

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

IBMC - UPR 9002 : Architecture et Réactivité de l'ARN

THÈSE présentée par :

Benoît MEYER

soutenue le : **26 Septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Biophysique et Biologie Structurale**

**Etude thermodynamique de l'initiation
de la traduction et de l'élongation chez
*Escherichia coli***

THÈSE dirigée par :

**ENNIFAR Éric
DUMAS Philippe**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg
Directeur de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

**MECHULAM Yves
GILLET Reynald**

Directeur de recherche, Ecole polytechnique (Paris)
Professeur des universités, Université de Rennes 1

AUTRES MEMBRES DU JURY :

**YUSUPOVA Gulnara
INNIS Axel**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg
Chargé de recherche, Université de Bordeaux

Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier tous les membres de mon jury, Dr. GulnaraYusupova, Dr. Yves Mechulam, Pr. Reynald Gillet, Dr. Axel Innis d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

En second lieu, je souhaite remercier le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche ainsi que l'Université de Strasbourg et le CNRS d'avoir bien voulu financer ces quatre années de thèse.

Merci au Dr. Eric Westhof de m'avoir accueilli au sein de l'UPR 9002. Mes remerciements s'étendent à l'ensemble des membres de l'UPR ; je me suis très bien entendu avec chacun d'entre vous et j'ai toujours trouvé quelqu'un de disponible quand j'en avais besoin.

Merci aux organisateurs du weekend de ski à Zweisimmen de m'avoir proposé de venir avec eux. Cette escapade hivernale m'a permis de passer du temps avec certains membres de l'UPR 9002 en dehors de l'institut. J'ai vraiment apprécié cette petite virée sportive.

Je remercie tous les membres passés et présents de l'équipe Structure et dynamique des machines biomoléculaires. L'ambiance de travail qui règne en 429 est unique et pour rien au monde je ne serai allé en 431 !

En particulier, merci à Guillaume Bec de m'avoir formé dès mon arrivé au sein de l'équipe durant un stage d'été il y a 6 ans. Depuis le début, tu t'es toujours pris du temps quand j'avais besoin de toi. Merci à Philippe Wolf pour ton aide entre autres quand il s'agissait d'avoir un spectre de masse ou un film. Merci à Dominique Burnouf pour ta bonne humeur au quotidien et en particulier pour tes analyses critiques et tes idées entre autres quand il s'agissait de rédiger une lettre de motivation. Merci à Cyrielle, ma voisine de paillasse, d'avoir fermé un œil quand les erlens envahissaient ta zone mais surtout de m'avoir formé à l'utilisation du microcalorimètre.

Bien entendu, je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse Eric Ennifar. Tu as cru en moi dès mon stage de Master. Ta disponibilité et ta richesse scientifique ont permis de diriger la progression de ma thèse d'une main de maître.

Un grand merci à mon co-directeur Philippe Dumas, tu m'as énormément appris en biophysique et surtout sur la pédagogie à adopter quand il s'agissait d'écrire (sans être verbeux) ou de réaliser une présentation orale claire.

Mes remerciements vont également à tous mes stagiaires sans qui je n'aurai pas avancé aussi efficacement, merci à Michaël, Isabel, Charline et Lauréline d'avoir nettement contribué au projet. Grâce à vous j'ai beaucoup appris notamment sur la façon d'encadrer un stagiaire tant au niveau de la formation pratique qu'au niveau relationnel. Votre présence m'a été très bénéfique.

Je tiens ensuite à remercier Emma Schenkbecher avec qui j'ai travaillé pendant près d'un an en binôme sur le projet ribosome. J'ai essayé de te transmettre toute mon expérience sur le sujet, maintenant je te laisse la bête. Je te souhaite bonne chance et j'espère que tu auras le même épanouissement que j'ai pu ressentir au cours de ma thèse. Tu le sais il faut une grande persévérance pour tout préparer quand il s'agit de faire de l'ITC sur le ribosome mais le jeu en vaut la chandelle.

Je remercie également Stefano Marzi, tu m'as beaucoup facilité le travail en me donnant tout ce que tu possédais en stock. Tes connaissances sur la traduction et ta disponibilité ont fait de toi une pièce maîtresse dans l'avancée de mon projet. Merci aussi de m'avoir permis de venir me défouler au foot le jeudi soir.

Merci aussi à Bernard Lorber d'avoir toujours été rapidement disponible quand il s'agissait de faire une mesure par DLS.

Merci à Marie Gerber, ma 'collègue' de thèse, tu as toujours été présente soit pour me distraire, soit pour me rappeler les formalités et dates butoirs quand il s'agissait de rendre un document important.

Je remercie tous nos collaborateurs, l'équipe d'Emmanuelle Leize-Wagner qui m'a permis d'obtenir les spectres du ribosome en masse entière, l'équipe de Bruno Klaholz à l'IGBMC

pour les études du ribosome par cryo-EM et en particulier Alexander Myasnikov pour son travail durant les vacances de Noël.

Finalement, je remercie aussi mes parents pour m'avoir 'sponsorisé' tout au long de mes études, sans vous je ne serai pas là où j'en suis actuellement. Merci de m'avoir permis de m'épanouir durant les diverses activités du samedi, merci aussi de m'avoir facilité la tâche en me préparant tous ces bons p'tits plats pendant ces 9 dernières années. Merci aussi à mon frère Stéphane et à Maëlle, pour leur soutien de près ou de loin durant les sessions Skype.

Merci à ma copine Carole. Tu m'as soutenu dans notre quotidien en te montrant arrangeante et dévouée surtout quand il s'agissait de m'aider à écrire un e-mail ou d'aller faire une course de dernière minute. Trêve de plaisanteries, tu as tout simplement été parfaite ! Je remercie également l'ensemble de sa famille pour son soutien.

Enfin, je remercie l'ensemble de mes amis d'avoir animé mes temps libres me permettant de recharger les batteries et de continuer d'avancer.

Liste des abréviations

30S PIC	Pre-Initiation Complex 30S
30SIC	30S Initiation Complex
70SIC	70S Initiation complex
aa-ARNt	aminoacyl-ARNt
ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	Acide DésoxyRiboNucléique
Arf	Alternative ribosome rescue factor
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ARNtm	ARN transfert-messenger
aSD	anti-Shine Dalgarno
ATP	Adénosine TriPhosphate
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Cal	Calorie
Cryo-EM	Cryo-Electron Microscopy
Da	Dalton
ddNTP	didésoxyribonucléotide
DLS	Dynamic Light Scattering
DTT	DiThioThreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
EF-G	Elongation Factor G
EF-Ts	Elongation Factor thermo stable
EF-Tu	Elongation Factor thermo unstable
fMet-ARNt ^{fMet}	ARNt initiateur
FRET	Förster Resonance Energy Transfert
GDP	Guanosine DiPhosphate
GMPPCP	β,γ-MethyleneGuanosine 5'-TriPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate

IF	Initiation factor
iITC	incremental ITC
IPTG	IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K_a	Constante d'affinité
K_d	Constante de dissociation
KinITC	Kinetic ITC
MDa	MégaDalton
MES	Acide 2-[N-morpholino]-éthane-sulfonique
Mg^{2+}	Magnésium
N-ter	N-terminale
OB-fold	Oligonucleotide-Binding fold
ppGpp	Guanosine pentaphosphate
RF	Release Factor
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNAses	ribonucléases
RRF	Ribosome Recycling Factor
RT	Rétrotranscriptase
S	Svedberg
SD	Shine et Dalgarno
Site A	Site de l' aminoacyl
Site E	Site de sortie
Site P	Site du peptidyl
SmPB	Small Basic Protein B
SRL	Sarcin-Ricin Loop
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TIR	Translation Initiation Region
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1
ΔC_p	Variation de capacité calorifique
ΔG	Variation d'énergie libre
ΔH	Variation d'enthalpie
ΔS	Variation d'entropie

TABLE DES MATIERES

Chapitre I : INTRODUCTION	6
I. Généralités sur la biosynthèse des protéines bactériennes	6
1. La synthèse protéique	6
2. Le ribosome	7
3. Les 4 étapes de la traduction	10
a) L'initiation de la traduction bactérienne	11
b) L'élongation de la traduction bactérienne	12
c) La terminaison de la traduction bactérienne	13
d) Recyclage du ribosome bactérien	14
II. L'étape d'initiation en détails	14
1. Les composants de l'initiation de la traduction chez les bactéries	14
a) Le facteur d'initiation IF1	14
b) Le facteur d'initiation IF2	16
c) Le facteur d'initiation IF3	20
d) L'ARN messager bactérien	21
i. Le codon d'initiation :	21
ii. La séquence Shine - Dalgarno :	22
iii. L'espaceur :	23
e) L'ARNt initiateur chez les bactéries (fMet-ARNt ^{fMet})	24
2. La formation du complexe d'initiation 30S (30SIC)	26
3. La conversion vers le complexe d'initiation 70S (70SIC)	28
III. Etape de l'élongation en détails	29
1. Les étapes de l'élongation chez les bactéries	29
a) Le décodage : le complexe ternaire EF-Tu/GTP - aa-ARNt	29
b) La translocation, le facteur EF-G	32
c) Le recyclage de EF-Tu, le facteur EF-Ts	33

2. Le mécanisme de trans-traduction.....	34
IV. Le ribosome, une cible pour les antibiotiques	37
V. La thermodynamique, cadre scientifique du projet de thèse	38
1. Petit historique sur les découvertes majeures concernant le ribosome	38
2. Introduction sur la microcalorimétrie par titration isotherme.....	40
3. Les bases de la thermodynamique	43
4. Mesure directe de la variation d'enthalpie par ITC	45
Chapitre II. OBJECTIF PRINCIPAL DE LA THESE	47
I. Etude thermodynamique de la formation du complexe d'initiation 30S (30SIC) par incremental ITC.....	47
II. Etude thermodynamique de la formation du complexe d'initiation 70S et de l'élongation.....	48
III. Etude thermodynamique de la fixation d'antibiotiques spécifiques au ribosome ...	48
Chapitre III. MATERIELS ET METHODES	49
1. Purification des facteurs d'initiation :	49
a) Purification d'IF1 et d'IF3 :	50
b) Purification d'IF2 :	51
2. Purification du ribosome 70S	52
3. Purification du 30S	53
4. Obtention de l'ARNm	54
a) Transcription in vitro :	54
b) Purification des ARNm par gel dénaturant :	55
5. Purification de la méthionyl-ARNt-synthétase (MetRS)	56
6. Test de d'aminoacylation.....	57

7. Purification de la méthionyl-ARNt formyltransférase (FT).....	58
8. Formation du 10-formyl-tétrahydrofolate	60
9. Test de formylation.....	60
10. Purification du fMet-ARNt ^{fMet}	62
11. Préparation d'une expérience ITC	63
12. Test d'activité des sous-unités ribosomales purifiées : détection de la présence de luciférase.....	64
13. Test d'activité des facteurs d'initiation dans leur globalité	65
14. Test d'activité d'IF3.....	65
15. Hydrolyse du GTP par IF2	66
16. Purification de EF-Tu.....	66
17. Préparation de la fraction S100.....	68
18. Purification de l'ARNt glycine	69
19. Purification du complexe ternaire aa-ARNt – EF-Tu/GTP	70

Chapitre IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS..... 72

I. Etude thermodynamique de la formation du complexe d'initiation 30S (30SIC) par *incremental ITC*..... 72

A. Mise au point d'une nouvelle approche expérimentale : *l'incremental ITC (iITC)*... ..72

1. Etudes de l'élongation de la transcription inverse du VIH-1 par *iITC*..... 72
2. Etudes de l'initiation de la traduction bactérienne par *iITC*..... 75

B. Détermination des paramètres thermodynamiques de la fixation des facteurs d'initiation sur le 30S

1. Paramètres thermodynamiques de la fixation d'IF3 sur le 30S

- a) Fixation d'IF3 sur le 30S seul..... 76
- b) Effet d'IF1 sur la fixation d'IF3 au 30S..... 80
- c) Effet d'IF2 sur la fixation d'IF3 au 30S..... 81
- d) Fixation d'IF3 sur le complexe 30S-IF1-IF2

2. Paramètres thermodynamiques de la fixation d'IF1 sur le 30S

a) Fixation d'IF1 sur le 30S seul	83
b) Fixation d'IF1 sur le complexe 30S-IF3	85
c) Effet d'IF2 sur la fixation d'IF1 au 30S.....	86
d) Fixation d'IF1 sur le complexe 30S-IF3-IF2	87
3. Paramètres thermodynamiques de la fixation d'IF2 sur le 30S	88
a) Paramètres thermodynamiques de la fixation de GTP sur IF2	88
b) Fixation du complexe IF2-GTP sur le 30S seul.....	90
c) Fixation du complexe IF2-GTP sur le complexe 30S-IF1	91
d) Fixation du complexe IF2-GTP sur le complexe 30S-IF3	92
e) Fixation du complexe IF2-GTP sur le complexe 30S-IF3-IF1	93
f) Fixation du complexe IF2-GMPPCP sur le 30S	94
4. Détermination de l'ordre préférentiel d'assemblage des facteurs d'initiation lors de la formation du complexe d'initiation 30S.....	95
a) Fixation des facteurs sur le 30S seul	95
b) Fixation d'IF1 et d'IF2-GTP sur le complexe 30S-IF3	96
c) Fixation d'IF2 sur le complexe 30S-IF3-IF1	97
5. Paramètres thermodynamiques de la fixation de l'ARNm sur le 30S	98
a) Fixation de l'ARNm sur le 30S seul	98
b) Comparaison des paramètres thermodynamiques de la fixation de l'ARNm sur différents complexes à 25°C	101
c) Fixation d'autres ARNm sur le 30S.....	103
6. Caractérisation de la fixation du fMet-ARNt^{fMet}	104
a) Fixation de l'ARNt initiateur sur IF2.....	104
b) Fixation de l'ARNt initiateur sur le complexe 30S-ARNm.....	105
c) Fixation de l'ARNt initiateur sur différents complexes.....	106
7. Détermination de la structure du complexe d'initiation 30S	108

II. Etude thermodynamique de la formation du complexe d'initiation 70S et de l'élongation

1. Fixation du 50S sur le complexe d'initiation 30S	111
2. Fixation du complexe EF-Tu/GTP-Gly-ARNt ^{gly} sur le complexe d'initiation 70SIC.....	113

III. Contrôle de l'ensemble des partenaires de l'initiation de la traduction 116

1. Vérification de la masse du 30S après purification 116
2. Vérification de la qualité du 30S et du 50S purifié par DLS..... 117
3. Test d'activité des sous-unités ribosomales après séparation..... 118
4. Test d'activité des facteurs d'initiation après purification 119
5. Test d'activité d'IF3 120
6. Test d'activité d'IF2 121
7. Vérification de la présence de la formyl-méthionine sur l'ARNt initiateur 123
8. Vérification de la solubilité d'IF1 124

IV. Etude thermodynamique de la fixation d'antibiotiques spécifiques du tunnel de sortie des polypeptides du ribosome 124

1. Etude thermodynamique de la fixation de l'érythromycine au 70S 125
2. Etude thermodynamique de la fixation de l'azithromycine au 70S..... 126
3. Etude thermodynamique de la fixation de Bac 7 (1-16) au 70S..... 128
4. Comparaison des 3 antibiotiques interagissant avec le tunnel de sortie du peptide du 70S.
..... 129

Chapitre V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 132

BIBLIOGRAPHIE..... 135

Chapitre I : INTRODUCTION

I. Généralités sur la biosynthèse des protéines bactériennes

1. La synthèse protéique

La biosynthèse des protéines, également appelée traduction, est un processus itératif complexe conduisant au décodage de l'information génétique portée par l'ARN messenger (ARNm) en protéines. Cette étape permet la lecture d'une séquence nucléotidique et sa traduction, sur la base du code génétique, en une séquence d'acides aminés. Chaque triplet de nucléotides (codon) de l'ARNm code spécifiquement pour l'un des vingt aminoacides habituels. En temps normal, c'est le codon AUG qui est le point de départ de la traduction. Dès l'arrivée d'un codon stop (UAA, UAG ou UGA), la synthèse s'arrête et le peptide néosynthétisé est relargué. Exceptionnellement, les codons stop UGA et UAG peuvent être reprogrammés pour l'insertion de deux acides aminés particuliers, la sélénocystéine et la pyrrolysine respectivement, selon un mécanisme spécifique.

