with increasing number of rings additional to the neamine moiety. Tables IIA, IIB, and IIC in the Supplementary material contains a list of the hydrogen bonding contacts, direct or water-mediated, between the rings of the aminoglycosides and the RNA duplex. In Table III of the supplementary material are given the root-mean-square-deviations (RMSD) of the RNA duplexes in all the complexes. When considering only the minimal A-site nucleotides, the RMSD values are between 0.4 and 0.9 Å, independently of the nature of the 4,5 or 4,6 linkage. When considering all atoms of the RNA duplexes, the values are slightly higher and tend to be a little higher when comparing 4,5 and 4,6 substituted aminoglycosides (but still less than 1.2 Å). Such comparisons cannot include the complex with neamine (see below). The comparisons are made with respect to the paromomycin complex (8) which is the only A-site bound aminoglycoside solved also within the context of the 30S particles (7). We showed before (8) that the rmsds between the complexed oligonucleotide crystals and the complexed 30S particles are less than 1 Å. Comparisons between the RNA alone structures of the present

complexes and the A site RNA in the paromomycin bound 30S particles (7) are also around 1 Å.

### Gentamicin C1A

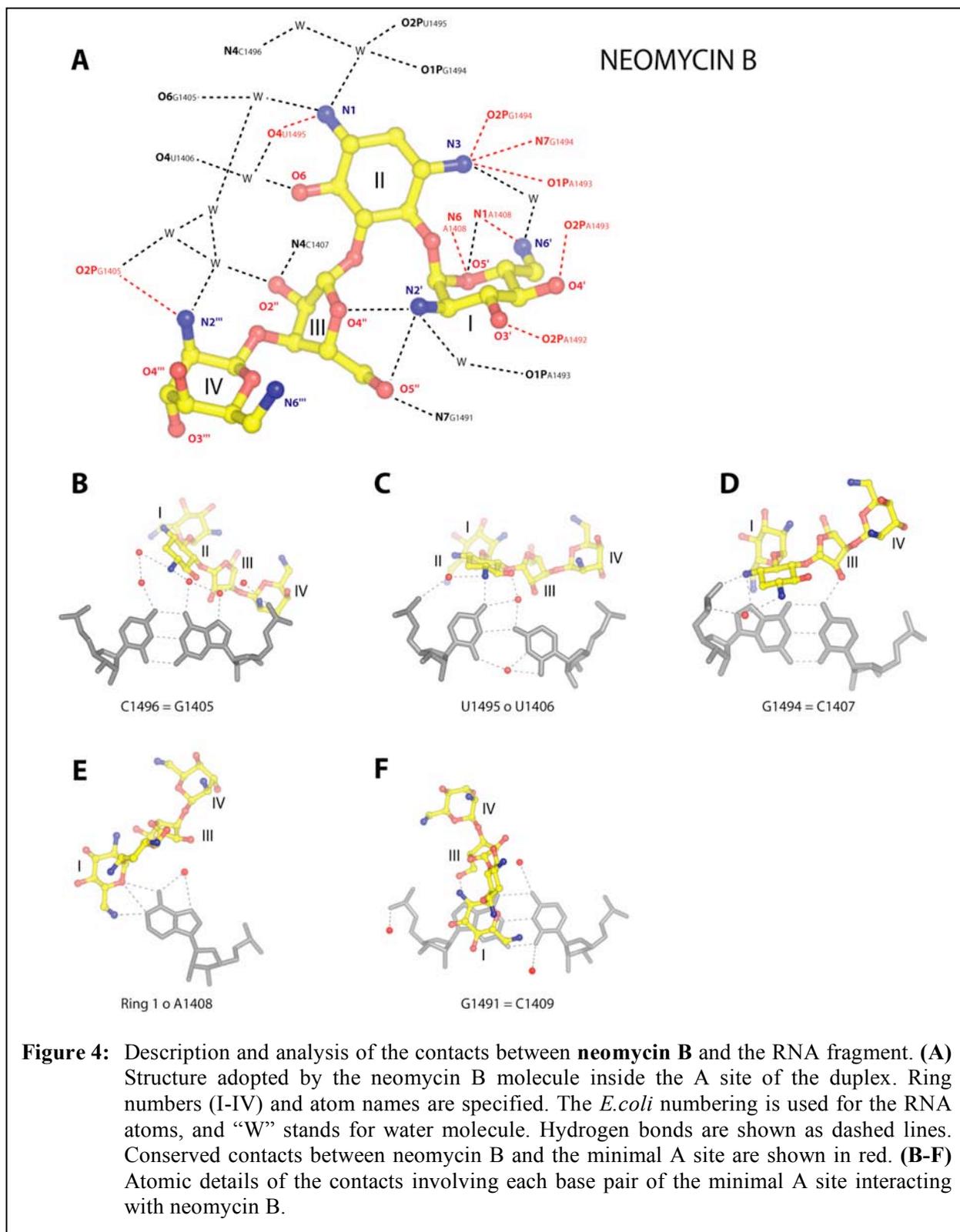
The gentamicin C1A is a 4,6 aminoglycoside very closely related to geneticin (also known as gentamicin G or G418). The differences are in ring I where the important 6' substituent is an ammonium group and carbons 3' and 4' are deoxy. Six of the eight invariant intermolecular contacts between rings I and II are present, the two missing ones being those involving the hydroxyl groups at the 3' and 4' positions. Of those six, four are



absent in the NMR structure (distances above 3.5 Å) (20). Such differences have been previously discussed (8,21). Four contacts are common in both gentamicin C1A and geneticin crystals (10) (Figure 3 and Tables IIA-C in supplementary material). The U1495oU1406 base pair is bifurcated with a H-bond between O4'' and O2P(U1406) as in geneticin. The intramolecular H-bond between N2' and O5 linking rings II and I is water-mediated in geneticin and direct in gentamicin, while the other intramolecular H-bond, between O5 and O5'' linking rings I and III are direct in both. The rmsd between the x-ray and NMR structure (20) is 2.32 Å while the rmsd between the present x-ray complex and the paromomycin bound to the 30S particle (7) is 1.05 Å.

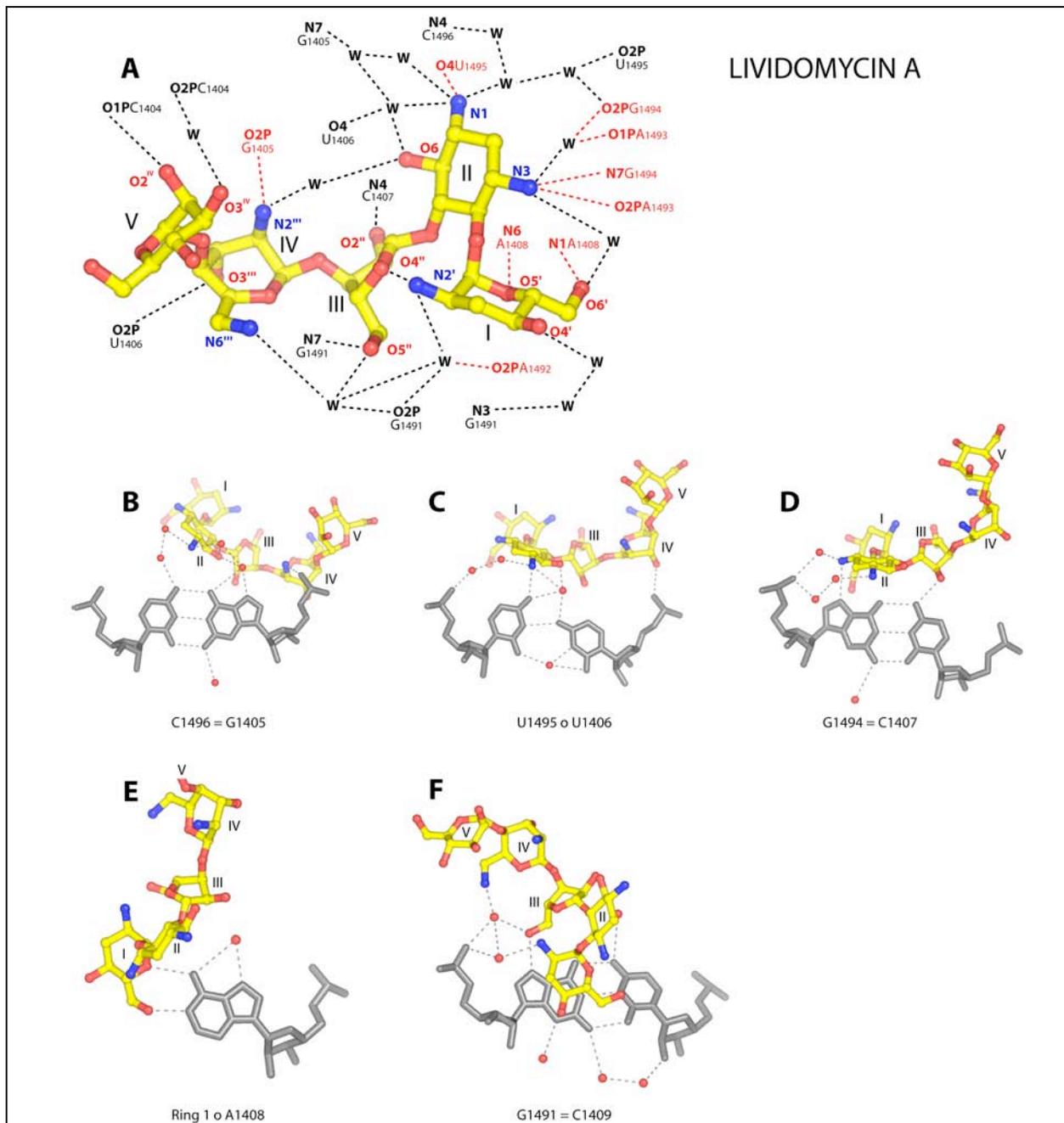
### **Neomycin B**

Neomycin B is a 4,5 aminoglycoside which differs from paromomycin by the presence of an ammonium group instead of a hydroxyl group at position 6'. It thus carries six positive charges, being the aminoglycoside with the highest charge. The number of aminoglycoside/RNA contacts is about the same in paromomycin and neomycin (24 and 23, respectively) with 15 common (Tables IIA-C and Figure 4). Again, the U1495oU1406 base pair is bifurcated with a water mediated contact between O4(U1406) and O6 of ring II instead of a direct H-bond as in gentamicin and geneticin. The two intramolecular H-bonds linking N2' of ring I to O4'' and O5'' of ring II are identical.



## **Lividomycin A**

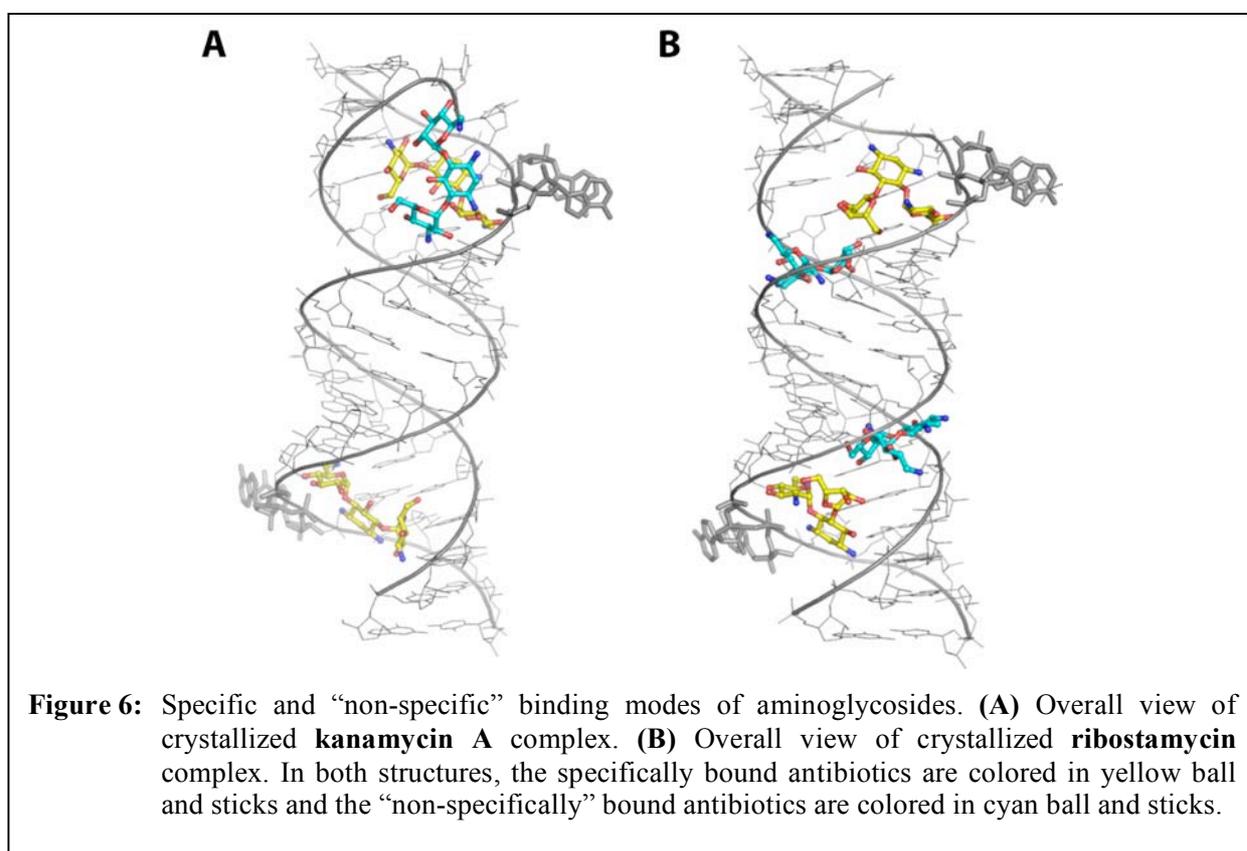
Lividomycin A is also a 4,5 aminoglycoside but with five rings, the most substituted compound we have analysed. Position 6' contains a hydroxyl group with a deoxy at position 3'. The last ring does not carry any positive charge and, thus, the overall charge is +5 like gentamicin. The resolution is among the highest of the crystals analysed (2.2 Å). Not surprisingly, the number of RNA/aminoglycoside contacts is high, 31, but with only 9 or 11 common between lividomycin and paromomycin or neomycin, respectively. Some of the differences can be ascribed to a conformational change of the phosphate of A1493 leading to an alternative hydration network between the neamine part and the RNA (Figure 5). In the complex of geneticin, this alternative conformer of A1493 was observed in equilibrium with the regularly seen conformer. Again, the U1495oU1406 base pair is bifurcated with two bound water molecules, one linking the RNA to the aminoglycoside and the other one bound to U1406. The hydroxyl groups of ring V contact only single anionic phosphate oxygen atoms.



**Figure 5:** Description and analysis of the contacts between **lividomycin A** and the RNA fragment. **(A)** Structure adopted by the lividomycin A molecule inside the A site of the duplex. Ring numbers (I-V) and atom names are specified. The *E.coli* numbering is used for the RNA atoms, and “W” stands for water molecule. Hydrogen bonds are shown as dashed lines. Conserved contacts between lividomycin A and the minimal A site are shown in red. **(B-F)** Atomic details of the contacts involving each base pair of the minimal A site interacting with lividomycin A.

## Complexes with both specific and non-specific binding

Two complexes displayed unexpected stoichiometries. In the crystal structure of the complex between kanamycin and the oligonucleotide, one A site contained a single antibiotic as usual but the second A site (with the lowest B-factors) presented two bound aminoglycosides, one in the standard binding mode and the second one in a new binding mode (Figure 6A). Further, in the complex between ribostamycin and the oligonucleotides, both A sites contained two bound aminoglycosides, one in the standard binding mode and the other one in still another binding mode (Figure 6B). We refer to those additional binding modes as ‘unspecific’ binding modes not only order to distinguish the binding modes but also because of the diversity in the binding modes of the ‘unspecific’ ones.



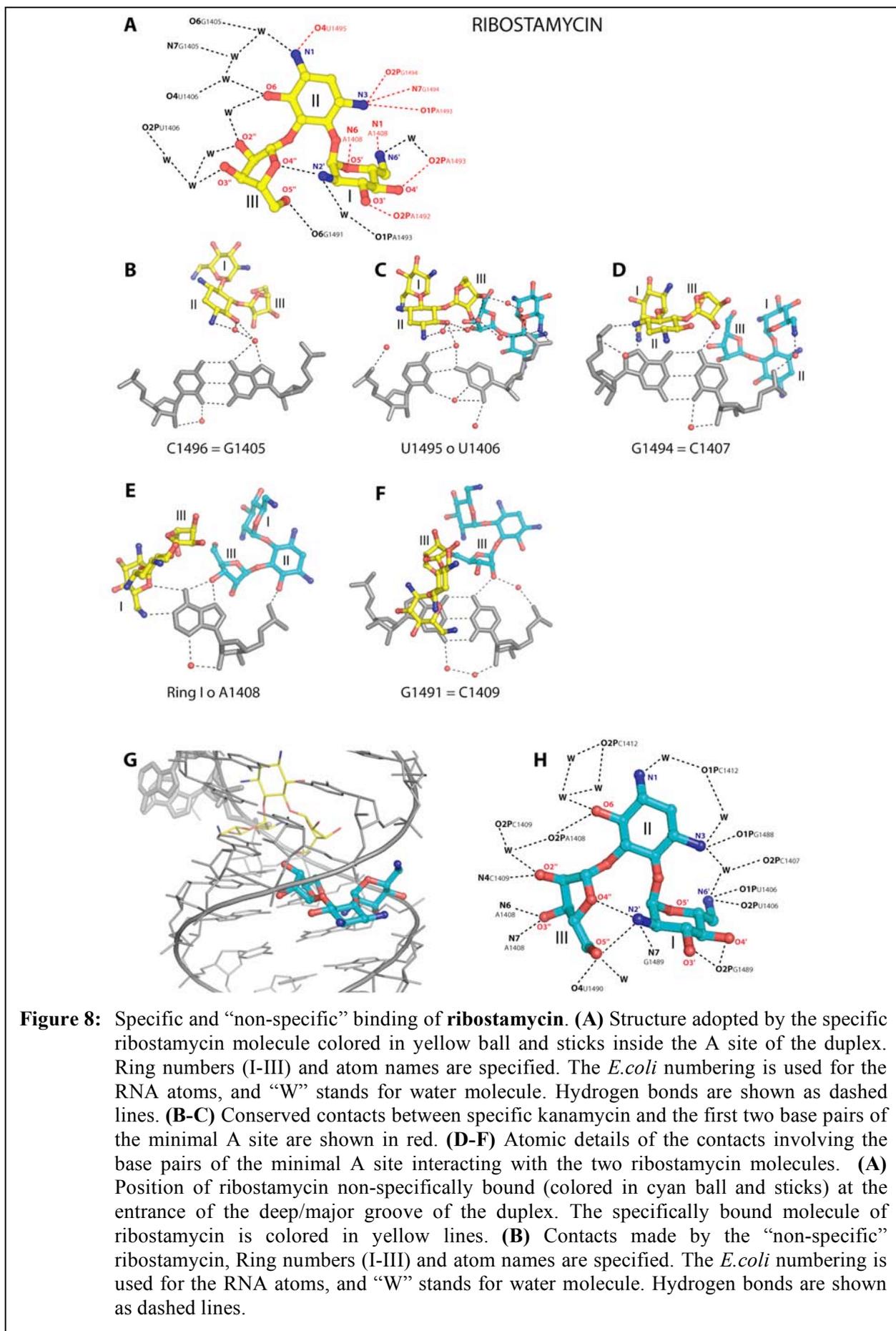
## **Kanamycin A**

Kanamycin A is a 4,6 aminoglycoside with two changes compared to tobramycin: there is a hydroxyl group at position 3' and position 2' contains a hydroxyl group instead of an ammonium group as in tobramycin. Thus, overall, kanamycin carries 4 positive charges instead of 5. Tobramycin and kanamycin present, respectively, 21 and 20 RNA/aminoglycoside contacts. Of those, eight contacts belong to the common and usual eight invariant contacts (Figure 7). In the best defined A site, there is a second kanamycin molecule straddling the entrance of the deep/major groove (Figure 7G). The conformations of the specifically and unspecifically bound kanamycin molecules are almost identical (RMSD of 0.46 Å with the RMSD between the two specifically bound kanamycin equal to 0.24 Å). The substituents on the rings make single H-bonds, six to water molecules and 5 to the RNA (Figure 7H). The two kanamycin molecules do not contact each other directly, but do interact via water molecules in an interesting fashion: the hydroxyl group O4'' of ring III binds a water molecule which links O2' and O5 of rings I and II, respectively. Although dimeric aminoglycosides have been synthesized (22,23), it could be interesting attempting to synthesize dimeric molecules able to mimic the two crystallographic bound molecules observed in the present crystal structure.



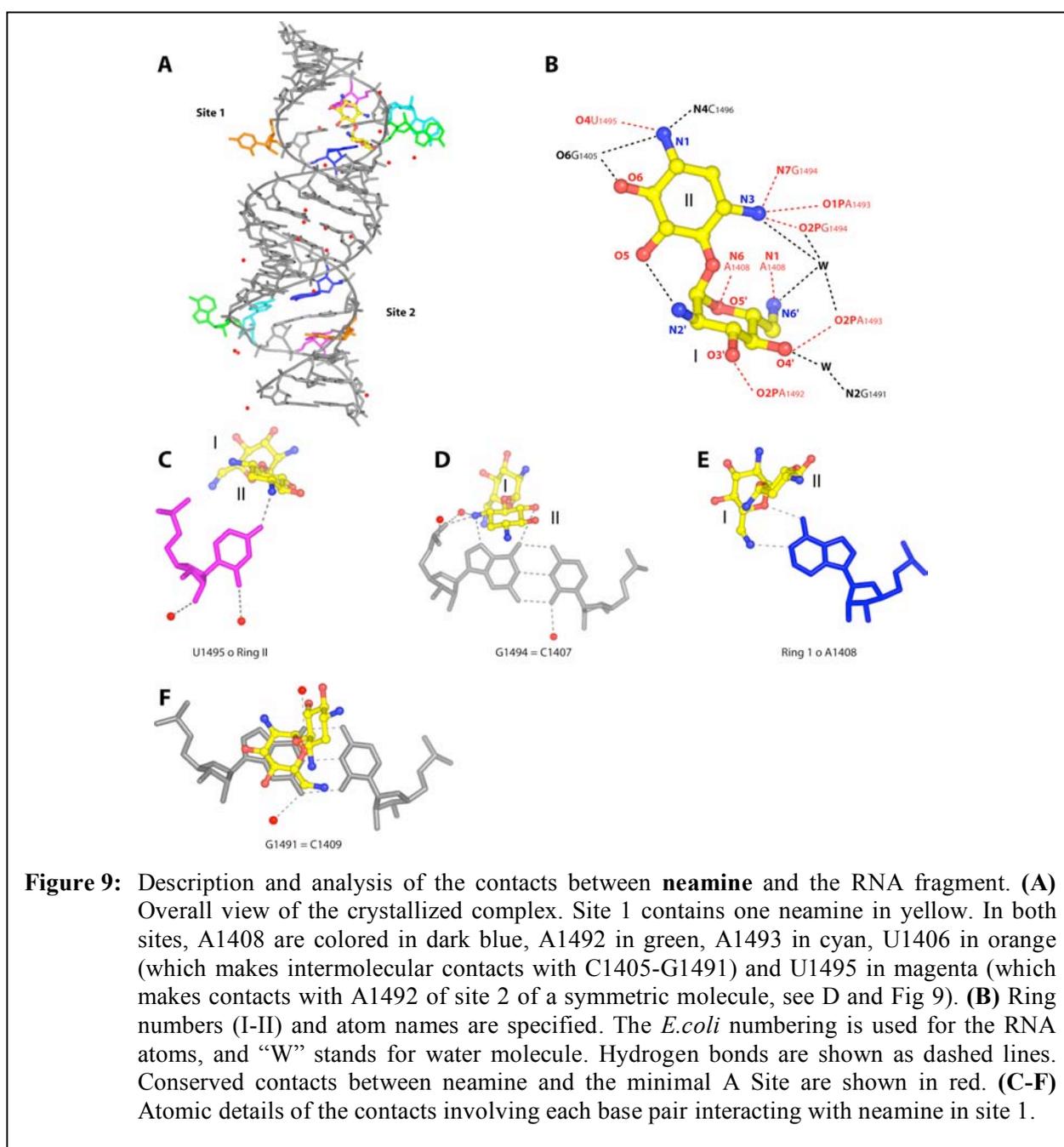
## Ribostamycin

Ribostamycin is a 4,5 aminoglycoside, equivalent to neomycin without ring IV. It, thus, carries only four positive charges. Compared to neomycin which makes 23 RNA/aminoglycoside contacts, the specifically bound ribostamycin makes 21 but, among those, 13 are common to both complexes (Tables IIA-C and Figure 8): the hydroxyl O5'' of ring III, instead of H-bonding to N7(G1491), H-bonds to O6(G1491). As discussed above, in both A sites, two ribostamycin molecules are bound (Figure 8G). The conformers of the ribostamycin molecules, the specifically and the unspecifically bound ones, are almost identical (RMSD specific-unspecific = 0.8 Å, RMSD specific-specific = 0.4 Å). In contrast to the situation observed in the kanamycin complex, the ribostamycin molecules face each other with their rings III but do not contact each other, even via water molecules (although this cannot be formally excluded owing to the moderate resolution). On the contrary, the two ribostamycin molecules bind to common nucleotides of the A site: the O3'' and O2'' of ring III interact with, respectively, N6 and N7 of A1408 as well as N4 and O2P of C1409 (Figure 8E,F and Figure 8H). Rings I and II of the unspecifically bound ribostamycin interact with nucleotides 'below' the conserved region of the A site (1412, 1488, 1489) (Figure 8H).

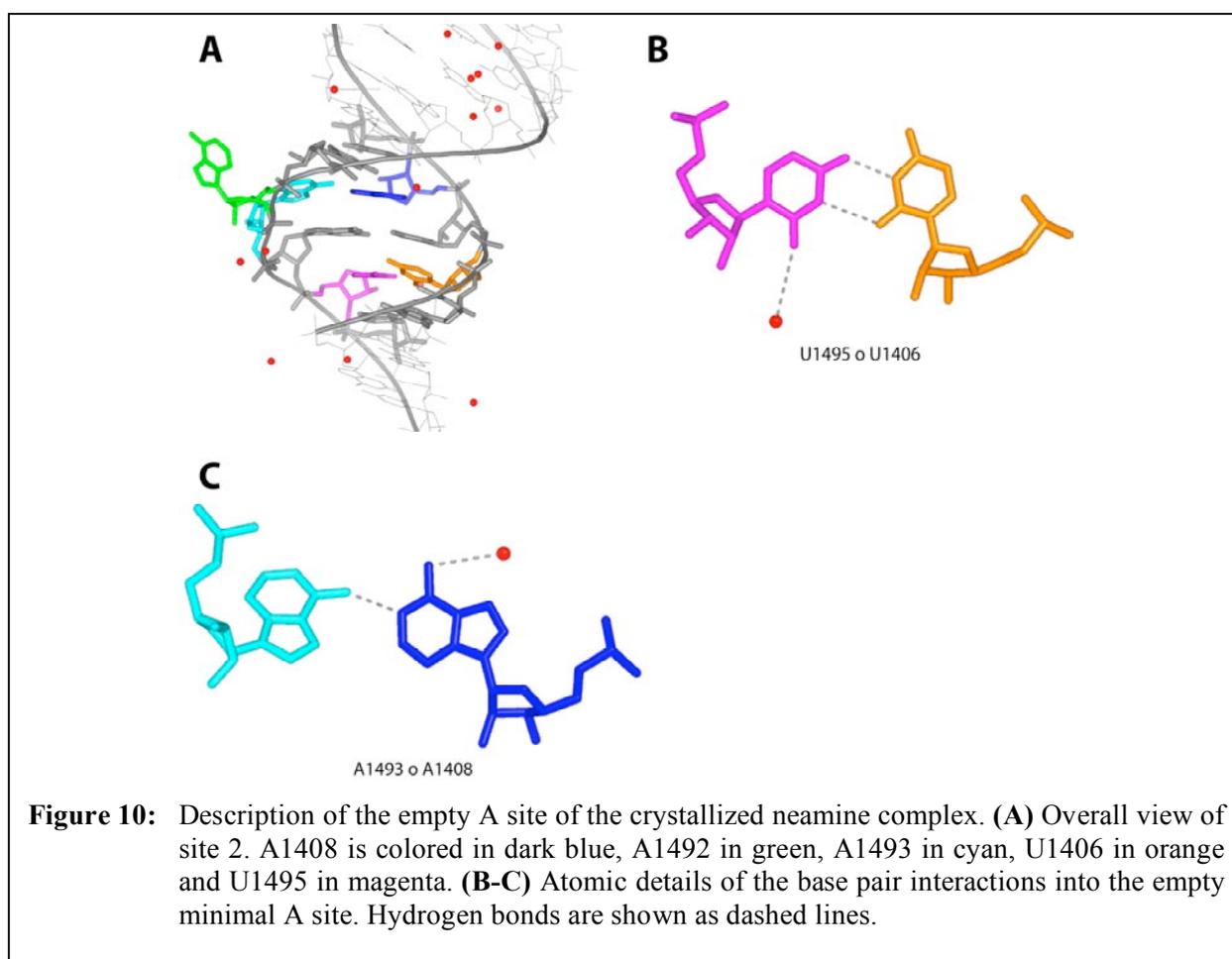


## The complex with neamine: variable occupancy

The crystal structure of the complex between neamine and the oligonucleotides is the most peculiar one. All the standard direct H-bonds between the neamine rings and the RNA are present with the two A1492 and A1493 bulging out as in all other complexes (Figure 9). However, U1406 does not form a base pair with U1495 but, instead, bulges out of the duplex. The place normally occupied by U1406 is filled in by an A1492 from a neighbouring molecule, forming a cis Watson-Crick/Hoogsteen pair (with the adenine in

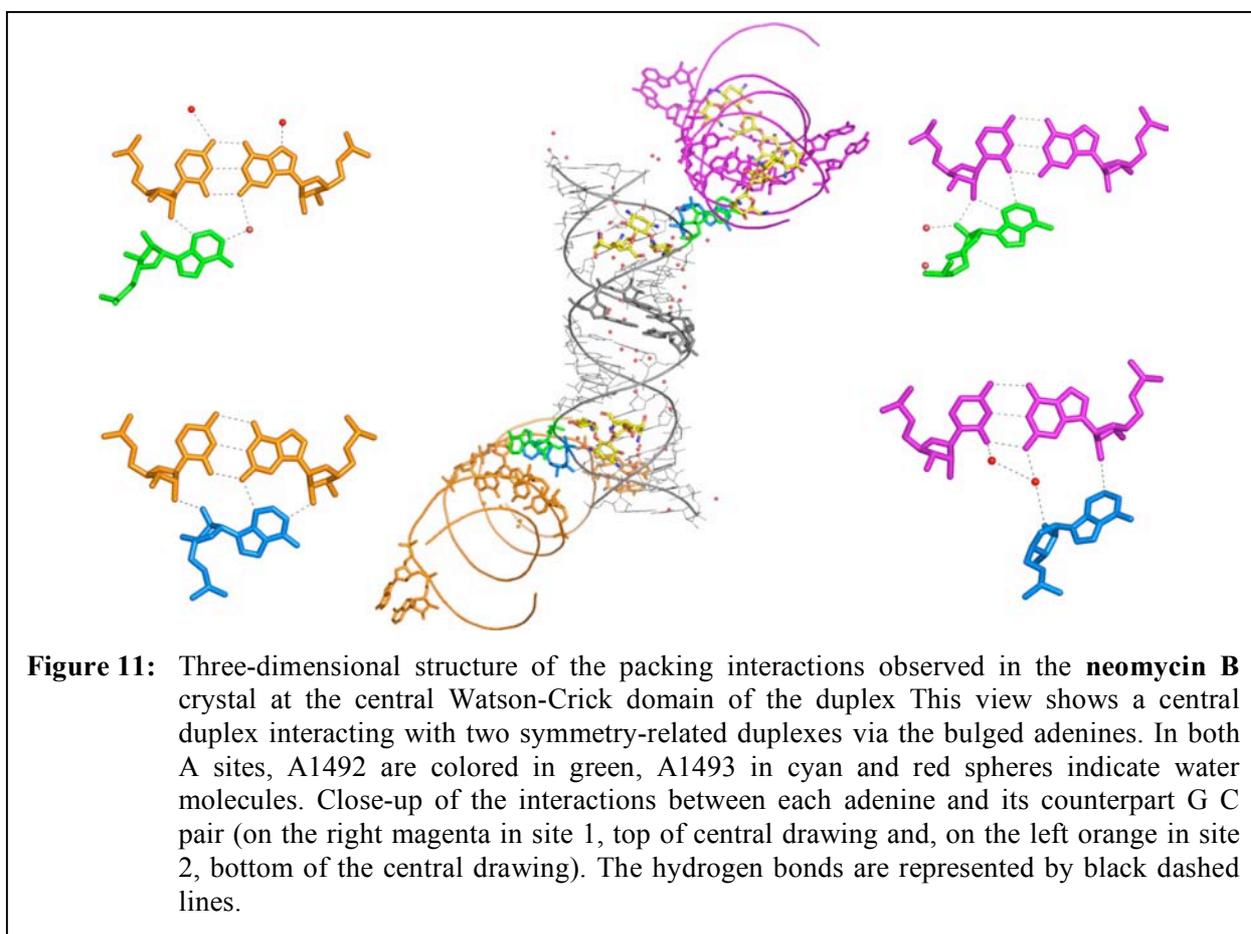


the syn conformation). The second site is void of antibiotic and adenine A1408 forms a single H-bond pair with A1493 in the syn conformation (Figure 10C), while the U1406oU1495 base pair is fully symmetric. Only A1492 bulges out (and H-bonds to a neighbouring molecule U1495, as just described). Such a conformation with the bulging U1406 is compatible with the conformation of the A site in the 30S ribosomal particle complexed to tRNA and mRNA (6) (Figure 1 in supplementary material). An isomorphous structure was obtained for complexes with neamine at a lower resolution as well as with modified neamine molecules (Murray et al. submitted)(19). Interestingly, in crystals of oligonucleotides containing a single A site (24), an equilibrium between the flipped out conformation of both A1492 and A1493 and a conformation with only A1493 flipped out was observed. The latter conformation is different from the one observed in the free A site of the neamine complex, since a cis Watson-Crick between A1408 and A1492 was observed (24). Thus, the free A site exists in multiple and alternative conformations in contrast to the aminoglycoside complexed A site, as observed previously (7,24).



**Crystal packing: Adenines 1492 and 1493 bulge out of the A-site helix to form A-minor contacts with the first two base pairs of the codon-anticodon.**

The previous structures of the minimal A-site RNA complexed to various aminoglycosides display crystal packings in which the main intermolecular contacts occur between the bulging adenines (A1492 and A1493) and the shallow/minor groove of a neighboring helix (11). The two adenines interact with the 3' ends of two adjacent helical Watson-Crick base pairs such that the first adenine (A1492) interacts in an antiparallel fashion with one base of the Watson-Crick pair and the second adenine (A1493) interacts in a parallel fashion with one base of the next Watson-Crick pair. Such contacts have been called A-minor motifs (25). The type I and type II names correspond to the trans sugar-edge/sugar-edge or cis sugar-edge/sugar-edge base pairs (26) (Figure 11). Two important points can be raised: (1) A1493 interacts with both strands of the receptor helix, whereas A1492 interacts only with one strand; (2) A1493 forms more hydrogen bonds than A1492. In all crystal structures of RNA/Aminoglycoside complexes (the previous ones (8-10) and those reported here), for at least one of the two sites, the two bulging adenines form ideal



A-minor motifs with a neighbouring molecule (Figure 3 in supplementary material shows a superimposition of all the structures). Although the packing is more complicated for the neamine complex, A1492 and A1493 of the bound site do form A-minor motifs with a neighbouring duplex (Figure 2 in supplementary material).