La synthèse peptidique est catalysée par un large complexe ribonucléoprotéique universel appelé ribosome. Il a été observé pour la 1^{ère} fois en 1955 par George Palade (Prix Nobel en 1974). Pour cette raison, il fut d'abord appelé '*grain de Palade*'. Le ribosome est composé de 2 sous-unités de tailles différentes qui s'assemblent dès le début de la traduction. Son rôle est de fixer de manière coordonnée l'ensemble des partenaires de la traduction et de catalyser la formation de liaison peptidique entre les aminoacides.

La traduction fait non seulement intervenir des protéines mais également 3 formes d'ARN distincts. L'ARNm qui contient l'information génétique, l'ARN ribosomique (ARNr) qui entre dans la composition du ribosome et l'ARN de transfert (ARNt) qui permet d'apporter les acides aminés au ribosome. Chaque codon de l'ARNm est reconnu spécifiquement par un ARNt grâce à la complémentarité de ses bases au niveau de l'anticodon.

2. Le ribosome

Dans le monde vivant, le ribosome représente l'unité centrale de la synthèse protéique. Ce complexe ribonucléoprotéique de haut poids moléculaire est asymétrique et constitué de 2 sous-unités distinctes désignées par leur coefficient de sédimentation. Le ribosome d'*Escherichia coli* (*E. coli*) fait en moyenne 2,4 MégaDalton (MDa) et possède un coefficient de sédimentation de 70 Svedberg (70S). Ce dernier est majoritairement constitué d'acides nucléiques puisqu'ils représentent les deux tiers de sa composition. Le tiers restant est composé de 55 protéines ribosomales distinctes. Les ARNr, au nombre de trois, sont localisés au centre du complexe le tout étant recouvert de protéines.

Le ribosome est formé d'une petite sous-unité (30S) et d'une grande sous-unité (50S) faisant respectivement 0,8 MDa et 1,5 MDa. Les aminoacyl-ARNt (aa-ARNt), substrats catalytiques du ribosome, viennent s'associer à l'interface des 2 sous-unités au niveau de 3 sites spécifiques présents dans le 30S comme dans le 50S. On retrouve le site A où se fixe l'aa-ARNt entrant, le site P où se situe le peptidyl-ARNt et enfin le site E depuis lequel l'ARNt déacylé se dissocie du ribosome (**Fig. 1**) (Rheinberger et al., 1981).

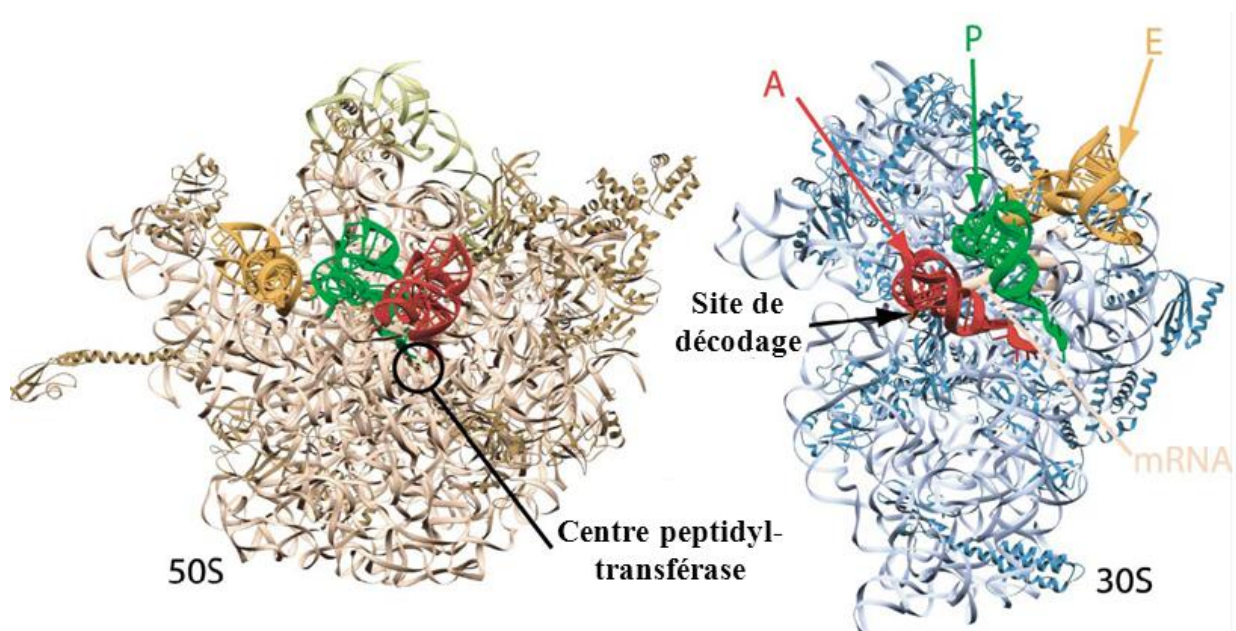


Figure 1 : (Adaptée de Ramakrishnan, 2002) : Structure cristallographique des sous-unités 50S et 30S de *Thermus thermophilus*. Les sites A, P et E sont représentés respectivement en rouge, vert et orange. Sur la structure figure également le centre peptidyl-transférase, le site de décodage ainsi que l'ARNm en gris.

INTRODUCTION

La petite sous-unité est composée de 21 protéines (S1 à S21) et d'un ARNr 16S d'environ 1500 nucléotides. Elle initie la traduction en fixant l'ARNm et participe également à la sélection du bon aa-ARNt, contrôlant ainsi la fidélité de la traduction à travers la mise en place des interactions codon-anticodon au niveau du centre de décodage (site A). La sous-unité 30S se subdivise en 3 domaines majeurs, le domaine 5', le domaine central et le domaine 3' que l'on appelle respectivement le corps, la plateforme et la tête (Wimberly et al., 2000) (**Fig. 2**).

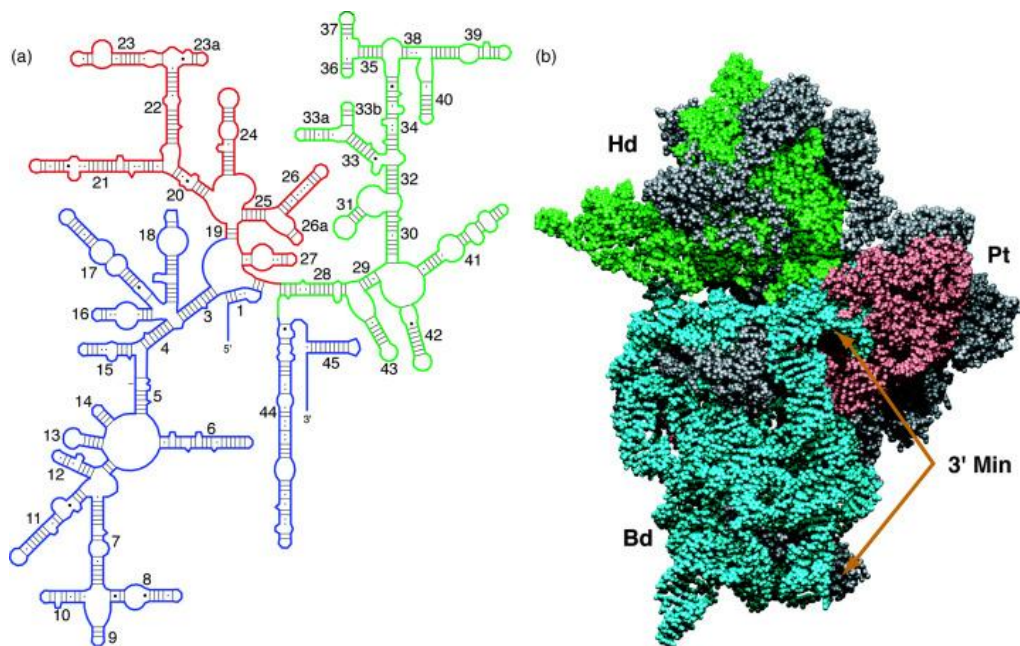


Figure 2 : (Tirée de Stagg et al., 2003) : (a) Représentation de la structure secondaire de l'ARNr 16S. (b) Représentation de la structure tertiaire du 30S. L'ARN 16S et le 30S sont divisés en 3 domaines : la tête (Hd) en vert, la plateforme (Pt) en rose et le corps (Bd) en bleu. La partie 3' de l'ARNr 16S est elle aussi en bleu parce qu'elle fait partir du corps. Les protéines sont représentées en gris.

La grande sous-unité, responsable de l'activité catalytique du ribosome, est constituée de 2 ARNr (5S et 23S) faisant respectivement 120 et 2900 nucléotides, ainsi que de 34 protéines ribosomales (L1 à L34). La catalyse s'effectue à travers l'activité peptidyl-transférase du 50S sur l'aminoacyl-ARNt présent dans le site A, conduisant à la formation d'une liaison peptidique entre l'acide aminé et la chaîne peptidique du peptidyl-ARNt localisé dans le site P (Monro, 1967). Les substrats du ribosome étant uniquement en contact avec l'ARNr 23S, il a été démontré que seul l'ARNr est impliqué dans la catalyse de la réaction ; par conséquent le ribosome est considéré comme un ribozyme (Nissen et al., 2000). Ce résultat est en parfait accord avec l'hypothèse du 'RNA world' primitif qui postule que l'ARN

a précédé les protéines très tôt au cours du monde prébiotique (Crick, 1968; Orgel, 1968; Woese et al., 1966).

Les 2 sous-unités interagissent par l'intermédiaire de 12 zones d'interactions (**Fig. 3**) (Yusupov et al., 2001). La plupart des interactions ARN-ARN sont localisées au centre du complexe, tandis que les interactions protéine-ARN et protéine-protéine sont plutôt réparties en périphérie (Dunkle et al., 2011).

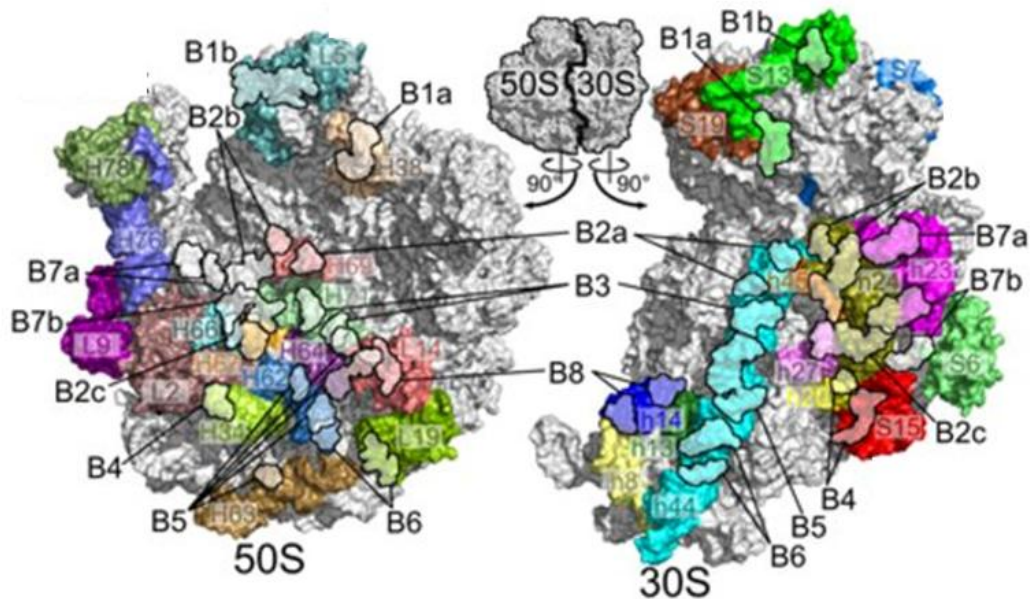


Figure 3 : (Adaptée de Bock et al., 2015) Représentation des 12 zones d'interactions entre les sous-unités ribosomales. Les protéines ribosomales et les hélices des ARNr impliquées dans ces interactions sont également représentées.

La biogénèse du ribosome est initiée par la transcription des 3 ARNr sous la forme d'un transcrit unique contenant également des ARNt. La maturation des ARNr débute avant que la transcription ne soit terminée, elle consiste tout d'abord à former des structures secondaires locales qui seront ensuite clivées par différentes ribonucléases (RNAses) et reconnues par les protéines ribosomales correspondantes. Ainsi, les RNAses III, E, G et T vont cliver le transcrit dans un ordre bien précis afin de rendre les ARNr opérationnels (Kaczanowska and Ryden-Aulin, 2007). Durant cette maturation, les ARNr sont également modifiés de façon post-transcriptionnelle. Chez *E. coli*, 36 modifications ont pu être identifiées. Ces dernières sont principalement localisées au niveau de la région de décodage (site A, P, E et site de fixation de l'ARNm) et au niveau du centre peptidyl-transférase (Decatur and Fournier, 2002). Bien que le rôle de la plupart des modifications reste encore

indéterminé, il a été démontré que certaines d'entre elles permettent aux bactéries de mieux se développer ou encore de résister à certains antibiotiques (Jiang et al., 2016).

La fixation des protéines ribosomales sur les ARNr se réalise de manière coopérative au cours même de leur transcription (de Narvaez and Schaup, 1979). En effet, plusieurs protéines se fixent uniquement sur l'ARNr, d'autres nécessitent à la fois une interaction avec l'ARNr et des protéines ribosomales, tandis que la dernière famille de protéines n'interagit qu'avec des protéines ribosomales. Une telle complexité a amené à proposer un ordre de fixation des protéines dans le cadre de la formation du 50S et du 30S (Kaczanowska and Ryden-Aulin, 2007).

Au cours de la traduction, le polypeptide nouvellement synthétisé émerge du ribosome grâce au tunnel de sortie. Ce dernier, d'une longueur de 100 Angströms et d'un diamètre variant entre 10 et 20 Angströms, est composé principalement d'ARNr 23S et de 3 protéines ribosomales (L4, L22 et L23) (Nissen et al., 2000). Entre 30 et 40 acides aminés de la protéine néosynthétisée se trouvent dans ce tunnel. Il a été démontré que la chaîne polypeptidique commence à se replier avant même d'être en dehors du ribosome. En effet, le tunnel de sortie peut accommoder à la fois des hélices α , des tournants β voire même de petits domaines composés uniquement d'hélices (Rodnina and Wintermeyer, 2016). Même si des repliements sont possible dans le tunnel de sortie, la mise en place de la structure tertiaire se réalise essentiellement à l'extérieur du ribosome grâce au "trigger factor" qui joue un rôle de chaperonne ATP indépendante (Hoffmann et al., 2010).