## Discussion

It has been shown that aminoglycosides disturb the fidelity of the tRNA selection step by stabilizing a conformation similar to that obtained for near-cognate complexes (4-6,12,27). In other words, aminoglycosides provoke a structural rearrangement of the decoding site from a state in which it accepts the tRNA to a conformation which is productive for peptide bond synthesis even in the absence of cognate mRNA/tRNA complexes (7). Crystallographic structures of various 30S ribosomal particles and the present minimal A-site complexes bound to aminoglycosides (together with the previous ones) offer different snapshots that helped to visualize atomic details of the mechanism of action of aminoglycosides. During decoding, the A site changes its conformation from an "off" conformation (with A1492 and A1493 folded into the shallow groove of the A site) to an "on" conformation (with A1492 and A1493 fully bulged out from the A site) (4-7). The crystal structure of the neamine complex gives one possible view of the "off" conformation with a single adenine bulging out and the other one paired within the A site. Recent elegant experiments (24) coupling x-ray crystallography and fluorescence of 2-amino purine substituted A1492 and A1493 fully confirm that interpretation. A different set of experiments (28), using equilibrium dialysis of 2'-O-methyl oligoribonucleotides devised for binding to the A-site of 30S particles, came to a similar conclusion. The observed conformational change is necessary to allow A1492 and A1493 to interact specifically with the first two of the three base pairs formed by the cognate codon:anticodon interaction. The crystal packing observed in all complexes display the same types of contacts between the bulging adenines and Watson-Crick base pairs of a neighbouring duplex. This observation was used to screen crystallographically compounds for specific binding to the A site. In this way, modified aminoglycosides with activity

against resistant bacteria could be crystallized and their structures solved (29). The work on modified aminoglycosides (29), as well as the data on the minimal inhibitory concentrations of natural aminoglycosides (30,31) confirm a posteriori the biological relevance of the present crystal complexes and their validity as models for the complexes between the 30S particles and aminoglycosides (7). Our present observations further support the view that the A site exists in a dynamic equilibrium between conformations in which A1492 and A1493 are fully bulged out and those in which only one base is bulging out with the other one tucked inside the A site.

## Conclusions

In the last five years, crystal structures of complexes between various antibiotics and ribosomal particles or oligonucleotides containing rRNA fragments (for a recent review, see (32)) have offered us detailed views of the molecular recognition between RNA targets and drugs. The comparative structural analysis of this work leads to the following main conclusions: (1) up to eight conserved contacts are observed in the complexes; (2) the conformations of the natural aminoglycosides are always very similar; (3) the aminoglycosides with the least amount of charges and/or of rings tend to bind A-site RNAs unspecifically in addition to specific binding.

(1) The conservation of contacts between the nine different aminoglycosides, either 4,5 or 4,6 substituted, and the ribosomal A site is clearly established. Despite the molecular diversity in the antibiotics, key characteristic and common interactions between aminoglycosides and the A site are conserved: (1) the intercalation of ring I; (2) the pseudo base pair between A1408 and ring I; (3) the contacts between the nitrogens of the 2-DOS, N1 to O4(U1495), N3 to N7(G1494), O2P(G1494), O1P(A1493). Besides those six H-bonds, the contacts between the hydroxyl groups O3' and O4' of ring II to the phosphate groups of A1492 and A1493 occur depending on the presence of the hydroxyl groups. It is striking to notice that the recent crystal structure of the complex between the unrelated aminoglycoside apramycin and the same oligonucleotide displayed, in addition to new contacts, the same invariant contacts between the 2-DOS as well as between the bicyclic ring II and the same nucleotides A1408, G1494, and U1495 (33).

(2) Variable contacts between the additional rings and the RNA are formed depending on the number of the rings, several of which are mediated by water molecules. The overall conformations of the aminoglycosides are always very similar; even when the aminoglycosides are bound unspecifically at the edges of the A site (RMSD values below 0.5 Å). This result is in stark contrast to the recent crystal structures of complexes between the same oligonucleotide and aminoglycosides modified at the 2'' position by chains of various length (29) where a large movement of rings III and IV could be observed. Thus, natural aminoglycosides maintain the same exact conformation in different binding modes in crystals, while they are flexible enough to form very different conformations in other complexes with non-natural substitutions.

(3) The least charged aminoglycosides among the nine structures (neamine, ribostamycin, geneticin and kanamycin which all have four positive charges instead of five or more for the other five aminoglycosides) display unusual behaviors. In the geneticin crystal structure (10), alternative conformations of the sugar-phosphate backbone were observed around 1492 and 1493. In the neamine complex, an empty A site could be observed. In the ribostamycin complex, each A site contained two bound antibiotics, while in the kanamycin complex, only one A site contains two bound antibiotics. The binding modes of the unspecifically bound aminoglycosides are not comparable between each other, possibly reflecting the fact that one is a 4,5 and the other a 4,6 aminoglycoside. In any case, the structures illustrate the difficulty of predicting the proper stoichiometry of such complexes between oppositely charged molecules, confirming recent data showing discrepancies between measurements of affinity constants and minimal inhibitory concentrations (30). It is interesting to remark that both ribostamycin and kanamycin A, which both present unspecific binding, present the largest dissociation constants in the family of aminoglycosides studied (34). Noticeable for drug design, the weakly charged aminoglycosides with the least number of rings display variable stoichiometries with unspecific binding. The number of rings together with the number of positive charges therefore contribute both to the formation of specific and high affinity 1:1 complexes.

In conclusion, the present comparative analysis of various aminoglycosides bound to the same ribosomal site helped us to decipher the contribution of each functional group to the specificity of the RNA/aminoglycoside complex and to derive structurally-based

rules for the mechanisms of binding and action of that important family of antibiotics. However, the analysis revealed also the difficulties and pitfalls in attempting to rationalize the wealth of available thermodynamic binding data on the basis of crystallographic data.

## Acknowledgements

We gratefully thank the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities. B.F. is supported by fellowships from Ribotargets Ltd (Vernalis Ltd) and the E.E.C. project 'Ribosomal Inhibitors' (QLRT-2001-000892) coordinated by Wolfgang Wintermeyer. E.W. wishes to thank the Institut universitaire de France for support over the last ten years.

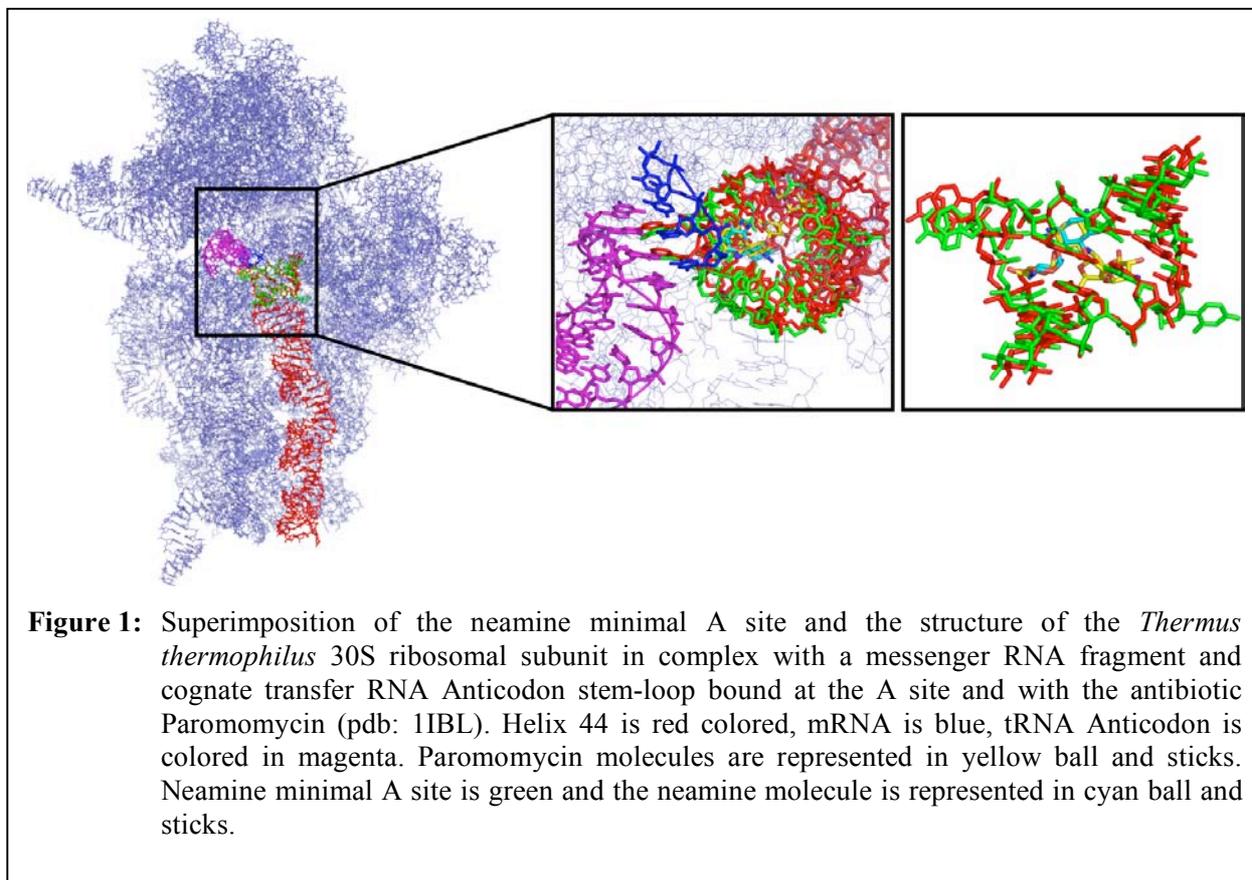
## References

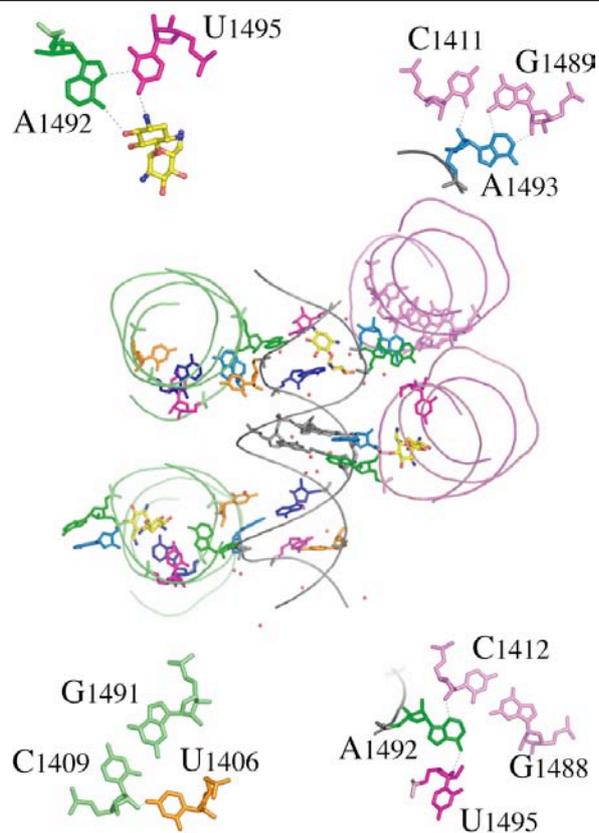
1. Davies, J., Gorini, L. and Davis, B.D. (1965) Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.*, **1**, 93-106.
2. Moazed, D. and Noller, H.F. (1987) Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*, **327**, 389-394.
3. Wright, G.D., Berghuis, A.M. and Mobashery, S. (1998) In Rosen, B. P. and Mobashery, S. (eds.), *Resolving the antibiotic paradox: progress in understanding drug resistance and development of new antibiotics*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp. 27-69.
4. Ogle, J.M., Murphy, F.V., Tarry, M.J. and Ramakrishnan, V. (2002) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*, **111**, 721-732.
5. Ogle, J.M., Carter, A.P. and Ramakrishnan, V. (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci*, **28**, 259-266.
6. Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons Jr, W.M., Tarry, M.J., Carter, A.P. and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, **292**, 897-902.
7. Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**, 340-348.
8. Vicens, Q. and Westhof, E. (2001) Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure*, **9**, 647-658.
9. Vicens, Q. and Westhof, E. (2002) Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site. *Chem. Biol.*, **9**, 747-755.
10. Vicens, Q. and Westhof, E. (2003) Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J Mol Biol*, **326**, 1175-1188.
11. Vicens, Q. and Westhof, E. (2003) RNA as a drug target: the case of aminoglycosides. *Chembiochem*, **4**, 1018-1023.

12. Pape, T., Wintermeyer, W. and Rodnina, M.V. (2000) Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol*, **7**, 104-107.
13. Auffinger, P. and Westhof, E. (2000) Water and ion binding around RNA and DNA (C,G) oligomers. *J Mol Biol*, **300**, 1113-1131.
14. Auffinger, P. and Westhof, E. (2001) Water and ion binding around r(UpA)<sub>12</sub> and d(TpA)<sub>12</sub> oligomers--comparison with RNA and DNA (CpG)<sub>12</sub> duplexes. *J Mol Biol*, **305**, 1057-1072.
15. Otwinowski, Z. and Minor, W. (1996) In Carter, C. W. J. and Sweet, R., M. (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Vol. 276, pp. 307-326.
16. Collaborative\_Computing\_Project\_Number\_4. (1994) The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 760-763.
17. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S. *et al.* (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54 (Pt 5)**, 905-921.
18. Kleywegt, G.J. and Jones, T.A. (1998) Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 1119-1131.
19. Russell, R.J., Murray, J.B., Lentzen, G., Haddad, J. and Mobashery, S. (2003) The complex of a designer antibiotic with a model aminoacyl site of the 30S ribosomal subunit revealed by X-ray crystallography. *J Am Chem Soc*, **125**, 3410-3411.
20. Yoshizawa, S., Fourmy, D. and Puglisi, J.D. (1998) Structural origins of gentamicin antibiotic action. *Embo J*, **17**, 6437-6448.
21. Lynch, S.R., Gonzalez, R.L. and Puglisi, J.D. (2003) Comparison of X-ray crystal structure of the 30S subunit-antibiotic complex with NMR structure of decoding site oligonucleotide-paromomycin complex. *Structure (Camb)*, **11**, 43-53.
22. Michael, K., Wang, H. and Tor, Y. (1999) Enhanced RNA binding of dimerized aminoglycosides. *Bioorg Med Chem*, **7**, 1361-1371.
23. Agnelli, F., Sucheck, S.J., Marby, K.A., Rabuka, D., Yao, S.L., Sears, P.S., Liang, F.S. and Wong, C.H. (2004) Dimeric aminoglycosides as antibiotics. *Angew Chem Int Ed Engl*, **43**, 1562-1566.
24. Shandrick, S., Zhao, Q., Han, Q., Ayida, B.K., Takahashi, M., Winters, G.C., Simonsen, K.B., Vourloumis, D. and Hermann, T. (2004) Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site. *Angew Chem Int Ed Engl*, **43**, 3177-3182.
25. Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2001) RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4899-4903.
26. Leontis, N.B. and Westhof, E. (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA*, **7**, 499-512.
27. Pape, T., Wintermeyer, W. and Rodnina, M. (1999) Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J*, **18**, 3800-3807.
28. Abelian, A., Walsh, A.P., Lentzen, G., Aboul-Ela, F. and Gait, M.J. (2004) Targeting the A site RNA of the Escherichia coli ribosomal 30 S subunit by 2'-O-methyl oligoribonucleotides: a quantitative equilibrium dialysis binding assay and differential effects of aminoglycoside antibiotics. *Biochem J*, **383**, 201-208.
29. Francois, B., Szychowski, J., Adhikari, S.S., Pachamuthu, K., Swayze, E.E., Griffey, R.H., Migawa, M.T., Westhof, E. and Hanessian, S. (2004) Antibacterial aminoglycosides with a modified mode of binding to the ribosomal-RNA decoding site. *Angew Chem Int Ed Engl*, **43**, 6735-6738.

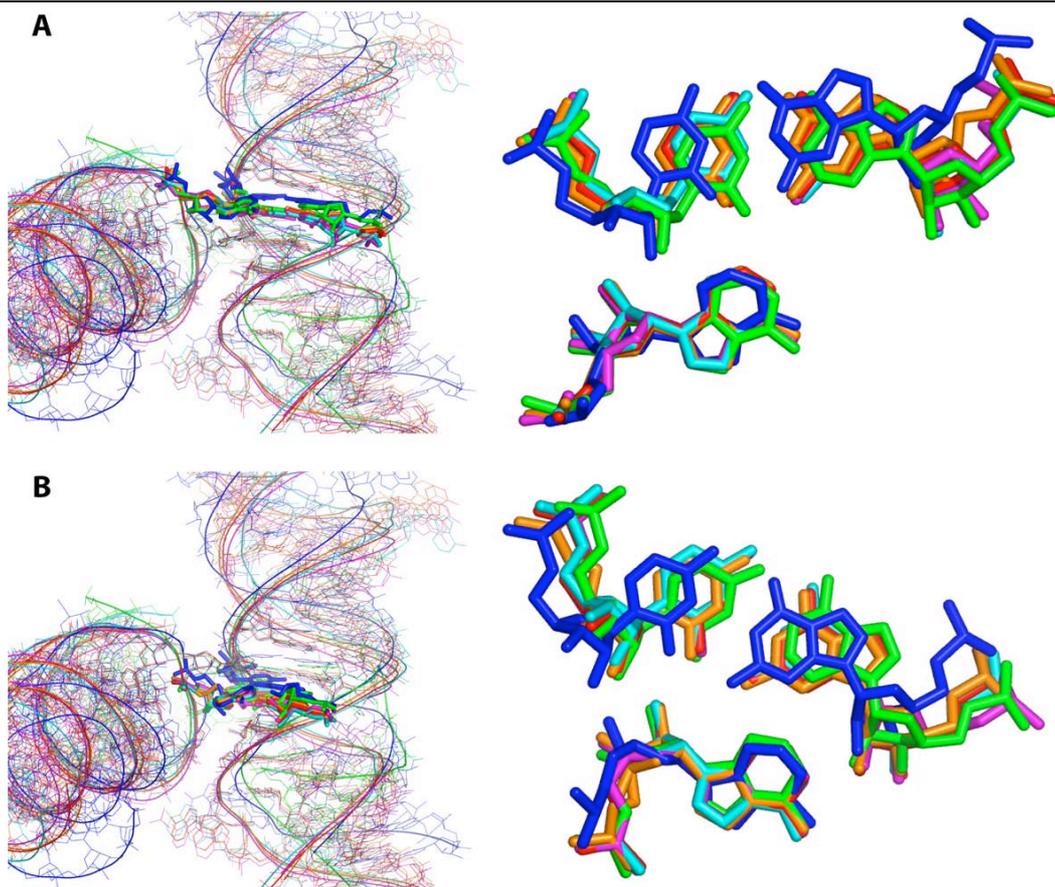
30. Pfister, P., Hobbie, S., Brull, C., Corti, N., Vasella, A., Westhof, E. and Bottger, E.C. (2005) Mutagenesis of 16S rRNA C1409-G1491 base-pair differentiates between 6'OH and 6'NH<sub>3</sub><sup>+</sup> aminoglycosides. *J Mol Biol*, **346**, 467-475.
31. Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Bottger, E.C. and Westhof, E. (2003) The Molecular Basis for A-Site Mutations Conferring Aminoglycoside Resistance: Relationship between Ribosomal Susceptibility and X-ray Crystal Structures. *ChemBioChem*, **4**, 100-110.
32. Hermann, T. (2005) Drugs targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 355-366.
33. Han, Q., Zhao, Q., Fish, S., Simonsen, K.B., Vourloumis, D., Froelich, J.M., Wall, D. and Hermann, T. (2005) Molecular recognition by glycoside pseudo base pairs and triples in an apramycin-RNA complex. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 2694-2700.
34. Wong, C.H., Hendrix, M., Priestley, E.S. and Greenberg, W.A. (1998) Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chem. Biol.*, **5**, 397-406.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL





**Figure 2:** Crystal packing of the neamine complex. Neamine is colored in yellow, A1408 are colored in dark blue, A1492 in green, A1493 in cyan, U1406 in orange and U1495 in magenta. Hydrogen bonds are shown in dashed lines. Strands of the RNA helices are represented by ribbons and interacting nucleotides are shown in ball and sticks.



**Figure 3:** Superimposition of all crystal packing contacts in the structures reported here. This figure highlights the interactions between the bulged adenines A1492 A1493 and the central G=C pairs at the central domain of the symmetrical duplex mimicking the codon-anticodon recognition. Only bulged adenines have been superimposed to generate this figure. In green the A site extracted from all *Thermus thermophilus* 30S ribosomal subunit structure (pdb: 1IBL) Adenines interact with the mRNA - cognate tRNA Anticodon mini-helix. Crystal structure of the neomycin complex is colored in red, paromomycin complex in orange (pdb: 1J7T), ribostamycin in magenta, lividomycin in dark blue and neamine in cyan. **(A)** A1492 interacts with the Watson-Crick shallow/minor groove of the duplex, forming type II minor groove contacts or *cis* sugar edge/sugar edge base pairs. **(B)** A1493 interacts with the Watson-Crick shallow/minor groove of the duplex, forming type I minor groove contacts or *trans* sugar edge/sugar edge base pairs.

**Table I:** Crystallographic parameters and statistics of data collection and structure determination.

	<b>Neomycin B</b>	<b>Ribostamycin</b>
Space Group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Unit Cell Parameters (Å)	a=33.22 b=45.95 c=93.81	a=97.96 b=33.21 c=44.86
	$\alpha=\beta=\gamma=90.00$	$\alpha=\beta=\gamma=90.00$
Wavelength (Å)	0.936	0.936
Resolution range used for refinement (Å) <sup>a</sup>	30 - 2.4 (2.49 - 2.4)	32 - 2.2 (2.88 - 2.2)
Number of reflections used in refinement	6016	7904
Redundancy	3.6 (2.0)	4.0 (2.0)
Average I/ $\sigma$ <sup>a</sup>	9.4 (2.7)	5.5 (3.6)
Completeness (%) <sup>a</sup>	95.0 (80.0)	90.0 (95.0)
R <sub>int</sub> (%) <sup>a,b</sup>	16.8 (48.0)	22.0 (53.0)
Rmsd for bonds (Å)	0.0056	0.0051
Rmsd for angles (°)	0.9095	0.8911
Average B factor (Å <sup>2</sup> )	40.62	32.35
R factor (%) <sup>c</sup>	20.85	22.75
R <sub>int</sub> (%) <sup>d</sup>	25.83	26.51
	<b>Lividomycin A</b>	<b>Neamine</b>
Space Group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit Cell Parameters (Å)	a=33.66 b=44.56 c=95.58	a=33.05 b=47.31 c=85.34
	$\alpha=\beta=\gamma=90.00$	$\alpha=\beta=\gamma=90.00$
Wavelength (Å)	0.936	0.936
Resolution range used for refinement (Å) <sup>a</sup>	30 - 2.2 (2.28 - 2.2)	50 - 2.5 (2.59 - 2.5 )
Number of reflections used in refinement	7759	4982
Redundancy	3.4 (3.2)	4.6 (2.0)
Average I/ $\sigma$ <sup>a</sup>	8.3 (1.98)	11.3 (7.7)
Completeness (%) <sup>a</sup>	90.0 (77.0)	90.0 (60.0)
R <sub>int</sub> (%) <sup>a,b</sup>	12.3 (46.9)	20.7 (49.5)
Rmsd for bonds (Å)	0.0079	0.0059
Rmsd for angles (°)	1.3099	1.155
Average B factor (Å <sup>2</sup> )	31.36	61.07
R factor (%) <sup>c</sup>	22.84	26.5
R <sub>int</sub> (%) <sup>d</sup>	27.46	28.01
	<b>Kanamycin</b>	<b>Gentamicin C1A</b>
Space Group	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit Cell Parameters (Å)	a=47.38 b=32.73 c=52.70	a=32.16 b=45.41 c=96.90
	$\alpha=90 \beta=107.38 \gamma=90$	$\alpha=\beta=\gamma=90.00$
Wavelength (Å)	0.936	0.936
Resolution range used for refinement (Å) <sup>a</sup>	30 - 3.0 (3.11 - 3.0)	20 - 2.8 (2.9 - 2.8)
Number of reflections used in refinement	3223	3796
Redundancy	2.4 (1.9)	3.56 (2.46)
Average I/ $\sigma$ <sup>a</sup>	12.0 (9.0)	16.2 (3.5)
Completeness (%) <sup>a</sup>	85.0 (75.0)	85.0 (60.0)
R <sub>int</sub> (%) <sup>a,b</sup>	11.0 (18.7)	6.3 (27.7)
Rmsd for bonds (Å)	0.0067	0.0073
Rmsd for angles (°)	1.1613	1.127
Average B factor (Å <sup>2</sup> )	32.41	56.33
R factor (%) <sup>c</sup>	20.15	20.95
R <sub>int</sub> (%) <sup>d</sup>	26.56	25.1

<sup>a</sup> Values for last shell are given between parentheses

<sup>b</sup>  $R_{int} = \sum ||I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ , where I is the measured intensity for each reflections and  $\langle I \rangle$  is the intensity

<sup>c</sup> R factor =  $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$

<sup>d</sup> R factor calculated using 10% of the reflections omitted from the refinement.

**Table IIA:** List of contacts between aminoglycoside ring I and RNA molecules.

Resolution (Å)	Paromomycin	Neomycin	Ribostamycin	Neamine	Lividomycin	Tobramycin	Kanamycin	Geneticin	Gentamicin
<i>Ring I</i>	2.5	2.4	2.2	2.5	2.2	2.54	3.0	2.4	2.8
N2' — O4"	3.2	2.95	3.08		2.9				
N2' — O5"	3.1	3.13							
N2' — O5				3.44					3.3
O2' — O5							3.39		
N2' — W — O5						2.8 / 3.0		3.0 / 2.7	
O2' — W — O5							3.08 / 2.88		
O2' — W							2.95		
N2' — W — O2P (A1492)					3.02 / 2.60	3.0 / 3.1			
N2' — W — O1P (A1493)	3.3 / 2.9	2.98 / 2.96	3.19 / 2.67			2.9 / 3.0			
N2' — W — O2P (G1491)					3.02 / 3.02				
N2' — W — W — N7 (G1491)						2.8 / 3.4 / 2.5		3.0 / n. o. / n. o.	
N2' — W — W — N6"					3.02 / 3.47 / 2.58	2.8 / 3.4 / 2.5		3.0 / n. o. / n. o.	
O3' — O2P (A1492)	2.9	2.74	2.89	2.54			2.63	2.7	
O4' — O2P (A1493)	2.5	2.58	2.56	2.77		2.7	2.65	2.5	
O4' — W						3.5			
O4' — W — N2 (G1491)				3.35 / 3.26					
O4' — W — W — N3 (G1491)					2.76 / 3.0 / 3.12	3.5			
O5' — N6 (A1408)	3.2	3.39	3.36	2.96	2.95	2.9	3.33	2.8	3.04
R6' — N1 (A1408)	2.5 (R=OH)	2.99 (R=NH3+)	2.84 (R=NH3+)	2.87 (R=NH3+)	2.52 (R=OH)	3.1 (R=NH3')	2.89 (R=NH3')	3.3 (R=OH)	2.83 (R=NH3+)
R6' — W	2.8			2.71			3.48		
R6' — W — N3		2.99 / 3.12		2.71 / 3.04	3.17 / 3.08				
R6' — W — O2P (A1493)		2.99 / 2.85	2.87 / 2.57	2.71 / 2.78					
R6' — W — O2P (G1494)				2.71 / 2.85					

**Table IIB:** List of contacts between aminoglycoside ring II and RNA molecules.

Resolution (Å)	Paromomycin	Neomycin	Ribostamycin	Neamine	Lividomycin	Tobramycin	Kanamycin	Geneticin	Gentamicin
<i>Ring II</i>	2.5	2.4	2.2	2.5	2.2	2.54	3.0	2.4	2.8
N1 — O2"						3	3.38	3.1	3.27
N1 — O4 (U1495)	2.8	2.7	2.71	2.83	2.8	2.6	2.57	2.7	2.66
N1 — O1P (U overhang)							2.96		
N1 — W — O6			2.70 / 2.91		3.25 / 2.47				
N1 — W — O2"							3.18 / 3.08		
N1 — W — O1P (G1494)		3.36 / 3.19							
N1 — W — O2P (U1495)		3.36 / 3.35							
N1 — W — N4 (C1496)	2.8 / n. o.					3.5 / 2.5		3.0 / n. o.	
N1 — W — O6 (G1405)		2.71 / 2.94	2.70 / 3.49						
N1 — W — O4 (U1406)					3.25 / 2.67				
N1 — W — W	2.7 / 2.7								
N1 — W — W — N4 (C1496)		3.36 / 3.15 / 2.87			3.11 / 2.62 / 2.93				
N1 — W — W — O6 (G1405)									
N1 — W — W — N7 (G1405)			2.70 / 2.50 / 2.67		3.03 / 2.79 / 2.81 3.25 / 3.36 / 2.81				
N1 — W — W — O2P (U1495)					3.11 / 3.07 / 2.62				
N1 — W — W — O2P (G1494)					3.11 / 3.07 / 2.67				
N3 — O1P (A1493)	3.1	2.83	2.96	2.92		3.1	3.07	2.8	2.88
N3 — O2P (A1493)					2.51				
N3 — N7 (G1494)	2.8	2.75	2.73	2.76	3.22	2.7	2.81	2.9	2.68
N3 — O2P (G1494)	3.1	2.69	2.7	2.53		2.6	2.89	2.7	2.76
N3 — W — O2P (G1494)					2.66 / 2.93				
N3 — W — O1P (A1493)					2.66 / 3.47				
C4 — O6 (G1494)	3.3					3		3.3	
O5 — O5"						3.2		3.3	3.41
O5 — O2 (G1494)				3.52					
O5 — W — O4"							2.88 / 2.94		
O6 — O6 (A1492_SYMSite2)				3.35					
O6 — W	3.2								
O6 — W	3.5								
O6 — W — O4 (U1406)	2.6 / 2.6	2.61 / 2.57	2.58 / 2.90		2.47 / 2.67				
O6 — W — O2"			3.23 / 2.69						
O6 — W — N2"					3.28 / 2.98				
O6 — W — O4 (U1495)		2.61 / 3.05							
O6 — W — W — N7 (G1405)			2.58 / 3.21 / 2.67		2.47 / 3.36 / 2.81				
O6 — W — W — W — O6 (G1405)			2.58 / 3.21 / 2.50 / 3.49						

**Table IIC:** List of contacts between aminoglycoside rings III, IV, V and RNA molecules.

Resolution (Å)	Paromomycin	Neomycin	Ribostamycin	Neamine	Lividomycin	Tobramycin	Kanamycin	Geneticin	Gentamicin
	2.5	2.4	2.2	2.5	2.2	2.54	3.0	2.4	2.8
<i>Ring III</i>									
O2'' — O6 (G1405)						2.8		2.7	3.07
O2'' — N4 (C1407)	2.7	2.77			2.85				
O2'' — W — N2'''		3.15 / 3.29							
O2'' — W — N4 (C1407)									
O2'' — W — W — O3'''			2.94 / 2.79 / 2.74						
O2'' — W — W — N3'''							3.08 / 2.96 / 3.13		
C2'' — W — N6 (A1408)	3.3 / 2.6								
O3'' — W — W — O2P (U1406)			2.74 / 2.67 / 2.70						
N3'' — O2P (G1405)								2.9	2.85
N3'' — N7 (G1405)							3.06		
O4'' — O2P (U1406)								2.7	2.83
O4'' — W — O2P (G1405)						3 / n.o.			
O4'' — W — O2P (U1406)									
O4'' — W — O5							2.90 / 3.31		
O4'' — W — O2'							2.90 / 2.79		
O5'' — O6 (G1491)			2.85						
O5'' — N7 (G1491)	2.7	2.65			2.75				
O5'' — W — O2P (G1491)					2.8 / 2.83				
O5'' — W — N6'''					2.80 / 2.58				
O5'' — N4 (C1407)						3.1		2.9	
<i>Ring IV</i>									
N2''' — O2P (G1405)	3.00	3.18			3.13				
O3''' — O2P (U1406)					3.38				
O3''' — W	3.5								
O4''' — O1P (G1405)	3.8								
<i>Ring V</i>									
O2''' — O1P (C1404)					3.00				
O3''' — W — O2P (C1404)					2.61 / 3.08				

**Table III:** RMSD between crystallographic structures using SwissPdb Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>). Upper-right triangle: RMSDs calculated using the 235 atoms of the minimal A site and in brackets RMSDs calculated using 215 atoms of the minimal A site without U1406. Down-left triangle: RMSDs calculated using all 898 atoms of the RNA duplex with in brackets values considering the sugar-phosphate backbone 168 atoms.

Resolution	PAROMOMYCIN	NEOMYCIN	RIBOSTAMYCIN	LIVIDOMYCIN	NEAMINE	TOBRAMYCIN	KANAMYCIN	GENETICIN	GENTAMICIN
	2.54	2.4	2.2	2.2	2.5	2.4	3.0	2.3	2.8
4.5	PAROMOMYCIN	0.36	0.69	0.74	2.3 0.79	0.55	0.63	0.44	0.48
	NEOMYCIN	0.56	0.68	0.91	2.23 0.66	0.44	0.49	0.51	0.46
	RIBOSTAMYCIN	0.88	0.76	0.95	2.38 0.88	0.59	0.58	0.53	0.60
	LIVIDOMYCIN	0.84	0.94	0.96	2.42 1.17	0.95	1.02	0.86	0.90
	NEAMINE	1.84 (1.19)	1.86 (1.24)	2.06 (1.70)	2.01 (1.66)	2.27 (0.68)	2.32 (0.78)	2.35 (0.83)	2.29 (0.70)
4.6	TOBRAMYCIN	0.8	0.83	0.96	1.08	1.75 (1.16)	0.33	0.61	0.59
	KANAMYCIN	1.03	1.02	1.12	1.19	1.88 (1.34)	0.53	0.66	0.65
	GENETICIN	1.04	1.22	1.25	1.22	2.11 (1.59)	0.94	1.09	0.41
	GENTAMICIN	0.83	1.00	1.35	1.18	2.10 (1.52)	1.24	1.40	1.16

## **II Publication 4 : fixation d'aminoglycosides à des ribosomes mutés comportant des altérations du site A.**

La présence de certaines mutations de l'ARN du site A induit des résistances aux aminoglycosides. L'utilisation d'une population homogène de *M. smegmatis* comportant une ou plusieurs mutations ponctuelles du gène *rrn* permet d'obtenir une information sur les interactions aminoglycosides / ARN. La comparaison de l'activité *in vivo* (grâce aux valeurs de MIC) des aminoglycosides de la famille de la néomycine permet d'explorer le rôle des cycles III, IV et V dans l'interaction avec l'ARN du site A et d'essayer de corrélérer ces résultats avec les structures cristallographiques récemment obtenues.<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup> *Binding of Neomycin-class Aminoglycoside Antibiotics to Mutant Ribosomes with Alterations in the A-site of 16S rRNA.* S. Hobbie, P. Pfister, C. Brüll, **B. François**, E. Westhof, and E.C. Böttger  
Soumis

# Binding of Neomycin-class Aminoglycoside Antibiotics to Mutant Ribosomes with Alterations in the A-site of 16S rRNA

S. Hobbie<sup>1</sup>, P. Pfister<sup>1</sup>, C. Brüll<sup>1</sup>, B. François<sup>2</sup>, E. Westhof<sup>2</sup>, and E.C. Böttger<sup>1,\*</sup>

1 Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Universität Zürich  
Gloriastr. 30/32  
CH-8006 Zürich  
Switzerland

2 Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS,  
UPR 'Architecture et Réactivité de l'ARN'  
Université Louis Pasteur  
15 rue René Descartes  
67084 Strasbourg Cedex (France)

\* Corresponding author  
Tel.: #41-1-634 26 60/61  
Fax: #41-1-634 49 06  
boettger@immv.unizh.ch

## Summary

Aminoglycoside antibiotics that bind to the aminoacyl-tRNA site (A-site) of the ribosome are composed of a common neamine core in which a glycopyranosyl ring is attached to position 4 of a 2 deoxystreptamine moiety. The core is further substituted by one (ribostamycin), two (neomycin, paromomycin) or three additional sugars (lividomycin A) attached to position 5 of the 2-deoxystreptamine. To study the role of rings III, IV and V in aminoglycoside binding, we used isogenic mutants of *M. smegmatis* *rrn*<sup>-</sup>, carrying homogeneous populations of mutant ribosomes with alterations in the 16S rRNA A-site. Minimal inhibitory concentrations were determined to investigate drug-ribosome interactions and the results compared with that of the previously published crystal structure of paromomycin bound to the ribosomal A-site. Our analysis demonstrates:

- i) that the stacking interaction between ring I and G1491 is largely sequence independent;
- ii) that rings III and IV each increase the strength of drug binding to the ribosome;

- iii) that ring IV of the 6'-NH<sub>3</sub> aminoglycosides compensates for loss of interactions between ring II and U1495 and between ring III and G1491;
- iv) that independently of the number of sugar rings attached to the neamine core, the aminoglycosides rely on pseudo-basepairing between ring I and A1408 for binding;
- v) that addition of ring V to the 6'-OH 4,5-aminoglycoside paromomycin does not alter the mode of binding;
- vi) the double mutation of the U1406oU1495 base pair into the C1406=G1495 base pair yields ribosomal susceptibilities to all 4,5-aminoglycosides comparable to those seen with wt A sites.

### Keywords

ribosome, 4,5-disubstituted 2- deoxystreptamines, crystal structure, drug binding

## Introduction

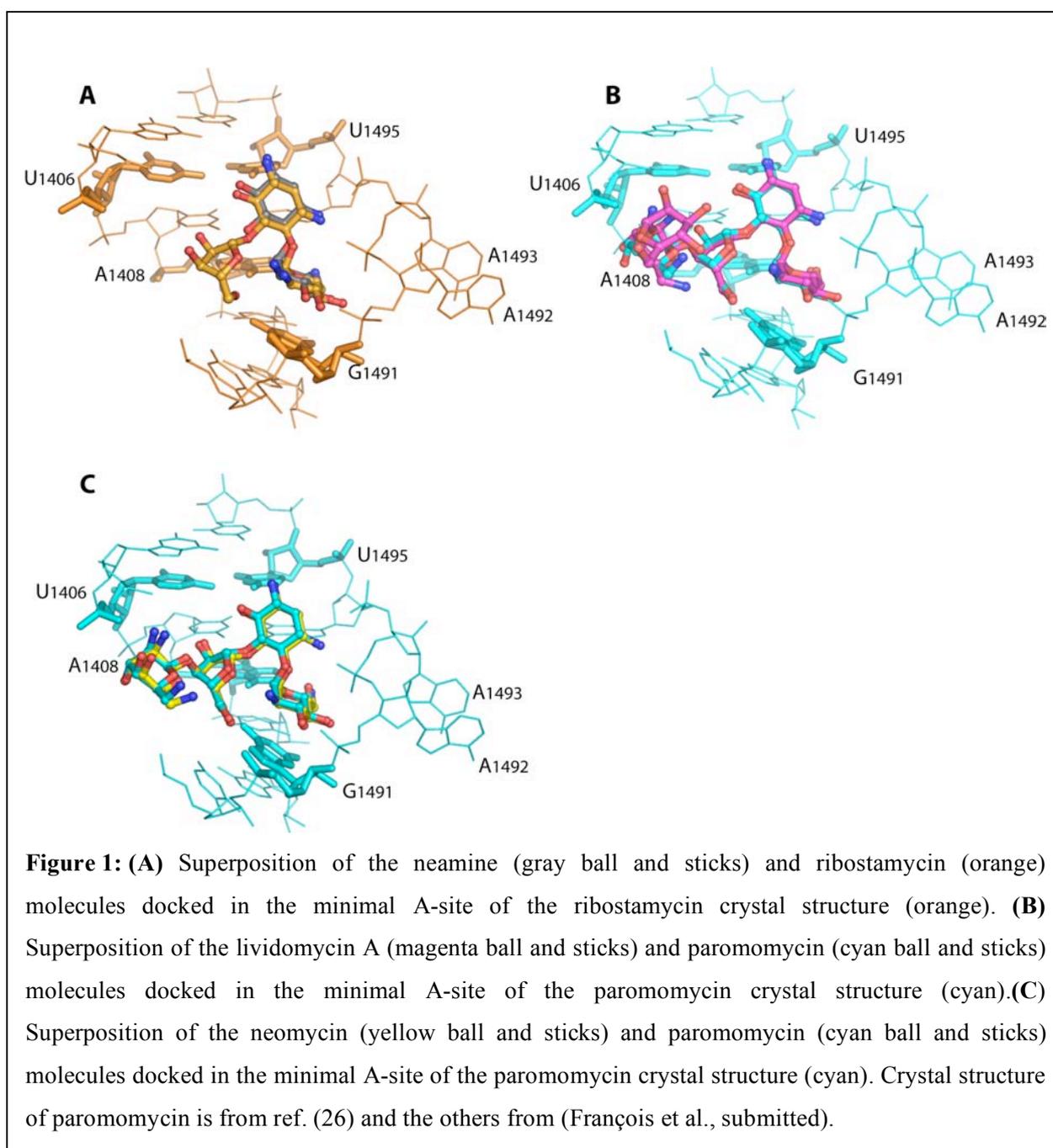
Aminoglycosides form a large family of water-soluble, polycationic amino sugars which are used as broad-spectrum antibacterial agents (11, 12). Common to all aminoglycosides is the neamine core. The neamine core is composed of a six-membered cyclitol (2-deoxystreptamine; ring II) glycosidically linked to a glucopyranosyl (ring I). Aminoglycosides target the ribosome by direct interaction with ribosomal RNA and they affect protein synthesis by inducing codon misreading and inhibiting translocation of the tRNA-mRNA complex from the A-to the P-site (3, 12, 15, 25).

Helix 44, located in the 1400-1500 region of 16S rRNA (*E. coli* numbering is used throughout the paper), has been identified as the site of codon-anticodon interaction (A-site) by a number of studies (2, 14, 16, 28). Although A-site bound tRNA and aminoglycosides protect the same nucleotides in the decoding region, namely A1408, A1492, A1493 and G1494, aminoglycosides do not act by sterically hindering the binding of the tRNA to the ribosome. Instead, they interfere with the decoding process by inducing conformational alterations of the ribosomal A-site (1, 16). Upon drug binding nucleotides A1492 and A1493 flip out from helix 44; this change in conformation is normally only observed after formation of a cognate tRNA-mRNA complex (1, 16, 17). Bulging out of A1492 and A1493 most likely is an essential step in aminoglycoside action as it explains the miscoding properties of these drugs (3).

The neamine core of the aminoglycosides is essential for drug activity (3, 5). NMR studies have revealed that rings I and II of the 4,5-aminoglycosides are sufficient to confer specificity of binding to a model A-site RNA (6). A1408 and basepairs C1409-G1491 and U1406-U1495 represent important elements of the drug binding pocket (see Figure 1). Ring I forms two direct hydrogen bonds to the Watson-Crick site of A1408 and is involved in a stacking interaction with G1491 (1,26). Ring II participates in a network of hydrogen bond contacts of which the interactions between the 1-amino group and O4 of U1495 and between the 3-amino group and N7 of G1494 are sequence specific (1,26). The neamine core makes additional direct or water-bridged hydrogen bond contacts to the phosphate backbone of A1492 and A1493 (1, 26, 27). Additional sugars (ring III, IV and V) are

attached to position 5 of the 2-deoxystreptamine moiety. The contacts of ring III are characterized by two direct hydrogen bonds with N7 of G1491 and with N4 of C1407 linking the two RNA strands of helix 44 together (26 and the other xtal structures of the lab). Ring IV is mainly involved in non-sequence specific electrostatic interactions with the phosphate backbone (1, 26). Recently, the complexes between oligonucleotides containing the A site and neamine, neomycin B, and lividomycin A have been solved (François et al., submitted) (see Figure 1).

RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to the ribosomal A-site have mostly been defined using RNA model oligonucleotides (7, 10, 13, 23). Data on *in vivo* mutagenesis of the ribosomal A-site are scarce and compromised by limitations in the *Escherichia coli* system, which is used as model system in ribosomal genetics. In particular, several rRNA nucleotides involved in forming the drug binding site could not be subjected to *in vivo* mutagenesis due to nonviability of the mutations in *E. coli*, e.g.



U1495A, U1495C, G1491A, C1409G (4, 22). These limitations were overcome with the development of the *Mycobacterium smegmatis* *rrn*<sup>-</sup> system (18-20, 24). In order to analyze further the contributions of rings III, IV and V to the binding of 4,5-aminoglycosides, we extended our experiments using *M. smegmatis* *rrn*<sup>-</sup> strains carrying a large set of mutations within the decoding site.

## Results

The genetic system chosen results in isogenic strains carrying homogeneous populations of mutant ribosomes (for a list of mutant strains see Table 1 and Figure 2). Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined to investigate ribosomal drug susceptibility. We interpreted the MIC data obtained for neamine, ribostamycin, neomycin, paromomycin and lividomycin on the basis of the X-ray structural information available (1, 26, François et al. submitted). The 4,5-disubstituted 2-deoxystreptamines investigated in this study share close structural similarities. The common core of the 4,5-aminoglycosides is composed of a 2-deoxystreptamine and a glycopyranosyl ring. The chemical group linked to the 6'-position of ring I separates the 4,5-aminoglycosides into two subclasses: the 6'-NH<sub>3</sub>-subclass (neamine, ribostamycin, neomycin B) and the 6'-OH-subclass (paromomycin, lividomycin A). The diversity within the two subclasses of 4,5-disubstituted aminoglycosides is based on the number of sugar rings attached to position 5 of ring II: one additional sugar attached to ring II of neamine results in ribostamycin; addition of a fourth ring to ring III of ribostamycin gives rise to neomycin. With exception of the 6'-position paromomycin is identical to neomycin; an additional ring attached to paromomycin gives rise to lividomycin A (for a list of drug structures see Figures 3 and 4). For comparison purposes, the number of charges and the nature of the substituent at position 6' are identical for the neamine/ribostamycin couple and for the paromomycin/lividomycin couple. In both cases, the number of rings varies, however.

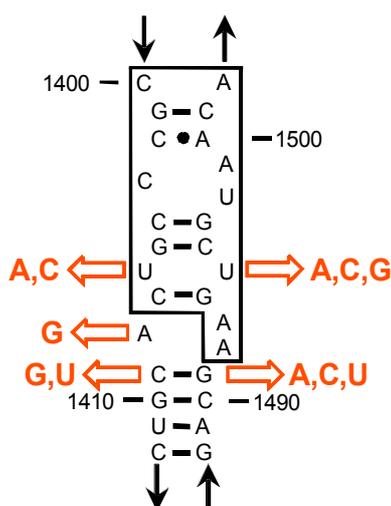
**Table 1:** Strains used in this study.

Strain	Reference
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-a)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2003)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> 1408G <sup>b)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2003)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> 1406C/1495A <sup>b)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2003)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> 1406C/1495G <sup>b)</sup>	(this study)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1406A <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2003)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1406C <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2003)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1495A <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2003)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1495C <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2003)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1409G <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2005)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1409U <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2005)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1491A <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2005)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1491C <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2005)
mc <sup>2</sup> 155 SMR5 <i>rrnB</i> <sup>-</sup> pMV361-Hyg-rRNA1491U <sup>c)</sup>	(Pfister <i>et al.</i> , 2005)

a) parental strain

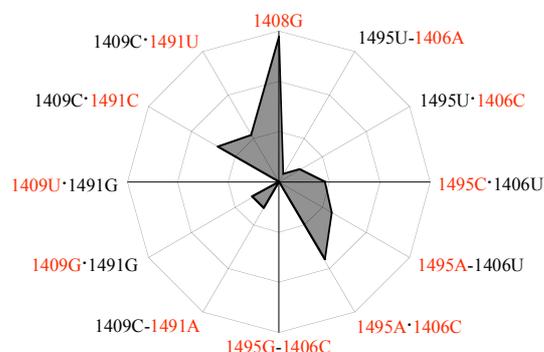
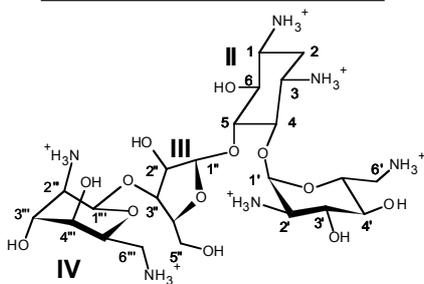
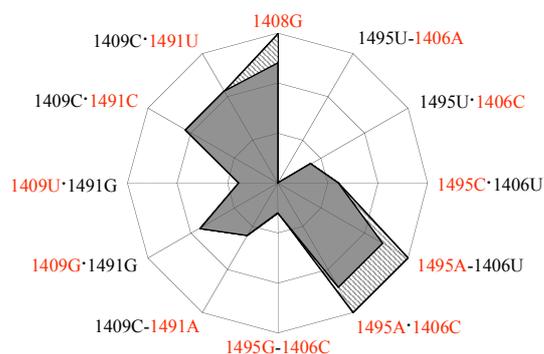
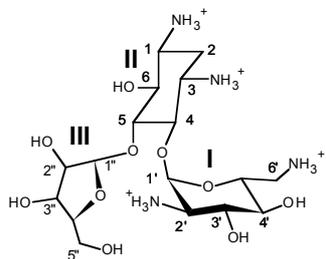
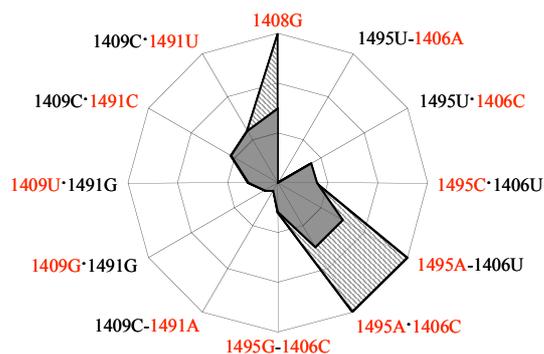
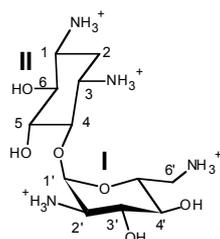
b) spontaneous mutants of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 SMR5 *rrnB*<sup>-</sup>

c) recombinant mutants of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 SMR5 *rrnB*<sup>-</sup>

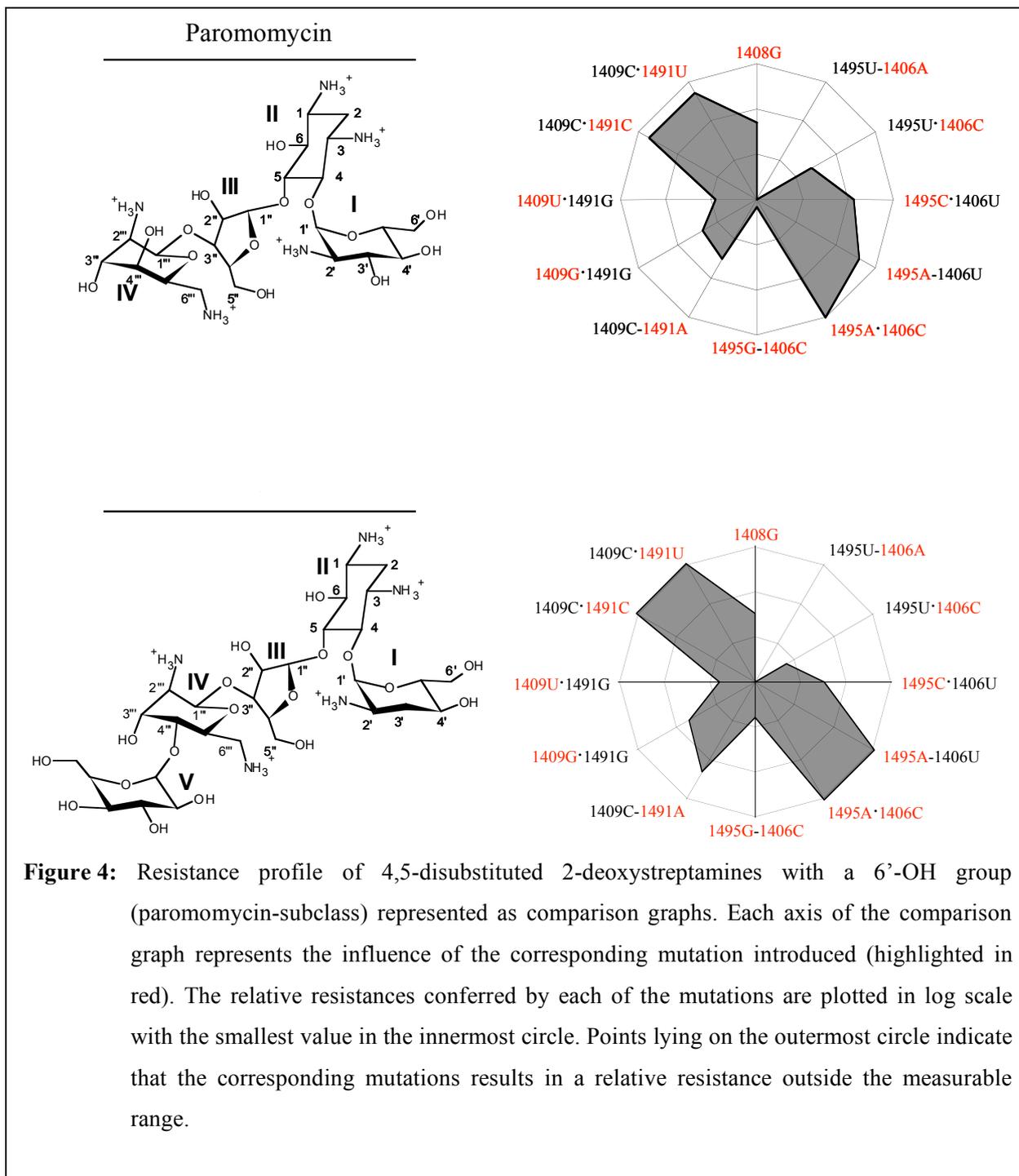


**Figure 2:** Secondary structure of the bacterial A-site (*E. coli* numbering). The mutations introduced are shown in red, the highly conserved part of the A-site is boxed.

### Neamine



**Figure 3:** Resistance profile of 4,5-disubstituted 2-deoxystreptamines with a 6'-NH<sub>3</sub> group (neomycin-subclass) represented as comparison graphs. Each axis of the comparison graph represents the influence of the corresponding mutation introduced (highlighted in red). The relative resistances conferred by each of the mutations are plotted in log scale with the smallest value in the innermost circle. Points lying on the outermost circle indicate that the corresponding mutations results in a relative resistance outside the measurable range. Neamine and ribostamycin bind weakly to the wild-type ribosomes, thus, quantitative analysis is limited. To reflect this limitation the values outside the measurable range are depicted by a hatched area.



The drug susceptibility measurements given in Table 2 reveal that in wild-type *M. smegmatis*  $rrn^-$  the potency of the 4,5-aminoglycosides correlates with the number of sugar rings attached to the neamine core. Between neamine and ribostamycin (same charge, same 6' substitution, one additional ring), there is a factor of eight in MIC. But, between ribostamycin and either paromomycin (4 rings, 5 charges and 6'OH), neomycin (4 rings, 6 charges and 6'NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), or lividomycin (5 rings, 5 charges, and 6'OH), there is still a

factor of about eight. More recently, the pseudo-basepair between ring I and A1408 was defined as a critical interaction for aminoglycoside binding (26, GENETICIN and tobramycin structures, Vicens/Westhof in Chembiochem, 19). Independently of the number of rings attached to the neamine core, disruption of the pseudo-basepair by the A1408G alteration prevents the binding of all 4,5-aminoglycosides with a 6'-NH<sub>3</sub> group (see Table 2). In contrast to the 6'-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-subclass and as discussed previously (26, Vicens/Westhof in Chembiochem, 19), the 6'-OH aminoglycosides (paromomycin and lividomycin) could become acceptor of an H-bond from N1 or N2 of A1408G. Thus, these drugs can still interfere with the target site in presence of A1408G (see Table 2).

**Table 2:** MIC and relative resistance measured for this study.

Mutation	Ring I; 6'-NH <sub>3</sub>						Ring I; 6'-OH			
	Neamine Rings I, II (4+) <sup>a)</sup>		Ribostamycin Rings I, II, III (4+) <sup>a)</sup>		Neomycin Rings I, II, III, IV (6+) <sup>a)</sup>		Paromomycin Rings I, II, III, IV (5+) <sup>a)</sup>		Lividomycin Rings I, II, III, IV, V (5+) <sup>a)</sup>	
	MIC <sup>b)</sup>	RR <sup>c)</sup>	MIC	RR	MIC	RR	MIC	RR	MIC	RR
wt	64	--	8	--	1 <sup>d)</sup>	--	1 <sup>d)</sup>	--	2	--
1408G	> 1024	> 16	> 1024	> 128	512-1024 <sup>d)</sup>	512-1024	32-64 <sup>d)</sup>	32-64	64	32
1491A	64-128	1-2	128	16	4 <sup>d)</sup>	4	32-64 <sup>d)</sup>	32-64	256-512	128-256
1491C	512-1024	8-16	1024	128	16-32 <sup>d)</sup>	16-32	512 <sup>d)</sup>	512	> 1024	> 512
1491U	1024	16	1024	128	8-16 <sup>d)</sup>	8-16	512 <sup>d)</sup>	512	> 1024	> 512
1409G	128	2	512	64	4 <sup>d)</sup>	4	16-32 <sup>d)</sup>	16-32	64-128	32-64
1409U	256	4	32-64	4-8	1 <sup>d)</sup>	1	8 <sup>d)</sup>	8	8-16	4-8
1408G / 1409G	> 1024	> 16	> 1024	> 128	1024 <sup>d)</sup>	1024	1024 <sup>d)</sup>	1024	> 1024	> 512
1408G / 1491U	> 1024	> 16	> 1024	> 128	> 1024 <sup>d)</sup>	> 1024	1024 <sup>d)</sup>	1024	> 1024	> 512
1406A	64	1	8	1	1-2 <sup>d)</sup>	1-2	1 <sup>d)</sup>	1	1	0.5
1406C	256-512	4-8	32-64	4-8	2-4 <sup>d)</sup>	2-4	16 <sup>d)</sup>	16	8-16	4-8
1495A	> 1024	> 16	> 1024	> 128	16 <sup>d)</sup>	16	256-512 <sup>d)</sup>	256-512	> 1024	> 512
1495C	256-512	4-8	128	16	8 <sup>d)</sup>	8	128 <sup>d)</sup>	128	64-128	32-64
1408G / 1406C	> 1024	> 16	> 1024	> 128	> 1024 <sup>d)</sup>	> 1024	> 1024 <sup>d)</sup>	> 1024	> 1024	> 512
1406C / 1495A	> 1024	> 16	> 1024	> 128	64 <sup>d)</sup>	64	> 1024 <sup>d)</sup>	> 1024	> 1024	> 512
1406C / 1495G	256	4	32	4	0.5	0.5	2-4	2-4	8-16	4-8

a) Overall net charge of the drug.

b) MIC, minimal inhibitory concentration (µg/ml)

c) RR, relative resistance; calculated by dividing MIC mutant through MIC wild-type

d) These MIC data have been published previously (18,19) and are included here for comparison.

### *Alteration of basepair C1409-G1491*

The Watson-Crick basepair C1409-G1491 produces a seat in the pocket at the lower end of the drug binding site, enabling ring I to stack on G1491. In addition, ring III forms a hydrogen bond between O5'' and N7 of G1491 (1, 26, other structures of ours, Vicens/Westhof in *Chembiochem*). The MIC data and the calculation of relative resistances given in Table 2 demonstrate that, within the 6'-NH<sub>3</sub> subclass, ribostamycin is always most affected by alterations of C1409-G1491. Thus, while ribosomal susceptibility to neamine and neomycin only moderately decreased upon mutations of the C1409-G1491 basepair (relative resistances between 1 and 16), significant resistance is conferred to ribostamycin (relative resistances between 8 and 128). In particular, transversion mutations (G1491 to C or U, C1409 to G) have a profound effect on ribostamycin susceptibility.

Compared to neomycin and as reported previously (18), the 6'-OH paromomycin is much more dependent on proper interaction with the C1409-G1491 basepair. The importance of this interaction is not alleviated by addition of a further aminosugar as in lividomycin (see Table 2). The double mutations A1408G/C1409G and A1408G/G1491U confer high-level drug resistance to all 4,5-aminoglycosides tested. This is to be expected for the 6'-NH<sub>3</sub> subclass, due to disruption of the pseudo-basepair interaction of ring I with A1408 (18, 19). For the 6'-OH subclass this finding indicates that the effects of the different mutations are additive, in particular for the A1408G/C1409G alteration (compare the level of relative resistance conferred by each single mutation, A1408G and C1409G, to that of the combined A1408G/C1409G alteration).

### *Alteration of the U1406·U1495 basepair*

The base-pair U1406·U1495 closes the binding pocket at the upper stem. One water mediated contact between O6 of ring II and O4 of U1406 is observed in the 4,5 2-deoxystreptamines (26, François et al. submitted). Mutation of U1406 to adenine does not affect drug susceptibility; alteration of U1406 to cytosine marginally influences drug

susceptibility (relative resistances 4 to 16). The A1408G/U1406C double mutation results in high-level resistance to all 4,5-aminoglycosides studied, indicating that for the 6'-OH subclass the effects of the individual mutations are additive. N1 of ring II makes an additional direct hydrogen bond contact with O4 of U1495. The transition mutation U1495C exchanges the O4 by an ammonium-group rendering the interaction of cytosine with N1 of the 4,5-aminoglycosides unfavorable. However, the correct insertion of ring I into the binding pocket and the pseudo-basepair interaction between O5' and 6'-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-group of ring I with A1408 still allow for binding of the 6'-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> subclass to the ribosome. In contrast, the 6'-OH-aminoglycosides are more affected by the U1495C alteration.

The U1495A is expected to prevent contacts between N1 of ring II and nucleotide 1495 even more than a U to C mutation owing to the size of the adenine ring. With the exception of neomycin, the aminoglycoside with the highest charge, the U1495A alteration confers significant drug resistance to all 4,5-aminoglycosides tested, including neamine, ribostamycin, paromomycin, lividomycin A. Apparently, both the 6'NH<sub>3</sub> ring I - A1408 interaction and ring IV are required to partly compensate for this major conformational change in the ribosomal A-site. The double mutation U1406C/U1495A confers high-level drug resistance to the 4,5-aminoglycosides with the exception of neomycin. On the contrary and unexpectedly, introducing the U1495G alteration into the U1406C mutant, thus replacing the U·U basepair by a C1406-G1495 Watson Crick interaction, nearly completely restores ribosomal susceptibility to the 4,5-aminoglycoside antibiotics.

## Discussion

Using a well defined *in vivo* system, we investigated the role of rings III, IV and V in the binding of 4,5-aminoglycosides to their ribosomal target. Site-directed mutagenesis of the ribosomal A-site in a genetic model where manipulation of rRNA results in cells carrying homogeneous populations of mutant ribosomes (18-20) allowed for a detailed investigation of drug-target interactions. The critical role of the 6' group of ring I in aminoglycoside - ribosome interaction has previously been investigated by mutagenesis

studies and will not be addressed here (19). In this study focus was given on the role of ring III, IV and V in drug binding.

In line with previous measurements of dissociation constants (6) ring III increases drug potency by a factor of 8, as determined by MIC measurements (see Table 2). Ring III makes sequence specific contacts with RNA, i.e. hydrogen bonding between 5''-OH and N7 of G1491 and between 2''-OH and N4 of C1407 (1, 26). Addition of ring IV increases the positive net charge and it contacts the ribosomal A site at the backbone of helix 44 (1, 26). The strength of these electrostatic contacts raises drug activity 8-fold as determined by MIC measurements (compare neomycin with ribostamycin). Overall, in our *in vivo* system neomycin is 64-fold more active than neamine. This finding is in good agreement with the dissociation constants  $K_d$  reported for neomycin and neamine (0.5  $\mu\text{M}$  versus 100  $\mu\text{M}$ ) (6).

For each couple of aminoglycosides with similar properties (charge and substituent at 6'), one can divide the effects of mutations in two categories: (1) those mutations for which the ratio of MICs is the same as in the wt situation; (2) those mutations for which this ratio is much less (or more, a rare case) than expected. Thus, for the neamine/ribostamycin couple, the C1409G mutation (and to a lesser extent, G1491A and G1491C or U1495C) leads to a higher susceptibility to neamine than to ribostamycin. In contrast, the C1409U or the U1406C mutation could lead to a higher susceptibility to neamine than to ribostamycin compared to the wt situation. For the paromomycin/lividomycin A couple, the G1491A and the C1409G lead to a higher susceptibility to paromomycin than to lividomycin A (unlike in the wt). On the opposite, the U1406C and the U1495C mutations lead to a greater than expected susceptibility to lividomycin A compared to paromomycin.

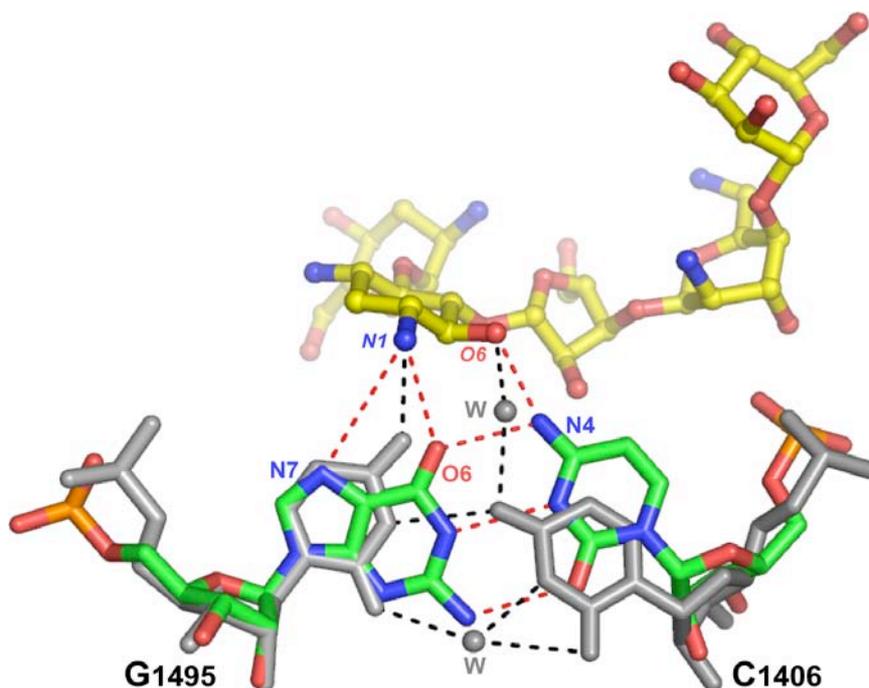
Addition of ring affects V little, if at all, drug activity and susceptibility of mutant ribosomes (compare lividomycin A with paromomycin, see Table 2), indicating that ring V only makes weak contacts with the A-site in a non sequence-specific manner – most likely with the RNA backbone, as seen in the crystal structure (François et al. submitted). To investigate ring I-G1491 interaction isolated from other interactions by additional rings, e.g. between 5''-OH of ring III and N7 of G1491, we determined minimal inhibitory

concentrations to neamine in a series of mutants with alterations in the C1409-G1491 basepair. These studies revealed that transitions affect weakly drug binding; transversion have a small, albeit significant effect. We interpret these findings as evidence that the ring I-G1491 stacking interaction is largely sequence independent. Within the 6'-NH<sub>3</sub> subclass ribostamycin is most affected by alterations of the C1409-G1491 basepair. The finding is rationalized by the X-ray structural data (François et al., submitted). Neamine interacts with G1491 merely by non-sequence specific stacking interaction of its ring I. Compared to ribostamycin, ring IV of neomycin apparently is able to compensate for the loss of sequence-specific interaction between ring III and G1491 and /or introduction of steric clashes as mediated by mutagenesis of C1409-G1491.

A thorough interpretation of the MIC measurements obtained upon mutagenesis of the U1406·U1495 wobble basepair is in part limited by the low susceptibility of wild-type ribosomes to neamine. Most of the mutations, i.e. U1406C, U1406A, U1495C only moderately affect ribosomal susceptibility to the 6'-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> aminoglycosides, if at all. The U1495A alteration confers significant resistance to ribostamycin (relative resistance >128) but only moderately affects susceptibility to neomycin (relative resistance 16). The low susceptibility of wild-type ribosomes to neamine does not allow to determine for relative resistances greater than 16. The loss of ribosomal susceptibility to neamine and ribostamycin can be rationalized by the loss of interaction between the 1-amino group of ring II and the O4 of U1495 in the U1495A mutant and by less favorable binding of ring II. Apparently, ring IV of neomycin is able to partly compensate for this interaction. The double mutation U1406C/U1495A alteration confers high-level drug resistance to all 4,5-aminoglycosides except neomycin which is moderately susceptible to this double mutant. As discussed previously (19), the U1406C/U1495A double alteration will result in a major change in basepair geometry precluding an appropriate positioning of ring II near the U1406·U1495 pair and consequently poor insertion of ring I in the drug binding pocket.

Alteration of U1495A to G in the U1406C/U1495A double mutant replaces the natural U1406·U1495 wobble basepair by a U1406C-U1495G Watson Crick basepair and restores ribosomal susceptibility to all 4,5-aminoglycosides of the 6'-NH<sub>3</sub> and the 6'-OH subclass investigated. This observation contrasts with the U1406-U1495A alteration, which confers significant resistance to most 4,5-aminoglycosides. Presumably, the

U1406C/U1495G alteration has a conformation and geometry similar to that of the U1406/U1495A alteration. How then to explain this surprising finding? One rationale would refer to the different net charges provided by the functional group at position C6 of U1495A (amino-group, positive charge) and U1495G (keto-group, negative charge). The keto-group at C6 of 1495G, together with the N7 of 1495G, could possibly interact with the ring II N1 ammonium group in a fashion similar to that of O4 of the pyrimidine U1495 or, more generally, be involved in a network of electrostatic interactions between the positively charged aminoglycosides and their target RNAs (8, 9). The Hoogsteen sites of guanines are often involved in binding positive ions like potassium ions (Auffinger & Westhof, Water and ion binding around r(UpA)<sub>12</sub> and d(ApT)<sub>12</sub> oligomers - Comparison with RNA and DNA (CpG)<sub>12</sub> duplexes. *J. Mol. Biol.*, 305, 1057-1072.). Figure 5 shows the superposition of a C1406=G1495 base pair on a typical U1406oU1495 base pair. The distances between a typical aminoglycoside (N1 and O6) and the Hoogsteen sites of G1495 are between 3.0 (O6) and 4.2 (N7) Å, respectively. It can be seen how the amino group N4 of C1406 replaces the recurrently observed water molecule between U1406 and the aminoglycoside so that a contact between N4(C1406) and O6 of ring II can be made. Interestingly, single mutants in which one U is replaced by a A display other effects (19). The A1495-U1406 mutants lead to resistance to aminoglycosides, while the U1495-A1406 mutants display susceptibilities to the neomycin class of aminoglycosides but less so to the tobramycin class (19).