3. Les 4 étapes de la traduction

La biosynthèse des protéines se divise en 4 étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et la dissociation des sous-unités ribosomales. Chacune d'entre elle est assistée par des protéines spécifiques appelées facteurs d'initiation (IF), facteurs d'élongation (EF), facteurs de terminaison (RF) et facteurs de recyclage (RRF).

a) L'initiation de la traduction bactérienne

Le ribosome peut initier la traduction chez les bactéries dès lors que la partie 5' de l'ARNm est synthétisée. En effet, il existe chez les procaryotes un couplage entre la transcription et la traduction. L'initiation est une étape lente de la traduction nécessitant de nombreux contrôles (Laursen et al., 2005). Elle débute par la mise en place d'une interaction entre le codon d'initiation (AUG) de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt initiateur (fMet-ARNt^{fMet}) (**Fig. 4**). Pour cela, l'ARNm vient se fixer sur la petite sous-unité et sa position est ajustée de sorte que le codon d'initiation puisse interagir avec l'anticodon du fMet-ARNt^{fMet} au niveau du site P du 30S. Ces interactions, finement contrôlées par les 3 facteurs d'initiations (IF1, IF2 et IF3), conduisent à la formation du complexe d'initiation 30S de la traduction (30SIC) (Gualerzi et al., 1977) (**Fig. 4**). Chaque facteur d'initiation participe spécifiquement au maintien de la fidélité de la traduction mais aussi à la formation rapide du 30SIC. Une fois l'interaction mise en place, la grande sous-unité vient se fixer sur le 30SIC pour former un complexe d'initiation 70S (70SIC) stable après relargage des facteurs d'initiation (**Fig. 4**).

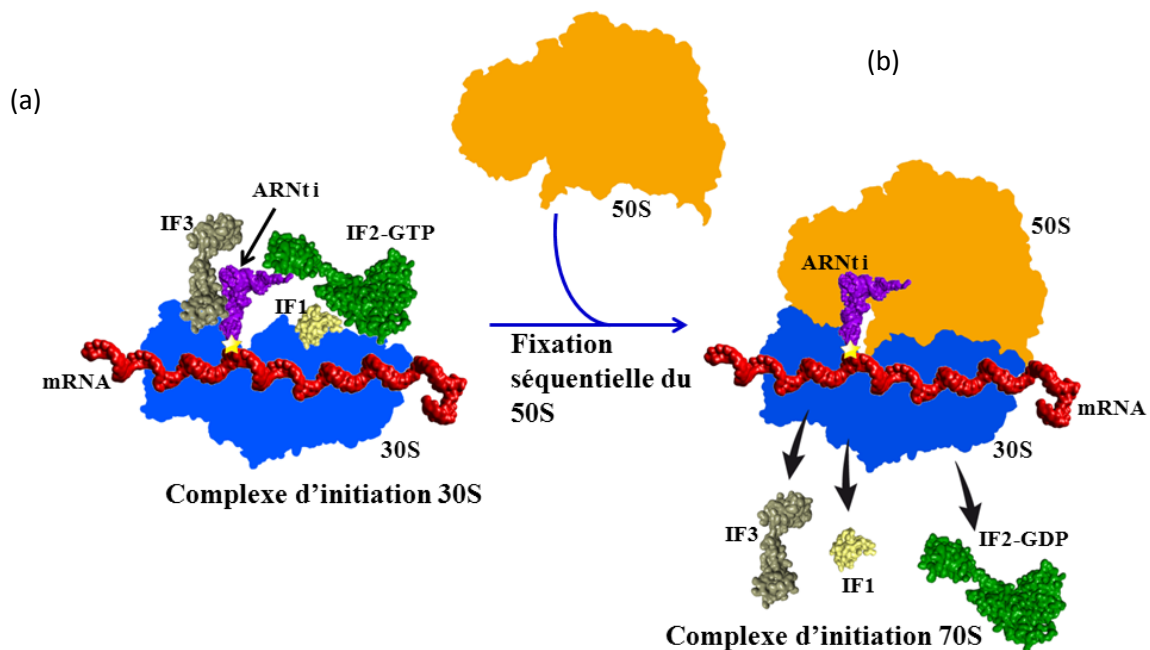


Figure 4 : (a) Représentation du complexe d'initiation 30S. Ce complexe requiert 3 facteurs d'initiation (IF1, IF2, IF3), l'ARNm et le fMet-ARNt^{fMet}. Il est caractérisé par la mise en place de l'interaction codon-anticodon. (b) Représentation du complexe d'initiation 70S. Après la fixation du 50S et l'hydrolyse du GTP par IF2, les facteurs d'initiation finissent par se dissocier du ribosome. On aboutit à la formation d'un complexe stable comprenant l'ARNm, le fMet-ARNt^{fMet} et les sous-unités ribosomales.

b) L'élongation de la traduction bactérienne

La fixation du premier aa-ARNt dans le site A du 30S représente la transition vers la phase d'élongation. A chaque cycle d'élongation, un acide aminé est ajouté à la chaîne peptidique en cours de synthèse. Ce processus est catalysé par 3 facteurs d'élongation : un facteur d'élongation non-thermostable (EF-Tu), un facteur d'élongation thermostable (EF-Ts) et un facteur d'élongation G (EF-G). Dans des conditions de croissance optimale, le ribosome bactérien incorpore en moyenne 20 acides aminés par seconde (Kramer et al., 2009) avec un taux d'erreur d'une mésincorporation tous les 10^3 à 10^4 acides aminés chez *E. coli* (Weickert and Apostol, 1998). Etant donné que la taille moyenne du protéome d'*E. coli* est de 300 acides aminés, on peut considérer que la quasi-totalité des polypeptides traduits présente une séquence primaire correcte.

Le cycle d'élongation peut être divisé en 3 étapes : le décodage, la transpeptidation et la translocation. L'élongation débute par la fixation d'un complexe ternaire aa-ARNt - EF-Tu/GTP au niveau du site A du 30S (**Fig. 5**). Une fois l'interaction codon-anticodon mise en place, le ribosome change de conformation ce qui aboutit à la stabilisation de l'aa-ARNt et déclenchement de l'hydrolyse du GTP. EF-Tu se dissocie alors de l'aa-ARNt permettant au bras accepteur de l'ARNt d'être accommodé dans le site catalytique peptidyl-transférase du 50S. La formation d'une liaison peptidique se produit ensuite ; la chaîne peptidique de l'ARNt du site P étant transférée sur l'acide aminé de l'aa-ARNt du site A (**Fig. 5**). Une fois ce transfert réalisé, le site P contient maintenant un ARNt déacylé et le site A, un peptidyl-ARNt avec une chaîne peptidique rallongée d'un acide aminé (Ramakrishnan, 2002).

Afin de permettre la venue du prochain aa-ARNt dans le site A, l'ARNt et l'ARNm doivent se décaler précisément d'un codon au cours de l'étape dite de translocation. Ainsi, l'ARNt du site P est déplacé dans le site E d'où il se dissociera tandis que le peptidyl-ARNt est déplacé vers le site P libérant ainsi le site A. Ce processus est facilité par la fixation du facteur EF-G couplé à une molécule de GTP (**Fig. 5**) (Ramakrishnan, 2002).

Une fois dissocié, EF-Tu doit échanger sa molécule de GDP contre une molécule de GTP pour pouvoir fixer un nouvel aa-ARNt. Cette étape nécessite le facteur d'élongation EF-Ts, en effet EF-Tu seul est 100 fois plus affiné pour le GDP que pour le GTP (Gromadski et al., 2002).

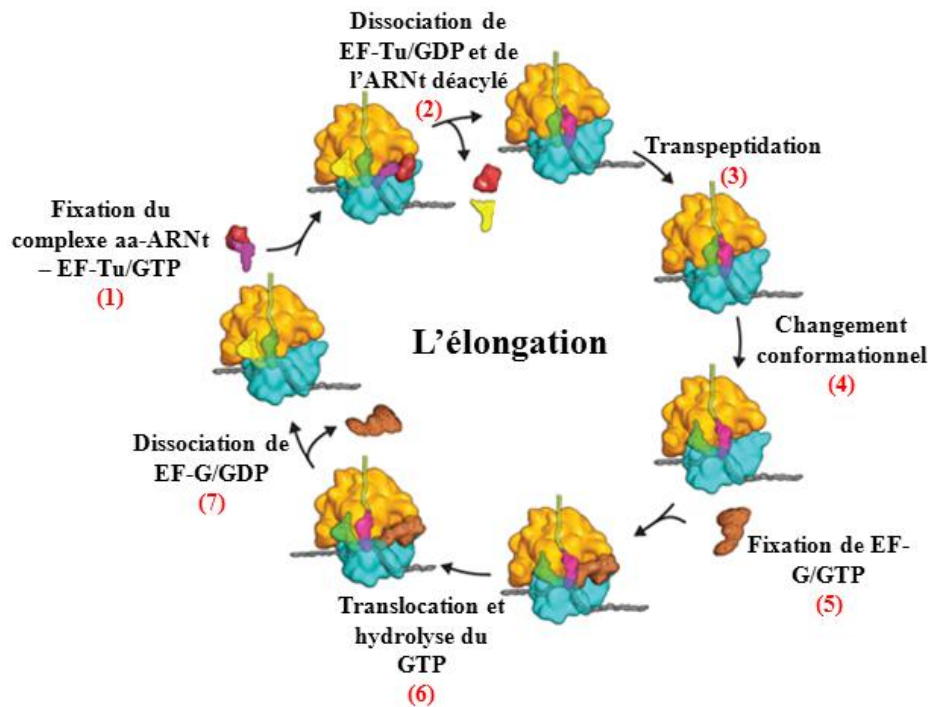


Figure 5 : (Adaptée de Schmeing and Ramakrishnan, 2009) Représentation schématique de l'ensemble des étapes de l'élongation de la traduction chez la bactérie.

c) La terminaison de la traduction bactérienne

L'étape de terminaison débute lors de l'arrivée d'un codon stop dans le centre de décodage du ribosome. Il est ensuite reconnu soit par le facteur RF1 (Release Factor 1), soit par RF2. Il existe 3 codons stop : UAA, UAG et UGA. Le codon stop UAA est reconnu spécifiquement par RF1 et UAG spécifiquement par RF2, tandis que le codon UGA est reconnu par les deux facteurs. En se fixant sur le ribosome au niveau du site A, le facteur induit l'hydrolyse de la liaison ester entre la chaîne peptidique néosynthétisée et l'ARNt positionné dans le site P (Nakamura and Ito, 2003). Une fois le polypeptide libéré, RF3, un autre facteur de terminaison, vient se fixer sur le ribosome sous la forme d'un complexe RF3-GTP. Ce dernier catalyse la dissociation des facteurs RF1 et RF2 par l'hydrolyse du GTP (Freistroffer et al., 1997).

d) Recyclage du ribosome bactérien

Une fois la terminaison achevée, le ribosome se trouve toujours lié à l'ARNm et à l'ARNt déacylé présent dans le site P. Le recyclage permet de faciliter la réinitiation du ribosome. Pour cela, l'ensemble de ces molécules doivent être dissociées et les sous-unités ribosomales doivent être maintenues séparées pour permettre leur entrée dans un nouveau cycle de traduction. Chez *E. coli*, cette étape est catalysée par les facteurs RRF (Ribosome Recycling Factor) et EF-G/GTP (**Fig. 6**) (Janosi et al., 1996). Récemment, il a été démontré que EF-G en se fixant au ribosome induit une réorientation de RRF permettant la rupture de la zone d'interaction B2a (**Fig. 3**), région importante dans le maintien de l'association des 2 sous-unités. Après hydrolyse du GTP, le changement de conformation de EF-G induit la dissociation du 70S (**Fig. 6**) (Zhang et al., 2015).

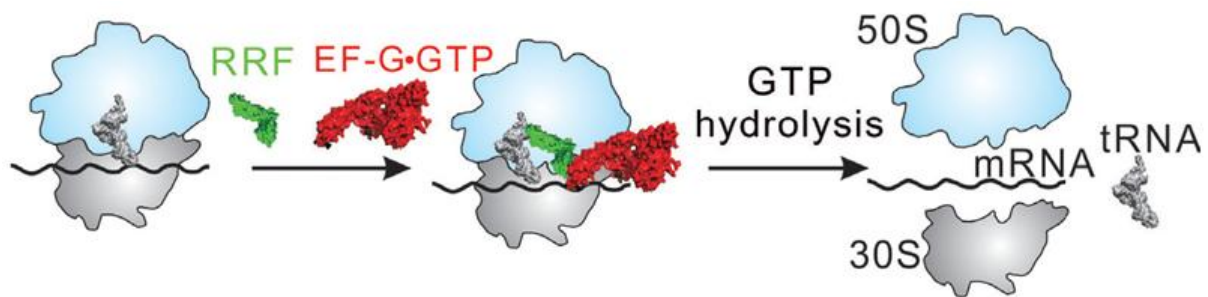


Figure 6 : (Tirée de Zhang et al., 2015) Représentation schématique de l'étape de recyclage de du ribosome chez les bactéries.

Enfin, il a été observé qu'IF3 est impliqué dans le recyclage. Ce dernier permet en effet la dissociation de l'ARNt déacylé présent dans le site P et empêche la réassociation des 2 sous-unités ribosomales (Peske et al., 2005).

II. L'étape d'initiation en détails

1. Les composants de l'initiation de la traduction chez les bactéries

a) Le facteur d'initiation IF1

IF1, codé par le gène *infA*, représente le plus petit des facteurs d'initiations (8,2 kDa). Malgré sa faible taille, ce facteur est essentiel pour la bactérie ; il a en effet été démontré que

l'inactivation du gène *infA* est délétère pour la croissance bactérienne (Cummins and Hershey, 1994).

La détermination de la structure par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) a permis d'identifier la présence d'un domaine adoptant un repliement de type OB-fold (Oligonucleotide-Binding fold) (Sette et al., 1997). Ce domaine, caractérisé par la présence de 5 brins β successifs agencés sous la forme d'un tonneau β (**Fig. 7**), est retrouvé dans plusieurs protéines fixant les acides nucléiques (Murzin, 1993). Par conséquent, il a été suspecté qu'IF1 avait la capacité d'interagir avec l'ARNr lors de l'initiation de la traduction.

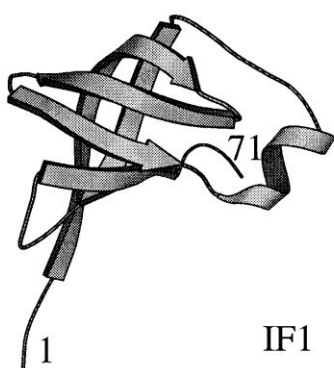


Figure 7 : (Tirée de Sette et al., 1997) Structure d'IF1 de *E. coli* déterminée par spectroscopie RMN. Cette structure est caractérisée par la présence d'un enchaînement de 5 brins β regroupés sous la forme compacte d'un tonneau β .