**Figure 5:** Manual superposition of a G1495=C1406 on a U1495oU1406 base pair in the crystal structure of paromomycin (26). The N1 and O6 atoms of ring II which contact positions 1495 and 1406 are indicated, as well as the N7, O6 of G1495 and N4 of C1406. In grey is shown the U1495oU1406 with the bound water molecules.

## ***Materials and Methods***

### *Bacterial strains and DNA techniques*

The conditions for selective plating and RecA-mediated homologous recombination to obtain mutant strains of *M. smegmatis*  $rrn^-$  (for a list of mutants see Table 1) have been described elsewhere (21). Following initial selection the strains were cultured on LB agar plates. Nucleic acid sequencing was used to verify that the point mutations had been introduced into the single functional rRNA operon of *M. smegmatis*  $rrn^-$ . Taq cycle sequencing was done with fluorescent-labelled nucleotides according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

### *Determination of the minimal inhibitory concentrations (MIC)*

Strains of *M. smegmatis*  $rrn^-$  were cultured on LB agar plates. To obtain 200 ml starting cultures with an  $OD_{600} = 0.025$ , colonies were taken from agar plates and

dissolved in liquid LB medium supplemented with 0.05 % Tween80. The antibiotics to be tested were added in 2-fold series of dilutions ranging from 0.25 mg/ml to 1024 mg/ml. The antibiotics used were obtained from Sigma: paromomycin (P-9297), lividomycin (L-4518), neomycin (N-6386), ribostamycin (R-2255), and from ICN Biomedicals: neamine (158966). The MIC is defined as the drug concentration at which the growth of the cultures is completely inhibited after 72h incubation at 37 °C, corresponding to 24 generations.

### **Acknowledgments**

This study was supported by grants from the Swiss National Science Foundation to ECB (3200-BO-100780, NRP 49). We thank T. Janusic for expert technical assistance. B.F. is supported by E.E.C. project 'Ribosomal Inhibitors' (QLRT-2001-000892) coordinated by Wolfgang Wintermeyer. E.W. wishes to acknowledge support from the Institut universitaire de France.

## References

1. **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**:340-8.
2. **Dahlberg, A. E.** 1989. The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis. *Cell* **57**:525-529.
3. **Davies, J., L. Gorini, and B. D. Davis.** 1965. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.* **1**:93-106.
4. **De Stasio, E. A., and A. E. Dahlberg.** 1990. Effects of mutagenesis of a conserved base-paired site near the decoding region of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **212**:127-133.
5. **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.
6. **Fourmy, D., M. I. Recht, and J. D. Puglisi.** 1998. Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **277**:347-362.
7. **Griffey, R. H., S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery, D. J. Ecker, and S. T. Crooke.** 1999. Determinants of aminoglycoside-binding specificity for rRNA by using mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:10129-10133.
8. **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.
9. **Hermann, T., and E. Westhof.** 1999. Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds. *J. Med. Chem.* **42**:1250-1261.
10. **Kaul, M., C. M. Barbieri, and D. S. Pilch.** 2005. Defining the basis for the specificity of aminoglycoside-rRNA recognition: a comparative study of drug binding to the A sites of *Escherichia coli* and human rRNA. *J. Mol. Biol.* **346**:119-134.
11. **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.

12. **Mingeot-Leclercq, M. P., Y. Glupczynski, and P. M. Tulkens.** 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:727-737.
13. **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 rRNA. *Nucleic Acids Res.* **24**:3700-3706.
14. **Moazed, D., and H. F. Noller.** 1986. Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes. *Cell* **47**:985-994.
15. **Noller, H. F.** 1991. Ribosomal RNA and translation. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:191-227.
16. **Ogle, J. M., F. V. Murphy, M. J. Tarry, and V. Ramakrishnan.** 2002. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**:721-732.
17. **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.
18. **Pfister, P., S. Hobbie, C. Brull, N. Corti, A. Vasella, E. Westhof, and E. C. Bottger.** 2005. Mutagenesis of 16S rRNA C1409-G1491 base-pair differentiates between 6'OH and 6'NH<sub>3</sub><sup>+</sup> aminoglycosides. *J. Mol. Biol.* **346**:467-475.
19. **Pfister, P., S. Hobbie, Q. Vicens, E. C. Bottger, and E. Westhof.** 2003. The molecular basis for A-Site mutations conferring aminoglycoside resistance: relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *ChemBioChem* **4**:1078-1088.
20. **Pfister, P., M. Risch, D. E. Brodersen, and E. C. Bottger.** 2003. Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1496-1502.
21. **Prammananan, T., P. Sander, B. Springer, and E. C. Bottger.** 1999. RecA-mediated gene conversion and aminoglycoside resistance in strains heterozygous for rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:447-453.
22. **Recht, M. I., S. Douthwaite, K. D. Dahlquist, and J. D. Puglisi.** 1999. Effect of mutations in the A site of 16 S rRNA on aminoglycoside antibiotic-ribosome interaction. *J. Mol. Biol.* **286**:33-43.

23. **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.
24. **Sander, P., T. Prammananan, and E. C. Bottger.** 1996. Introducing mutations into a chromosomal rRNA gene using a genetically modified eubacterial host with a single rRNA operon. *Mol. Microbiol.* **22**:841-848.
25. **Spahn, C. M., and C. D. Prescott.** 1996. Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J. Mol. Med.* **74**:423-439.
26. **Vicens, Q., and E. Westhof.** 2001. Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure (Camb)* **9**:647-658.
27. **Vicens, Q., and E. Westhof.** 2003. Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: an analysis of x-ray crystal structures. *Biopolymers* **70**:42-57.
28. **Zimmermann, R. A., C. L. Thomas, and J. Wower.** 1990. Structure and function of rRNA in the decoding domain and at the peptidyltransferase centre, p. 331-347. *In* W. E. Hill, A. E. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger, and J. R. Warner (ed.), *The ribosome: Structure, Function and Evolution*. American Society for Microbiology, Washington DC.



## **CHAPITRE 4**

# **STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DE COMPLEXES ENTRE AMINOGLYCOSIDES MODIFIES ET SITE A**



# Chapitre 4 Structures cristallographiques de complexes entre aminoglycosides modifiés et site A

## I Les aminoglycosides modifiés

Les phénomènes de résistance aux antibiotiques ont considérablement compliqué la gestion de maladies telles que pneumonie, tuberculose, malaria et autres infections affectant les personnes atteintes du SIDA. Alors que le développement de nouveaux composés permettait jusqu'alors de contenir le phénomène de résistance, l'industrie pharmaceutique a progressivement réduit ses investissements de recherche et développement dans le domaine de l'infectiologie pour des raisons financières. En effet, au regard des coûts de développement de plus en plus élevés et des politiques gouvernementales visant à réduire la consommation de médicaments, le retour sur investissement pour des antibiotiques est devenu trop faible. C'est ainsi que la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques s'est ralentie (voir figure 4.1) (Payne and Tomasz 2004;

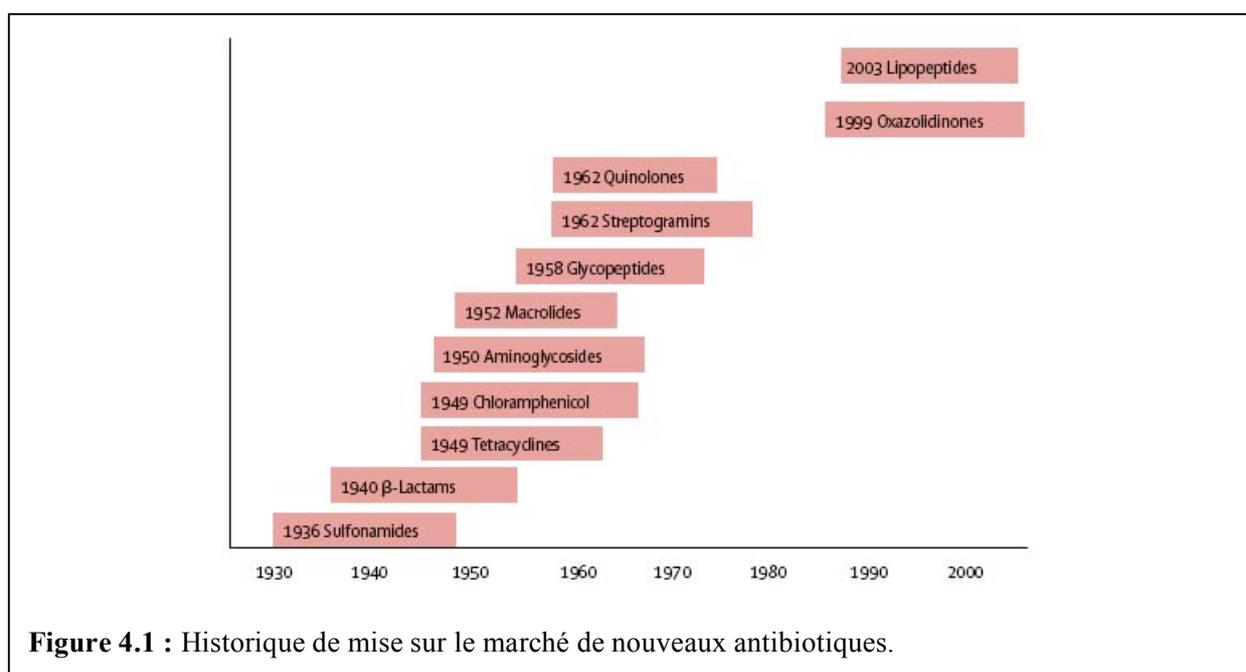


Figure 4.1 : Historique de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques.

Norrby, Nord et al. 2005)

Durant les six dernières années, les efforts de recherche pour le développement de nouveaux composés ont été essentiellement supportés par des laboratoires académiques et des sociétés de biotechnologies ciblant ce marché de niche. Récemment, des réorganisations industrielles ont vu le rachat d'un certain nombre de ces petites sociétés (Vicuron par exemple) par des géants industriels (tels que Pfizer) afin de se repositionner sur ce marché.

Les aminoglycosides présentent un axe de recherche intéressant à plusieurs points de vue : ces composés sont anciens et ne sont donc plus protégés par des brevets commerciaux, la matière première est peu onéreuse et la chimie des sucres permet actuellement un grand nombre de réactions. De nombreuses modifications chimiques ont été testées sur les aminoglycosides dès 1976, aussi bien pour augmenter leur affinité pour l'ARN ou l'ADN que pour restaurer leurs propriétés antibactériennes dans des souches résistantes. Ces travaux ont déjà fait l'objet de plusieurs revues (Wang and Tor 1998; Hermann 2000; Hermann 2005), mais il est intéressant de reprendre l'ensemble des approches chimiques employées et de les mettre en relation avec les données biologiques aujourd'hui disponibles.

La majorité des travaux présentés ci-après ont été réalisés par des laboratoires de chimie dont le but principal était de publier de nouvelles voies de synthèse d'aminoglycosides modifiés et non pas de développer de nouveaux médicaments. De nombreuses modifications chimiques ont été réalisées « en aveugle » sans disposer d'information structurale sur le site A bactérien. La chimie des aminoglycosides a connu un second essor après la résolution de plusieurs complexes aminoglycoside / site A bactérien par RMN et cristallographie aux RX (Fourmy, Recht et al. 1996; Fourmy, Recht et al. 1998; Fourmy, Yoshizawa et al. 1998; Brodersen, Clemons et al. 2000; Ogle, Brodersen et al. 2001; Vicens and Westhof 2001; Vicens and Westhof 2002; Vicens and Westhof 2003). Certains laboratoires se sont basés sur ces structures de manière plus ou moins heureuse, et plusieurs d'entre eux ont étudié l'activité biologique de leurs synthons de manière plus approfondie.

Plusieurs approches ont été utilisées pour modifier les aminoglycosides et peuvent se regrouper au sein de six classes :

- la recherche de molécules aux propriétés chimiques analogues et la synthèse *de novo* ;
- l'obtention de composés issus de couplages d'aminoglycosides avec des sucres, d'autres antibiotiques ou des polyamines ;
- les homo et hétéro-dimérisations d'aminoglycosides ;
- la substitution chimique d'un sucre naturel par un composé cyclique ;
- la cyclisation des aminoglycosides ;
- la substitution ou l'addition de groupements chimiques pour fonctionnaliser les sucres naturels constitutifs des aminoglycosides.

## **A. Identification d'analogues**

Pour découvrir et mettre au point des analogues d'aminoglycosides, il a fallu développer de nouvelles techniques d'investigation pour mesurer rapidement les interactions entre les composés de la librairie chimique testée et la cible biologique. La société Abbot a utilisé un système de criblage de composés chimiques par RMN en observant les déplacements chimiques produits par l'interaction de ces composés avec un fragment d'ARN comportant le site A bactérien (Yu, Oost et al. 2003). Cette technique leur a permis d'identifier une série de molécules appartenant aux familles des 2-aminobenzimidazoles et des 2-aminoquinolines (figure 4.2 A et B respectivement).

Une seconde approche de screen rapide de composés analogues ou dérivés d'aminoglycosides a été mise au point en 2004 (Bryan and Wong 2004) et repose sur l'utilisation d'un fragment d'ARN comportant le site A bactérien couplé à un fluorophore. La réaction de compétition et l'évolution du signal de fluorescence qui a lieu lors de l'ajout des librairies de composés chimiques permet d'identifier lesquels de ces composés ciblent le site A bactérien.

Une technique similaire a été employée par l'équipe de Peter H. Seeberger (Disney and Seeberger 2004). Une librairie de composés chimiques a été fixée sur un support solide puis trois fragments d'ARN comportant respectivement un site A bactérien, un site

A humain et un intron du groupe I, couplés à un fluorophore (TAMARA ou fluorescéine). Cette méthode permet de détecter la liaison d'aminoglycosides au site A bactérien même lorsque les constantes d'affinités sont faibles. La possibilité d'appliquer cette technologie de puce aussi bien aux ARN qu'aux protéines, a permis à la même équipe d'identifier des aminoglycosides modifiés susceptibles d'inhiber par encombrement stérique les sites catalytiques des enzymes de modification bactériennes (AAC(2') issue de *Mycobacterium tuberculosis* et la 6'-acétyltransférase AAC(6') issue de *Salmonella enterica*) (Disney, Magnet et al. 2004).

Les programmes informatiques de modélisation et de docking initialement conçus pour les protéines ont été modifiés pour permettre d'évaluer les bibliothèques d'inhibiteurs potentiels du ribosome (Detering and Varani 2004).

Une nouvelle voie de synthèse d'aminoglycosides *de novo* a été développée en 2004 (Dahl and Finney 2004). En utilisant des réactions de cycloadditions sur des molécules de triazolines, il est possible d'obtenir des aminoglycosides en s'affranchissant des réactifs initiaux qu'étaient le glucose ou la glucosamine. Ces travaux ouvrent de nouvelles possibilités pour la synthèse d'analogues d'aminoglycosides.

Il est à noter que plusieurs de ces techniques seront reprises dans les études mentionnées par la suite, afin de tester rapidement l'affinité des nouveaux composés synthétisés pour leur cible ARN.

## **B. Réactions de couplages sur aminoglycosides**

Les réactions de couplage d'aminoglycosides avec des sucres, des polyamines ou d'autres antibiotiques ont été envisagées pour diminuer l'affinité des aminoglycosides pour leurs enzymes de modifications en empêchant l'accès au cœur catalytique mais également pour augmenter leur affinité pour leurs sites de fixation (site A et RRE) par ajout de contacts supplémentaires avec l'ARN. Il faut toutefois noter que les aminoglycosides peuvent également interagir avec le grand sillon d'hélices d'ADN, et ont été couplés à des molécules ciblant ces hélices telle que Hoechst 33258 (figure 4.2 C) en position 5'' afin de développer des inhibiteurs des facteurs de transcription (Arya and Willis 2003).

Les premiers travaux ont été menés par couplage d'une molécule d'EDTA en position 5'' d'une tobramycine (Wang and Tor 1998) (figure 4.2 D). Cette stratégie a été

mise au point pour inhiber l'activité catalytique du ribozyme à tête de marteau HH16. Les auteurs envisageaient que la partie tobramycine allait cibler la composante ARN tandis que la partie EDTA complexée à une molécule de Fe(II) allait pouvoir déplacer un  $Mg^{2+}$  et ainsi destabiliser le ribozyme.

En 2003, une première série de dérivés acridines (néomycine B, kanamycine ou tobramycine couplées en position 5'' à une molécule d'acridine (figure 4.2 E)) a été synthétisée et testée sur RRE (Luedtke, Liu et al. 2003). Les molécules d'acridines ont été greffées en faisant varier la longueur du bras intercaleur entre l'acridine et l'aminoglycoside, cette longueur influe directement sur la spécificité et la force de liaison du nouveau composé. La même année, l'équipe de Timor Baasov (Fridman, Belakhov et al. 2003) a synthétisé une série de composés issus du couplage d'une néomycine B avec des monosaccharides en position 5'' (figure 4.2 F). Ces conjugués se sont révélés plus actifs que l'aminoglycoside seul contre des souches antibio-résistantes de *Salmonella virchow* (SV49). Cette série de dérivés a également mis en évidence que l'introduction de groupements ammoniums supplémentaires en 5'' n'influçait pas l'activité antibactérienne (MIC similaires) même si elle augmentait l'affinité de ces composés mesurée *in vitro*.

L'actualité des menaces bio-terroristes a mis en évidence la nécessité d'obtenir rapidement des inhibiteurs efficaces de la bactérie Gram positive *Bacillus anthracis* et de sa toxine. Près de 3000 composés ont été passés au crible et la néomycine B est apparue comme candidat potentiel. De nouveaux conjugués en 5'' de néomycine B – monosaccharides ont été testés sur des souches de la bactérie (Fridman, Belakhov et al. 2005). Ces composés (figure 4.2 G) présentent une activité antibactérienne (similaire à celle de la néomycine B) mais sont également efficaces contre la toxine.

L'équipe de Timor Baasov a poursuivi ses études sur le potentiel bactéricide des conjugués néomycine B – mono et disaccharides sur de nouvelles souches bactériennes dont *P. aeruginosa* (Hainrichson, Pokrovskaya et al. 2005). Les résultats ont cette fois démontré une relation directe entre l'activité antibactérienne et le nombre de groupements ammoniums du monosaccharide couplé en 5'', le (2NH<sub>2</sub>)glucose est plus actif que le (1NH<sub>2</sub>)glucose lui-même plus actif que la molécule de glucose seule. L'affinité des enzymes de modification APH(3')-IIIa pour ces composés est plus faible que pour la néomycine B naturelle, ce qui laisse supposer une activité antibactérienne sur les souches de *Pseudomonas* porteuses du gène codant pour cette enzyme.

La néomycine B a également été couplée à d'autres antibiotiques comme le chloramphénicol (Cam) ou le linézolid (Lnz) (Lee, Kwon et al. 2004) pour lui conférer une meilleure affinité pour RRE et TAR. Le couplage en 5'' (figure 4.2 H) a permis de multiplier l'affinité de ces composés par un facteur 10, selon la longueur du bras intercalant (six carbones étant l'optimum).

Les aminoglycosides ont également fait l'objet de modifications chimiques par greffe de polyamines notamment sur une molécule de néomycine B afin d'être utilisés en chromatographie d'affinité (Rege, Hu et al. 2004). Cette approche est intéressante car l'ajout des groupements polyamines s'est fait par réaction enzymatique. Une approche semblable pourrait être envisagée pour fonctionnaliser les cycles IV de molécules de paromomycine, néomycine ou lividomycine.

### **C. Dimérisation d'aminoglycosides**

L'intérêt premier pour les dimères d'aminoglycosides résidait dans leur capacité théorique à occuper simultanément plusieurs sites de liaison d'aminoglycosides au sein d'une grosse molécule d'ARN et ainsi bénéficier des avantages thermodynamiques (entropie et enthalpie) pour augmenter l'affinité de ces derniers pour leur cible. De plus, la génération de dimères permet d'augmenter rapidement le nombre de molécules potentiellement capables de se fixer à l'ARN.

Parmi les premiers à développer cet axe de recherche, le professeur Tor a synthétisé en 1999 (Michael, Wang et al. 1999) plusieurs homo-dimères (néomycine-néomycine, tobramycine-tobramycine et kanamycine-kanamycine) ainsi que des hétéro dimères (tobramycine-néomycine, kanamycine-tobramycine), en reliant les positions 5'' des aminoglycosides par un intercalant suffisamment long et flexible pour explorer des sites de fixations potentiels. Le système biologique étudié est le ribozyme L-21 Sca I de *Tetrahymena*. L'activité inhibitrice des dimères est bien meilleure (facteur 100 pour la tobramycine par exemple) que celle des monomères. Une explication pourrait être la plus forte affinité des dimères pour l'ARN du ribozyme ainsi que le déplacement du magnésium catalytique par les nombreux groupements ammoniums.

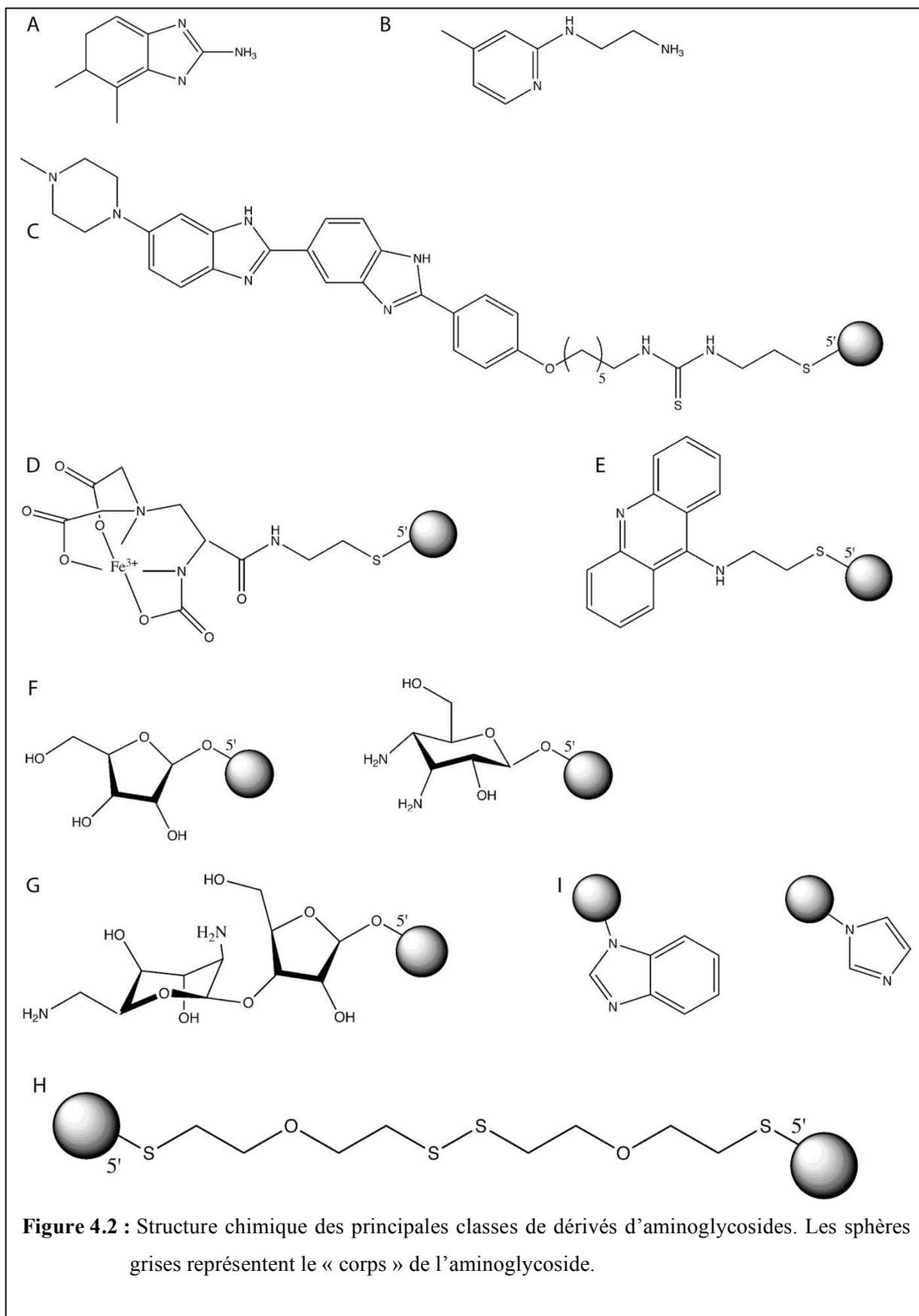
L'année suivante, le même procédé de dimérisation en 5'' a été appliqué à la néamine (Sucheck, Wong et al. 2000) afin d'augmenter son affinité pour l'ARNr et la rendre moins sensible aux enzymes de modification chimique AAC(6') et APH(3'). Ces

dimères possèdent de plus la propriété d'inhiber l'activité APH(2'') de l'enzyme AAC(6')-APH(2'') qui est l'une des principales causes de résistance aux aminoglycosides.

Les homo- et hétéro-dimères de tobramycine, néomycine et kanamycine précédemment mentionnés (Michael, Wang et al. 1999) ont été testés sur RRE avec plusieurs longueurs d'intercalant (Luedtke, Liu et al. 2003). Cette étude a démontré que la dimérisation permettait d'augmenter l'affinité des aminoglycosides pour RRE sans pour autant augmenter la spécificité pour ce dernier. Or ce point est critique pour tout développement de traitements destinés à l'homme afin de diminuer les risques d'effets secondaires.

Les aminoglycosides, tout comme les autres ligands de l'ARN, ne ciblent généralement pas les boucles en épingle à cheveux. La synthèse d'homo-dimères de 2-déoxystreptamine reliés en position 4 par des intercalants de différents types (aromatiques ou non) a permis l'obtention de ligands de type aminoglycoside capable de se lier à ce motif structural (Liu, Thomas et al. 2004). Comme précédemment, l'affinité de ces composés résulte d'une combinaison entre longueur et nature de l'intercalant. Les auteurs n'ont pas traité de l'activité antibactérienne de tels composés.

Deux autres études ont estimé l'effet de variables telles que la longueur, la nature et le positionnement (4,5 ou 4,6 DOS) de l'intercalant pour des homo-dimères de néamine (Agnelli, Sucheck et al. 2004; Liang, Romero et al. 2005). Il ressort de ces travaux que les molécules dimérisées en position 6 du cycle déoxystreptamine sont plus efficaces que celles dimérisées en position 5.



## D. Remplacement d'un sucre naturel

En se basant sur les données structurales RMN de Puglisi, l'équipe du professeur Hanessian a produit une carte du site A bactérien à l'aide du programme GRID afin de déterminer les zones énergétiquement favorables à l'ajout de charges supplémentaires à une molécule de paromomycine. Cette modélisation a déterminé une zone entourée de groupements phosphates normalement occupée par les cycles III et IV de la paromomycine (Hanessian, Tremblay et al. 2001). Leur hypothèse de travail a donc été de supprimer les deux cycles naturels et de les remplacer par des appendices, cycliques ou non, comportant des groupements ammoniums à leur extrémité ou par les cycles I et II constituant ainsi des dimères de paromamine. Aucun des composés ainsi produits n'a présenté d'activité antibactérienne contre des souches résistantes à une dose de 50 µg / ml.

Une autre approche consiste à introduire des éléments hétérocycliques sur une molécule d'aminoglycoside. Pour déterminer leur positionnement, les auteurs (Ding, Hofstadler et al. 2003) ont comparé l'activité de la paromomycine privée de son cycle I ou de son cycle IV. La technique employée a montré que le cycle I est moins indispensable que le cycle IV et leur travaux se sont donc orientés vers une suppression du cycle I et son remplacement par des groupements hétérocycliques. L'affinité du composé final (figure 4.2 I) pour le site A est inférieure à celle mesurée pour la paromomycine, mais les valeurs de MIC50 sont semblables 2,8 mM et 3 mM. Le positionnement de ce double hétérocycle n'est pas évident et seule une structure cristallographique permettra de connaître son mode d'interaction avec les adénines 1408, 1492 et 1493.

D'autres travaux visant à remplacer le cycle III de la kanamycine A par d'autres sucres ont été menés (Li, Wang et al. 2004). Les mesures systématiques d'affinité et de MIC50 pour l'ensemble des substituants employés a permis d'identifier les positions les plus favorables pour les différents groupements chimiques sur le cycle III (ammonium, hydroxyle ou benzyle). Parallèlement, un autre groupe (Chou, Wu et al. 2004) a développé une méthode de synthèse d'analogues de kanamycine B sans pour autant tester l'activité biologique de ces derniers.

## E. Cyclisation d'aminoglycosides naturels

La recherche d'aminoglycosides insensibles aux enzymes de modification a été facilitée par la résolution des structures de ces enzymes en présence de leur substrat (Pedersen, Benning et al. 1995). Ainsi il est apparu que l'O-nucléotidyltransférase ANT4 de *Staphylococcus aureus* nécessite en son site actif une conformation de la néomycine B différente de celle adoptée par l'antibiotique dans le site A bactérien. Deux groupes (Asensio, Hidalgo et al. 2005; Zhao, Zhao et al. 2005) ont eu l'idée de maintenir une molécule de néomycine dans sa configuration « active » en créant une liaison entre le groupement hydroxyle 5'' du cycle III et le groupement ammonium en 2' du cycle I. La structure cristallographique de la néomycine cyclisée n'est que de 3 Å (en plus de certaines libertés prises avec les statistiques d'affinement) alors que le système de cristallisation employé permet d'atteindre des résolutions voisines de 2 Å ; le rôle des molécules d'eau dans l'interaction entre l'antibiotique et sa cible ARN n'a pas été discutée par les auteurs (Zhao, Zhao et al. 2005).

## F. Incorporation-substitution de groupements chimiques

L'amikacine est le premier aminoglycoside modifié chimiquement obtenu en 1976 par incorporation d'un groupement chimique (le L(-)-gamma-amino-alpha-hydroxybutyryl) sur l'ammonium en C1 de la kanamycine (Kawaguchi 1976). Ce composé a été rapidement utilisé en milieu hospitalier car il restait efficace sur des souches résistantes.

La bromoacétylation des groupements ammoniums d'une néamine (Roestamadji and Mobashery 1998) y compris en position C1, permet à cette nouvelle molécule de conserver une efficacité antibactérienne sur des souches résistantes. Les groupements bromoacétyles diminuent légèrement l'affinité de l'aminoglycoside, mais surtout modifient l'organisation du site catalytique pour l'enzyme de modification bactérienne APH(3')-IIa.

Les précédents résultats sont-ils dus aux charges supplémentaires apportées aux antibiotiques ? Pour répondre à cette question, Hai Wang and Yitzhak Tor (Wang and Tor 1998) ont éliminé les groupements hydroxyles en 6'' des molécules de tobramycine et de

kanamycine A puis les ont remplacés par des groupements ammoniums. Ils ont procédé de même pour le groupement hydroxyle en 5'' de la néomycine B. L'effet inhibiteur de ces molécules a été testé sur le ribozyme à tête de marteau : la (6''NH<sub>2</sub>)kanamycine A présente la même efficacité que la kanamycine B (même charge totale), de même, l'efficacité de la (6''NH<sub>2</sub>)tobramycine et de la (5''NH<sub>2</sub>)néomycine B a été augmentée d'un facteur cinq. Dans le cas de cette étude, il y a corrélation directe entre le nombre de charges et l'affinité des aminoglycosides pour l'ARN. Cependant l'activité antibactérienne de ces dérivés n'a pas été mesurée.

D'autres positions sur le cycle I ont été exploitées pour ajouter des groupements fonctionnels au squelette paromamine (Simonsen, Ayida et al. 2002), après élimination des cycles III et IV de la paromomycine, Hermann et ses collaborateurs ont testé diverses fonctionnalisations des positions 4' et 6'. Aucun de ces composés ne possède une activité bactéricide comparable à celle de la paromomycine (facteur entre 100 et 1000). Il faut noter que les modifications en position 4' n'induisent pas systématiquement de perte d'activité, par contre tout changement en position 6' supprime la pseudo paire de base entre le cycle I et l'adénine A1408. Il est regrettable que les auteurs aient supprimé les cycles III et IV de la paromomycine privant ainsi leurs composés de quatre contacts directs avec l'ARN du site A (Vicens and Westhof 2001), les diminutions drastiques de l'activité étant probablement liées.

Le groupement aminohydroxybutyryle (HABA) a été repris en 2003 (Russell, Murray et al. 2003) pour dériver en position N1 une molécule de néamine qui possède un ligand aminoalkyle sur l'hydroxyle en position 6. Tout comme pour l'amikacine, ce composé présente un large spectre d'activité (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Staphylococcus aureus*) y compris sur des souches résistantes comportant l'enzyme APH(3')-IIIa. La structure cristallographique à 2,5 Å met en évidence les quatre contacts entre le groupement HABA et les bases U1495, G1403, C1496 et G1497 ; ainsi que les trois contacts entre le groupement aminoalkyle et les bases G1405 et U1406. La superposition de ce composé sur la structure de la kanamycine liée au site actif de l'enzyme APH(3') révèle une gêne stérique entre la partie HABA et une boucle constitutive du site catalytique. L'explication proposée rejoint celle formulée en 1998 (Roestamadji and Mobashery 1998) qui suppose une réorganisation du site catalytique de l'enzyme d'où la perte d'activité de ce dernier.

La fonctionnalité et la stéréochimie du groupement HABA a été étudiée au travers d'une série complète d'analogues (cyclisation, allongement de la chaîne et remplacement de l'ammonium terminal par un groupement hydroxyle) (Hanessian, Kornienko et al. 2003). Les analogues d'amikacine N-hydroxyurée présentent des niveaux d'efficacité similaires à ceux de l'amikacine contre les souches *Escherichia coli* (ATCC25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC13709) mais sont également actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Cependant, ils sont inefficaces contre la souche résistante de cet organisme ainsi que contre la souche de *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 33591).