Le site de fixation du facteur a pu être caractérisé par des techniques de sondage chimique ; ainsi la guanine 530 et les adénines 1492 et 1493 de l'ARNr 16S sont protégées quand IF1 est présent. Il a donc été conclu qu'IF1 vient interagir avec le 30S au niveau du site A (Dahlquist and Puglisi, 2000; Moazed et al., 1995). La structure cristallographique du complexe 30S-IF1 de *Thermus thermophilus* (*T. thermophilus*) a permis de visualiser avec précision le site de fixation du facteur (Carter et al., 2001) (**Fig. 8**). IF1, en interagissant avec l'hélice 44 de l'ARNr 16S, séquestre les 2 adénines expliquant leur protection lors du sondage chimique. En plus des changements aux abords du site A, il a également été observé qu'IF1 induit des changements plus lointains au sein du 30S comme par exemple un déplacement de la tête (Carter et al., 2001).

De nombreuses fonctions biologiques sont attribuées à ce facteur. Tout d'abord, sa présence au niveau du site A prévient la fixation d'un ARNt dans ce site durant toute l'initiation (Dahlquist and Puglisi, 2000 ; Carter et al., 2001) (**Fig. 8**).

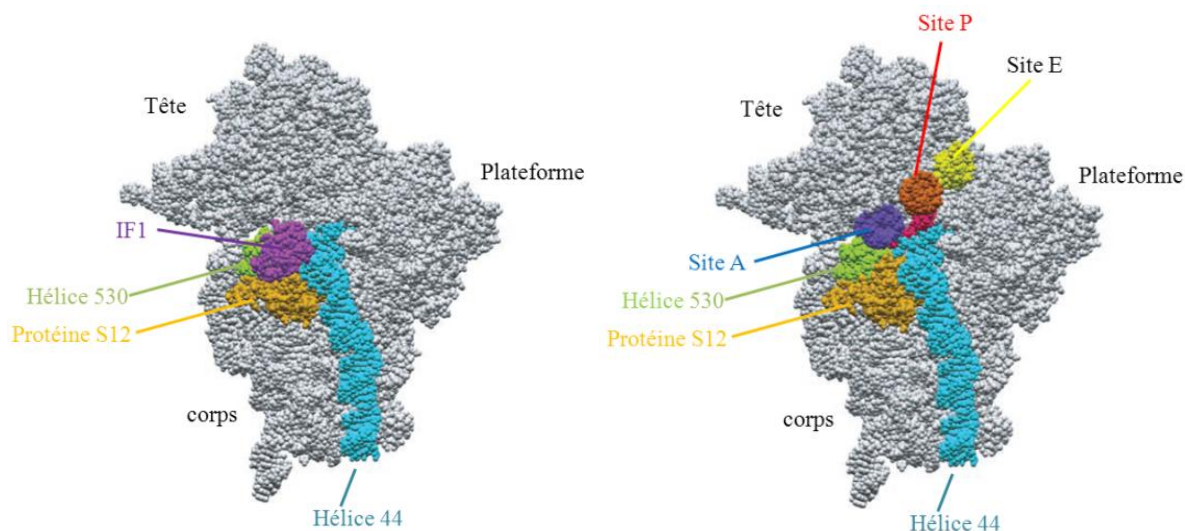


Figure 8 : (Tirée de Carter et al., Science 2001) (a) Représentation de l'interaction entre IF1 (en violet) avec le 30S de *Thermus thermophilus* (en gris). L'hélice 44, la boucle 530 et la protéine S12 sont représentées respectivement en cyan, vert et orange. (b) Représentation des sites A, P et E (en bleu foncé, rouge et jaune) au sein du 30S (en gris). Par comparaison des 2 structures, on voit que le site de fixation d'IF1 recouvre le site A et bloque par conséquent la fixation de l'ARNt dans ce site.

Il a été par ailleurs observé qu'IF1 stimule la mise en place du complexe de pré-initiation 30S en augmentant la cinétique de formation du complexe de 2,5 fois (Pon and Gualerzi, 1984). IF1 a également la capacité, à lui seul, de dissocier partiellement le 70S (Grunberg-Manago et al., 1975) et sa présence stimule l'activité dissociante du facteur IF3 (Grunberg-Manago et al., 1975). Enfin, IF1 stimule la fixation d'IF2 et d'IF3 sur la petite sous-unité ribosomale en augmentant leur affinité pour le 30S (Goyal et al., 2015). IF1 stimule la fixation d'IF2 en interagissant directement avec une région située entre ses domaines III et V de ce dernier (Moreno et al., 1999).

b) Le facteur d'initiation IF2

IF2, avec une masse de 97,3 kDa, représente le facteur d'initiation le plus grand. IF2, codé par le gène *infB*, est une protéine essentielle qui existe chez *E. coli* sous 3 isoformes appelés IF2 α (97,3 kDa), IF2 β (79,7 kDa) et IF2 γ (78,8 kDa) (Laalami et al., 1991; Nyengaard et al., 1991). Ces trois isoformes, résultent de trois codons d'initiation alternatifs dans la même phase de lecture et ne diffèrent donc que par leur extrémité N-terminale (N-ter). La production des isoformes doit être équivalente pour permettre une croissance bactérienne

optimale à 37°C, en revanche aucun d'entre eux n'est essentiel (Sacerdot et al., 1992). La seule différence d'expression entre les isoformes a pu être identifiée lors d'un choc thermique. En effet, si la culture bactérienne passe brusquement de 37°C à 15°C, une augmentation de la production des isoformes IF2 β et γ est détectée au dépens d'IF2α (Giuliodori et al., 2004).

IF2 est une protéine G faisant partie de la superfamille des GTP hydrolases. Elle est composée de 3 domaines : le domaine N, le domaine G et enfin le domaine C (Gualerzi et al., 1991). Chaque domaine est subdivisé en sous-domaines (N1, N2 ; G1, G2, G3 ; C1, C2) (**Fig. 9**) (Caserta et al., 2006). Pour l'instant, la structure du facteur n'est pas connue dans sa totalité.

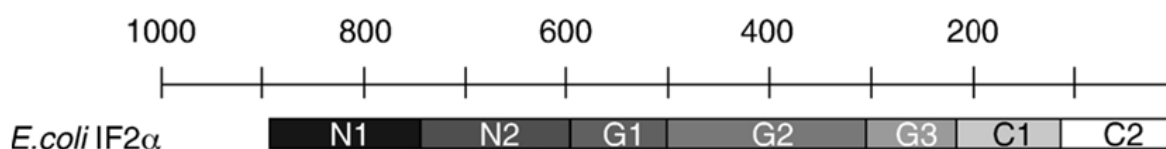


Figure 9 : (Adaptée de Caserta et al., 2006) Représentation schématique des sous-domaines d'IF2 alpha chez *E. coli*.

Le domaine N, facilement sujet à la protéolyse, est très variable génétiquement; sa séquence et sa longueur varient d'une espèce bactérienne à une autre (Steffensen et al., 1997). Chez *E. coli*, la structure des 50 premiers acides aminés du sous-domaine N1 a pu être obtenue par RMN (Laursen et al., 2003). Il a été découvert que cette même séquence est répétée dans la protéine d'*E. coli*. En effet, les 50 premiers acides aminés de la protéine sont retrouvés au niveau du sous-domaine G1, juste en amont du site de fixation du GTP (Laursen et al., 2004). Les 2 motifs sont séparés par une région non structurée très variable. Il a été démontré que les sous-domaines N1 et G1 sont impliqués dans la formation du complexe 70SIC (Simonetti et al., 2013) et que le domaine N2 est impliqué dans la fixation d'IF2 au niveau du 30S (Caserta et al., 2006).

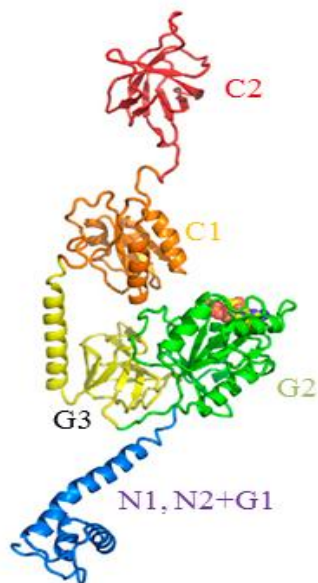


Figure 10 : (Tirée de Simonetti et al., 2013) Modèle du facteur d'initiation IF2 complet. Ce résultat a été obtenu à partir d'une structure cryo-EM du facteur fixé au 30S. Les différents sous-domaines y sont représentés : C2 en rouge, C1 en orange, G3 en jaune, G2 en vert et les sous-domaines N1, N2 et G3 en bleu.

Le sous-domaine G2, très conservé, est responsable de la fixation et de l'hydrolyse du GTP ainsi que de l'interaction avec la sous-unité 50S (**Fig. 10**). Le sous-domaine G3, quant à lui, interagit avec la sous-unité 30S (Caserta et al., 2010).

Pour être actif dans l'initiation, le facteur doit obligatoirement être couplé au GTP. Même si IF2 est 2 fois plus affiné pour le GDP à 37°C, cette protéine ne nécessite aucun facteur d'échange (Hauryliuk et al., 2009). En effet, il a été observé qu'IF2 présente une affinité pour les guanines nettement plus faible par rapport aux autres GTPases comme par exemple EF-Tu. De plus, sachant que la concentration cellulaire en GTP est 10 fois supérieure à celle du GDP, IF2 échange donc spontanément *in vivo* son GDP contre une molécule de GTP (Buckstein et al., 2008).

L'hydrolyse du GTP par IF2, déclenchée par l'arrivée de la sous-unité 50S, facilite la libération du facteur (Luchin et al., 1999). Chez toutes les GTPases, le mécanisme d'hydrolyse est assuré par une histidine catalytique (Voorhees et al., 2010). Cette dernière vient interagir avec la boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S au niveau de l'adénine en position 2662 ce qui active l'hydrolyse du GTP (Voorhees et al., 2010).

Le sous-domaine C2 permet la fixation du fMet-ARNt^{fMet} (**Fig. 10**) (Gualerzi et al., 1991). Seul le fMet-ARNt^{fMet} chargé et formylé est pris en charge par IF2 (Sundari et al., 1976). Chez *Bacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*), il a été démontré que les 90 derniers acides aminés du sous-domaine C2 reconnaissent spécifiquement l'hexanucléotide

présent à l'extrémité 3' du fMet-ARNt^{fMet}. De plus, le groupement formyl interagit spécifiquement avec une partie du sous-domaine C2 (Guenneugues et al., 2000).

IF2 assure différentes fonctions durant l'initiation de la traduction. Le facteur est tout d'abord capable d'interagir spécifiquement avec le fMet-ARNt^{fMet}, cette interaction le protégeant de la déacylation (Petersen et al., 1979). Il a donc été supposé qu'IF2, comme EF-Tu, jouerait un rôle de transporteur et qu'il viendrait se fixer au ribosome sous la forme d'un complexe fMet-ARNt^{fMet} - IF2. Cette hypothèse a été contestée suite à une étude par fluorescence qui propose tout d'abord une association d'IF2 au 30S suivit par le recrutement du fMet-ARNt^{fMet}, le complexe IF2- fMet-ARNt^{fMet} étant trop instable en dehors du ribosome (Milon et al., 2010). Plus récemment, il a été démontré par des techniques de FRET en molécule unique que la fixation d'IF2 et du fMet-ARNt^{fMet} serait affectée à la fois par la concentration des deux partenaires dans la cellule, par la présence d'autres facteurs d'initiation, mais également par la concentration en magnésium (Mg²⁺) libre. Par conséquent, il est encore difficile de conclure en faveur d'un ordre de fixation bien précis (Petrov et al., 2012).

IF2 accélère non seulement la fixation du fMet-ARNt^{fMet} au niveau du site P du 30S, mais il permet également de positionner correctement le fMet-ARNt^{fMet} afin de permettre la mise en place de l'interaction codon-anticodon (La Teana et al., 1996). Par ailleurs, il a été démontré qu'IF2 accélère également la fixation de la sous-unité 50S sur le 30SIC (Antoun et al., 2003). IF2 est également impliqué dans le mécanisme particulier de l'initiation de la traduction des ARNm sans extrémité 5' non traduite (Grill et al., 2000).

Chez la bactérie, beaucoup d'ARNm sont polycistroniques et une fois que le ribosome a fini de traduire un cistron, il peut directement traduire le cistron suivant sans se détacher de l'ARNm selon un mécanisme dit de ré-initiation. Il a été observé qu'IF2 permet d'augmenter l'efficacité de cette ré-initiation (Yoo and RajBhandary, 2008).

En dehors de l'initiation de la traduction, il a été suggéré qu'IF2, en interagissant avec la Guanosine PentaPhosphate (ppGpp) au niveau du domaine G, joue également un rôle de senseur métabolique. De plus, une fois fixé au facteur, le ppGpp bloque la traduction et par conséquent permet une régulation de la synthèse protéique (Milon et al., 2006).

c) Le facteur d'initiation IF3

IF3, codée par le gène *infC*, est une protéine de petite taille (20,4 kDa) essentielle pour la bactérie. La première structure du facteur, obtenue par RMN (Garcia et al., 1995), montre qu'IF3 est composé de 2 domaines de taille équivalente (IF3N et IF3C) connectés par une région flexible non structurée de 20 acides aminés (**Fig. 11**) (Hua and Raleigh, 1998). Chacun des deux domaines interagit avec le ribosome de façon indépendante et avec une affinité pour le 30S qui lui est propre. De ces deux domaines, IF3C possède l'affinité la plus forte pour le 30S et il a été démontré qu'il se fixe en premier sur le ribosome (Sette et al., 1999).

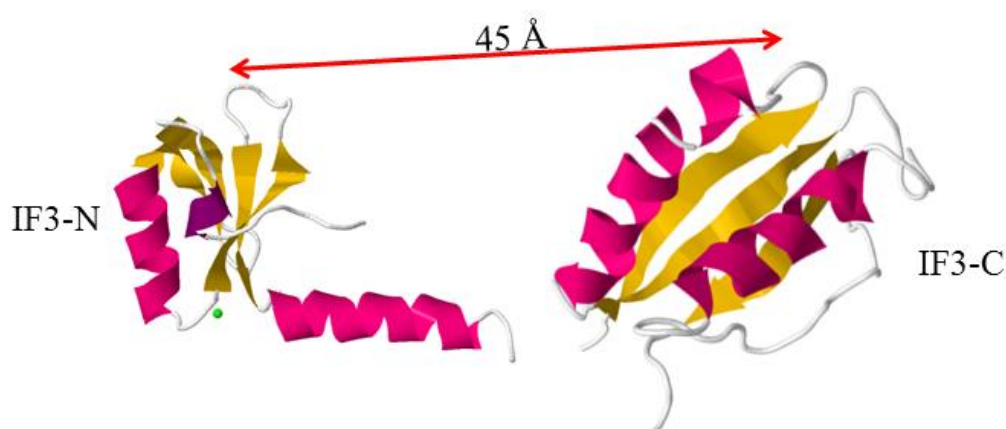


Figure 11 : Structure cristallographique du domaine IF3-N de *B. stearothermophilus* (PDB code 1TIF) du domaine IF3-C de *E. coli* (PDB code 2IFE). Ces 2 domaines sont reliés par une région non structurée de 20 acides aminés. Les hélices sont en mauve et les feuillets en jaune.

Le facteur présente une importance capitale dans le cadre de la formation du complexe d'initiation. Tout d'abord, en interagissant avec le 30S, il empêche l'association de la sous-unité 50S rendant la formation du ribosome impossible. On qualifie son activité d'anti-associante (Grunberg-Manago et al., 1975). Il a récemment été démontré qu'IF3 facilite également le recyclage du ribosome par le facteur RRF, en participant à la dissociation de l'ARNt déacylé présent dans le site P tout en empêchant la réassociation des 2 sous-unités ribosomales (Singh et al., 2005).

IF3 augmente non seulement la vitesse de formation du complexe d'initiation 30S d'environ 20 fois, mais permet aussi de sélectionner spécifiquement le fMet-ARNt^{fMet} (Hartz et al., 1989; Wintermeyer and Gualerzi, 1983). En effet IF3 facilite la mise en place de

l'interaction codon-anticodon et, par ailleurs, assure la fidélité de l'initiation en augmentant la vitesse de dissociation des ARNt élongateur (Gualerzi et al., 1977 ; Hartz et al., 1989). On sait de plus qu'IF3 est capable de discriminer les codons d'initiation non canoniques (AUU) des codons d'initiation AUG (Grigoriadou et al., 2007). Ainsi, en présence d'un AUU dans le site P, IF3 se dissocie très lentement, inhibant la formation du 70SIC et donc le passage en phase d'élongation (Milon et al., 2008). Enfin, IF3 permet l'ajustement de l'ARNm au sein du 30S, faisant en sorte que l'AUG soit correctement positionné dans le site P dans le but de permettre l'interaction codon-anticodon (La Teana et al., 1995).

In vitro, le domaine IF3C est capable d'accomplir à lui seul, la majorité des fonctions du facteur complet (Petrelli et al., 2001). On constate cependant qu'IF3N contribue à plusieurs activités : il stabilise la fixation d'IF3 sur le 30S (Petrelli et al., 2001), il est également impliqué dans la sélection du fMet-ARNt^{fMet}, dans la reconnaissance du codon d'initiation ainsi que dans l'initiation des ARNm dépourvu de 5'-UTR (Maar et al., 2008).

In vivo, la région flexible reliant les 2 domaines impliquée dans la sélection spécifique du fMet-ARNt^{fMet} (de Cock et al., 1999).

d) L'ARN messenger bactérien

Au cours de l'initiation de la traduction, l'ARNm interagit avec le ribosome au niveau de l'ARNr 16S, mais également avec l'ARNt au niveau du site P. Le messenger se fixe à la sous-unité 30S par l'intermédiaire d'une région spécifique appelée TIR (Translation Initiation Region). Cette région, qui couvre les positions -20 à +15 par rapport au codon d'initiation (Dreyfus, 1988), contient le codon d'initiation, la séquence Shine - Dalgarno, un espaceur et une région riche en adénine et/ou en uracile. Elle permet de positionner correctement et rapidement le messenger au sein du ribosome.

i. Le codon d'initiation :

Dans la majorité des cas, chez *E. coli*, l'initiation de la synthèse protéique débute par un codon AUG (90%). Elle peut également débiter par les codons GUG (8%) ou UGG (1%), AUU (moins de 0,1%), voire même AUC et CAU (encore plus rare) (Osterman et al., 2013). Les codons GUG et UGG peuvent servir d'initiateur car ils sont reconnus par l'anti-codon du

fMet-ARNt^{fMet} grâce à la formation d'une paire de base "wooble" au niveau du premier nucléotide du codon initiateur (Asano, 2014).

Très rarement, le codon AUU peut également initier la traduction lorsque la concentration en IF3 intracellulaire est faible. Dans ces conditions, la stringence de l'initiation diminue rendant l'initiation possible à partir d'un codon AUU. Ce phénomène a été observé au niveau de l'ARNm d'IF3 et il a été conclu qu'IF3, en régulant l'expression de son propre gène, est impliqué dans la fidélité de l'initiation (Butler et al., 1987).

ii. La séquence Shine - Dalgarno :

Découverte en 1974, la séquence Shine - Dalgarno (SD), riche en purine, se trouve dans l'extrémité 5' non traduite des ARNm. La fixation du messager au ribosome est possible car cette séquence est complémentaire avec l'extrémité 3' de l'ARNr 16S appelée séquence anti-Shine - Dalgarno (aSD) (Shine and Dalgarno, 1974). La mise en place de cette interaction est très importante car elle permet le bon positionnement du codon d'initiation de la traduction dans le site P (**Fig. 12**).

En revanche, un séquençage complet d'un grand nombre de génomes bactériens a montré que seuls 40% des ARNm contiennent une séquence SD clairement identifiable. Chez *E. coli*, la séquence consensus de la SD est GGAGG (Ma et al., 2002). De plus, il existe de nombreux ARNm dépourvus d'extrémité 5' non traduite, leur séquence commençant donc directement par le codon d'initiation. Il a été démontré dans ce cas que l'ARNm est reconnu directement par un complexe d'initiation 30S-IF2- fMet-ARNt^{fMet} (Grill et al., 2000).

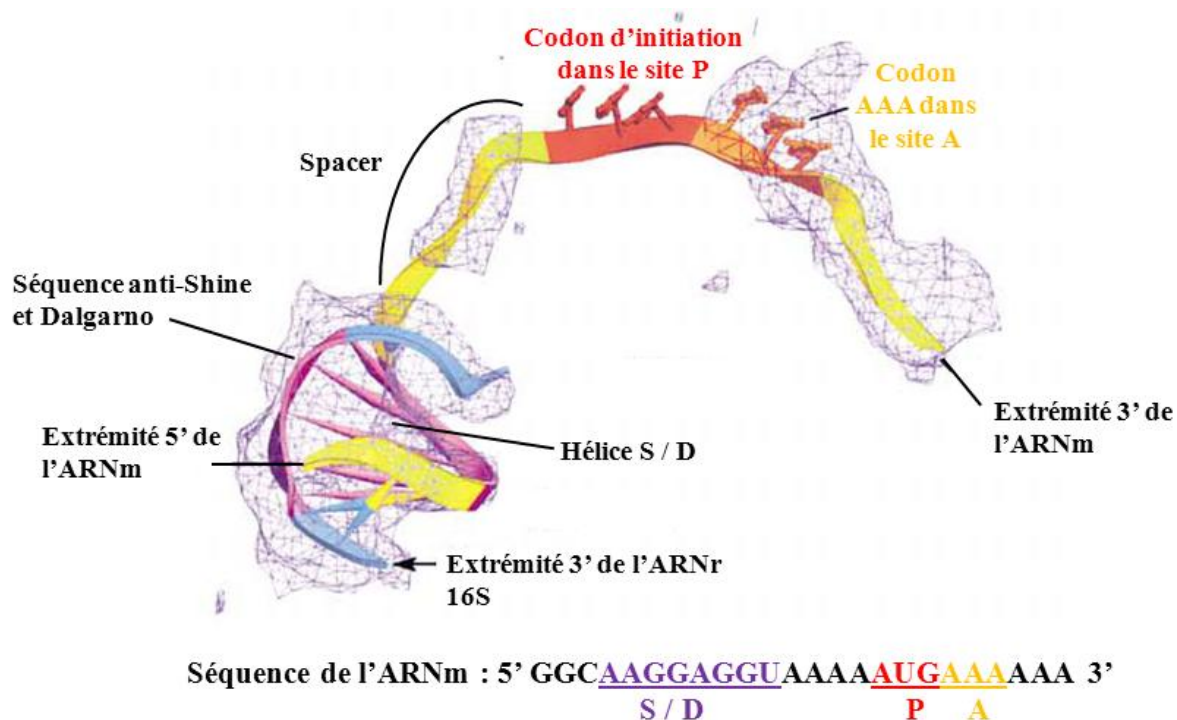


Figure 12 : (Adaptée de Yusupova et al., 2001) : Structure cristallographique de l'ARNm à l'intérieur du 70S de *T. thermophilus*. Présence de l'hélice Shine et Dalgarno (en magenta), de la partie 3' de l'ARNr 16S (en cyan), du positionnement du codon d'initiation dans le site P et du codon suivant dans le site A(en rouge et en orange respectivement). Le reste de l'ARNm est en jaune.

iii. L'espaceur :

Présent entre la séquence SD et le 1^{er} AUG, il a été démontré que l'espaceur affecte l'efficacité de la traduction. La présence de ces nucléotides permet de faire le lien entre le site d'interaction SD-aSD et le site P où doit se positionner l'AUG pour interagir avec le fMet-ARNt^{fMet} (**Fig. 12**). Par comparaison de séquence, on estime que l'espaceur varie entre 5 et 13 nucléotides, un espacement de 5 nucléotides permettant une traduction optimale (Chen et al., 1994).

Beaucoup d'ARNm présentent des structures secondaires au sein de la TIR, permettant ainsi aux bactéries de réguler l'expression de nombreux gènes (de Smit and van Duin, 1990). En présence d'une telle structure dans la TIR, le messenger est amené à se fixer sur le ribosome en deux temps. Une région riche en adénine et en uracile est souvent présente dans l'extrémité 5' non traduite, elle permet la mise en place d'une première interaction avec le ribosome au niveau d'un site de pré-initiation localisé au niveau de la plateforme (Marzi et al., 2007). Puis,

grâce à la protéine S1, l'ARNm est déplié pour ensuite intégrer le tunnel de décodage (Duval et al., 2013).

Une fois l'ARNm correctement positionné, 30 bases environ se retrouvent dans le tunnel de décodage. Ainsi durant l'initiation, le ribosome interagit avec les nucléotides allant de la position -15 à +15 (Yusupova et al., 2001).

La plupart des ARNm présentent des structures secondaires au sein de leur séquence codantes. Ainsi, durant la synthèse protéique, l'ARNm doit être déplié pour pouvoir être décodé. Il a été démontré que les protéines S3, S4 et S5 jouent un rôle d'hélicase ATP indépendante permettant à l'ARNm d'entrer dans le tunnel de décodage (Takyar et al., 2005).

e) L'ARNt initiateur chez les bactéries (fMet-ARNt^{fMet})

Dans le monde vivant, la synthèse protéique débute systématiquement par le même acide aminé : la méthionine. Cette méthionine est incorporée par un ARNt initiateur spécifique qui reconnaît principalement le codon d'initiation AUG. En effet, l'interaction codon-anticodon est la plus stable quand il s'agit d'un codon AUG. Chez les procaryotes, la méthionine est de plus formylée et le fMet-ARNt^{fMet} peut également interagir avec les codons UGG et UUG ; la mise en place de 2 paires de bases suffit pour initier la traduction. Cependant, ces codons UGG et UUG contribuent faiblement à l'initiation de la synthèse protéique (Kozak, 1999).

Le fMet-ARNt^{fMet} présente de réelles spécificités structurales par rapport à un ARNt élongateur (**Fig. 13**). Tout d'abord, l'ARNt initiateur est caractérisé par la présence d'une paire de base non Watson Crick entre les nucléotides 1 et 72 (RajBhandary, 1994). Cet appariement spécifique permet à la molécule de ne pas être reconnue par le facteur d'élongation EF-Tu et intervient dans le processus de formylation (Varshney et al., 1993). L'ARNt^{fMet} possède une paire de base purine - pyrimidine en position 11 : 24 à la place d'une paire de base consensus pyrimidine – pyrimidine (**Fig. 13**). Cette caractéristique subtile affecte la cinétique de formylation de l'ARNt (Varshney et al., 1993). Enfin, la molécule contient également 3 paires de bases GC à la base de la tige de l'anticodon (**Fig. 13**). Cette particularité réduit la flexibilité de la tige boucle lui permettant de s'insérer directement dans le site P (Seong and RajBhandary, 1987).

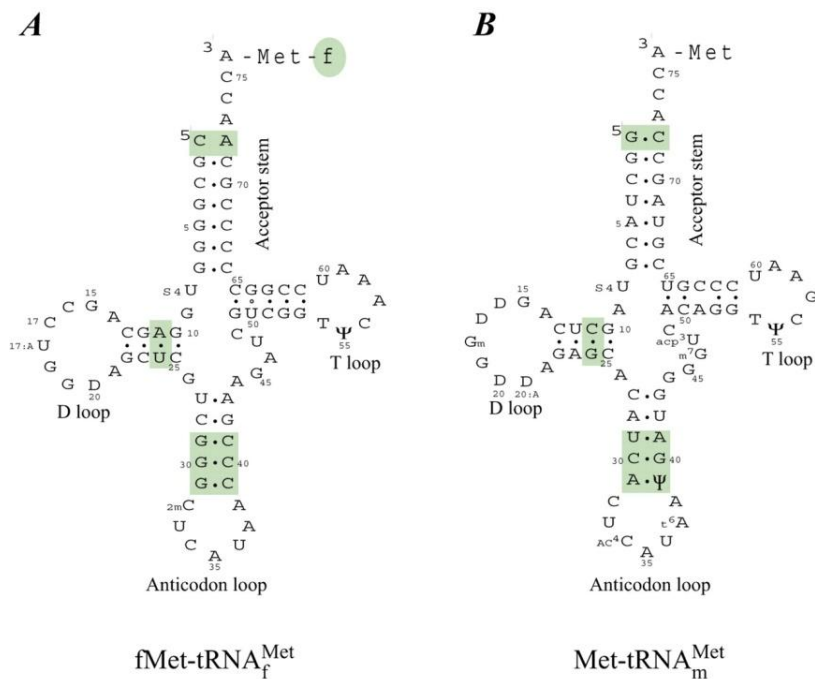


Figure 13 : (Tirée de Laursen et al., 2005) Représentation de la structure secondaire du fMet-ARNt^{fMet} (A) et de l'ARNt méthionine élongateur (B) chez *E. coli*. Les différences entre les 2 ARNt sont représentées par les encadrés en couleur.

Le fMet-ARNt^{fMet} est méthionylé par la méthionyl-ARNt-synthétase (MetRS). L'enzyme reconnaît spécifiquement l'anticodon de l'ARNt, c'est pourquoi elle peut à la fois aminoacyler l'ARNt initiateur et les ARNt méthionine élongateurs (Mechulam et al., 1999).

Une fois l'ARNt^{fMet} aminoacylé, la méthionine est formylée par la méthionyl-ARNt formyltransférase (Schmitt et al., 1998). L'enzyme reconnaît spécifiquement le fMet-ARNt^{fMet} grâce au mésappariement présent entre les bases 1 et 72 (**Fig. 13**). Cette formylation, uniquement observée chez les bactéries, les chloroplastes et les mitochondries, favorise la reconnaissance du fMet-ARNt^{fMet} par IF2 (Sundari et al., 1976). Le groupement formyl est ainsi très important pour l'initiation de la traduction ; en revanche, une fois la synthèse initiée, ce groupement est enlevé dans la plupart des cas; il en est de même pour la majorité des méthionines présente à l'extrémité N-ter (Kozak, 1983).

2. La formation du complexe d'initiation 30S (30SIC)

L'association des 3 facteurs d'initiation, de l'ARNm et du fMet-ARNt^{fMet} sur la sous-unité 30S conduit rapidement à la formation d'un complexe de pré-initiation 30S (30S PIC) instable.

A ce stade, l'ARNm, s'il présente des structures secondaires, se fixe au ribosome grâce à sa région simple brin riche en A-U, au niveau du site de pré-initiation localisé près de la plateforme du 30S (Marzi et al., 2007). Par conséquent, la 1^{ère} interaction entre le 30S et l'ARNm se réalise indépendamment de l'interaction SD-aSD. Une fois l'ARNm déplié par la protéine S1, il peut s'accommoder dans le tunnel de décodage et l'interaction SD-aSD est alors mise en place, stabilisant ainsi le messenger au niveau du 30S (Studer and Joseph, 2006). Il a été démontré que, ni les facteurs d'initiation, ni le fMet-ARNt^{fMet}, n'influencent l'affinité de l'ARNm pour le 30S (Studer and Joseph, 2006).