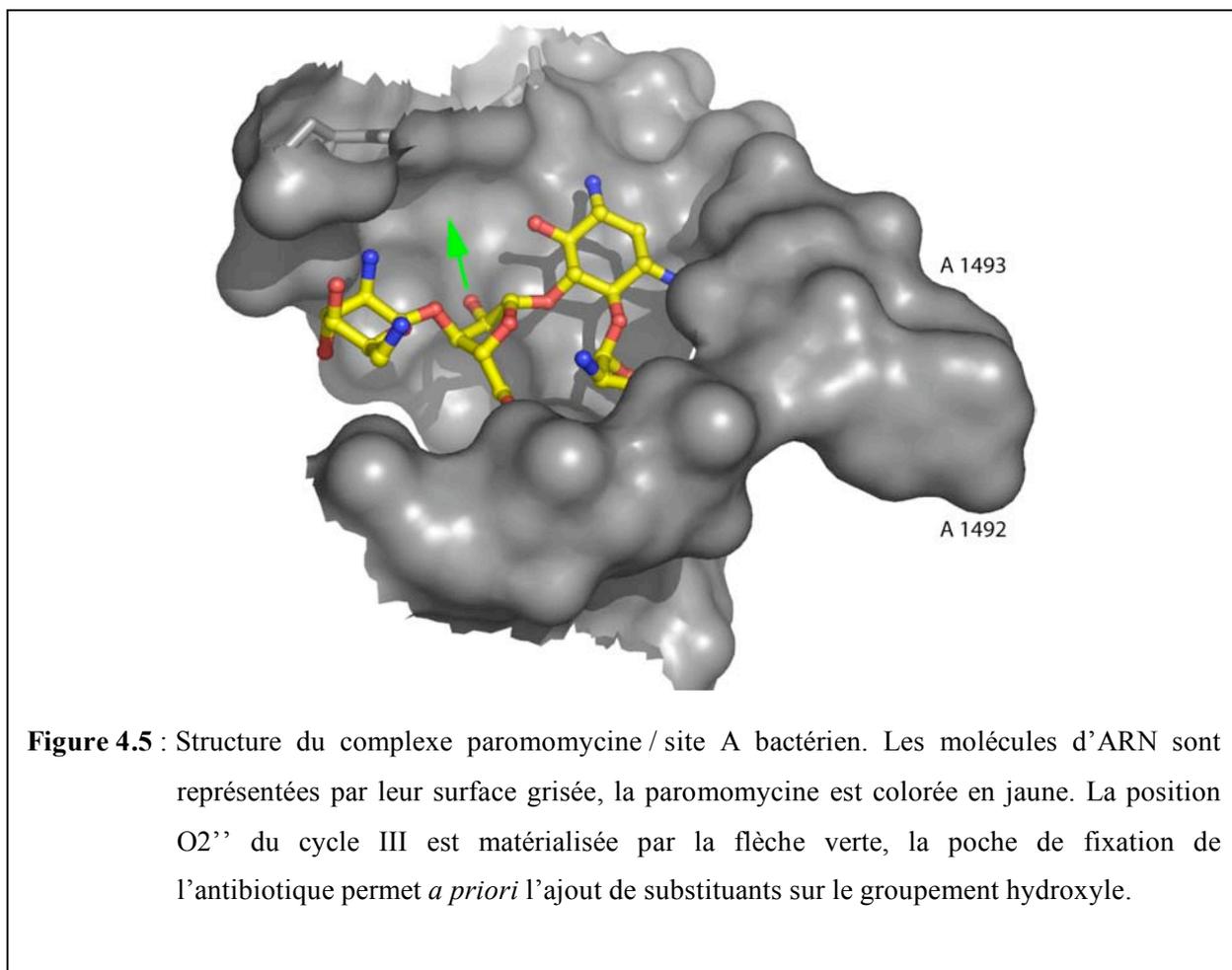
En se basant sur les structures cristallographiques des sites de fixation de la paromomycine (Ogle, Brodersen et al. 2001; Vicens and Westhof 2001) et de l'hygromycine (Brodersen, Clemons et al. 2000), Hermann et collaborateurs ont synthétisé des dérivés de néamine en O6 et N1 pour étendre les interactions de celle-ci jusqu'au site de fixation de l'hygromycine (Vourloumis, Winters et al. 2005). Les composés obtenus possèdent la capacité de se fixer à l'ARN mais sont de faibles inhibiteurs de croissance bactérienne. Les auteurs n'ont pas été en mesure de démontrer la spécificité de ces molécules pour les sites de fixation de la paromomycine et de l'hygromycine.

La table 4.1 résume l'ensemble des positions chimiques ayant fait l'objet de modifications. Il faut bien noter que la plupart des publications citées dans cette partie sont issues de laboratoires de chimie pour lesquels seules les notions d'affinité et de constantes d'associations comptent. La spécificité des nombreuses molécules synthétisées n'a pas toujours été estimée ou du moins publiée, il y a cependant fort à parier que ces mêmes molécules ont été reprises par les industriels du secteur pharmaceutique pour accroître leurs bibliothèques de composés, puis testées par criblage à haut débit (HTS).

La paromomycine est un aminoglycoside possédant une bonne affinité pour le site A bactérien et est efficace à faible concentration sur des souches classiques. Ces deux arguments font de cette molécule un candidat idéal pour tester de nouvelles modifications chimiques. Le choix du groupement fonctionnel ciblé tient compte de la table 4.1 et de la structure cristallographique du site A bactérien : le groupement hydroxyle O2'' du cycle

**Table 4.1** : Localisation des principales modifications chimiques d'aminoglycosides.

	PAROMOMYCINE NEOMYCINE	TOBRAMYCINE KANAMYCINE	NEAMINE 2-DOS
<b>Cycle I</b>			
Remplacement	[Ding, 2003]	N.T	N.T
Substitutions	<b>4' et 6'</b> [Simonsen, 2002]		
<b>Cycle II</b>			
Remplacement	N.T	N.T	N.T
Dimérisation	N.T	N.T	<b>O4</b> [Liu, 2004] <b>O5 O6</b> [Agnelli, 2004] [Liang, 2005]
Substitutions	<b>N1</b> [Kawaguchi, 1976] [Russell, 2003] [Hanessian, 2003]	<b>N1</b> [Hanessian, 2003] [Brodersen, 2005]	<b>N1 et O6</b> [Roestamadj, 1998] [Brodersen, 2000]
<b>Cycle III</b>			
Remplacement	[Hanessian, 2001]	[Li, 2004] [Chou, 2004]	N.T
Couplage	<b>5''</b> [Arya, 2003] [Luedtke, 2003] [Fridman, 2003] [Lee, 2004] [Hainrichson, 2005] [Fridman, 2005]	<b>5''</b> [Wang, 1998] [Luedtke, 2003]	<b>5''</b> [Luedtke, 2003]
Dimérisation	<b>5''</b> [Michael, 1999] [Luedtke, 2003]	<b>5''</b> [Michael, 1999] [Luedtke, 2003]	<b>5''</b> [Michael, 1999] [Sucheck, 2000] [Luedtke, 2003]
Substitutions	<b>O2''</b> [Francois, 2004]	N.T	N.T



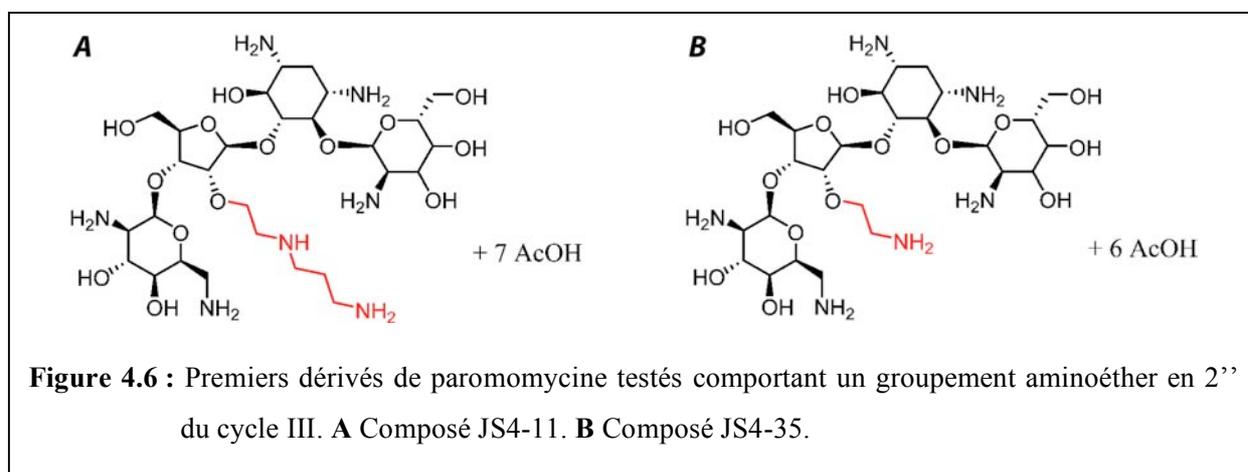
III n'a pas encore fait l'objet de modifications, et le positionnement de la paromomycine (figure 4.5) laisse entrevoir la possibilité d'y greffer des groupements fonctionnels sans perturbation majeure du site A.

Le laboratoire de chimie organique, bioorganique et de chimie médicinale de l'université de Montréal dirigé par le professeur Stephen Hanessian (<http://osiris.org.umontreal.ca/index.shtml>) a synthétisé de nombreux composés exploitant la position 2'' de la paromomycine. Les dérivés présentant l'activité biologique la plus intéressante sur des souches d'*Escherichia coli* nous ont été fournis pour étude structurale. La seconde partie de ce chapitre va tout d'abord présenter les essais de cristallisation effectués avec ces composés puis les structures et publications associées.

## II Essais de cristallisations

Les dérivés de paromomycine m'ont été fournis sous forme de poudres jaune-brun ou sous la forme d'huiles brunâtres. La première étape a été leur solubilisation dans de l'eau milli-Q pour obtenir une solution stock de 30 mM.

La première série d'essais a porté sur deux composés : JS4-11 et JS4-35 (figure 4.6) possédant des groupements aminoéther en position 2''. Les fragments d'ARN utilisés sont A3, A3-4 et A3-8 permettant ainsi d'identifier rapidement l'effet de l'empilement (voir chapitre 2). Les conditions de cristallisation sont celles employées pour le complexe A3 / paromomycine (Vicens and Westhof 2001) étendues à des concentrations de glycérol et de MPD un peu plus élevées (table 4.2). Pour les fragments A3-4 et A3-8, seules trois conditions ont été testées (table 4.3). La méthode de cristallisation employée est celle de la goutte suspendue (sur boîtes LIMBRO classiques avec lamelles en verre et réservoir MPD 40 %) composée de 1 µl de complexe paromomycine modifiée / ARN et de 1 µl de solution de cristallisation. Après six jours à 37°C, les premiers cristaux apparaissent (table 4.4) et l'on constate des différences notables entre les complexes. Dans les deux cas, le fragment A3-8 n'a généré aucun cristal, l'insertion d'une paire de base dans la partie centrale du duplexe semble défavorable à la nucléation, malgré la présence d'un léger précipité observé dans la plupart des gouttes, des cristaux ont été obtenus avec les fragments A3 et A3-4. Les cristaux du composé JS4-35 ressemblent fortement à ceux obtenus avec la tobramycine et la généticine : ce sont de fines plaquettes de très petite taille. Par contre, pour le composé JS4-11 (partie supérieure de la table 4.4), les cristaux obtenus sont « tridimensionnels » (avec un profil de bipyramide à base carrée entrecoupée



par deux plaquettes) ; ces cristaux seront appelés « en hélice d'avion ».

Les essais d'optimisation des cristaux obtenus avec le composé JS4-11 ont testé des variations locales des concentrations en MPD et en glycérol, mais n'ont pas permis de reproduire les premiers cristaux. Après transfert à 20°C, les cristaux du complexe JS4-11 / A3-4 sont prélevés puis congelés dans l'éthane liquide après passage 5 minutes dans une solution cryoprotectrice contenant 50 % de MPD, 10 % de glycérol et 150 mM de KCl. Les cristaux obtenus avec le composé JS4-35, trop petits et fragiles, n'ont pu être congelés.

Le 15 septembre 2003, trois cristaux du complexe JS4-11 / A3-4 ont été testés sur la ligne ID14-4 de l'ESRF (Grenoble). Pour l'un d'entre eux, la résolution visible sur le détecteur a atteint 2,7 Å et 170 images ont été collectées avec une rotation de 1° entre chacune d'elles et un temps d'exposition de 0,6 seconde (longueur d'onde du faisceau : 0,9999 Å).

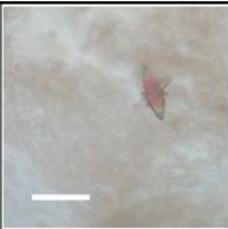
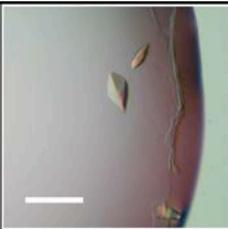
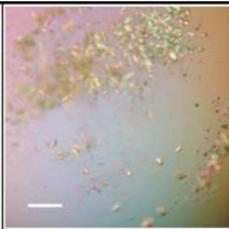
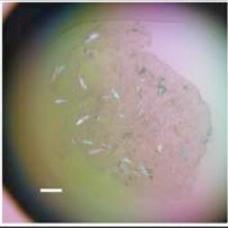
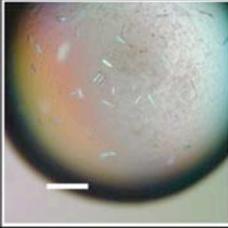
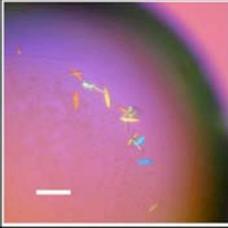
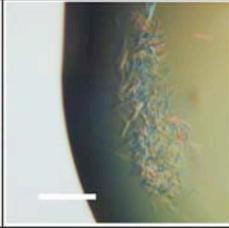
**Table 4.2 :** Premier screen de cristallisation utilisant le fragment A3.

MPD (%)	5	4	3,5	2	1,5	1,5	1	1	1
Glycérol (%)	3	2	2	2	2	3	3	4	5
JS4-11 (M) JS4-35 (M)	0,002								
Na caco pH 6,4 (M)	0,05								
KCl (M)	0,15								

**Table 4.3 :** Premier screen de cristallisation utilisant les fragments A3-4 et A3-8.

MPD (%)	3,5	2	2
Glycérol (%)	2	2	4
JS4-11 (M) JS4-35 (M)	0,002		
Na caco pH 6,4 (M)	0,05		
KCl (M)	0,15		

**Table 4.4 :** Résultats des premiers essais de cristallisation des composés JS4-11 et JS4-35.

JS4-11				
	A3	A3	A3-4	A3-4
	MPD	5	1,5	2
	Glyc	3	2	2
JS4-35				
	A3	A3	A3-4	A3-4
	MPD	4	1,5	3,5
	Glyc	2	3	2

Les données synchrotron ont été indexées à l'aide de la suite logicielle HKL2000 (Otwinowski and Minor 1996) en utilisant les 179 clichés. Le primo groupe d'espace proposé par le logiciel est orthorhombique P222 avec les paramètres de maille affinés suivants :  $a= 39,37$  ;  $b= 39,59$  ;  $c= 99,52$  et une mosaïcité de 0,8.

Après mise à l'échelle, sur une plage de résolution ( $50-2,6 \text{ \AA}$ ), les paramètres de maille sont  $a= 39,186$  ;  $b= 39,155$  et  $c= 99,02 \text{ \AA}$  avec une complétude moyenne de 99,6 % (100 % sur la couche 2,69-2,6) et une mosaïcité de 0,62.

Les premiers essais de remplacement moléculaire utilisant le programme AMoRe (Navaza and Saludjian 1996) et la structure de la paromomycine de Quentin Vicens (PDB : 1J7T) n'ont cependant donné qu'une très faible corrélation (inférieure à 25 %).

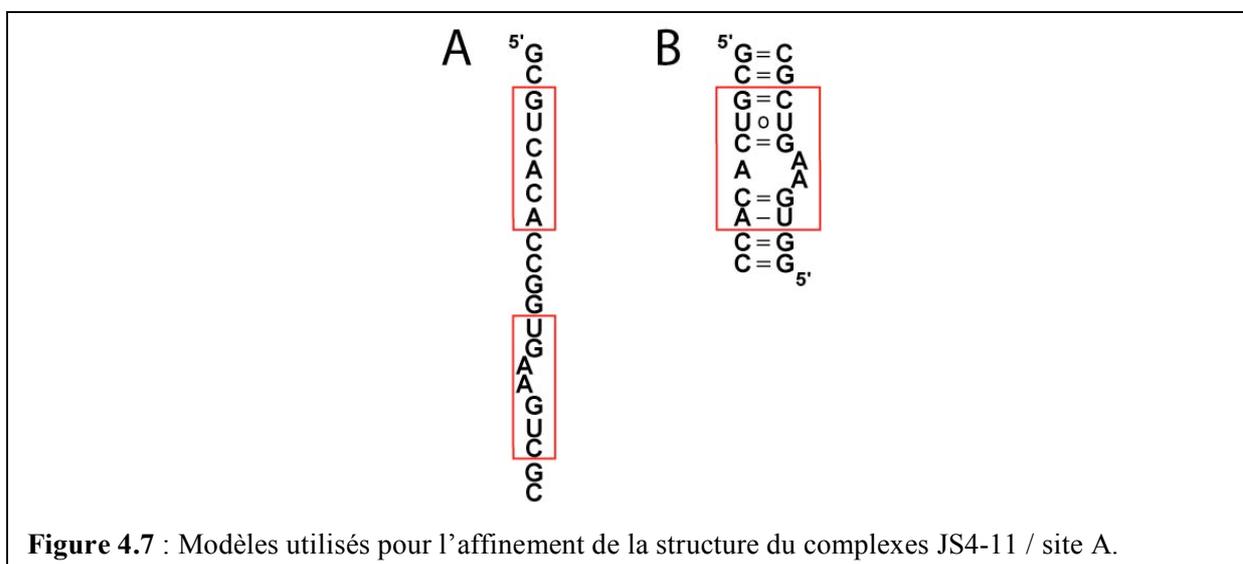
L'examen plus attentif des fichiers d'indexation a mis en évidence les similitudes entre les paramètres  $a$  et  $b$  de la maille, signifiant que le groupe d'espace est plutôt tétragonal de type P422. Des extinctions le long de l'axe 4 et de l'axe 2 ont également été révélées. Le choix du groupe d'espace à imposer au logiciel se restreint donc à  $P4_12_12$  ou  $P4_32_12$  avec les paramètres de maille suivants :  $a= 39,17$  ;  $b= 39,17$  et  $c= 99,03 \text{ \AA}$ . Ce groupe d'espace signifie qu'il y a une symétrie parfaite entre les deux sites A d'un même

duplexe alors que dans les structures précédentes, un des deux sites était toujours mieux défini (Vicens and Westhof 2001; Vicens and Westhof 2002; Vicens and Westhof 2003).

Le remplacement moléculaire utilisant le groupe d'espace P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 et la structure de la paromomycine permet d'obtenir un facteur de corrélation de 72,5 % et un facteur R de 43,9 %.

La matrice de rotation et de translation est appliquée à la chaîne A de la structure de la paromomycine (figure 4.7 A) à l'aide de moleman2 (Uppsala factory) et fournit le modèle de base qui sera affiné ensuite en utilisant CNS 1.1 (Brunger, Adams et al. 1998). Cependant, l'augmentation systématique des facteurs R et R<sub>free</sub> lors des recuits simulés a conduit à échanger ce premier modèle pour une moitié de duplexe (figure 4.7 B) qui permet au logiciel de tenir compte des paramètres de topologie appliqués aux paires de bases. En alternant recuit simulé et construction manuelle de l'ARN dans les cartes de densité 2Fo-Fc et Fo-Fc visualisées à l'aide d'O8, le positionnement de l'antibiotique au sein du site A devient visible, y compris pour le groupement en 2''. Les cycles III et IV (figure 4.8 A et B) ont une orientation différente de celle observée pour la molécule de paromomycine, il y a sans doute eu rotation des liaisons glycosidiques entre les cycle II, III et IV.

Le fichier pdb de la molécule JS4-11 est élaboré à partir de la paromomycine en utilisant le logiciel Rasmol 3.2. Les fichiers de paramètres et de topologie ont été calculés sur le serveur XDICT (Kleywegt, Henrick et al. 2003; Kleywegt, Harris et al. 2004). Après positionnement de l'antibiotique dans le site A, les facteurs d'agitation thermique sont affinés pour la molécule d'ARN et pour les deux molécules de paromomycine modifiée.

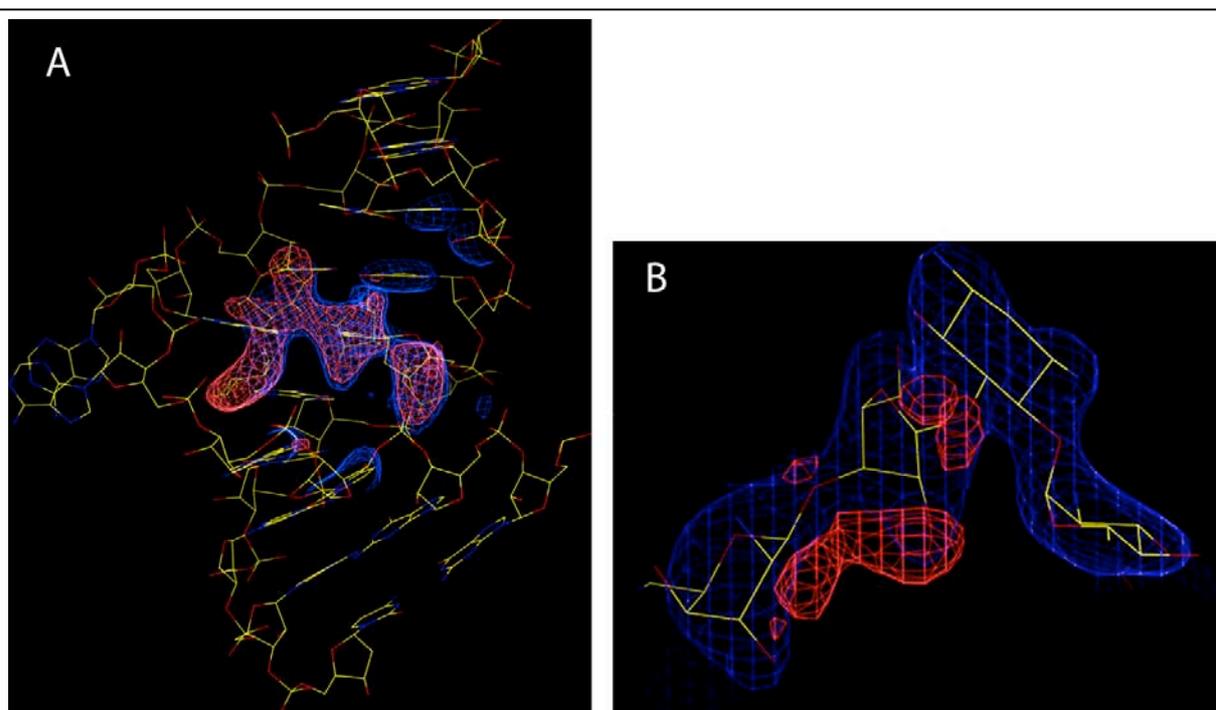


**Figure 4.7** : Modèles utilisés pour l'affinement de la structure du complexes JS4-11 / site A.

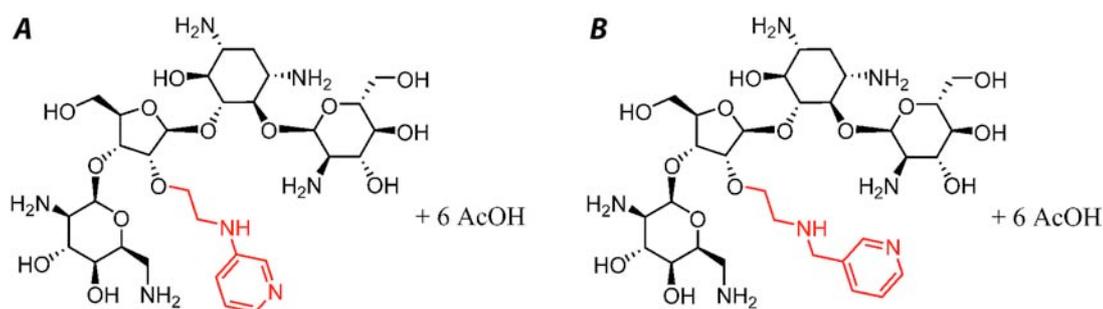
Cependant les dernières cartes Fo-Fc et 2Fo-Fc ne comportent plus de densité pour la partie aminoéther de JS4-11. De plus le logiciel ne parvient pas à positionner les molécules de solvant dans la structure.

Le traitement est suspendu à cette étape avec des facteurs  $R = 23,5 \%$  et  $R_{free} = 28,9 \%$ .

Parallèlement à cet affinement, une nouvelle série de paromomycines modifiées en 2'' nous est envoyée en janvier 2004. Les deux composés JS5-38 et JS5-39 (figure 4.9)



**Figure 4.8** : Premières cartes de densité pour la molécule JS4-11. Carte 2Fo-Fc en bleu, carte Fo-Fc en rouge. **A** Les quatre cycles de la molécule sont bien visibles dans les deux cartes de densité. (Fo-Fc contournée à  $3,4 \sigma$  et 2Fo-Fc à  $1,3 \sigma$ ) **B** Apparition de la densité pour la chaîne en 2'' (Fo-Fc contournée à  $3 \sigma$  et 2Fo-Fc à  $1,5 \sigma$ ).



**Figure 4.9** : Seconde série de dérivés de paromomycine testés : composé JS5-38 (**A**) et JS5-39 (**B**).

possèdent un groupement de type aminoéther pyridyle.

Les essais de cristallisation utilisent à nouveau trois fragments d'ARN (A3 ; A3-4 et A3-8), et un crible de cristallisation restreint aux conditions qui avaient donné de bons résultats dans le cas de JS4-11 et JS4-35 (table 4.5). La méthode de cristallisation par goutte suspendue se fait dans des boîtes NEXTAL<sup>®</sup> (www.nextalbiotech.com) dont les lamelles de plastique comportent 6 cupules.

Les premiers cristaux sont apparus après 6 jours à 37°C et la boîte a été transférée à 20°C après 6 jours de croissance cristalline. Le comportement des différents complexes varie à nouveau selon le composé et selon le fragment d'ARN utilisé (table 4.6). Le composé JS5-38 ne cristallise (sous forme de plaquettes) que complexé au fragment A3-4 tandis que le composé JS5-39 cristallise (sous forme d'hélices d'avion) lorsqu'il est complexé au fragment A3. Les résultats de ces essais sont consignés dans la table 4.7.

Après transfert à 20°C, les cristaux du complexe JS5-39 / A3 sont prélevés puis congelés dans l'éthane liquide après passage 5 minutes dans une solution cryoprotectrice contenant 30 % de MPD, 5 % de glycérol et 200 mM de KCl.

Les cristaux très fragiles obtenus avec le composé JS5-38 se sont systématiquement fissurés lors du trempage rendant leur congélation vaine. Pour contourner ce problème de fragilité, une expérience de trempage a été menée : des cristaux du complexe JS5-39 sont mis à tremper pendant 4 heures dans une solution contenant 5 mM du composé JS5-38. L'aspect des cristaux n'ayant pas été modifié, la première solution est échangée contre une

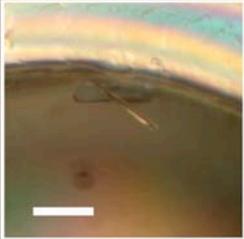
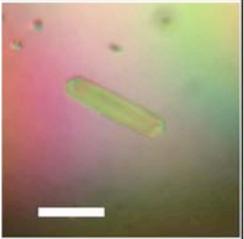
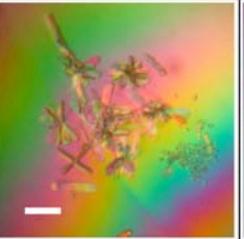
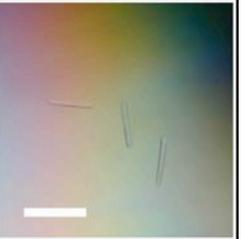
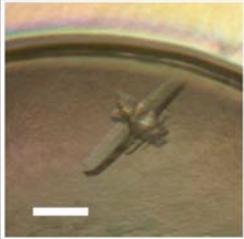
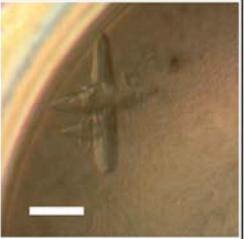
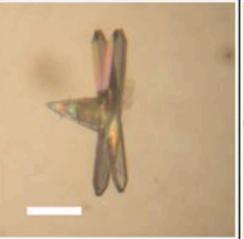
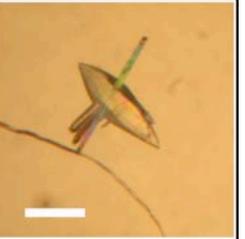
**Table 4.5 :** Screen de cristallisation appliqué aux fragments A3, A3-4 et A3-8.

MPD (%)	3,5	2,5	1,5	2	2	1
Glycérol (%)	2	1	1	2	4	5
JS5-38 (M)	0,002					
JS5-39 (M)	0,002					
Na caco pH 6,4 (M)	0,05					
KCl (M)	0,15					

**Table 4.6 :** Comportement des différents complexes lors de la deuxième série de cristallisations.

	A3	A3-4	A3-8
JS5-38	gouttes claires	Cristaux	gouttes claires
JS5-39	Cristaux	Précipité	Précipité

**Table 4.7 :** Résultats des essais de cristallisation des composés JS5-38 et JS5-39.

JS5-38					
	A3-4	A3-4	A3-4	A3-4	
	MPD	3,5	2,5	1,5	2
	Glyc	2	1	1	2
JS5-39					
	A3	A3	A3	A3	
	MPD	3,5	2,5	1,5	2
	Glyc	2	1	1	2

solution contenant 10 mM de JS5-38 et le trempage se poursuit pendant 12 heures. Si les cristaux ne semblent *a priori* pas avoir été altérés, leur manipulation induit cependant un grand nombre de fissures et plans de cassures.

Le 13 février 2004, huit cristaux du complexe JS5-39 / A3 ont été testés sur la ligne ID14-2 de l'ESRF (Grenoble). Pour l'un d'entre eux, la résolution visible sur le détecteur a atteint 2,5 Å et 330 images ont été collectées avec une rotation de 1° entre chacune d'elles et un temps d'exposition de 5 secondes (longueur d'onde du faisceau : 0,933 Å).

Les données synchrotron ont été indexées à l'aide de la suite logicielle HKL2000 (Otwinowski and Minor 1996) en utilisant 270 clichés. Le primo groupe d'espace proposé est un tétragonal P4 avec les paramètres de maille affinés suivants :  $a = 39,23$  ;  $b = 39,23$  ;  $c = 99,33$  et une mosaïcité de 0,88.

Après mise à l'échelle, sur une plage de résolution 50-2,63 Å, le groupe d'espace est P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 avec ces paramètres de maille :  $a = 39,14$  ;  $b = 39,14$  ;  $c = 99,14$ . La complétude moyenne est de 98,2 % (100 % sur la couche 2,72-2,62) et la mosaïcité est de 0,86.

Les essais de remplacement moléculaire utilisant le programme AMoRe (Navaza and Saludjian 1996) et la structure du complexe JS4-11 / A3-4 sur le domaine de

résolution 10,5-3,0 Å donnent une solution avec un facteur de corrélation de 85,4 % et un facteur R égal à 30,9 %.

La matrice de rotation et de translation est appliquée au demi-duplexe (figure 4.7 B) à l'aide de *moleman2* et fournit le modèle de base qui sera affiné ensuite en utilisant CNS (Brunger, Adams et al. 1998). En alternant recuit simulé et construction manuelle de l'ARN dans les cartes de densité 2Fo-Fc et Fo-Fc visualisées à l'aide d'O8, le positionnement de l'antibiotique au sein du site A devient visible. Cependant, tout comme pour le précédent complexe, le positionnement des molécules d'eau et du groupement en 2'' est impossible et le facteur R<sub>free</sub> reste élevé (30,4 %).

Après discussion avec le professeur Shing HO (en séjour sabbatique au laboratoire), l'hypothèse d'un mauvais groupe d'espace est avancée : si les deux sites ont une structure très proche cela peut induire une pseudo symétrie interne et une augmentation de la symétrie du cristal. Pour faciliter l'affinement, il suffit de « redescendre » en symétrie et passer au groupe d'espace P4<sub>1</sub>, ce qui signifie utiliser le duplexe entier dans les essais de remplacement moléculaire et pour l'affinement.

Le jeu de données du complexe JS5-39 / A3 est donc repris dans HKL2000 pour une mise à l'échelle dans le groupe d'espace P4<sub>1</sub>. Un modèle de duplexe est généré en additionnant deux demi-duplexes obtenus par symétrie en P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 et le logiciel AMoRe fournit deux solutions équivalentes sur l'intervalle de résolution 15,0-3,5 Å avec un facteur de corrélation de 73,3 % et un facteur R égal à 36,1 %. Une des deux matrices est appliquée au modèle et l'affinement est commencé. Le positionnement des deux molécules JS5-39 est difficile, elles sont donc scindées en deux parties : la partie paromamine et les cycles III-IV avec le groupement en 2''. Le calcul des cartes par omission (*omit-map*) portant sur ces deux résidus produit deux cartes dans lesquelles le groupement en 2'' pointe vers le sillon et non plus vers l'adénine A1408. De plus, l'orientation des cycles III et IV qui est différente de celle observée avec la paromomycine classique, nécessite une modification du plissement du sucre constituant le cycle III. Ce dernier passe d'une conformation C2'' endo à une conformation C3'' endo. Le composé est reconstruit progressivement dans la densité électronique, les facteurs d'agitation thermique sont affinés puis 44 molécules de solvant sont enfin ajoutées.

Les problèmes rencontrés lors de l'affinement du complexe JS4-11 / A3-4 étant semblables, le jeu de données synchrotron est à nouveau indexé en P4<sub>1</sub>. L'utilisation de paramètres pour le remplacement moléculaire identiques à ceux utilisés pour JS5-39

conduisent à deux solutions jumelles avec un facteur de corrélation de 71,1 % et facteur R de 42,9 %. L'affinement de la structure est rapide car la matrice de rotation-translation est appliquée au dernier fichier pdb du complexe JS5-39 précédemment affiné. L'orientation des deux paromomycines modifiées est identique (même modification du plissement du cycle III, même orientation du groupement en 2''). Après positionnement des molécules dans leur densité et optimisation des facteurs d'agitation thermique, 62 molécules de solvant sont ajoutées et affinées.

Des essais ultérieurs permettront d'obtenir des cristaux du complexe JS5-38 / A3-4 suffisamment solides pour être congelés et testés sur ligne synchrotron. Seuls quelques clichés ont pu être enregistrés avant que le cristal ne se détériore, leur indexation a donné les paramètres suivants : résolution 2,6 Å, groupe d'espace orthorhombique P222 avec  $a= 33,24$  ;  $b= 45,66$  et  $c= 93,49$  Å.

### **III Publication 5 : structures tridimensionnelles des complexes site A / JS4-11 et JS5-39.**

Les deux structures de JS4-11 et JS5-39 mentionnées précédemment ont fait l'objet d'une publication en décembre 2004 (Francois, Szychowski et al. 2004) <sup>5</sup>.

Cette publication décrit la synthèse chimique puis commente les structures cristallographiques des deux composés en s'attardant principalement sur les différences observées par rapport à la paromomycine classique. Dans cet article, le composé JS4-11 est mentionné sous le numéro 9 et le composé JS5-39 sous le numéro 10.

Plusieurs figures complémentaires à la publication ont été rajoutées en annexe.

---

<sup>5</sup> *Antibacterial Aminoglycosides with a Modified Mode of Binding to the Ribosomal-RNA Decoding Site*. Boris Francois, Janek Szychowski, Susanta Sekhar Adhikari, Kandasamy Pachamuthu, Eric E. Swayze, Richard H. Griffey, Michael T. Migawa, Eric Westhof and Stephen Hanessian. *Angewandte Chemie International Edition*. Pub Date: 12, 2004.