Au sein du complexe 30S PIC, le fMet-ARNt^{fMet} est fixé dans un premier temps de manière codon-indépendante (**Fig. 14**). L'interaction codon-anticodon se met ensuite en place au niveau du site P grâce à un changement de conformation du ribosome. Ce remaniement conduit à la formation d'un complexe d'initiation 30S (30SIC) stable, qui constitue la première grande étape de l'initiation (**Fig. 14**).

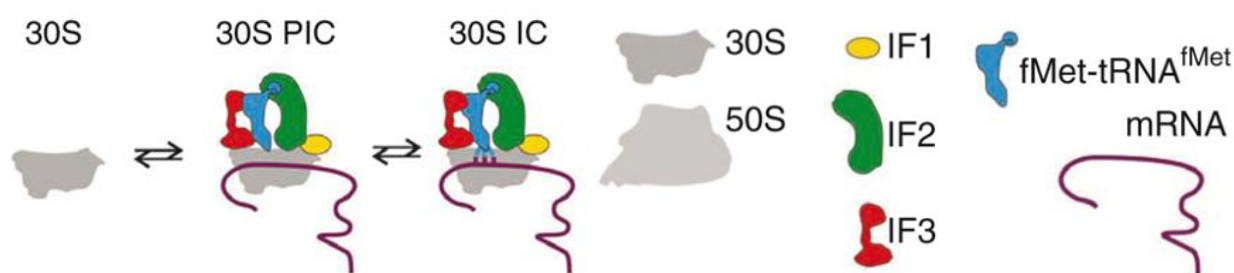


Figure 14 : (Tirée de Milon et al., 2012) Schéma de la formation du complexe d'initiation 30SIC chez *E. coli*.

Du fait que chacun des partenaires peut s'associer *in vitro* au ribosome de façon indépendante, il a longtemps été supposé que la formation du PIC se faisait de manière aléatoire (Gualerzi and Pon, 1990). Mais l'accumulation des données sur l'initiation a modifié cette vision sur la formation du complexe d'initiation. En effet, lors de l'étape de recyclage du ribosome, il a été observé qu'IF3 permettait à la fois l'élimination de l'ARNt déacylé présent

dans le site P ainsi que la dissociation de l'ARNm (Peske et al., 2005). De plus, une fois le 70S dissocié, il a été démontré qu'IF3 empêche la réassociation des sous-unités ribosomales permettant par la suite un nouveau cycle de traduction (Peske et al., 2005). Sur cette base, on peut émettre l'hypothèse qu'IF3 devrait être le premier facteur à venir se fixer sur le 30S.

De plus, à l'opposé de l'hypothèse initiale, une forme de synergie entre les facteurs a été démontrée par plusieurs groupes. Par exemple, IF2 est plus affin pour le 30S quand IF1 et IF3 sont déjà fixés (Weiel and Hershey, 1982). De même, l'affinité d'IF1 pour le ribosome est maximale quand IF2 et IF3 interagissent déjà avec ce dernier (Zucker and Hershey, 1986). En revanche, d'après cette étude, la présence d'IF1 et d'IF2 ne modifie pas l'affinité d'IF3 pour le ribosome (Zucker and Hershey, 1986). Ainsi, l'association des facteurs au 30S provoquent un changement de conformation, modifiant l'affinité du partenaire suivant.

De plus, il a récemment été démontré la présence d'une voie d'association des facteurs d'initiation cinétiquement préférentielle (Milon et al., 2012). Cette étude, menée grâce à l'utilisation de protéines marquées et du FRET (Förster Resonance Energy Transfert), a permis de déterminer les vitesses d'association des facteurs d'initiation. Il a ainsi été proposé qu'IF3 vienne se fixer en premier au 30S, suivi de près par IF2, les résultats montrant que ces deux protéines s'associent très rapidement au ribosome. IF1 viendrait ensuite interagir avec le 30S, le fMet-ARNt^{fMet} étant la dernière molécule à compléter le complexe (Milon et al., 2012). Le fait de retrouver le fMet-ARNt^{fMet} en dernière position n'a rien de surprenant étant donné que son recrutement est directement dépendant des 3 facteurs d'initiation.

La formation du 30SIC représente le premier point de contrôle de l'initiation, la position du codon d'initiation AUG de l'ARNm au niveau du site P étant essentielle dans la sélection du bon cadre de lecture (La Teana et al., 1995 ; Milon et al., 2008). De plus, il faut que le fMet-ARNt^{fMet} soit correctement recruté à cette étape, ceci est contrôlé par IF2 et IF3 (Gualerzi et al., 1977 ; Hartz et al., 1989). En effet, si ces étapes préalables ne sont pas correctement établies, IF3 empêche alors la fixation du 50S et donc la conversion du complexe en 70SIC en déstabilisant l'ARNt et en ralentissant l'association du 50S à tel point que le 30SIC finit par se dissocier (Antoun et al., 2006).

3. La conversion vers le complexe d'initiation 70S (70SIC)

La formation du 70SIC, qui représente la dernière étape de l'initiation, est caractérisée par l'association de la grande sous-unité ribosomale, l'hydrolyse du GTP par IF2 et le relargage de l'ensemble des facteurs d'initiation. Une fois le 30SIC formé, il a été observé par cryo-EM une rotation de la tête du 30S par rapport au corps. Ce changement de conformation semblerait permettre une association rapide du 50S et une augmentation de la dissociation des facteurs (Julian et al., 2011). Une fois la conversion réalisée, le ribosome bascule définitivement en élongation. La formation du 70SIC représente donc bien l'ultime étape de contrôle avant le démarrage irréversible de la synthèse protéique.

Dans un 1^{er} temps, IF2-GTP, présent sur le 30S, recrute le 50S en augmentant la vitesse d'association. En effet, il a été observé qu'IF2, en interagissant avec la protéine ribosomale L12 du 50S, accélère la mise en place du 70SIC de plus de 40 fois (Huang et al., 2010). La présence de GTP est très importante ; en effet sa substitution par du GDP ralentit considérablement la formation du 70SIC. En revanche, la vitesse ne change pas en présence d'un analogue non-hydrolysable du GTP ; ce qui indique que l'hydrolyse n'intervient pas dans la cinétique de formation du 70SIC (Antoun et al., 2003).

Des expériences de cartographie chimique ont montré que la fixation du 50S se réalise de manière séquentielle. Certaines interactions se mettent en place instantanément, d'autres nécessitent plus de temps ou requièrent un changement de conformation (Hennelly et al., 2005).

Le 50S interagit tout d'abord de manière réversible avec le 30S. La grande sous-unité active ensuite IF2 qui hydrolyse son GTP (**Fig. 15**) (MacDougall and Gonzalez, 2015). A ce stade, il a été montré qu'IF3 influence la stabilité de l'interaction 50S - 30SIC en empêchant la formation de la zone d'interaction B2b (**Fig. 3**) (Julian et al., 2011). Puis, au fur et à mesure que les interactions entre le 30S et le 50S, IF3 se dissocie en deux temps : d'abord par le domaine IF3N puis par le domaine IF3C (Fabbretti et al., 2007). La dissociation d'IF3, indépendante de l'hydrolyse du GTP (Goyal et al., 2015), conduit à la formation irréversible du complexe 70SIC. Ce caractère irréversible fait de la dissociation d'IF3 une étape clef dans l'initiation de la traduction (Grigoriadou et al., 2007).

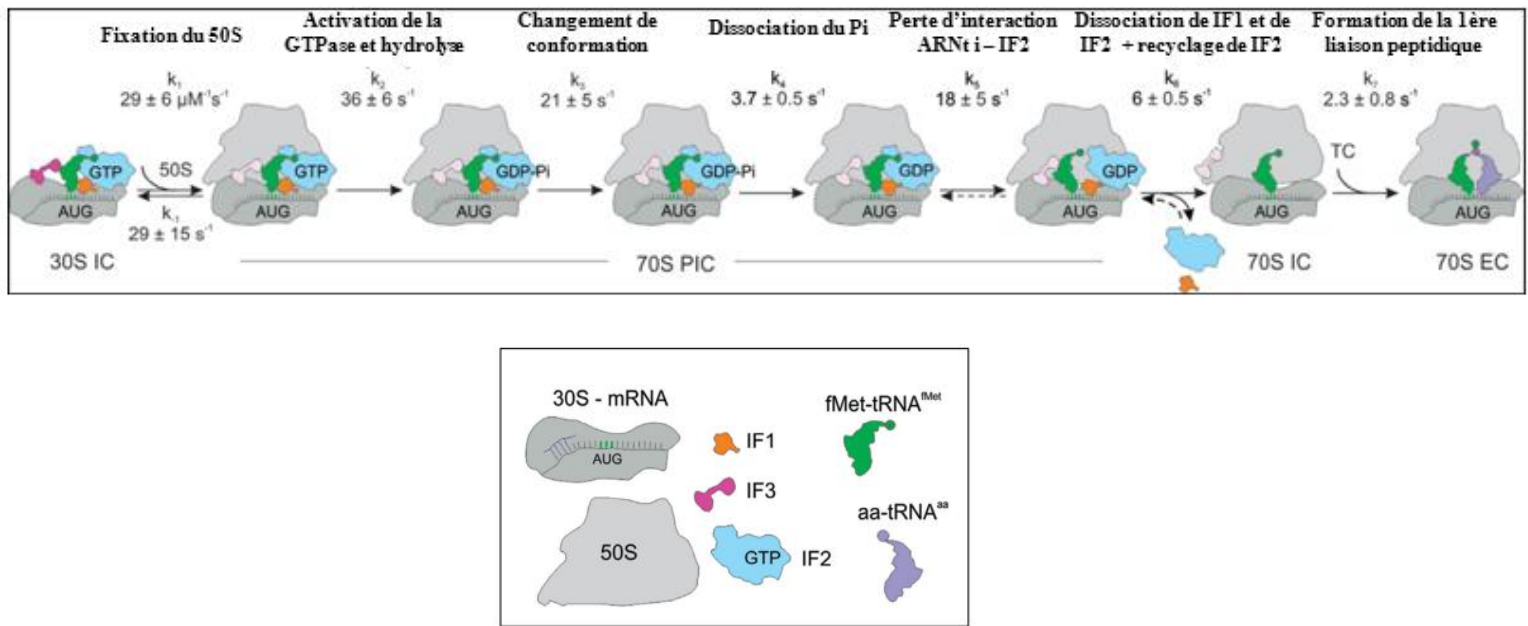


Figure 15 : (Tirée de Goyal et al., 2015) : Représentation schématique de la conversion du 30SIC en 70SIC. La formation de la 1^{ère} liaison peptidique représente le passage à un complexe d'élongation 70SEC. Sur le schéma figure également la constante cinétique de chaque étape. Du fait que le IF3 peut se dissocier à tout moment durant la formation du 70SIC, il a été représenté en gris dès lors que le 50S interagit avec le 30SIC.

Une fois l'hydrolyse du GTP réalisée, le ribosome subit d'importants changements de conformation, particulièrement au niveau du site de fixation d'IF1 (**Fig. 15**). Le phosphate inorganique est ensuite relargué et l'interaction entre le fMet-ARNt^{fMet} et IF2 est rompue (Goyal et al., 2015). L'absence d'interaction avec IF2 permet alors au bras accepteur du fMet-ARNt^{fMet} d'être accommodé dans le centre peptidyl-transférase du 50S (Myasnikov et al., 2005). Enfin, IF1 et IF2-GDP se dissocient du 70S permettant au ribosome d'entrer définitivement en phase d'élongation (**Fig. 15**).

III. Etape de l'élongation en détails

1. Les étapes de l'élongation chez les bactéries

a) Le décodage : le complexe ternaire EF-Tu/GTP - aa-ARNt

Comme IF2, EF-Tu appartient de la famille des protéines G. Ce facteur, en amenant au ribosome les différents aminoacyl-ARNt nécessaires à la synthèse protéique, joue un rôle

central dans l'élongation. Ainsi, EF-Tu est la protéine la plus abondante chez *E. coli*, il représente à lui seul 5 à 10 % des protéines totales. Sa concentration cellulaire (0,1 à 0,2 mM) est par conséquent 10 fois supérieure à celle du ribosome.

EF-Tu étant une GTPase, cette protéine possède de l'affinité pour le GTP et le GDP. L'hydrolyse du GTP conditionne la structure d'EF-Tu qui oscille entre deux conformations distinctes. Associé au GTP, EF-Tu prend une conformation qui lui permet d'avoir une forte affinité pour l'aa-ARNt (Weijland et al., 1992). En revanche, une fois l'hydrolyse du GTP réalisée, le facteur perd son affinité pour le substrat et se dissocie du ribosome. La présence d'un ion Mg^{2+} est également essentielle pour permettre la fixation et le bon positionnement du GTP dans son site (**Fig. 16**) (Song et al., 1999).

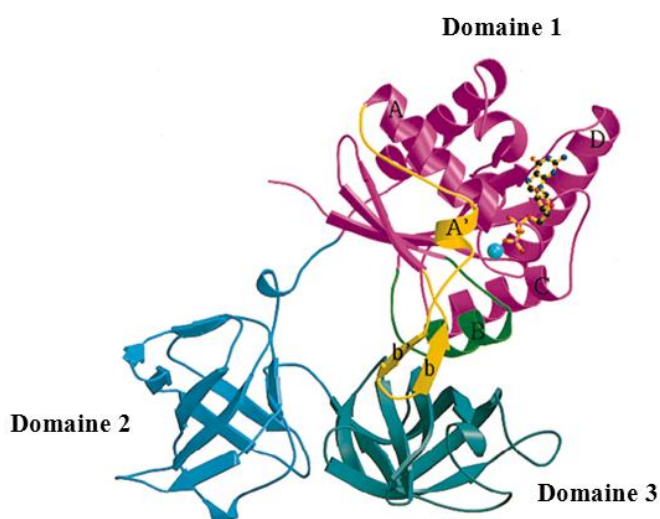


Figure 16 : (Adaptée de Song et al., 1999) Structure cristallographique du facteur d'élongation EF-Tu de *E. coli* couplé à une molécule de GDP. Représentation des 3 domaines composant le facteur. L'ion Mg^{2+} est représenté par une sphère de couleur cyan. En jaune et en vert sont représentées les régions qui changent de conformation suivant que EF-Tu est couplé au GTP ou au GDP.

Encodé par 2 gènes, *tufA* et *tufB*, EF-Tu est composé de 3 domaines. Le domaine 1, également appelé domaine G, permet la fixation et l'hydrolyse du GTP. Il présente un motif structural de type repliement de Rossmann ('Rossmann fold') comprenant à la fois des hélices et un feuillet β à brins parallèles (**Fig. 16**). En revanche, les domaines 2 et 3 contiennent uniquement des brins β antiparallèles et sont impliqués dans la fixation de l'ARNt (**Fig. 16**). EF-Tu est incapable de différencier un ARNt correctement aminoacylé ou non, cette fonction étant assurée par les aminoacyl-ARNt synthétases. En revanche, il est capable de discriminer les ARNt déacylés des ARNt chargés (Pingoud et al., 1977).

L'obtention de la structure du complexe EF-Tu/GTP - aa-ARNt a permis d'identifier les zones de contacts entre le facteur et l'aa-ARNt élongateur. Ainsi, les 3 domaines de EF-Tu sont impliqués dans la fixation de l'aa-ARNt. Les domaines 1 et 2 interagissent avec

l'extrémité 3'-CCA - aminoacide de l'aa-ARNt. De cette manière, la liaison ester entre l'acide aminé et l'aa-ARNt se trouve protégée de l'hydrolyse (**Fig. 17**). D'autre part, le domaine 3 fixe un côté de la tige T et l'extrémité 5' de l'aa-ARNt, ainsi qu'une partie de la tige acceptrice, interagissent au niveau de l'interface des 3 domaines du facteur (**Fig. 17**) (Nissen et al., 1996).

Une fois sous la forme d'un complexe ternaire, EF-Tu délivre l'aa-ARNt dans le site A du 30S de manière codon-indépendante (Rodnina et al., 1996). Tant que l'interaction codon-anticodon n'est pas en place, le complexe reste labile et EF-Tu/GTP - aa-ARNt peut se dissocier du ribosome. La mise en place de l'interaction codon - anticodon, qui nécessite la présence d'ion Mg^{2+} , stabilise ensuite le complexe avec le ribosome (Rodnina et al., 1996).

Le complexe EF-Tu/GTP - aa-ARNt interagit avec les 2 sous-unités du ribosome. La boucle de l'anticodon de l'aa-ARNt s'associe au centre de décodage du 30S, le petit sillon de la tige D de l'aa-ARNt interagit également avec la protéine S12 et la boucle T avec l'ARNr 23S. EF-Tu, comme toutes les GTPases, interagit avec sa boucle P du domaine 1 au niveau de la boucle sarcine-ricine (SRL) de l'ARNr 23S (**Fig. 17**) (Carvalho et al., 2015). La protéine ribosomale L12 interagit également avec EF-Tu (Stark et al., 2002).

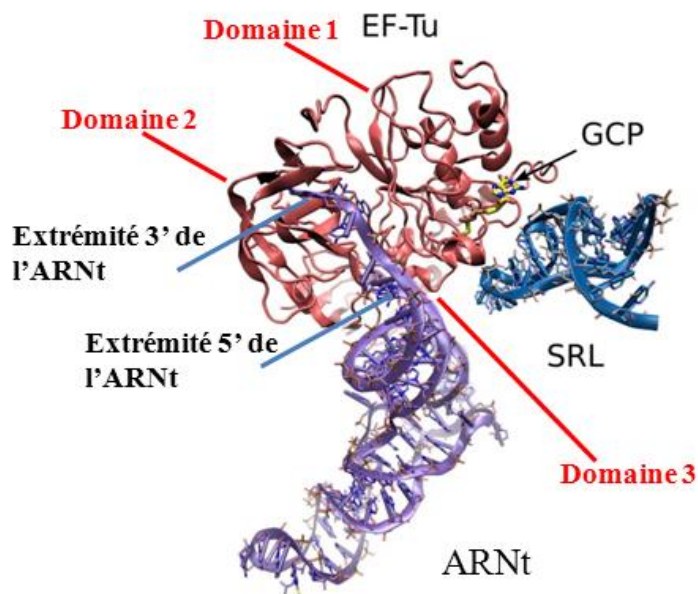


Figure 17 : (Tirée de Carvalho et al., 2015) Structure cristallographique du complexe ternaire aa-ARNt - EF-Tu/GCP au sein du 70S. L'ARNt est en violet et EF-Tu en rouge, le facteur est couplé à un analogue non hydrolysable du GTP : le GCP. Cette structure permet également de voir l'interaction entre la boucle P du facteur et la boucle sarcine-ricine (SRL) de l'ARNr 23S du 50S.

Le changement de conformation de EF-Tu consécutive à l'hydrolyse du GTP entraîne sa dissociation de l'aa-ARNt. Le bras accepteur de ce dernier va ensuite s'accommoder dans le centre peptidyl-transférase pour réagir instantanément avec le peptide présent sur l'ARNt du site P. Enfin, EF-Tu/GDP va se dissocier du ribosome ; cette étape de dissociation représente l'évènement le plus lent de l'ensemble des réactions impliquant cette protéine (Pape et al., 1998).

b) La translocation, le facteur EF-G

Synthétisé à partir du gène *fusA*, le facteur d'élongation EF-G fait également partie de la famille des GTPases. Complexé au GTP, ce facteur a pour but de catalyser la réaction de translocation. Avec une longueur de 100 Angströms, EF-G est divisé en 5 domaines : le domaine N-ter ou domaine G qui fixe le GTP et les domaines 2 à 5 (Czworkowski et al., 1994). Comme pour EF-Tu, le domaine G vient également s'associer au niveau de la boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S. C'est au niveau de ce site que l'hydrolyse du GTP sera déclenchée.

Durant la translocation, l'ARNt déacylé est transféré du site P au site E tandis que le peptidyl-ARNt est déplacé du site A au site P. Le site A étant alors inoccupé, un nouveau complexe aa-ARNt - EF-Tu/GTP peut venir s'y fixer (Ramakrishnan, 2002). Il a été démontré que cette étape nécessite une rotation au préalable de la petite sous-unité 30S par rapport au 50S. Par conséquent, les ARNt passent successivement d'un stade A(30S)/A(50S) et P(30S)/P(50S) à un stade hybride A(30S)/P(50S) et P(30S)/E(50S) (**Fig. 18**). Autrement dit, la tige-boucle de l'anticodon est toujours dans le site A du 30S lorsque le bras accepteur est dans le site P du 50S (Zhang et al., 2009). Cet état n'étant pas figé, la réaction reverse peut avoir lieu à tout moment, le 30S oscille donc sans cesse entre les deux orientations (**Fig. 18**).

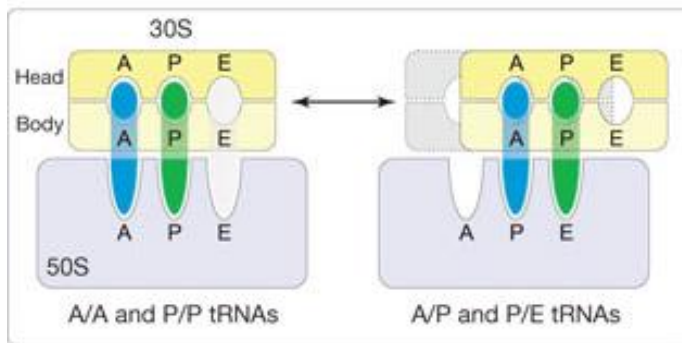


Figure 18 : (Tirée de Ratje et al., 2010) Représentation du ribosome en phase pré-translocationnelle. Existence d'un équilibre entre une forme classique (a) et une forme où le 30S présente une rotation (b) Quand le 30S est décalé par rapport au 50S, les ARNt se retrouvent dans un état hybride avec le bras accepteur dans le site P et E et la tige boucle de l'anticodon dans le site A et P (b).

La fixation d'EF-G, favorise en revanche la conformation où le 30S présente une rotation (**Fig. 18**) (Pulk and Cate, 2013). L'hydrolyse du GTP conduit au déplacement de l'ARNm et les tiges boucles des anticodons des ARNt translatent alors vers les sites E et P. Une fois le phosphate inorganique relargué, EF-G et l'ARNt déacylé se dissocient du site E. L'hydrolyse du GTP permettrait donc le déplacement du ribosome ainsi que la dissociation du facteur EF-G (Belardinelli et al., 2016).

Comparé à d'autres GTPases, EF-G ne nécessite aucun facteur de recyclage. Il peut échanger spontanément et très rapidement le GDP par un GTP (Savelsbergh et al., 2000).

c) Le recyclage de EF-Tu, le facteur EF-Ts

Une fois le GTP hydrolysé, le complexe EF-Tu/GDP se dissocie du ribosome. Sous sa forme couplée au GDP, EF-Tu est non fonctionnel. Par conséquent, pour fixer un nouvel aa-ARNt, il faut absolument que le facteur échange son GDP contre un GTP. Cependant, EF-Tu, présente 100 fois plus d'affinité pour le GDP. Ainsi, EF-Tu requiert le facteur d'échange EF-Ts. Ce dernier a pour but d'augmenter la vitesse de dissociation du GDP de 60 000 fois (Gromadski et al., 2002).

EF-Ts, avec une taille de 282 acides aminés, est codé par le gène *tsf*. Le complexe EF-Tu/EF-Ts a été cristallisé et sa structure résolue (**Fig. 19**). EF-Ts, de forme allongée peut-être subdivisée en 4 domaines : le domaine N-ter, le domaine central, le site de dimérisation et le module C-ter (**Fig. 19**) (Kawashima et al., 1996).

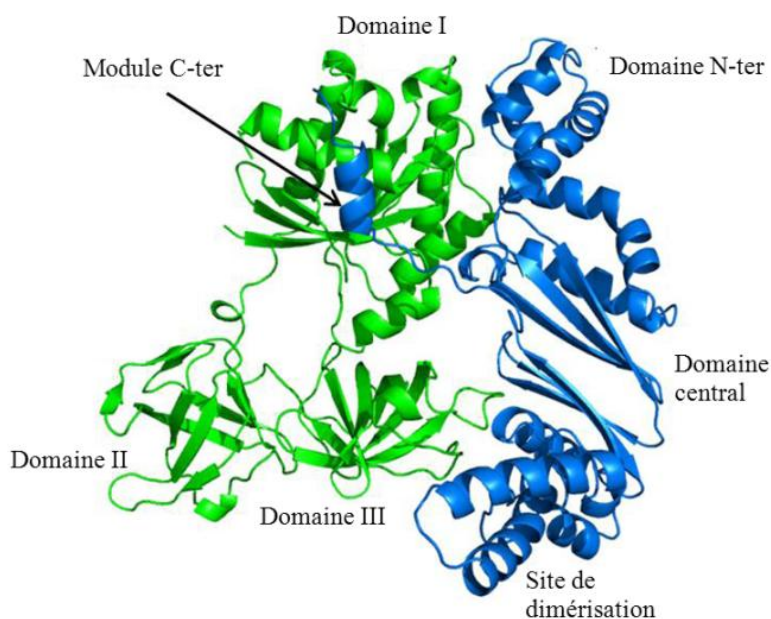


Figure 19 : (Tirée de la PDB : 1EFU) Structure cristallographique du complexe EF-Tu – EF-Ts de *E. coli* (EF-Tu en vert et EF-Ts en bleu). Les 3 domaines de EF-Tu sont représentés, de même que les 4 domaines de EF-Ts.

L'interaction entre le domaine I de EF-Tu et le domaine N-ter de EF-Ts permet la dissociation du GDP (**Fig. 19**). En effet, EF-Ts induit un changement de conformation de la boucle P du domaine I de EF-Tu, ce qui altère le site de fixation des phosphates du nucléotide et casse une liaison de coordination avec un ion Mg^{2+} . Ces événements ont pour conséquence une importante diminution de l'affinité pour le GDP induisant sa dissociation (Kawashima et al., 1996).

La mise en place d'une interaction entre l'hélice D de EF-Tu et le domaine N-ter de EF-Ts permet également d'augmenter la vitesse de dissociation du GTP (Wieden et al., 2002).

2. Le mécanisme de trans-translation

Bien que la synthèse protéique soit très contrôlée chez les bactéries, il arrive néanmoins que le ribosome se bloque en cours de traduction. Deux situations sont responsables d'un ralentissement de la traduction, voire d'un blocage du 70S. Lorsque le ribosome est ralenti ou arrêté en cours de traduction alors que le codon stop n'est pas atteint ; on parle d'ARNm '*no-go*'. Lorsque le ribosome se retrouve bloqué en fin de messenger sans avoir rencontré un codon stop, on qualifie cet ARNm de '*non-stop*' (Mace et al., 2015). Dans ces deux cas, le ribosome se retrouve à l'arrêt sur l'ARNm, toujours associé aux ARNt et au polypeptide incomplet.

Dans le cas des ARNm '*non-stop*', trois mécanismes permettent de résoudre rapidement le problème : la trans-translation et les systèmes alternatifs ArfA (alternative ribosome rescue factor A) et ArfB.

La trans-translation, qui représente le principal mécanisme d'échappement, est presque exclusivement présente dans le monde bactérien. Ce processus comprend un ARN transfert-messager (ARNtm), molécule hybride possédant à la fois les propriétés d'un ARNm et d'un ARNt, couplé à une protéine SmPB (Small basic protein B) (Gillet and Felden, 2007).

La protéine SmPB détecte non seulement les ribosomes bloqués mais sert également à maintenir la conformation tridimensionnelle de l'ARNtm pour le positionner correctement afin qu'il puisse être traduit. Cet ARNtm, aminoacylé par une alanine, est ainsi amené au ribosome par le facteur EF-Tu/GTP (**Fig. 20**) (Neubauer et al., 2012).

L'ARNtm code pour un peptide qui sera par la suite reconnu par des protéases spécifiques et sa séquence codante se termine par un codon stop, permettant le recyclage du ribosome. Enfin, l'ARNm, après dissociation du ribosome, est dégradé par la RNase R (**Fig. 20**) (Richards et al., 2006).

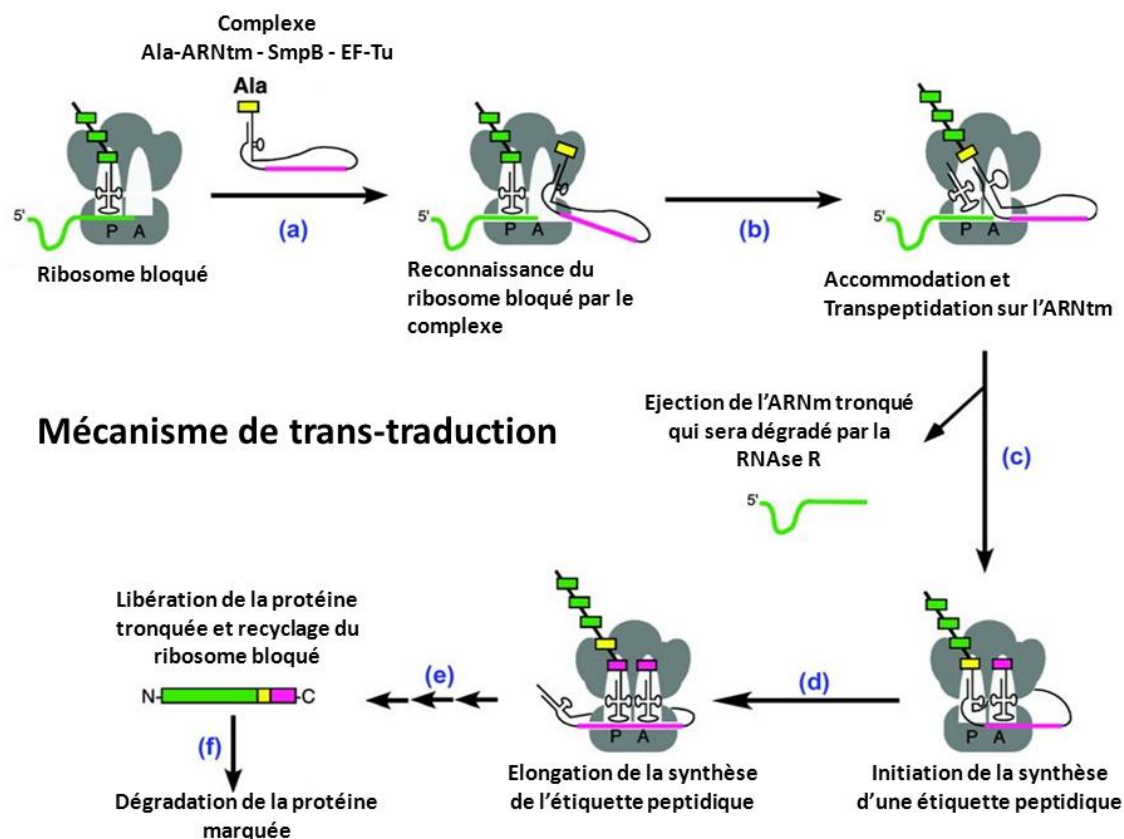


Figure 20 : (Adaptée de Dulebohn et al., 2007) Représentation schématique du mécanisme de trans-translation. (a) Reconnaissance du ribosome bloqué et fixation du complexe Ala-ARNtm – SmpB – EF-Tu au niveau du site A du ribosome. (b) Accommodation et transpeptidation sur l'ARNtm. (c) Ejection de l'ARNm tronqué puis dégradation de ce dernier par la RNase R et initiation de la synthèse de l'étiquette peptidique. (d) Synthèse de l'étiquette peptidique jusqu'au codon stop. (e) Libération de la protéine étiquetée et recyclage du ribosome bloqué. (f) Dégradation de la protéine par des protéases spécifiques.