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

**Antibacterial Aminoglycosides with a Modified Mode of Binding to the Ribosomal-RNA Decoding Site**

**Boris François**, Janek Szychowski, Susanta Sekhar Adhikari, Dr., Kandasamy Pachamuthu, Dr., Eric E. Swayze, Dr., Richard H. Griffey, Dr., Michael T. Migawa, Dr., Eric Westhof, Prof., Stephen Hanessian, Prof

**Angewandte Chemie International Edition, 2004, Volume 43, N° 48, Pages 6735-6738**

Pages 6735-6738 :

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://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/109856599/HTMLSTART>

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](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)



**Supporting Information**

for

*Angew. Chem. Int. Ed.* 200462092

© Wiley-VCH 2004

69451 Weinheim, Germany

Gel-purified and desalted oligonucleotides were purchased from Dharmacon Research (Lafayette, CO). Prior to the crystallization experiment, a renaturation buffer (100 mM Sodium Cacodylate pH 6.4, 25mM NaCl, 5mM MgSO<sub>4</sub>) was used to prepare a 2mM RNA solution. The RNA was annealed by heating the renaturation buffer at 85 °C for 2 minutes and by slow cooling to 37 °C. Addition of the paromomycin analogs (**9** and **10**) (2:1 ratio with RNA) occurred at 37 °C; slow cooling then proceeded to 21°C. These complexes were crystallized by the hanging-drop vapor-diffusing method using 1 volume of crystallization solution (50 mM Sodium Cacodylate pH 6.4, 150mM KCl, 1%-5 % glycerol, 1%-6% MPD [Fluka], and 3mM modified paromomycin analogs **9** and **10**) and 1 volume of annealing solution (1mM RNA, 50 mM Sodium Cacodylate pH 6.4, 12.5mM NaCl, 5mM MgSO<sub>4</sub> and 2mM modified paromomycin), equilibrated against a 40% MPD solution. Small crystals grew within one week, the optimization of the crystallization conditions led to bipyramidal crystals.

For X-ray diffraction, crystals were transferred to cryoprotecting solutions containing all the components present in the crystallization solution (but with 60% MPD) and flash-cooled in liquid ethane (110 K). Data collection occurred at beamline ID14-4 of the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) up to a resolution of 2.6 Å (**Table 1**) Reflection files were indexed, scaled using HKL2000 (1) and the CCP4 suite (2). Structures were solved by molecular replacement using the paromomycin-A Site complex (3) as the initial model within the program AmoRe (4) and refined with CNS 1.1 (5)

**Table 1**  
**Data Collection and Structure Determination**

	<b>9</b>	<b>10</b>
Space Group	P4 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>
Unit Cell Parameters (Å)	a = b = 39.2 c = 99.1	a = b = 39.2 c = 99.1
Wavelength (Å)	0.9999	0.9999
Resolution range used for refinement (Å) <sup>a</sup>	50 - 2.6 (2.69 - 2.60)	50 - 2.63 (2.72 - 2.63)
Number of unique reflections used in refinement	4642	4495
Redundancy	7.0	10.2
Average I/σ <sup>a</sup>	31.7 (3.9)	28 (9.4)
Completeness (%) <sup>a</sup>	99.7 (100)	99 (100)
R <sub>sym</sub> (%) <sup>a,b</sup>	5.8 (49.4)	6.4 (25.9)
Rmsd for bonds (Å)	0.006	0.007
Rmsd for angles (°)	0.96	0.88
Average B factor (Å <sup>2</sup> )	58.8	62.8
R factor (%) <sup>c</sup>	22.09	24.33
R <sub>free</sub> (%) <sup>d</sup>	25.71	27.26

<sup>a</sup> Values for last shell are given between parentheses

<sup>b</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ , where I is the measured intensity for each reflections and  $\langle I \rangle$  is the intensity averaged from multiple observations of symmetry related reflections

<sup>c</sup> R factor =  $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$

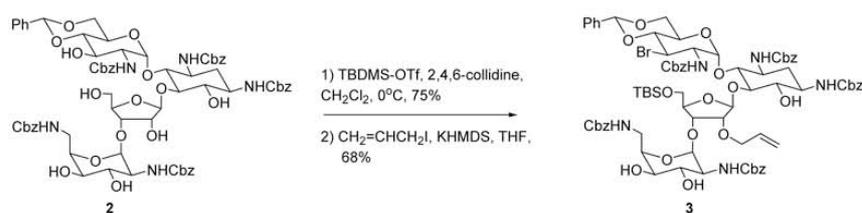
<sup>d</sup> R factor calculated using 10% of the reflections omitted from the refinement.

#### General information

Solvents were distilled under positive pressure of dry nitrogen before use and dried by standard methods; THF and ether, from Na/benzophenone; and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, from CaCl<sub>2</sub>. All commercially available reagents were used without further purification. All reactions were performed under argon atmosphere. NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) spectra were recorded on AMX-300 and ARX-400 spectrometers. Mass spectra were recorded on VG Micromass, AEI-MS 902 or Kratos MS-50 spectrometers using fast atom bombardement (FAB) or electrospray techniques. Optical rotations were recorded on a Perkin-Elmer 241 polarimeter in a 1 dm cell at ambient temperature. Analytical thin-layer chromatography was performed on Merck 60F<sub>254</sub> pre-coated silica gel plates. Visualization was performed

by ultraviolet light and/or by staining with ceric ammonium molybdate. Flash column chromatography was performed using (40-60  $\mu\text{m}$ ) silica gel at increased pressure.

**Compound 3:**

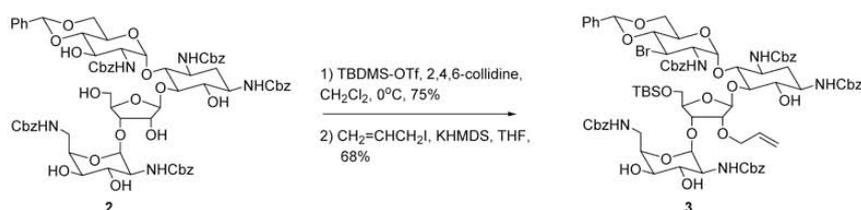


The alcohol **2** (**6**) (6.00 g, 4.367 mmol) dried by two co distillations with toluene was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400 mL) and 2,4,6-collidine (1.15 mL, 8.735 mmol) followed by TBDMSOTf (0.50 mL, 2.184 mmol) were added at  $0^\circ\text{C}$ . After 18 h., 0.6 equivalent of TBDMSOTf was added and 6 h. later, some of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was evaporated to a smaller volume before washing with HCl 0.5 M twice and  $\text{H}_2\text{O}$ . Drying with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and purification by silica gel chromatography (2% MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gave the 5''-O-monoprotected compound (4.861 g, 75%);  $[\alpha]_{\text{D}} + 41^\circ$  (c 0.9,  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f$  0.6 ( $\text{CHCl}_3$ :EtOAc:MeOH (20:5:3))  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.60-7.10 (m, 30H), 5.60-3.00 (m, 41H), 2.20 (m, 1H), 1.30 (m, 1H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); ESI  $m/z$  calcd  $\text{C}_{76}\text{H}_{93}\text{N}_5\text{O}_{24}\text{Si}$  1487.60; found 1488.9.

The above compound (2.10 g, 1.411 mmol) was co-distilled with toluene twice and the residue dissolved in dry THF (70 mL) in a flask covered with aluminum foil. Allyl iodide (1.29 mL, 14.11 mmol) was added at room temperature followed by the dropwise addition of 0.5 eq. of a 0.5 M KHMDS solution in toluene (1.411 mL, 0.706 mmol). The mixture was stirred for overnight at room temperature, then, another 0.5 equivalents of KHMDS (1.411 mL, 0.706 mmol) was added and 6 h. later the reaction mixture was quenched with an aqueous solution of saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 mL) and water. THF was evaporated, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 times), and the organic layer was washed with a sodium thiosulfate solution, brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The

by ultraviolet light and/or by staining with ceric ammonium molybdate. Flash column chromatography was performed using (40-60  $\mu\text{m}$ ) silica gel at increased pressure.

**Compound 3:**



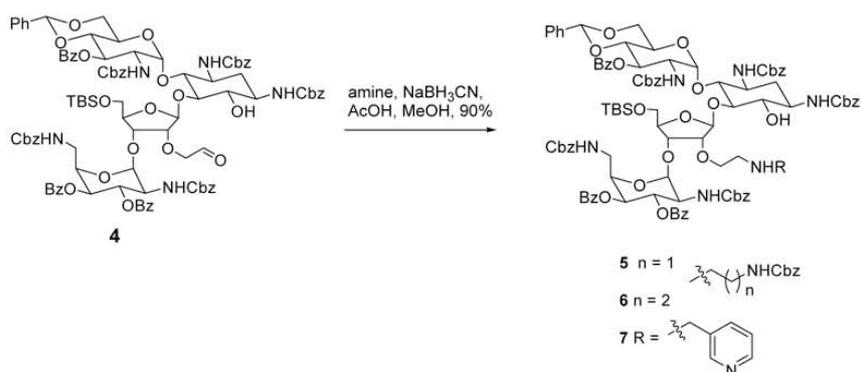
The alcohol **2** (6) (6.00 g, 4.367 mmol) dried by two co distillations with toluene was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400 mL) and 2,4,6-collidine (1.15 mL, 8.735 mmol) followed by TBDMsOTf (0.50 mL, 2.184 mmol) were added at  $0^\circ\text{C}$ . After 18 h., 0.6 equivalent of TBDMsOTf was added and 6 h. later, some of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was evaporated to a smaller volume before washing with HCl 0.5 M twice and  $\text{H}_2\text{O}$ . Drying with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and purification by silica gel chromatography (2% MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gave the 5''-O-monoprotected compound (4.861 g, 75%);  $[\alpha]_{\text{D}} + 41^\circ$  (c 0.9,  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f$  0.6 ( $\text{CHCl}_3$ :EtOAc:MeOH (20:5:3))  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.60-7.10 (m, 30H), 5.60-3.00 (m, 41H), 2.20 (m, 1H), 1.30 (m, 1H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); ESI  $m/z$  calcd  $\text{C}_{76}\text{H}_{93}\text{N}_5\text{O}_{24}\text{Si}$  1487.60; found 1488.9.

The above compound (2.10 g, 1.411 mmol) was co-distilled with toluene twice and the residue dissolved in dry THF (70 mL) in a flask covered with aluminum foil. Allyl iodide (1.29 mL, 14.11 mmol) was added at room temperature followed by the dropwise addition of 0.5 eq. of a 0.5 M KHMDS solution in toluene (1.411 mL, 0.706 mmol). The mixture was stirred for overnight at room temperature, then, another 0.5 equivalents of KHMDS (1.411 mL, 0.706 mmol) was added and 6 h. later the reaction mixture was quenched with an aqueous solution of saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 mL) and water. THF was evaporated, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 times), and the organic layer was washed with a sodium thiosulfate solution, brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The

128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.0, 98.5, 82.2, 78.1, 70.3, 70.2, 68.0, 67.8, 67.6, 67.4, 67.2, 26.6, 18.9; ESI  $m/z$  calcd for  $C_{100}H_{109}N_5O_{27}Si$  1839.71; found 1840.9.

The compound obtained above (2.00 g, 1.086 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (60 mL) was cooled at  $-78^\circ C$  and ozone was bubbled for 2 h. after which excess ozone was removed by bubbling argon. The mixture was treated with  $PPh_3$  (427 mg, 1.629 mmol), warmed to room temperature and the solvent was removed under vacuum. The crude solid was purified by silica gel flash chromatography (2:3 EtOAc/ hexane) to give the aldehyde **4** (1.627 g, 80%);  $R_f$  0.4 (1:1 EtOAc/hexane); ESI  $m/z$   $C_{99}H_{107}N_5O_{28}Si$  1841.69; found 1842.9.

**General procedure for reductive amination :**



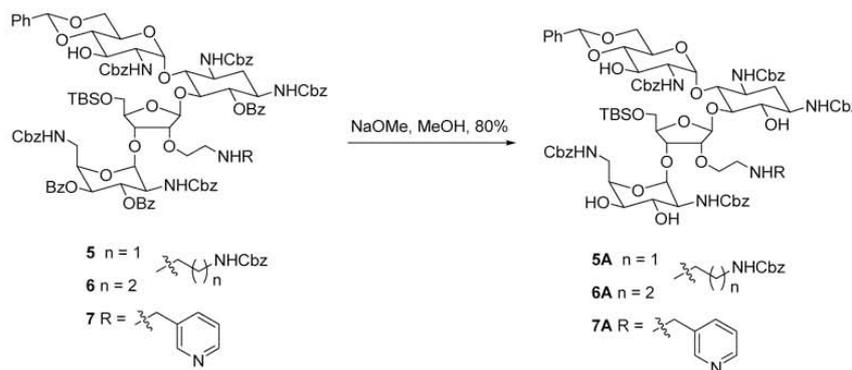
To a mixture of **4** (80.0 mg, 0.043 mmol) and appropriate amine (0.129 mmol) in dry MeOH (3 mL) was added acetic acid (0.1 mL) followed by  $NaBH_3CN$  (1.0 M in THF, 60  $\mu L$ ). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvents were removed under vacuum and the crude solid was dissolved in ethyl acetate and washed with a solution of saturated  $NaHCO_3$  and dried over  $Na_2SO_4$ . After evaporation of the solvents, the residue was purified by flash chromatography.

Compound **5**. 90%; silica gel flash chromatography eluent : 3% MeOH/ $CH_2Cl_2$ ;  $[\alpha]_D^{25} + 21.6^\circ$  (c 1.7,  $CHCl_3$ );  $R_f$  0.5 (5% MeOH/ $CH_2Cl_2$ ); ESI  $m/z$   $C_{109}H_{121}N_7O_{29}Si$  2019.80; found 2021.9.

Compound **6**. 90%; silica gel flash chromatography eluent : 3% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> + 12.7° (c 0.8, CHCl<sub>3</sub>); R<sub>f</sub> 0.5 (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); FAB m/z C<sub>110</sub>H<sub>123</sub>N<sub>7</sub>O<sub>29</sub>Si 2033.81; found 2036.1.

Compound **7**. 90%; silica gel flash chromatography eluent : 3% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> + 17.8° (c 0.9, CHCl<sub>3</sub>); R<sub>f</sub> 0.6 (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); ESI m/z C<sub>105</sub>H<sub>115</sub>N<sub>7</sub>O<sub>27</sub>Si 1933.76; found 1934.8.

**General procedure for debenzoylation :**



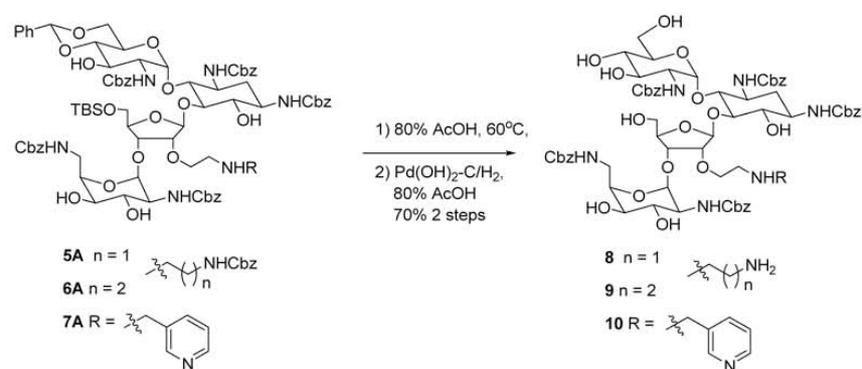
The ester was treated with a catalytic amount of NaOMe in MeOH (1:1, 2 mL, pH 9-10) and stirred at room temperature overnight. The solution was cooled down to -78 °C and dry ice was added, solvent was removed under vacuum and the residue was taken in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and filtered over Celite. After removal of the solvent under vacuum the solid was purified by silica gel flash chromatography.

Compound **5A**. 80%; silica gel flash chromatography eluent : 5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; R<sub>f</sub> 0.1 (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Compound **6A**. 80%; silica gel flash chromatography eluent : 5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; R<sub>f</sub> 0.1 (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Compound **7A**. 80%; silica gel flash chromatography eluent : 5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; [α]<sub>D</sub> + 10.3° (c 1.1, MeOH); R<sub>f</sub> 0.1 (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); ESI m/z C<sub>84</sub>H<sub>103</sub>N<sub>7</sub>O<sub>24</sub>Si 1621.68; found 1644.8 (M + Na).

**General procedure for final deprotection :**



The appropriate substrate was dissolved in 80% aqueous acetic acid (3 mL) and heated at 60 °C for 3 h. The solution was cooled down to room temperature and a catalytic amount of 20% palladium hydroxide on carbon was added and the suspension was stirred at room temperature under an atmosphere of hydrogen (hydrogen balloon) until the conversion of the starting material into the product was completed as indicated by MS analysis. The mixture was filtered through a layer of Celite, concentrated under vacuum, washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the aqueous layer was lyophilized to afford fluffy white solids as peracetate salts.

Compound **8**. 70%; [α]<sub>D</sub> + 8.1° (c 0.6, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5.75 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.30-4.00 (m, 4H), 3.85-3.50 (m, 13H), 3.40-3.15 (m, 8H),

3.00-2.55 (m, 4H) 2.31 (m, 1H), 1.91 (s, 21H), 1.63 (m, 1H); ESI m/z  $C_{27}H_{55}N_7O_{14}$  701.38; found 702.6.

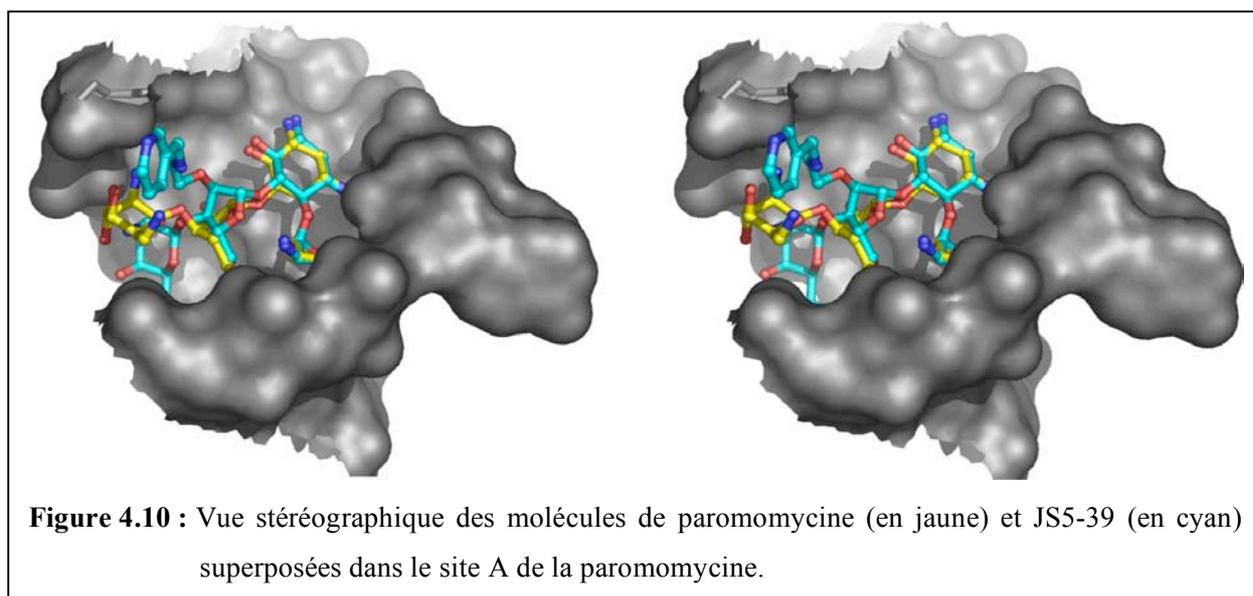
Compound **9**. 70%;  $[\alpha]_D + 5.7^\circ$  (c 0.4,  $H_2O$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  5.72 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.21 (m, 1H), 4.59 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 4H), 3.95-3.50 (m, 13H), 3.45-2.7 (m, 14H), 2.26 (m, 1H), 1.87 (s, 21H), 1.59 (m, 1H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  182.2, 108.9, 96.8, 96.0, 86.0, 81.8, 79.8, 74.5, 74.3, 71.3, 71.2, 70.1, 68.6, 68.2, 67.5, 61.0, 54.8, 51.8, 51.1, 50.3, 49.8, 48.8, 45.5, 43.7, 41.1, 37.3, 31.1, 27.4, 24.5, 24; ESI m/z  $C_{28}H_{57}N_7O_{14}$  715.40; found 716.4.

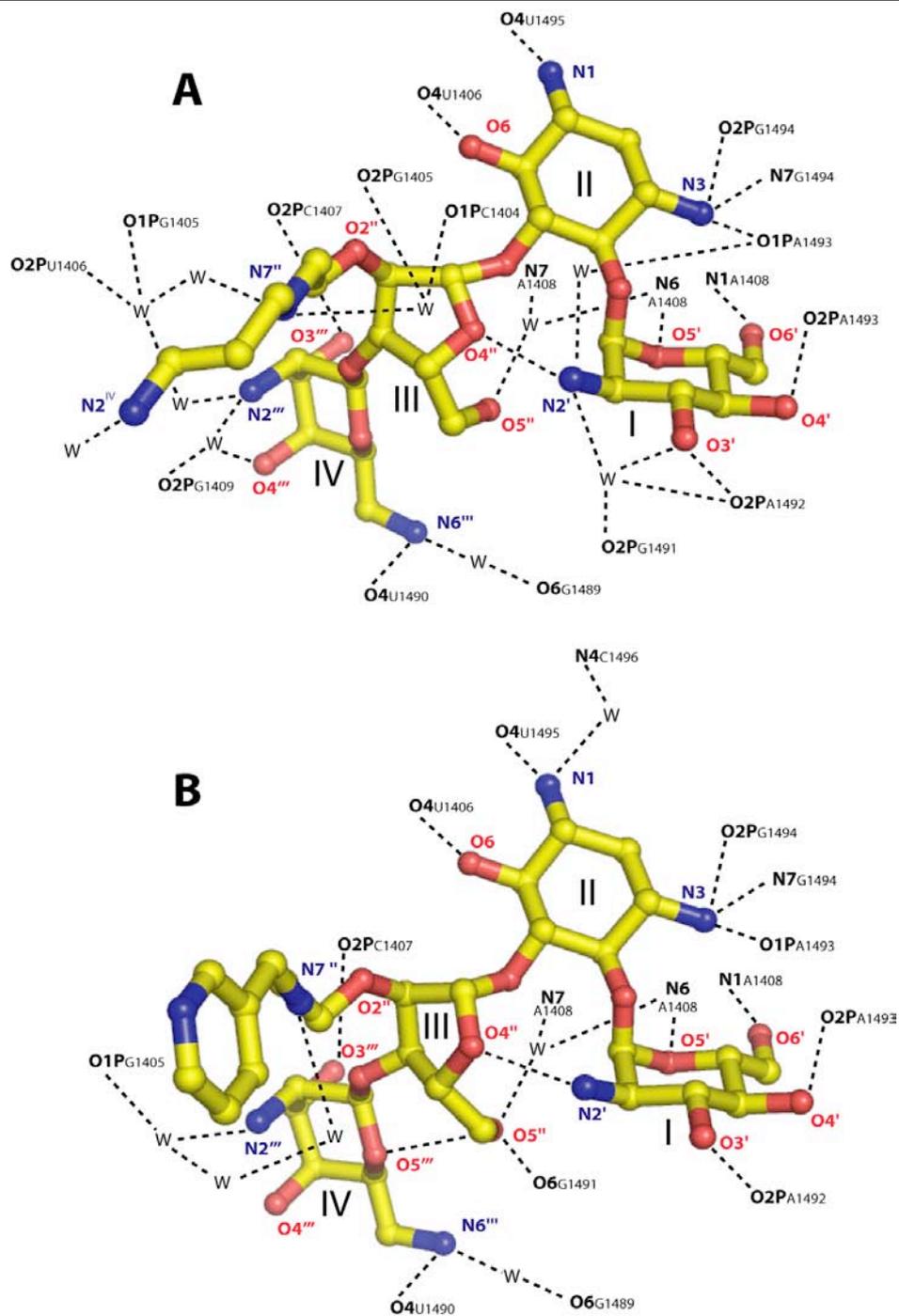
Compound **10**. 70%;  $[\alpha]_D + 5.4^\circ$  (c 0.6,  $H_2O$ );  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.70-7.30 (m, 4H), 5.71 (m, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 4H), 3.95-3.50 (m, 15H), 3.45-3.15 (m, 8H), 2.32 (m, 1H), 1.81 (s, 18H), 1.65-1.40 (m, 1H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  181.4, 150.5, 140.0, 133.9, 132.8, 129.8, 129.1, 128.9, 128.2, 125.5, 109.0, 96.6, 95.7, 85.7, 81.4, 78.5, 74.3, 73.7, 71.1, 69.9, 68.5, 68.1, 61.0, 60.1, 54.6, 51.6, 50.8, 49.6, 46.6, 41.1, 31.8, 29.7, 23.5; ESI m/z  $C_{31}H_{55}N_7O_{14}$  749.38; found 750.4.

1. Z. Otwinowski, W. Minor, in *Methods in Enzymology Vol. 276* (Eds.: C. W. J. Carter, R. Sweet, M.), Academic Press, pp. 307 (1996).
2. C. C. P. N. 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **50**, 760 (1994).
3. Q. Vicens, E. Westhof, *Structure (Camb)* **9**, 647 (2001).
4. J. Navaza, P. Saludjian, in *Methods in Enzymology Vol. 276* (Eds.: C. W. J. Carter, R. Sweet, M.), Academic Press, pp. 581 (1996).
5. A. T. Brunger, 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, G. L. Warren, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **54** (Pt 5), 905 (1998).
6. S. Hanessian, T. Takamoto, R. Massé, G. Patil, *Can. J. Chem.* **56**, 1482 (1978).

### Données supplémentaires concernant les structures JS4-11 et JS5-39.

La figure 4.10 met en évidence la superposition des cycles I et II à l'intérieur du site A minimal et la conservation des interactions avec les adénines A1492 et A1493. L'ensemble des contacts directs et indirects observés au sein des deux structures cristallographiques sont présentés dans la figure 4.11.





**Figure 4.11** : Contacts moléculaires entre les molécules JS4-11 (A), JS5-39 (B) et l'ARN du site A. Les molécules d'eau sont représentées par la lettre W, les liaisons hydrogène par les lignes en pointillés.

## **IV Poursuite des essais de cristallisation**

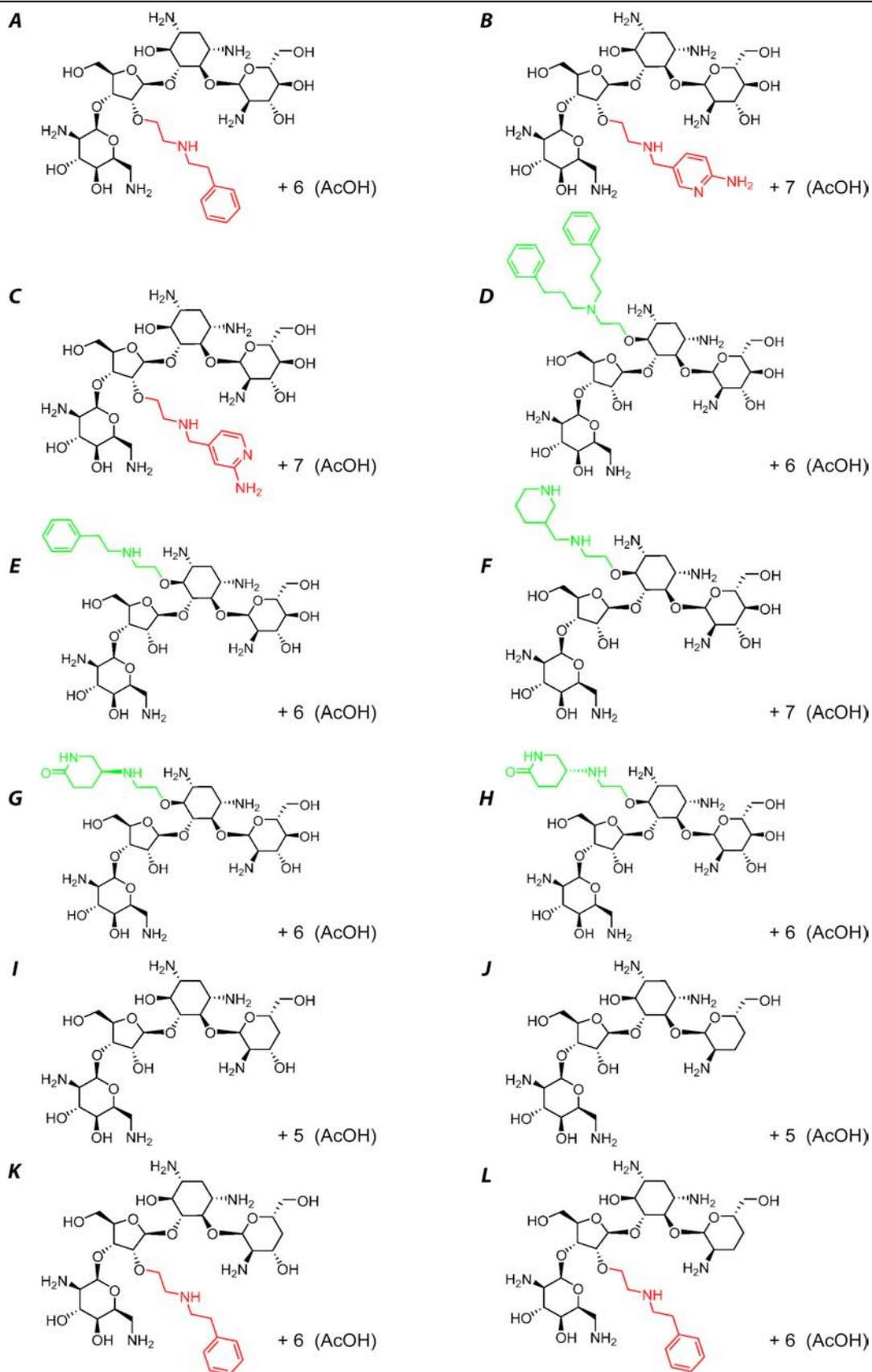
De nouvelles séries de composés (figures 4.12 et 4.13) ont été synthétisées afin de tester six éléments de l'interaction aminoglycoside / ARN :

- De nouvelles substitutions en 2'' du cycle III (figure 4.12 A - C).
- Des modifications en position 6 du cycle 2-DOS (figure 4.12 D - H).
- Les déshydroxylations des positions 3' et / ou 4' du cycle I avec ou sans modification de la position 2'' (figure 4.12 I - L).
- La suppression du cycle IV combiné à la modification de la position 2'' (figure 4.13 M et N).
- L'ajout du groupement HABA en position 1 du cycle 2-DOS (figure 4.13 O) avec modification de la position 2'' (figure 4.13 P) et la déshydroxylation des positions 3' et 4' du cycle I (figure 4.13 Q).
- La modification de la position 6''' du cycle IV (figure 4.13 R).

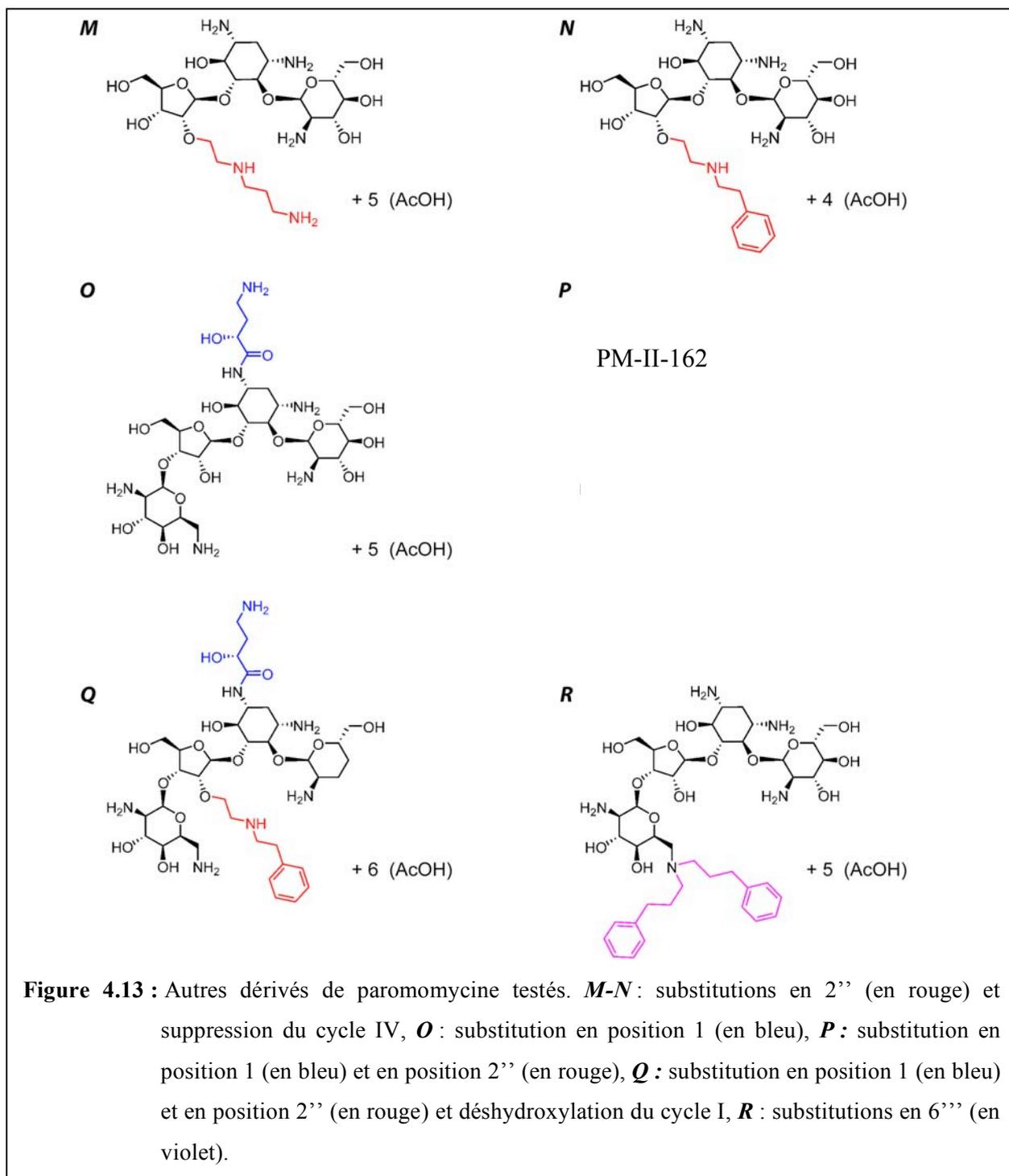
### **Préparation des solutions stocks et des complexes aminoglycosides / ARN**

Les solutions stocks (30 mM dans l'eau) des composés JS5-102 et JS5-103 ont présenté des particules en suspension nécessitant l'utilisation de micro-filtres Nalgène® 0,22 µm afin d'éliminer ces dernières, l'impact sur la concentration effective d'aminoglycosides en solution n'a pu être quantifié.

D'autres problèmes sont apparus lors de la préparation des complexes aminoglycosides / ARN à 37°C : un précipité blanc s'est formé en présence des composés PM-II-51, PM-180, JS5-71, JS6-136 lors de la complexation avec le fragment d'ARN A3. Un passage au vortex suivi d'une agitation énergique à l'aide du pipetman ont permis de dissiper partiellement ce précipité. Un phénomène de surconcentration locale pourrait expliquer ce phénomène : lors de l'ajout d'antibiotique, un choc osmotique dû aux nombreux sels présents (issus de la synthèse chimique) provoque une précipitation de l'ARN. La seconde explication de ces précipitations impliquerait une fixation non spécifique des paromomycines modifiées sur les molécules d'ARN.



**Figure 4.12 :** Autres dérivés de paromomycine testés. *A-C* : substitutions en 2'' (en rouge), *D-H* : substitutions en position 6 (en vert), *I-J* : déshydroxylation du cycle I, *K-L* : substitutions en 2'' (en rouge) et déshydroxylations du cycle I.



Pour contrôler au mieux la composition des solutions stocks, un protocole de bonnes pratiques de fabrication (BPF) a été mis en place avec nos collaborateurs : les composés seront désormais systématiquement purifiés par HPLC afin d'éliminer les sels et autres impuretés apportées lors de la synthèse. Malgré cette étape de purification, des ions acétates demeurent liés aux paromomycines modifiées et sont mentionnées comme contre-ions sur les figures 4.12 et 4.13.

## Cristallogénese des complexes ARN-aminoglycosides

Lors des essais précédents, le fragment d'ARN A3-8 n'a pas permis d'obtenir de cristaux, et donc, afin de minimiser la consommation de solutions stocks d'aminoglycosides modifiés et d'ARN, cette séquence n'a pas été testée de manière systématique pour les composés suivants. Ces essais ont été effectués à l'aide de séquences nouvellement purifiées par HPLC et dessalées (voir chapitre 2).

Les conditions de cristallisations utilisées dans un premier temps contiennent de faibles concentrations en MPD et glycérol (table 4.7 Série A) ; les cristaux de paromomycine utilisés comme témoins pour chaque nouveau lot d'ARN ne sont apparus à 37°C qu'au bout de 10 jours contre 3 jours habituellement. Le degré de pureté supérieur de ce lot d'ARN peut expliquer ce décalage dans le temps : la concentration en agent précipitant n'est pas suffisante et c'est sans doute la perte progressive de vapeur d'eau à 37°C (dûe à la porosité du plastique et du joint en silicone) qui permet d'atteindre lentement la zone de nucléation. Une seconde série de solutions de cristallisation utilisant des concentrations plus élevées en agent précipitant a été préparée (table 4.7 Série B).

Une grande diversité de comportement entre les différents complexes a été relevée comme précédemment (table 4.8). Les lettres désignant les composés sont celles employées dans les figures 4.12 et 4.13. Les conditions testées se sont avérées judicieuses puisque 23 complexes sur 34 ont cristallisé, deux ont précipité dès leur formation, et les autres sont restés parfaitement solubles (gouttes claires).

**Table 4.7 :** Conditions de cristallisations utilisées pour tester les nouveaux composés.

### Série A

MPD (%)	1	2	2	1,5	2,5	3,5
Glycérol (%)	5	4	2	1	1	1,5
Dérivés de Paromomycine (M)	0,002					
Na caco pH 6,4 (M)	0,05					
KCl (M)	0,2 - 0,3					

### Série B

MPD (%)	3,5	4,5	5,5	6,5	8,5	10,5
Glycérol (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2
Dérivés de Paromomycine (M)	0,002					
Na caco pH 6,4 (M)	0,050					
KCl (M)	0,300					

**Table 4.8** : Comportement des différents complexes lors des essais de cristallisation.

Composé		A3	A3-4
A	JS6-136	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>
B	JS5-71	Précipité	Précipité
C	SA4-1	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>
D	JS7-93	Gouttes claires	Gouttes claires
E	PM-II-108	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>
F	PM-II-107	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>
G-H	SA3-147	Sphérulites	Sphérulites
I	PM-II-38	<i>Cristaux</i>	Gouttes claires
J	PM-II-52	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>
K	PM-180	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>
L	PM-II-51	Gouttes claires	<i>Cristaux</i>
M	JS5-102	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>
N	JS5-103	Gouttes claires	Gouttes claires
O	PM-II-140	Gouttes claires	<i>Cristaux</i>
P	PM-II-162	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>
Q	PM-II-172	Gouttes claires	Gouttes claires
R	JS7-111	<i>Cristaux</i>	<i>Cristaux</i>

Les travaux de Quentin Vicens ont démontré que les fragments d'ARN ne peuvent cristalliser en l'absence d'aminoglycoside naturel au sein du site A. Si l'on étend ce postulat aux dérivés de paromomycine testés, les résultats consignés dans la table 4.8 renseignent sur la spécificité de ces nouvelles molécules pour le site A bactérien.

L'obtention de gouttes claires a cependant deux explications possibles : soit une forte solubilité du complexe qui empêche d'atteindre la zone de nucléation dans les conditions testées ou bien l'incapacité du composé à lier le site A. La majorité des complexes ont été testés avec la série A puis avec la série B de solutions de cristallisation (table 4.7), les résultats obtenus me poussent à croire en la seconde explication.

Les images des cristaux obtenus et leurs conditions expérimentales sont consignées dans les tables 4.9 à 4.12. Il faut cependant se garder de faire trop de comparaisons entre ces différents aminoglycosides car tous les essais n'ont pas été effectués simultanément et malgré tous mes efforts, un certain nombre de paramètres ne peuvent être contrôlés. Les seules informations véritablement exploitables concernent le comportement des deux fragments ARN A3 et A3-4 avec un même aminoglycoside. A cet effet, les images présentées dans ces quatre tables ne présentent pas nécessairement les plus jolis cristaux mais autant que possible ceux obtenus dans des conditions expérimentales similaires pour A3 et A3.4.

Après un temps de croissance cristalline qui varie de 6 à 15 jours, les boîtes de cristallisations ont été transférées à 20°C. La sélection des complexes à congeler s'est faite selon plusieurs critères : sur leur aspect, sur la possibilité de détacher un fragment monocristallin à partir d'un amas, sur leur résistance aux conditions cryoprotectrices. Seule une petite fraction des cristaux présentés ici ont été testés sur ligne synchrotron.

Dans un grand nombre de cas, les complexes ne diffractaient que médiocrement (très basse résolution uniquement ou cliché de diffraction non-indexable). Ces cristaux sont fragiles et se dégradent rapidement lorsqu'exposés au rayonnement surpuissant des synchrotrons malgré la présence d'atténuateurs de faisceau ; ainsi, bon nombre d'enregistrements ont été stoppés au bout de quelques degrés d'oscillation.

Le 29 janvier 2005, une série d'expériences sur la ligne ID14-4 de l'ESRF (Grenoble) a permis de collecter trois jeux de données pour les complexes suivants :

- PM-II-38 / A3-4 : résolution 2,69 Å
- PM-II-51 / A3 : résolution 2,79 Å
- SA4-1 / A3-4 : résolution 2,79 Å

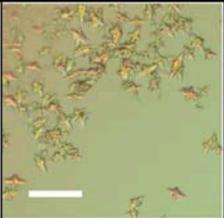
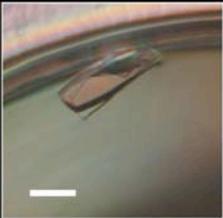
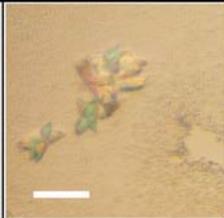
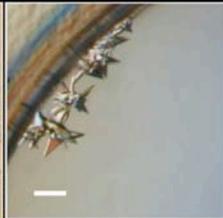
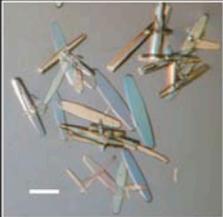
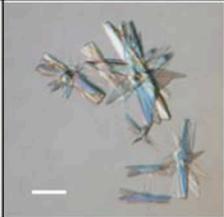
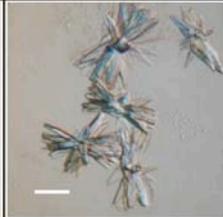
Le 10 juin 2005, un déplacement sur la ligne PX1 du SLS (Villigen) a permis de collecter quatre autres jeux de données concernant les complexes suivants :

- PM-II-162 / A3-4 : résolution 1,8 Å
- JS7-111 / A3 : résolution 2,2 Å environ

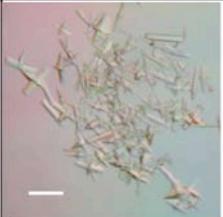
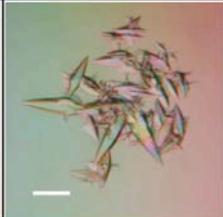
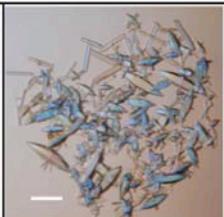
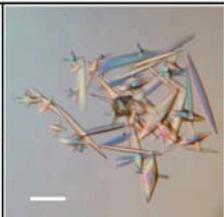
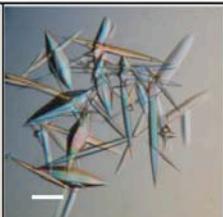
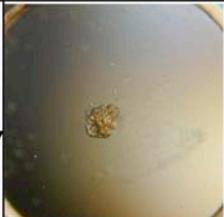
- PM-II-107 / A3-4 : résolution 2,9 Å environ
- PM-II-107 / A3 : résolution 2,9 Å environ.

Les trois derniers jeux de données n'ont pas encore été résolus faute de temps et seront traités ultérieurement par Jiro Kondo et Julia Wirmer-Bartoschek, deux post-doctorants de l'équipe.

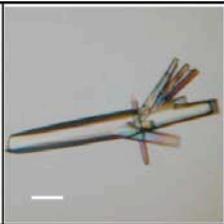
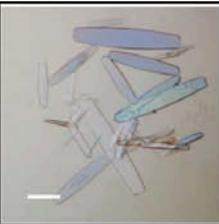
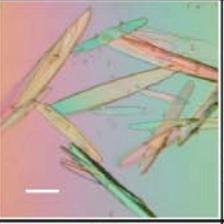
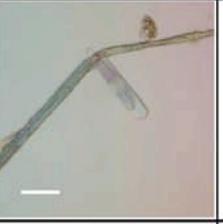
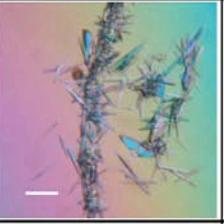
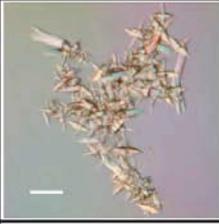
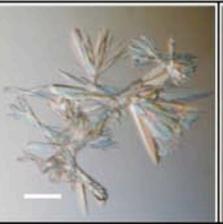
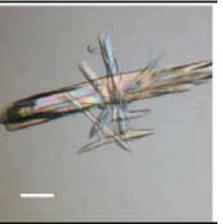
**Table 4.9 :** Résultats des essais de cristallisation des composés présentant une substitution en 2''.

<b>A</b> <b>JS6-136</b>					
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	2	2,5	2	2,5
	Glyc	2	1	2	1
<b>C</b> <b>SA4-1</b>					
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	2	3,5	2	3,5
	Glyc	2	1	2	1

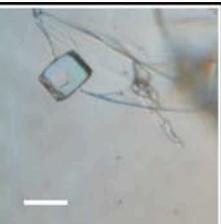
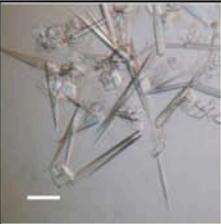
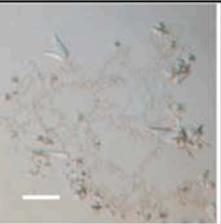
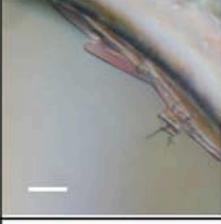
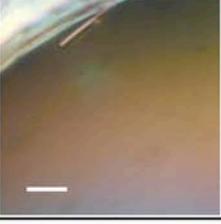
**Table 4.10 :** Résultats des essais de cristallisation des composés présentant une substitution en position 6 du cycle 2-DOS.

<b>E</b> <b>PM-II-108</b>					
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	5,5	8,5	5,5	8,5
	Glyc	1,5	1,5	1,5	1,5
<b>F</b> <b>PM-II-107</b>					
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	5,5	8,5	5,5	8,5
	Glyc	1,5	1,5	1,5	1,5
<b>G-H</b> <b>SA3-147</b>					
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	1	3,5	1	3,5
	Glyc	5	1,5	5	1,5

**Table 4.11** : Résultats des essais de cristallisation des composés avec déshydroxylations du cycle I.

<b>I</b> <b>PM-II-38</b>	Gouttes Claires	Gouttes Claires			
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	1,5	3,5	1,5	3,5
	Glyc	1	1,5	1	1,5
<b>J</b> <b>PM-II-52</b>				Gouttes Claires	
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	2	3,5	2	3,5
	Glyc	2	1,5	2	1,5
<b>K</b> <b>PM 180</b>			Gouttes Claires		
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	1,5	8,5	1,5	3,5
	Glyc	1	1,5	1	1,5
<b>L</b> <b>PM-II-51</b>					
	A3-4	A3-4	A3	A3	
	MPD	1	1,5	1	1,5
	Glyc	5	1	5	1

**Table 4.12 :** Résultats des essais de cristallisation des composés avec modifications en positions 1 du cycle II et position 6''' du cycle IV.

<b>M</b> <b>JS5-102</b>			précipité				
	A3-4	A3-4		A3	A3		
	MPD	1		1,5	1	1,5	
	Glyc	5		1	5	1	
<b>O</b> <b>PM-II-140</b>			Gouttes Claires	Gouttes Claires			
	A3-4	A3-4			A3	A3	
	MPD	4,5			8,5	4,5	8,5
	Glyc	1,5			1,5	1,5	1,5
<b>P</b> <b>PM-II-162</b>			Gouttes Claires	Gouttes Claires			
	A3-4	A3-4			A3	A3	
	MPD	3,5			4,5	3,5	4,5
	Glyc	1,5			1,5	1,5	1,5
<b>R</b> <b>PM-II-111</b>			Gouttes Claires	Gouttes Claires			
	A3-4	A3-4			A3	A3	
	MPD	5,5			6,5	5,5	6,5
	Glyc	1,5			1,5	1,5	1,5

## V Structures tridimensionnelles de trois nouveaux complexes paromomycines modifiées / site A.

### A. Données structurales.

Les trois enregistrements des complexes PM-II-38, SA4-1 et PM-II-51 ont été indexés à l'aide du logiciel d\*Trek (Rigaku Crystal Clear). Une solution de remplacement moléculaire a pu être obtenue à l'aide d'AmoRe en utilisant les structures de paromomycine (pour PM-II-38 et SA4-1) et de JS5-39 (pour PM-II-51) comme modèles. Les fichiers pdb des molécules de paromomycines modifiées ont été créés à l'aide du logiciel SPARTAN '02 (www.wavefun.com) sans minimisation d'énergie. Les fichiers de paramètres et de topologie ont été calculés sur XDICT server (Uppsala factory). Les statistiques cristallographiques d'enregistrement et d'affinement figurent dans la table 4.13.

**Table 4.13 :** Statistiques cristallographiques.

	<b>PM-II-51</b>	<b>PM-II-38</b>	<b>SA4-1</b>
Groupe d'espace	P4 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Paramètres de maille (Å)	a = b = 39,2 c = 99,04	a = 33,5 b = 45,5 c = 96,05	a = 34,0 b = 45,5 c = 95,05
Longueur d'onde (Å)	0,9999	0,9999	0,9999
Gamme de résolution utilisée pour l'affinement (Å) <sup>a</sup>	25 - 2,79 (2,89 - 2,79)	48 - 2,69 (2,79 - 2,69)	41 - 2,79 (2,89 - 2,79)
Nombre de réflexions uniques utilisées pour l'affinement	3678	4385	3898
Redondance	7,17 (7,50)	6,6 (6,9)	3,4 (3,6)
I/σ moyen <sup>a</sup>	6,1 (2,3)	9,1 (1,6)	6,6 (0,9)
Complétude (%) <sup>a</sup>	98,4 (100)	99,3 (100)	97,8 (100)
R <sub>sym</sub> (%) <sup>a,b</sup>	22,8 (47,9)	13,4 (49,8)	12,5 (48,5)
RMSD pour les liaisons (Å)	0,004	0,007	0,009
RMSD pour les angles (°)	0,57	1,27	1,12
Facteur B moyen (Å <sup>2</sup> )	58,8	53,2	71,2
Facteur R (%) <sup>c</sup>	21,87	24,26	26,12
Facteur R <sub>free</sub> (%) <sup>d</sup>	27,05	27,96	29,91

<sup>a</sup> les valeurs pour la dernière couche de résolution sont données entre parenthèses.

<sup>b</sup>  $R_{sym} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ , où I est l'intensité mesurée pour chaque réflexions et  $\langle I \rangle$  l'intensité moyennée de plusieurs observations liées par des opérations de symétrie.

<sup>c</sup> Facteur R =  $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$

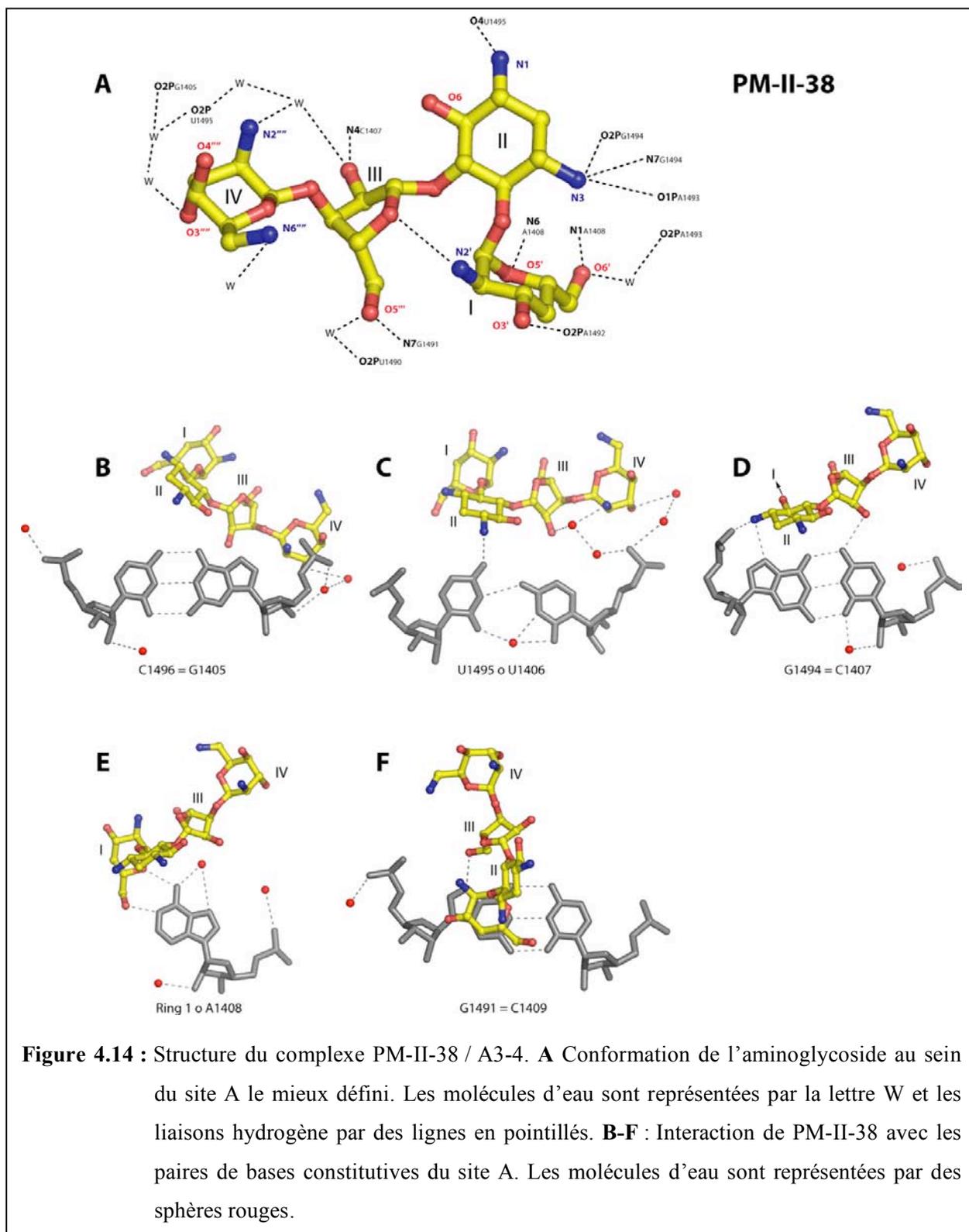
<sup>d</sup> Facteur R calculé en omettant 10% des réflexions lors de l'affinement.

Les figures 4.14, 4.15 et 4.16 présentent la conformation des trois dérivés de paromomycine et l'ensemble des contacts qu'ils établissent directement ou *via* des molécules d'eau avec l'ARN au sein du complexe.

### **PM-II-38**

Le composé PM-II-38 ne diffère de la paromomycine que par une déshydroxylation du cycle I en position 4'. Les paramètres de maille (table 4.13) sont identiques à ceux observés pour le complexe avec la paromomycine. Malgré la perte de la liaison hydrogène entre l'hydroxyle O4' et le groupement O2P de l'adénine A1493, le positionnement du cycle I n'est pas modifié et la pseudo paire de base avec l'adénine A1408 n'est pas altérée (figure 4.14 A et E). La superposition de l'ARN du site A le mieux défini avec celui issu de la structure de la paromomycine classique (pdb : 1J7T) donne un RMSD de 0,25 Å, les deux complexes peuvent être considérés comme isomorphes. Il n'y a cependant plus de liaison hydrogène directe entre le cycle IV et l'ARN mais celles-ci se font *via* des molécules d'eau (figure 4.14 A, B et C).

Cette structure ne présente aucune modification de la conformation de l'antibiotique et tend donc à prouver que le groupement hydroxyle en position 4' n'est pas indispensable au positionnement du cycle I. Cependant, la diminution du nombre de contacts directs entre PM-II-38 (de 12 à 9 par rapport à la paromomycine) sans augmentation du nombre de contacts indirects se traduit par une valeur de Kd plus élevée (de 0,15 à 0,63 µM) et une diminution de l'activité biologique sur des souches d'*E. coli* et de *S. aureus* (augmentation des MIC par un facteur 5).



### PM-II-51

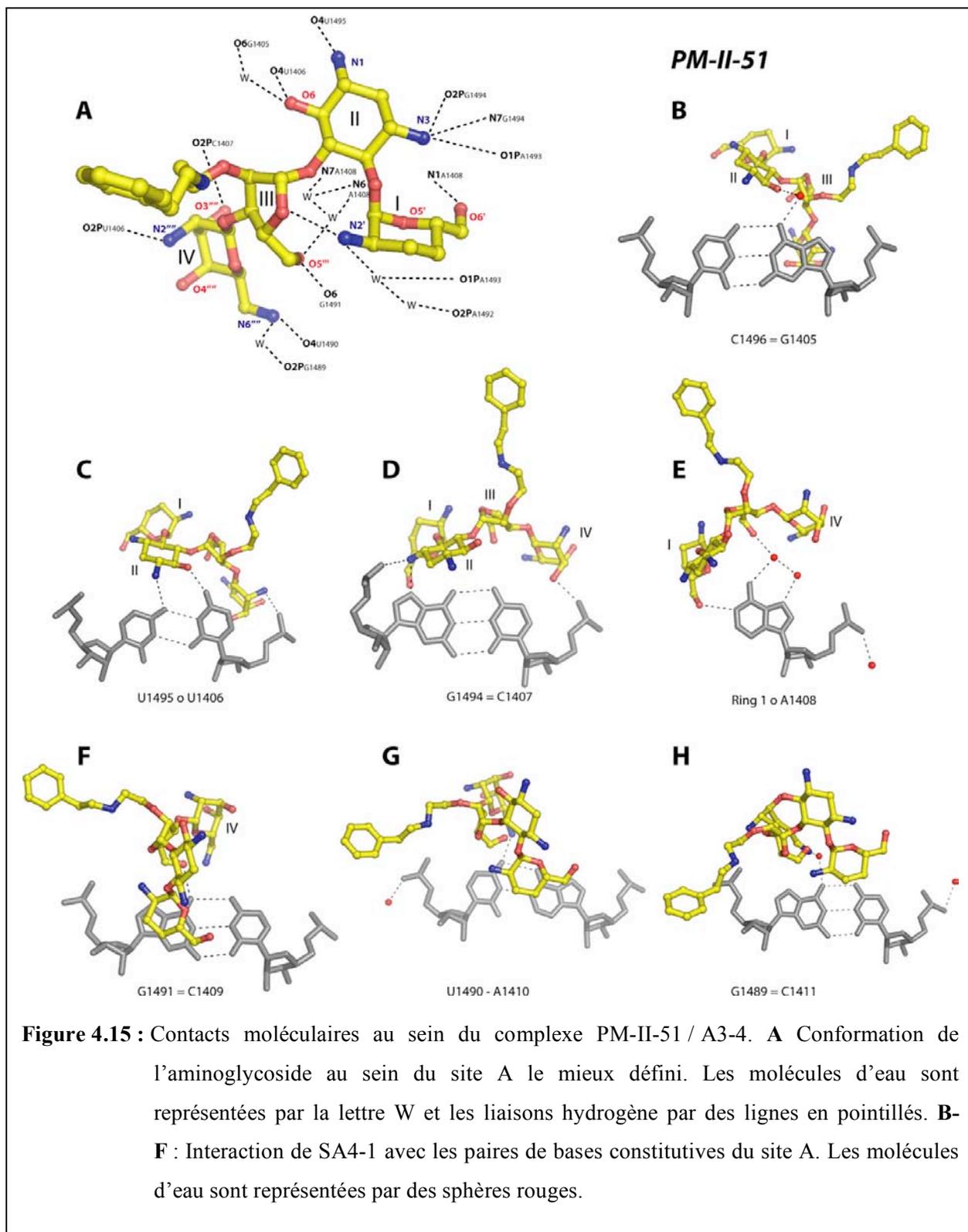
Ce dérivé de paromomycine permet de tester simultanément une double déshydroxylation du cycle I en 3' et 4' ainsi qu'une substitution de la position 2''. Les

paramètres de maille du complexe sont identiques à ceux obtenus pour les composés JS4-11 et JS5-39 (table 4.13), et la superposition des ARN constituant les sites A les mieux définis donne des valeurs de RMSD de 0,22 et 0,21 Å respectivement. Cependant le caractère isomorphe des ARN constituant les sites A ne s'applique pas aux trois aminoglycosides : le dérivé PM-II-51 présente un réseau d'interaction avec l'ARN sensiblement différent de celui présent dans les deux autres complexes (figure 4.15).

Les déshydroxylations des positions 3' et 4' se traduisent par la perte des contacts directs avec les groupements O2P de l'adénine A1493 et O2P de l'adénine A1492 (figure 4.15 A). Cette perte est compensée par un réseau de deux molécules d'eau qui permet d'établir un lien entre l'ammonium N2' et les positions O1P de l'adénine A1493 et O2P de l'adénine A1492 (figure 4.15 A). Le positionnement du cycle I est modifié et la pseudo-paire de base avec l'adénine A1408, jusqu'alors retrouvée dans toutes les structures sous la forme de deux liaisons hydrogène (O5' – N6 A1408 et O6' – N1A1408), est réduite à la seule liaison O6' – N1 A1408 (figure 4.15 A et E).

La substitution en position 2'' du cycle III induit un changement dans la conformation de l'aminoglycoside similaire à celui observé pour les composés JS4-11 et JS5-39 : la rotation de 40° de la liaison entre cycle II et III ainsi que le changement de plissement du cycle III (qui passe de C2'' -endo à C3'' -endo) conduisent à une rotation de 90° du cycle IV. Le positionnement de ce dernier permet au dérivé PM-II-51 d'établir une liaison hydrogène supplémentaire avec la guanine G1489 par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. L'aminoglycoside n'établit plus que 10 contacts directs avec l'ARN et 6 contacts indirects (contre respectivement 12 et 4 pour la paromomycine).

Les trois modifications sur la présente molécule et la perte de deux liaisons directes avec l'ARN se traduisent *in vitro* par une augmentation du Kd au niveau de l'ARN 16S (de 0,15 à 0,43 µM). Le comportement *in vivo* est plus difficile à interpréter : la valeur de MIC augmente d'un facteur supérieur à 16 chez *E. coli* tandis qu'elle n'est pratiquement pas modifiée chez *S. aureus* (souche MRSA). Ces résultats laissent à penser que l'interaction du composé PM-II-51 avec le ribosome diffère chez les deux espèces mais les données biologiques disponibles pour le moment ne permettent pas de se prononcer sur l'existence d'un autre site de fixation chez *S. aureus* (souche MRSA) (sur l'ARN ou lors de l'entrée dans la cellule).



## SA4-1

Le composé SA4-1 diffère de la paromomycine par une substitution en position 2'' et rejoint ainsi la classe des composés JS4-11 et JS5-39. Les trois précédents dérivés comportant une substitution « encombrante » en 2'' du cycle III ont cristallisé dans le groupe d'espace tétragonal  $P4_1$  alors que SA4-1 conserve un groupe d'espace orthorhombique  $P2_12_12_1$  et des paramètres voisins de ceux de la paromomycine. La superposition des ARN constitutifs des sites A les mieux définis fournit des valeurs de RMSD légèrement inférieures pour la paromomycine et PM-II-38 (groupe d'espace orthorhombique) que pour JS4-11, JS5-39 et PM-II-51 (groupe d'espace tétragonal). L'examen des contacts entre SA4-1 et l'ARN du site A (figure 4.16 A) montre que la partie paromamine de SA4-1 établit les contacts avec les trois adénines non appariées que l'on retrouve dans toutes les structures cristallographiques (chapitre 3). Comme précédemment observé, le changement de conformation du cycle III et la rotation de la liaison cycle II – cycle III induisent une rotation globale du cycle IV de 90°. Le groupement hydroxyle O5'' a pivoté de 90° (par rapport aux autres dérivés de la même classe) et pointe vers la guanine G1491 avec laquelle il établit deux liaisons hydrogène directes (figure 4.16 A et F). Le groupement substitutif en 2'' se distingue des autres par une fonction amine primaire en position *meta* du cycle aromatique, et établit par son intermédiaire deux liaisons hydrogène avec le squelette phosphate de l'ARN en O2P de G1491 et O1P de U1490 (figure 4.16 A et F). Le groupement N7'' contacte le O2P de la guanine G1405 par l'intermédiaire d'un réseau de deux molécules d'eau (figure 4.16 A et B). Le composé SA4-1 établit au total 15 contacts directs avec l'ARN du site A et trois contacts indirects *via* des molécules d'eau (observées à 2,79 Å de résolution), son affinité pour l'ARN 16S est sept fois meilleure que la paromomycine ( $K_d = 0,02 \mu\text{M}$ ). Les essais *in vitro* indiquent une efficacité similaire à celle du composé PM-II-51 : une forte augmentation de la valeur du MIC chez *E. coli* (entre 10 et 20 fois) et une efficacité constante chez *S. aureus* (souche MRSA) par rapport à la paromomycine.



## B. Superposition des différents aminoglycosides modifiés.

La superposition du site A le mieux défini pour chacune des structures résolues ainsi que le calcul de RMSD ont été effectués à l'aide du logiciel SPDBV. La table 4.14 présente les valeurs de RMSD obtenues pour l'ensemble de la double hélice d'ARN (898 atomes) et pour les seules molécules d'ARN constitutives du site A minimal le mieux défini (277 atomes).

Toutes ces structures présentent des valeurs de RMSD inférieures à 0,8 Å pour la superposition de leur site A le mieux défini. Les similitudes les plus fortes étant retrouvées d'une part entre JS4-11, JS5-39 et PM-II-51, et d'autre part entre la paromomycine et PM-II-38. Le composé SA4-1 ne peut être rattaché à aucun de ces deux groupes en se basant sur les seules RMSD.

La figure 4.17 présente tout d'abord les sites A les mieux définis (A) puis la superposition de chaque paire de base constitutive de ce site A (B-F). Ces superpositions mettent en évidence les points communs et les changements conformationnels liés aux modifications chimiques.

- Maintien de la conformation des cycles I et II (partie paromamine) des cinq dérivés malgré les déshydroxylations des positions 3' et 4' (figure 4.17 B-F).
- Conservation de l'orientation des adénines A1492 et A1493 à l'extérieur de

**Table 4.14 :** Valeurs de RMSD obtenues par superposition des ARN de la double hélice (partie inférieure gauche) et par superposition des ARN du site A minimal le mieux défini (partie supérieure droite).

	Paromomycine	JS4-11	JS5-39	PM-II-38	PM-II-51	SA4-1
Paromomycine		0,75	0,78	0,25	0,76	0,49
JS4-11	1.26		0,14	0,78	0,22	0,54
JS5-39	1.27	0,15		0,80	0,21	0,57
PM-II-38	0.29	1,14	1,16		0,79	0,48
PM-II-51	1,30	0,34	0,34	1,16		0,56
SA4-1	0,61	1,10	1,11	0,52	1,14	

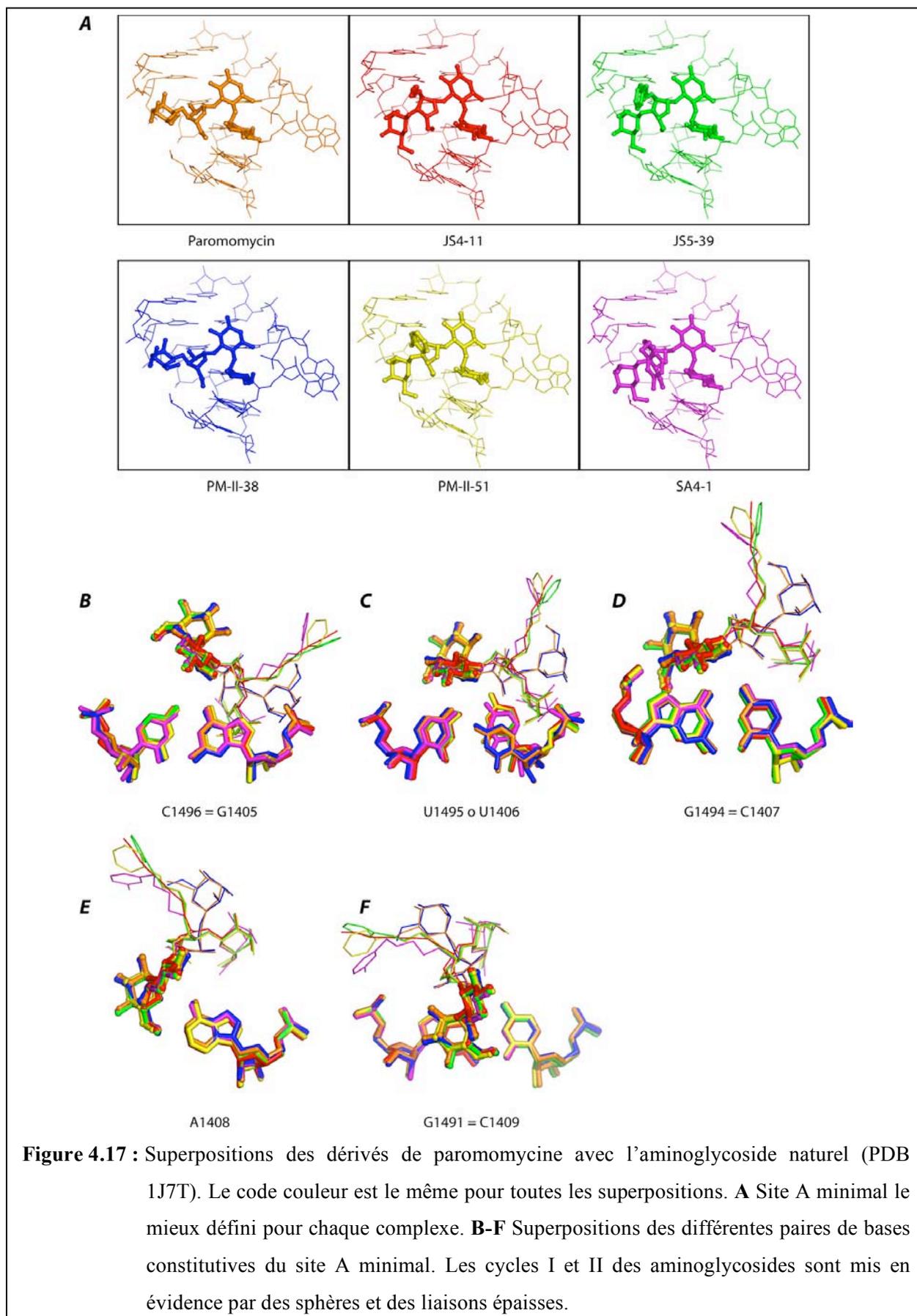
l'hélice.

- Conservation des paires C1496-G1405, G1494-C1407 et G1491-C1409 (figure 4.17 B,D et F).

Modifications liées aux substitutions en 2'' :

- Changement de plissement du cycle III et rotation du cycle IV de 90° (visible en A et D).
- Placement des groupements substitutifs dans le sillon de l'hélice d'ARN en interaction avec les groupements phosphate.
- Réorientation de la paire U1495oU1406 qui adopte une configuration classique à deux liaisons hydrogène O4 – N3 et N3 – O2.

Les observations rapportées pour les composés JS4-11, JS5-39, PM-II-51 et SA4-1 mettent en évidence un certain nombre de caractéristiques communes qui peuvent servir de base structurale pour la conception de nouveaux aminoglycosides comportant un groupement additionnel en 2''. Le maintien de la conformation de la paromamine au travers de ces six structures rejoint les conclusions formulées pour les aminoglycosides naturels soulignant l'importance des cycles I et II dans l'interaction aminoglycosides / site A.



## **C. Interactions moléculaires des différents aminoglycosides modifiés avec le site A bactérien.**

Les résolutions des différents complexes cristallisés (aminoglycosides modifiés et paromomycine) se situent dans une gamme allant de 2,54 à 2,79 Å ; il est donc possible de comparer les interactions moléculaires entre ces composés et l'ARN du site A bactérien.

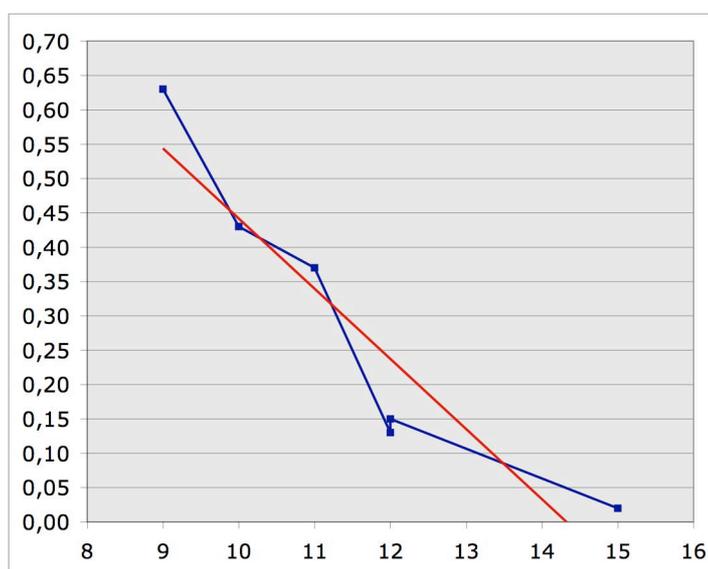
Le nombre de contacts (directs et indirects) aminoglycosides / site A a été relevé dans chaque structure (table 4.15) puis comparé à la valeur de  $K_d$  mesurée pour ces complexes. La représentation graphique du  $K_d$  en fonction du nombre de contacts directs entre l'aminoglycoside et l'ARN (figure 4.18 courbe bleue) met en évidence une corrélation négative entre ces deux variables (le coefficient de corrélation est de - 0,93). Cela signifie que la conséquence directe de l'augmentation du nombre de contacts directs, entre l'aminoglycoside et son site de fixation, est l'amélioration de la stabilité du complexe.

Quelle est l'influence de la partie paromamine ou des cycles III et IV sur les  $K_d$  mesurés ? Les taux de corrélation obtenus pour la partie paromamine (cycles I et II) ainsi que pour les cycles III et IV sont de - 0,7. Cette moindre corrélation peut s'expliquer par les différences observées dans la répartition des liaisons directes dans les six structures (en particulier lorsqu'il y a deshydroxylation du cycle I).

Les charges ont-elles un effet sur l'affinité des aminoglycosides modifiés ? Si l'on considère qu'à pH physiologique, toutes les fonctions amines sont protonées, la comparaison entre le nombre de charges positives et le  $K_d$  mesuré pour chaque aminoglycoside conduit à une corrélation de - 0,6. Cette valeur correspond à une corrélation moyenne, l'effet n'est pas significatif et peut s'expliquer par le fait que les groupements additionnels comportent de un à trois ammoniums sans établir de contacts directs alors que ce sont ces derniers qui augmentent l'affinité.

**Table 4.15 :** Présentation du nombre de liaisons hydrogène directes ou médiées par des molécules d'eau, ainsi que des valeurs de Kd et de MIC50 pour chaque molécule de paromomycine modifiée.

	Contacts		16 S kd ( $\mu$ M)	MIC ( $\mu$ M)	
	directs	indirects		<i>E. Coli</i>	<i>S. Aureus</i>
Paromomycine	12	5	0,15	2,5 - 05	1,2 - 2,5
JS4-11	11	10	0,37	25 - 50	03 - 06
JS5-39	12	5	0,13	12 - 25	< 1,5
PM-II-38	9	5	0,63	20 - 40	05 - 10
PM-II- 51	10	6	0,43	> 40	01 - 03
SA4-1	15	3	0,02	06 - 12	0,6 - 01



**Figure 4.18 :** Courbe de corrélation entre le nombre de contacts directs aminoglycoside / ARN (en abscisses) et valeur du Kd en  $\mu$ M associée (en ordonnée).



## **CHAPITRE 5**

### **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



## Chapitre 5 Conclusions et perspectives

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. Trois orientations principales ressortent de ces travaux : (1) un aspect méthodologique au travers de l'optimisation de la cristallisation de complexes aminoglycosides / ARN, (2) la finalisation de l'étude structurale de complexes d'aminoglycosides naturels avec l'interprétation des données recueillies, et (3) la résolution de cinq dérivés de paromomycine complexés au site A bactérien qui ouvre vers la conception de nouveaux antibiotiques.

### Optimisation des procédures de cristallisation et de purification

Des fragments d'ARN incorporant le motif minimal du site A bactérien ou du site A mitochondrial humain conçus par Quentin Vicens ont permis d'obtenir les trois premiers complexes avec la paromomycine, la généticine et la tobramycine. Les essais de cristallisation, réalisés dans le cadre de cette thèse, ont montré l'influence de deux paramètres testés au travers des différents fragments : la nature de l'extrémité 5' et la longueur (variable selon le nombre de plateaux de bases insérés dans la partie centrale de l'hélice d'ARN).

Pour chaque aminoglycoside testé, l'aspect des cristaux obtenus a été modifié selon que le fragment porte une extrémité C5' ou UU5' ; il n'a jamais été possible de prédire *a priori* quel environnement serait le plus favorable à la stabilisation de l'empilement cristallin. Le protocole mis en place pour la cristallisation de nouveaux complexes aminoglycosides / site A a permis d'explorer l'influence de ce paramètre au travers des séquences A3 et A3-4.

L'impact de la longueur séparant les deux sites A d'un duplexe n'a été vérifié qu'en deuxième recourt et de ce fait présente un moindre retour sur expérience. Les cristaux de

complexes obtenus à ce jour avec des fragments présentant une insertion ou une délétion de plateaux de bases dans la partie centrale n'ont pas permis la résolution de structure ; cependant ces changements induisent sans doute une modification du positionnement d'un site A par rapport à l'autre et leur interaction avec les molécules symétriques. Des travaux ultérieurs seront réalisés afin de confirmer cette hypothèse et tester l'incidence de telles modifications sur la nature de l'empilement cristallin.

La pureté requise pour les expériences de cristallographie est très élevée et a fait l'objet de plusieurs optimisations successives. L'influence des extrémités 5' sur la cristallisation impose la séparation précise des fragments d'ARN synthétisés chimiquement afin d'éviter toute « pollution » du milieu par des oligoribonucléotides tronqués ; la séparation par HPLC en milieu dénaturant répond à cet impératif. De même, le contrôle de la nature et de la concentration des sels présents dans les solutions de cristallisation nécessite le dessalage des ARN après l'étape de purification. Après ces deux étapes, les rendements finaux de purification avoisinent les 40 - 45 % pour un degré de pureté optimal. La qualité des ligands testés est aussi importante que celle de l'ARN, leur purification par HPLC à l'issue de la synthèse réduit considérablement les problèmes de formation de précipités.

Le protocole de criblage des conditions de cristallisation, associé à l'optimisation des étapes de purification, a permis d'obtenir des cristaux de complexes aminoglycosides modifiés / site A dans près de 67 % des cas. Ces améliorations techniques ont ainsi rendu possible la comparaison raisonnée du comportement des différents aminoglycosides en présence du site A bactérien. Les composés qui n'ont pas donné de cristaux dans les premières conditions feront l'objet de nouveaux essais utilisant d'autres fragments d'ARN (notamment pour tester l'effet de la longueur de la section centrale).

### **Etude de complexes aminoglycosides naturels / site A bactérien**

Y a-t-il une règle générale qui régit les interactions entre les aminoglycosides et l'ARN du site A bactérien ? Peut-on étendre les hypothèses formulées à partir des observations des structures de la paromomycine, de la tobramycine et de la généticine ? La diversité structurale des aminoglycosides (nombre de cycles variables, nature des

groupements fonctionnalisants) ne permet pas de répondre à ces questions *a priori*. La résolution des structures cristallographiques de six nouveaux complexes aminoglycosides naturels / site A bactérien (néamine, gentamicine C1a, kanamycine A, ribostamycine, lividomycine A et néomycine B) a permis de compléter les données existantes et d'examiner de manière approfondie les modes d'interactions des différentes sous-classes d'aminoglycosides avec leur site de fixation. Trois faits importants ont été ainsi notés :

- (a) La comparaison des neuf structures cristallographiques d'aminoglycosides (à des résolutions allant de 2,2 à 2,8 Å), a clairement mis en évidence l'existence d'un mode d'interaction commun aux différentes sous-classes 4,5-2-DOS et 4,6-2-DOS. Tous les sites A ont présenté une conformation similaire combinant l'intercalation du cycle I sur la guanine G1491 et la formation d'une pseudo-paire de base entre ce même cycle et l'adénine A1408. La présence de groupements hydroxyles en 3' et 4' du cycle I ajoute deux contacts supplémentaires avec les adénines A1492 et A1493. Le cycle II (2-DOS) a conservé quatre liaisons hydrogène avec l'uridine U1495, la guanine G1494 et l'adénine A1493. L'ancrage des aminoglycosides au sein du site A bactérien repose essentiellement sur la partie néamine (cycles I et II) et est stabilisé par six à huit liaisons hydrogène.
- (b) Les aminoglycosides présentent une grande diversité structurale et le nombre de cycles additionnels (de un à trois) influe directement sur le nombre de contacts qu'ils sont susceptibles d'établir avec l'ARN du site A. Il est à noter que ces liaisons hydrogène sont souvent médiées par des molécules d'eau. La superposition des aminoglycosides liés au site A a révélé une étonnante conservation de leur conformation (valeur de RMSD inférieure à 0,5 Å) : l'ajout de cycles supplémentaires ne modifie pratiquement pas le plissement global de la molécule. Cette conformation n'est pas retrouvée lorsque les aminoglycosides sont liés à d'autres sites de fixation.
- (c) Ce point traduit la difficulté de prédire avec exactitude le mode d'interaction qui s'établit entre l'aminoglycoside et l'ARN du site A. En effet, les structures des molécules les moins chargées (néamine, ribostamycine, généticine et kanamycine) se distinguent des autres structures par certaines particularités : conformations alternatives, aminoglycosides supplémentaires liés de manière non spécifique. La généticine, par exemple, présente deux conformations alternatives pour les adénines A1492 et A1493. Le duplexe formé avec la néamine comporte un site vide de tout

antibiotique au sein duquel l'adénine A1492 pointe à l'extérieur de l'hélice tandis que l'A1493 forme une pseudo-paire de bases avec l'A1408. La stoechiométrie des complexes formés avec la ribostamycine et la kanamycine est respectivement de 2 et 1,5 : chaque site A présente une molécule liée de manière spécifique (présentant les huit liaisons hydrogène communes à toutes les structures) mais également une seconde molécule liée de manière non spécifique en interaction avec le squelette phosphate de l'ARN. La conformation des trois cycles de ces molécules liées de manière non spécifique est cependant la même que celle observée pour les molécules liées de manière spécifique. Le mode d'interaction de la kanamycine et des ribostamycines non spécifiques est différent et reflète leur appartenance à deux sous-classes 4,5-2-DOS et 4,6-2-DOS.

Ces stoechiométries atypiques peuvent expliquer les différences observées entre  $K_d$  et MIC. Par exemple, la kanamycine et la ribostamycine présentent les constantes d'affinités les plus élevées (car fixent deux fois plus d'aminoglycoside) mais des efficacités moyennes (car le nombre de sites A occupés par une  $\mu$ mole est moindre). Pour des composés comme les aminoglycosides, la manière la plus judicieuse de mesurer le pouvoir antibactérien semble être dans ce cas la mesure de la concentration minimale d'inhibition. Ces structures ont apporté de nombreuses informations sur les positions indispensables à l'interaction aminoglycoside / site A. Dans le futur, le développement de nouveaux dérivés d'aminoglycosides devra prendre en compte ces éléments : les groupements chimiques impliqués dans la liaison avec l'ARN ne devront pas être altérés sous peine d'obtenir des composés inactifs. Les bactéries ne s'y sont pas trompées puisque les cycles I et II sont la cible d'un grand nombre d'enzymes de modification.

Les informations structurales obtenues recouvrent assez largement les aminoglycosides de la famille de la néomycine et ont été utilisées comme support pour l'exploration du rôle des cycles III, IV et V dans les interactions antibiotique / site A. Pour chaque antibiotique (néomycine B, ribostamycine, paromomycine et lividomycine A), la mesure des MIC a été relevée pour des sites A présentant des mutations ponctuelles. Il devient alors possible de comparer l'impact des cycles additionnels sur l'efficacité biologique. Il a ainsi été possible de démontrer plusieurs points :

- (a) Les cycles supplémentaires III et IV confèrent une activité plus grande aux aminoglycosides (néomycine et paromomycine sont en effet huit fois plus efficaces que la ribostamycine elle-même huit fois plus efficace que la néamine). Ce comportement trouve une explication dans l'examen des contacts supplémentaires qu'établissent les cycle III et IV avec l'ARN du site A. Cette théorie est confirmée par l'exemple de la lividomycine A dont le cycle V n'établit qu'une seule liaison hydrogène (car orienté dans le sillon de l'hélice) ce qui se traduit par une activité biologique similaire à celle mesurée pour la néomycine et la paromomycine. Les interactions entre le cycle IV de la néomycine et le site A permettent de compenser la perte des contacts entre le cycle II et l'U1495 et ceux entre le cycle III et la G1491 lorsque ces deux positions sont mutées.
- (b) Les structures cristallographiques ont montré la conservation de la pseudo-paire de bases formée entre le cycle I et l'adénine 1408. Les mesures de MIC confirment l'importance majeure de cette interaction : toute modification de la position 1408 conduit à une diminution de l'activité biologique indépendamment du nombre de cycles supplémentaires présents sur le squelette néamine. L'ajout de contacts supplémentaires ne permet pas de compenser l'altération de la pseudo-paire de bases. Les aminoglycosides comportant un groupement hydroxyle en 6' du cycle I (impliqué dans la pseudo-paire de bases) sont moins pénalisés par la mutation A1408G que ceux comportant un groupement ammonium en 6'. Par contre toute mutation combinant A1408G avec une autre mutation (G1491U ou C1409G) conduit à la perte totale d'activité pour tous les aminoglycosides de la famille de la néomycine.
- (c) Le positionnement du cycle I sur la base en position 1491 n'est pas strictement lié à la présence d'une guanine, l'activité antibactérienne est affectée par la modification de la paire C1409=G1491 mais elle n'est pas totalement supprimée. La susceptibilité dépend de l'aminoglycoside testé (la ribostamycine est plus sensible que la néomycine).
- (d) Alors que le remplacement de l'uridine U1495 par une adénine induit une diminution de l'activité, la double mutation qui transforme la paire U1406oU1495 en paire C1406=G1495 restaure l'activité des six aminoglycosides. En superposant une paire C=G classique sur les paires UoU observées dans les structures

cristallographiques, il est apparu que les contacts entre le cycle II et ces bases peuvent être conservés (le groupement N4 de la C1406 remplace la molécule d'eau qui assure habituellement la connexion entre l'U1406 et le groupement O6 de l'aminoglycoside).

Le système biologique développé par l'équipe du professeur Eric Böttger a permis de recouper de manière fiable les informations issues des structures cristallographiques et de finaliser l'étude des interactions entre aminoglycosides 4,5-2-DOS et le site A bactérien.

La confirmation de certaines hypothèses formulées nécessite de cristalliser des fragments d'ARN comportant des mutations du site A. De nouvelles séquences intégrant la paire C1406=G1495 ou une G1408 sont en cours d'étude. L'obtention récente des premiers cristaux de complexes généticine / site A (G1408) est un premier pas encourageant dans cette démarche.

## Etude de complexes aminoglycosides modifiés / site A bactérien

Les données structurales concernant le mode d'interaction entre les aminoglycosides naturels et leur site de fixation ont été intégrées dans la synthèse de nouveaux aminoglycosides dérivés de la paromomycine. Les modifications ont essentiellement porté sur l'hydroxyle en 2'' du cycle III mais d'autres synthèses ont eu pour objet d'examiner les interactions aminoglycosides / ARN (ajout de groupements en position 6, deshydroxylations des positions 3' et 4' du cycle I, suppression du cycle IV, ajout d'un groupement HABA en position I et modification de la position 6''' du cycle IV).

La méthode de cristallisation employée pour les aminoglycosides naturels a été reprise avec succès pour les nouveaux composés : 22 complexes cristallisés, neuf jeux de données synchrotron collectés et cinq structures résolues à ce jour. Quatre dérivés comportent un groupement additionnel en 2'', le cinquième (PM-II-38) ne diffère de la paromomycine que par une deshydroxylation de la position 4'. Ces structures présentent des similitudes avec les structures jusqu'alors résolues mais également des particularités induites par les modifications chimiques dont elles ont fait l'objet.

De manière globale, les structures sont isomorphes à celle de la paromomycine : les deux fragments d'ARN forment une hélice avec les adénines A1492 et A1493 pointant à l'extérieur. Les cycles I et II de ces composés, moyennant les deshydroxylations en 3' et/ou 4', possèdent la même conformation et interagissent avec l'ARN du site A de la même manière que les aminoglycosides naturels : empilement du cycle I sur la guanine G1491 et formation d'une pseudo-paire de bases avec l'adénine A1408. La superposition des sites A met en évidence la conservation des paires C1496=G1405, G1494=C1407 et G1491=C1409. Les groupements hydroxyles en 3' et 4' contactent directement les groupements phosphates des adénines A1492 et A1493, lorsque ces deux fonctions sont deshydroxylées (composés PM-II-51 et PM-II-38), le positionnement du cycle I n'est pas affecté : une réorganisation de la sphère d'hydratation est observée et deux molécules d'eau relient les adénines au groupement N2'.

Les aminoglycosides comportant des groupements additionnels aminoéther en position 2'' présentent des repliements très différents de celui de la paromomycine : la liaison entre le cycle 2-DOS et le cycle III a tourné de 40° tandis que le plissement du sucre passe de C2''-endo à C3''-endo. La combinaison de ces deux éléments conduit à une réorientation à 90° du cycle IV. Les groupements additionnels pointent dans le sillon

profond de l'hélice d'ARN et seul celui du composé SA4-1 établit deux liaisons hydrogène avec le squelette phosphate.

L'ARN du site A minimal présente également certains réarrangements notamment au niveau de la paire U1406oU1495 qui passe d'une conformation bifurquée à une géométrie plus classique (cis-Watson-Crick / Watson-Crick) avec deux liaisons hydrogène O4...H-N3 et N3-H...O2. De nouveaux contacts entre l'aminoglycoside et l'ARN ont été observés, notamment une troisième liaison hydrogène médiée par une molécule d'eau entre l'hydroxyle en 5' et le N7 de l'adénine A1408, portant ainsi à trois le nombre de liaisons hydrogène impliquées dans l'interaction avec cette adénine.

Les deshydroxylations opérées sur le cycle I ne modifient pas son positionnement à l'intérieur du site A mais diminuent le nombre de contacts directs entre l'aminoglycoside et l'ARN. Les mesures effectuées sur ces composés mettent en évidence une augmentation du Kd ainsi qu'une diminution de l'activité biologique.

Les résolutions des différents complexes cristallisés (aminoglycosides modifiés et paromomycine) se situent dans une gamme allant de 2,54 à 2,79 Å ; il est donc possible de comparer les interactions moléculaires entre ces composés et l'ARN du site A bactérien afin de vérifier s'il y a corrélation entre les différents paramètres mesurés (charge, nombre de cycles, nombre de contacts directs, Kd et MIC). Le calcul de RMSD sur la double hélice d'ARN et l'ARN du site A minimal le mieux défini divise les structures en deux catégories : celles adoptant la conformation de la paromomycine (paromomycine et PM-II-38) et celles comportant une paire U1406oU1495 classique (JS4-11, JS5-39 et PM-II-51). La structure obtenue pour le composé SA4-1 ne peut être rattachée à aucun de ces groupes sur la seule base des RMSD.

La conformation de la paire U1406oU1495 semble influencer sur le type d'empilement cristallin : lorsque les deux uridines sont bifurquées, le groupe d'espace obtenu est orthorhombique (PM-II-38 et paromomycine). Lorsqu'elles forment une paire classique, le groupe d'espace obtenu est tétragonal (JS4-11, JS5-39 et PM-II-51). La structure du complexe SA4-1 fait figure d'exception puisqu'elle possède un groupe d'espace orthorhombique et une paire U1406oU1495 non bifurquée.

Le nombre de contacts directs entre l'aminoglycoside et le site A, comparé à la valeur du Kd mesurée met en évidence une forte corrélation entre ces deux variables (-0,93) : la diminution du nombre de contacts augmente la valeur du Kd ; l'affinité entre

aminoglycoside et ARN est moindre. La même comparaison centrée sur la partie paromamine aboutit à une corrélation moindre, ce qui peut s'expliquer par les deshydroxylations des positions 3' et 4' et les pertes de contacts directs associées. La démarche similaire, cherchant à trouver une corrélation entre l'activité biologique et le nombre de contacts directs, est plus difficile à mettre en œuvre du fait des erreurs expérimentales plus importantes dans la mesure des MIC (une valeur moyenne est donc utilisée). Aucune corrélation n'est observée entre le nombre de contacts directs au niveau du site A et l'activité biologique *in vivo* (pour *E. coli* et *S. aureus*), supposant que ce paramètre n'explique pas à lui seul l'efficacité des aminoglycosides modifiés.

Ces derniers résultats montrent que l'efficacité des aminoglycosides repose majoritairement sur leur capacité à se fixer au site A bactérien et que d'autres paramètres entrent vraisemblablement en jeu. Les variations d'efficacité observées, sur des souches bactériennes résistantes, entre les différents dérivés de paromomycine prouvent que leur action s'exerce également en dehors du site A et peuvent s'expliquer par une différence de susceptibilité aux enzymes de modification présentes dans ces souches bactériennes. En effet, si pour une affinité similaire *in vitro*, deux composés présentent une activité *in vivo* différente, il est possible que l'un d'eux ait fait l'objet d'une modification enzymatique. Cette hypothèse suppose que les changements conformationnels opérés sur les dérivés de paromomycine diminuent leur affinité pour le site catalytique des enzymes de modification. Il paraît donc nécessaire et intéressant d'obtenir la structure cristallographique de complexes entre les aminoglycosides dérivés les plus actifs biologiquement et le site catalytique des enzymes. De nouvelles informations pourront être apportées et permettront le développement de nouveaux antibiotiques à forte affinité pour le site A et constituant de mauvais substrats pour les enzymes induisant les résistances aux aminoglycosides.



## **CHAPITRE 6**

### **BIBLIOGRAPHIE**



## Chapitre 6 Bibliographie

**Ali, B. H.** (1995). "Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research." *Gen. Pharmacol.* 26(7): 1477-87.

**Bar-Nun, S., Y. Shneyour, et al.** (1983). "G-418, an elongation inhibitor of 80S ribosomes." *Biochim. Biophys. Acta* 741(1): 123-7.

**Beauchamp, D. and G. Labrecque** (2001). "Aminoglycoside nephrotoxicity: do time and frequency of administration matter?" *Curr Opin Crit Care* 7(6): 401-8.

**Biertumpfel, C., J. Basquin, et al.** (2002). "Crystallization of biological macromolecules using agarose gel." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58(Pt 10 Pt 1): 1657-9.

**Brodersen, D. E., W. M. Clemons, Jr., et al.** (2000). "The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit." *Cell* 103(7): 1143-54.

**Busscher, G. F., F. P. Rutjes, et al.** (2005). "2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics." *Chem Rev* 105(3): 775-91.

**Chast, F.** (2002). *Histoire contemporaine des médicaments*. Paris, Editions La Découverte/Poche.

**Dugue, G. A.** (2004). "Comment on: effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*." *J Antimicrob Chemother* 53(2): 403; author reply 403.

**East, J. E., J. E. Foweraker, et al.** (2005). "Gentamicin induced ototoxicity during treatment of enterococcal endocarditis: resolution with substitution by netilmicin." *Heart* 91(5): e32.

**Ennifar, E., J. C. Paillart, et al.** (2003). "HIV-1 RNA dimerization initiation site is structurally similar to the ribosomal A site and binds aminoglycoside antibiotics." *J Biol Chem* 278(4): 2723-30.

**Ferreira, L. S., G. A. Ramaldes, et al.** (2004). "In vitro skin permeation and retention of paromomycin from liposomes for topical treatment of the cutaneous leishmaniasis." *Drug Dev Ind Pharm* 30(3): 289-96.

**Forge, A. and J. Schacht** (2000). "Aminoglycoside antibiotics." *Audiol. Neurootol.* 5(1): 3-22.

**Gale, J. E., W. Marcotti, et al.** (2001). "FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel." *J Neurosci* 21(18): 7013-25.

**Guan, M. X., N. Fischel-Ghodsian, et al.** (2000). "A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity." *Hum Mol Genet* 9(12): 1787-93.

**Han, Q., Q. Zhao, et al.** (2005). "Molecular recognition by glycoside pseudo base pairs and triples in an apramycin-RNA complex." *Angew Chem Int Ed Engl* 44(18): 2694-700.

**Hermann, T.** (2005). "Drugs targeting the ribosome." *Curr Opin Struct Biol* 15(3): 355-66.

**Hori, R., M. Okuda, et al.** (1992). "Surface binding and intracellular uptake of gentamicin in the cultured kidney epithelial cell line (LLC-PK1)." *J Pharmacol Exp Ther* 261(3): 1200-5.

**Iraji, F. and A. Sadeghinia** (2005). "Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran." *Ann Trop Med Parasitol* 99(1): 3-9.

**Jezowska-Bojczuk, M., A. Karaczyn, et al.** (1998). "Copper(II) binding to tobramycin: potentiometric and spectroscopic studies." *Carbohydr. Res.* 313(3-4): 265-269.

**Jones, Y. E., S. Chappell, et al.** (2002). "Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals and their environment in England and Wales from 1988 to 1999." *Vet Rec* 150(21): 649-54.

**Just, M., G. Erdmann, et al.** (1977). "The renal handling of polybasic drugs. 1. Gentamicin and aprotinin in intact animals." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 300(1): 57-66.

**Kadri, A., B. Lorber, et al.** (2005). "Crystal quality and differential crystal-growth behaviour of three proteins crystallized in gel at high hydrostatic pressure." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61(Pt 6): 784-8.

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

**Kotra, L. P., J. Haddad, et al.** (2000). "Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 44(12): 3249-56.

**Kurtz, D. I.** (1974). "Fidelity of protein synthesis with chicken embryo mitochondrial and cytoplasmic ribosomes." *Biochemistry* 13(3): 572-7.

**Kusunoki, T., S. Cureoglu, et al.** (2004). "Effects of aminoglycoside administration on cochlear elements in human temporal bones." *Auris Nasus Larynx* 31(4): 383-8.

**Levy, S. B.** (2002). *The Antibiotic Paradox. How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers.* Cambridge, MA, Perseus Publishing.

**Lipsitch, M., R. S. Singer, et al.** (2002). "Antibiotics in agriculture: when is it time to close the barn door?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 5752-4.

**Lynch, S. R. and J. D. Puglisi** (2001). "Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes." *J. Mol. Biol.* 306(5): 1037-58.

**Magnet, S. and J. S. Blanchard** (2005). "Molecular insights into aminoglycoside action and resistance." *Chem Rev* 105(2): 477-98.

**Magnet, S., T. A. Smith, et al.** (2003). "Aminoglycoside resistance resulting from tight drug binding to an altered aminoglycoside acetyltransferase." *Antimicrob Agents Chemother* 47(5): 1577-83.

**Matz, G., L. Rybak, et al.** (2004). "Ototoxicity of otological antibiotic drops in humans." *Otolaryngol Head Neck Surg* 130(3 Suppl): S79-82.

**Mingeot-Leclercq, M. P. and P. M. Tulkens** (1999). "Aminoglycosides: nephrotoxicity." *Antimicrob Agents Chemother* 43(5): 1003-12.

**Mingeot-Leclercq, M. P., Y. Glupczynski, et al.** (1999). "Aminoglycosides: activity and resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 43(4): 727-37.

**Moazed, D. and H. F. Noller** (1987). "Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA." *Nature* 327(6121): 389-94.

**Moestrup, S. K., S. Cui, et al.** (1995). "Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs." *J Clin Invest* 96(3): 1404-13.

**Moreno, A., A. Theobald-Dietrich, et al.** (2005). "Effects of macromolecular impurities and of crystallization method on the quality of eubacterial aspartyl-tRNA synthetase crystals." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61(Pt 6): 789-92.

**Murakami, S., R. Nakashima, et al.** (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." *Nature* 419(6907): 587-93.

**Nagai, J. and M. Takano** (2004). "Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity." *Drug Metab Pharmacokinet* 19(3): 159-70.

**Navaza, J. and P. Saludjian** (1996). AMoRe: An Automated Molecular Replacement Program Package. *Methods in Enzymology*. C. W. J. Carter and R. Sweet, M., Academic Press. 276: 581-594.

**Nayak, R. and P. B. Kenney** (2002). "Screening of Salmonella isolates from a turkey production facility for antibiotic resistance." *Poult Sci* 81(10): 1496-500.

**Paulsen, I. T.** (2003). "Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution." *Curr Opin Microbiol* 6(5): 446-51.

**Pfister, P., M. Risch, et al.** (2003). "Role of 16S rRNA Helix 44 in Ribosomal Resistance to Hygromycin B." *Antimicrob Agents Chemother* 47(5): 1496-502.

**Pfister, P., S. Hobbie, et al.** (2003). "The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures." *Chembiochem* 4(10): 1078-88.

**Pfister, P., S. Hobbie, et al.** (2005). "Mutagenesis of 16S rRNA C1409-G1491 base-pair differentiates between 6'OH and 6'NH<sub>3</sub><sup>+</sup> aminoglycosides." *J Mol Biol* 346(2): 467-75.

**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(0): 191-307.

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

**Putman, M., H. W. van Veen, et al.** (2000). "Molecular properties of bacterial multidrug transporters." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 672-93.

**Ritter, T. K. and C. H. Wong** (2001). "Carbohydrate-Based Antibiotics: A New Approach to Tackling the Problem of Resistance." *Angew Chem Int Ed Engl* 40(19): 3508-3533.

**Sander, P., A. Meier, et al.** (1996). "Ribosomal drug resistance in mycobacteria." *Res Microbiol* 147(1-2): 59-67.

**Sander, P., T. Prammananan, et al.** (1996). "Introducing mutations into a chromosomal rRNA gene using a genetically modified eubacterial host with a single rRNA operon." *Mol Microbiol* 22(5): 841-8.

**Scaringe, S. A.** (2001). "RNA oligonucleotide synthesis via 5'-silyl-2'-orthoester chemistry." *Methods* 23(3): 206-17.

**Sica, F., D. Demasi, et al.** (1994). "Elimination of twinning in crystals of *Sulfolobus solfataricus* alcohol dehydrogenase holo-enzyme by growth in agarose gels." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 508-11.

**Slee, A. M., M. A. Wuonola, et al.** (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(11): 1791-7.

**Swaney, S. M., H. Aoki, et al.** (1998). "The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria." *Antimicrob Agents Chemother* 42(12): 3251-5.

**Therese-Rio, S.** (2001). *Ototoxicité des aminosides chez les carnivores domestiques*. Ecole Nationale Vétérinaire. Nantes, Nantes: 136.

**Thiessen, K. J.** (1994). "The use of two novel methods to grow protein crystals by microdialysis and vapor diffusion in an agarose gel." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 491-5.

**Tollefson, L. and B. E. Karp** (2004). "Human health impact from antimicrobial use in food animals." *Med Mal Infect* 34(11): 514-21.

**Vakulenko, S. B. and S. Mobashery** (2003). "Versatility of aminoglycosides and prospects for their future." *Clin Microbiol Rev* 16(3): 430-50.

**Vardi, N., H. Parlakpınar, et al.** (2005). "Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats." *Fundam Clin Pharmacol* 19(2): 173-7.

**Vetting, M., S. L. Roderick, et al.** (2003). "What can structure tell us about in vivo function? The case of aminoglycoside-resistance genes." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 3): 520-2.

**Vicens, Q. and E. Westhof** (2001). "Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site." *Structure* 9(8): 647-58.

**Vicens, Q. and 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.

**Vicens, Q. and E. Westhof** (2003). "Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide." *J Mol Biol* 326(4): 1175-88.

**Vicens, Q. and E. Westhof** (2003). "Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: An analysis of x-ray crystal structures." *Biopolymers* 70(1): 42-57.

**Vicens, Q. and E. Westhof** (2003). "RNA as a drug target: the case of aminoglycosides." *Chembiochem* 4(10): 1018-23.

**Vourloumis, D., G. C. Winters, et al.** (2005). "Aminoglycoside-hybrid ligands targeting the ribosomal decoding site." *Chembiochem* 6(1): 58-65.

**Wagman, G. H., R. T. Testa, et al.** (1974). "Antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: fermentation, isolation, and preliminary characterization." *Antimicrob Agents Chemother* 6(2): 144-9.

**Waguespack, J. R. and A. J. Ricci** (2005). "Aminoglycoside ototoxicity: permeant drugs cause permanent hair cell loss." *J Physiol* 567(Pt 2): 359-360.

**Waitz, J. A., F. Sabatelli, et al.** (1974). "Biological activity of antibiotic G-418, a new micromonospora-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths." *Antimicrob Agents Chemother* 6(5): 579-81.

**Walsh, C.** (2000). "Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance." *Nature* 406(6797): 775-81.

**Wegener, H. C.** (2003). "Antibiotics in animal feed and their role in resistance development." *Curr Opin Microbiol* 6(5): 439-45.

**Williams, P. D., D. B. Bennett, et al.** (1987). "Correlation between renal membrane binding and nephrotoxicity of aminoglycosides." *Antimicrob Agents Chemother* 31(4): 570-4.

**Woodcock, J., D. Moazed, et al.** (1991). "Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA." *Embo J* 10(10): 3099-103.

**Zuker, M.** (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." *Nucleic Acids Res* 31(13): 3406-15.