D'autre part, on retrouve également les systèmes appelés ArfA et ArfB. ArfA est une protéine qui recrute le facteur de terminaison RF2 dans le site A du ribosome ce qui permet le relargage du peptide incomplet (Shimizu, 2012). ArfB quant à elle, mime le domaine catalytique de RF2 conduisant également la dissociation du peptide en cours de synthèse ; ce mécanisme a cependant une contribution mineure à la trans-translation.

D'autres mécanismes permettent de recycler les ribosomes bloqués en cours de traduction chez *E. coli*. En effet, dans le cas d'un ARNm *no-go*, le facteur d'élongation EF-P permet de débloquent des ribosomes immobilisés spécifiquement sur des régions riches en prolines (Doerfel et al., 2013). La peptidyl-ARNt hydrolase permettrait également de

débloquer les ribosomes en hydrolysant le peptide présent sur l'ARNt du site P (Vivanco-Dominguez et al., 2012). Enfin, le facteur d'élongation EF-4, à haute force ionique ou à faible température, restaure l'étape de translocation (Pech et al., 2011).

IV. Le ribosome, une cible pour les antibiotiques

La famille des antibiotiques inhibe la croissance bactérienne en interagissant avec de nombreux processus cellulaires : la synthèse de la paroi ou de la membrane bactérienne, les ADN gyrases et topoisomérases, l'ARN polymérase, le métabolisme de l'acide folique ou bien encore la synthèse protéique (**Fig. 21**) (Lewis, 2013).

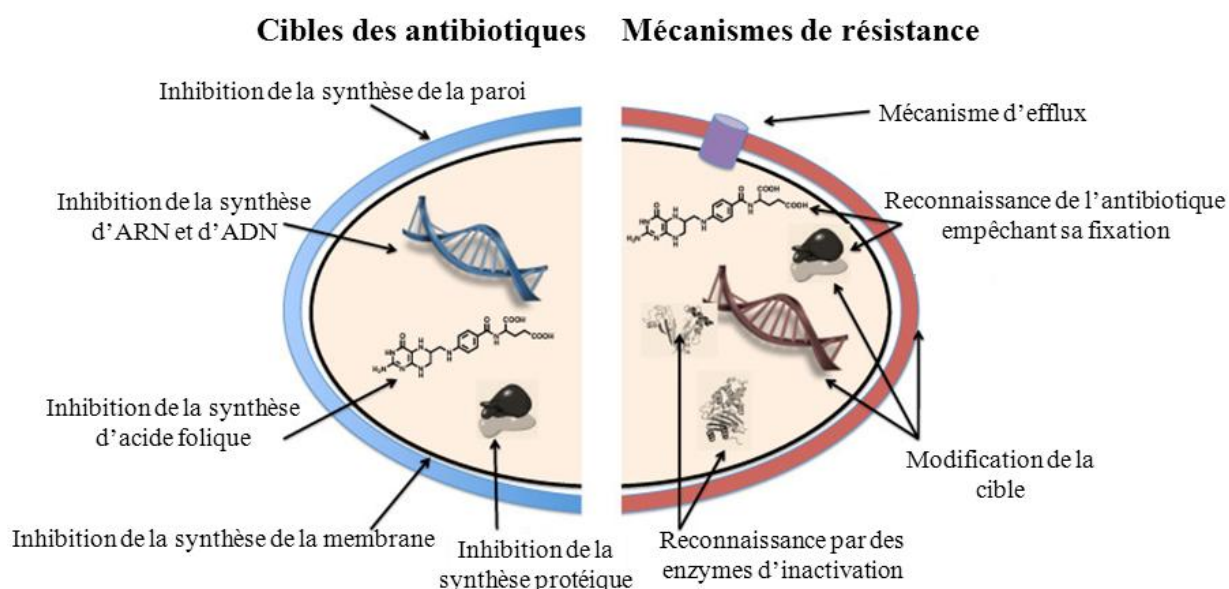


Figure 21 : (Adaptée de Wright, 2010) Représentation schématique des cibles des antibiotiques et des mécanismes de résistances mis en place par les bactéries.

La synthèse protéique, et le ribosome en particulier, représente donc une des cibles majeures des antibiotiques contre les infections bactériennes. La plupart des composés ciblant le 30S inhibent spécifiquement l'étape d'élongation en interférant, soit avec la fixation de l'aa-ARNt au niveau du site A, soit avec l'étape de translocation.

Les antibiotiques se fixant au 50S agissent soit au niveau du centre peptidyl-transférase en interférant avec la formation de la liaison peptidique, soit au niveau du tunnel de sortie de la protéine où ils empêchent la synthèse peptidique en bloquant la sortie du polypeptide (Wilson, 2014).

Bien que certains antibiotiques ciblent l'initiation, ces derniers sont peu utilisés du fait de leur faible spécificité, de leur toxicité et de leur insolubilité.

Comparés à beaucoup d'autres médicaments, les antibiotiques ont une durée de vie limitée. En effet, l'utilisation intensive d'antibiotiques favorise l'apparition de résistances qui se propagent rapidement à l'intérieur d'une même espèce par transfert de gènes vertical ou horizontal (Wright, 2011). Les bactéries utilisent ainsi une importante panoplie de mécanismes de résistance face aux antibiotiques (**Fig. 21**). Certaines espèces bactériennes présentent une résistance naturelle à un antibiotique. D'autres deviennent résistante par mutation génétique ou modification post-traductionnelle de la cible, par modification métabolique de l'antibiotique ou encore par un mécanisme d'efflux (Blair et al., 2015). L'utilisation des transporteurs à ATP binding cassette (ABC) est un exemple des moyens mis en œuvre pour contrecarrer l'action d'un antibiotique en l'expulsant de la bactérie (Wilson, 2016).

Suite à l'apparition de souches bactériennes multirésistantes, il est urgent de développer de nouveaux antibiotiques. Ainsi, la compréhension des mécanismes de résistance au niveau moléculaire peut permettre de mieux pouvoir lutter contre les infections bactériennes en orientant la recherche de composés antimicrobiens innovants. A l'heure actuelle, on se tourne vers de nouvelles classes d'agents anti bactériens, comme par exemple les peptides antimicrobiens, les ADN antisens ou encore des molécules inhibant le *quorum sensing* qui est la première étape permettant à une colonie de bactéries pathogènes (typiquement *S. Aureus*) de passer d'un stade de prolifération à un stade offensif (Sharma et al., 2015).

V. La thermodynamique, cadre scientifique du projet de thèse

1. Petit historique sur les découvertes majeures concernant le ribosome

Depuis la découverte du ribosome en 1955, ce dernier a été le sujet de très nombreuses études. Les premières avancées ont porté sur la preuve que le ribosome est bien le siège de la synthèse protéique (Keller et al., 1954), puis sur la caractérisation de l'ensemble des

molécules qui le constitue (Littlefield et al., 1955). Les analyses biochimiques ont ensuite permis de comprendre les étapes de la traduction de l'ARNm en protéine.

Les premières études structurales du ribosome ont été réalisées par microscopie électronique. En effet, il était supposé que la taille imposante du complexe ribonucléoprotéique rendrait la cristallisation du ribosome très difficile. Ainsi, c'est dans les années 70 que le premier modèle de la structure du 30S et du 50S a été réalisé par microscopie électronique. En 1995, l'équipe de Joachim Frank et le groupe de Holger Stark publièrent les premières images 3D d'un ribosome par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) (Frank et al., 1995; Stark et al., 1995). Depuis, les techniques de cryo-EM n'ont cessé de progresser et il est maintenant possible des structures à haute résolution pouvant aller jusqu'à 2,65 Angström (Fischer et al., 2015).

En 1981, à l'encontre du pessimisme initial, Ada Yonath présenta les premiers cristaux de 50S de *Bacillus stearothermophilus* (Appelt et al., 1981). Puis en 1991, elle réussit à obtenir un cliché de diffraction du 50S de *Haloarcula marismortui* à 3 Å de résolution (von Bohlen et al., 1991). Cela démontra qu'il était possible de déterminer la structure atomique du ribosome par cristallographie. Ainsi, l'obtention des premières structures cristallographiques des sous-unités ribosomales à haute résolution ont été obtenues en 2000, ce qui a valu le prix Nobel de chimie à Ada Yonath, Thomas steitz et Venkatraman ramakrishnan en 2009.

Le ribosome a donc été étudié de manière très approfondie par cristallographie et par cryo-EM ce qui a permis d'étudier le processus de la traduction au niveau atomique. De plus, d'importantes études cinétiques ont également été effectuées dans le but d'analyser le fonctionnement du ribosome en temps réel.

En revanche, son activité d'un point de vue thermodynamique reste très peu connue. Il n'existe en effet que très peu de données thermodynamiques directes sur le ribosome. C'est la raison pour laquelle, dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes fixé pour objectif d'étudier l'initiation de la traduction chez *E. coli* par des approches thermodynamiques à l'aide de microcalorimétrie par titration isotherme (ITC). Le but est d'obtenir une description thermodynamique détaillée des étapes conduisant à la formation du complexe d'initiation 70SIC et de mettre en évidence un ordre de fixation préférentiel des différents partenaires impliqués dans la formation du complexe 30SIC.

2. Introduction sur la microcalorimétrie par titration isotherme

La microcalorimétrie par titration isotherme (ITC) est une technique qui permet de mesurer directement, et en une seule expérience, l'ensemble des paramètres thermodynamiques d'une interaction entre deux molécules. Contrairement à d'autres approches équivalentes comme la fluorescence ou la résonance plasmonique de surface, l'ITC ne nécessite ni le marquage des protéines (ou acides nucléiques), ni la fixation sur un support solide. De plus, elle n'est pas restreinte par la taille des molécules étudiées et s'accommode de la plupart des tampons utilisés.

Le microcalorimètre est composé de 3 parties : une cellule de référence, une cellule à échantillon contenant (généralement) la macromolécule et enfin une seringue à ligand (**Fig. 22**). Il est à noter que rien n'interdit d'injecter la macromolécule dans la cellule contenant le ligand. Le principe de la mesure de la chaleur de réaction produite ou absorbée au cours de la réaction est fondé sur le maintien d'une petite différence de température très précise entre la cellule dans laquelle se déroule la réaction et une cellule de référence qui n'est le siège d'aucune réaction. Ainsi, si la réaction est exothermique, la chaleur dégagée va tendre à faire augmenter la température de la cellule de réaction par rapport à la cellule de référence et, en maintenant constante la différence de température (en absorbant de la chaleur par effet Peltier), on peut déterminer précisément la puissance thermique produite par la réaction. Inversement, si la réaction est endothermique, la différence de température est maintenue constante en apportant de la chaleur. Il est important d'insister sur le fait que la mesure brute obtenue par un microcalorimètre porte sur une puissance (chaleur absorbée ou fournie *par unité de temps* : $\mu\text{cal s}^{-1}$), et non pas une quantité de chaleur (μcal). Pour rendre les choses immédiatement perceptibles, on peut faire l'analogie élémentaire suivante. La mesure brute fournie par un microcalorimètre est analogue à celle fournie en km h^{-1} par le compteur de vitesse d'une automobile. De la même manière que la distance D parcourue au cours d'un voyage correspond à la vitesse instantanée $V(t)$ intégrée au cours du temps ($D = \int V(t) dt$), la chaleur Q mise en jeu au cours d'une réaction correspond à la puissance instantanée $P(t)$ intégrée au cours du temps ($Q = \int P(t) dt$). Ce facteur temps est précisément ce qui explique pourquoi une expérience ITC peut permettre d'obtenir des informations cinétiques selon la méthode *kinITC* activement développée au laboratoire (Burnouf et al., 2012; Dumas et al., 2016).

Avant toute expérience d'ITC, chaque partenaire est dialysé rigoureusement dans le même tampon. En effet, toute différence de tampon risque de générer un signal parasite correspondant à une '*chaleur de dilution*', rendant ainsi l'interprétation des résultats plus difficile, voire impossible. Ces effets de dilution, qui sont le plus souvent imperceptibles dans la vie courante, prennent en effet une importance considérable avec un appareil capable de mesurer des puissances thermiques extrêmement faibles de l'ordre de 0.1 μW .

Une fois tous les réactants dans le même tampon, la macromolécule est déposée dans la cellule à échantillon et le ligand est aspiré dans la seringue à ligand. La seringue d'injection est également munie d'une pale qui permet une homogénéisation rapide du ligand après son injection dans la cellule à échantillon. L'appareil est programmé pour faire des injections successives de ligand à intervalle régulier de temps. Suite à une injection, l'interaction ligand-macromolécule va produire une absorption ou émission de chaleur, qui sera instantanément compensée par le microcalorimètre. On reste à température constante : le processus est donc isotherme. La compensation de chaleur selon le mécanisme décrit précédemment fournit une courbe dont l'ordonnée correspond à chaque instant à la puissance calorifique produite ou absorbée par la réaction (**Fig. 22**). L'intégration de cette puissance permet d'obtenir la quantité de chaleur émise ou absorbée. L'équilibre thermodynamique du système étant atteint lorsque la courbe rejoint la ligne de base, l'injection suivante peut alors être déclenchée. De cette manière, on réalise donc une titration où l'on observe la saturation progressive de la macromolécule.

Chaque injection produit une quantité de chaleur et l'ensemble des points expérimentaux appelé « isotherme d'interaction » fournit (pour les mécanismes d'association simples) une courbe de forme sigmoïdale (**Fig. 22**). En ajustant cette dernière avec une courbe théorique, on déduit les paramètres thermodynamiques : la variation d'enthalpie ΔH (kcal ou $\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$) et la constante d'affinité K_a (M^{-1}) ainsi que la stœchiométrie. Dans les cas simples, pour lesquels l'affinité est suffisante, un plateau est nettement visible et le ΔH correspond tout simplement à l'amplitude totale de la sigmoïde (**Fig. 22**). La constante d'affinité K_a est, elle, directement reliée à la pente maximum de la sigmoïde. Enfin, la stœchiométrie n de la réaction correspond approximativement à la position du point d'inflexion. Enfin, on déduit aussi la variation d'entropie ΔS (cal ou $\text{J mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) au cours de la réaction à l'aide des relations fondamentales $\Delta G = -R T \text{Ln}(K_a) = \Delta H - T \Delta S$, où $R = 8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ est la constante des gaz parfaits et T la température absolue. L'analyse des données ITC a été réalisée dans ce travail à l'aide du logiciel Origin® 7.0 (**Fig. 22**).

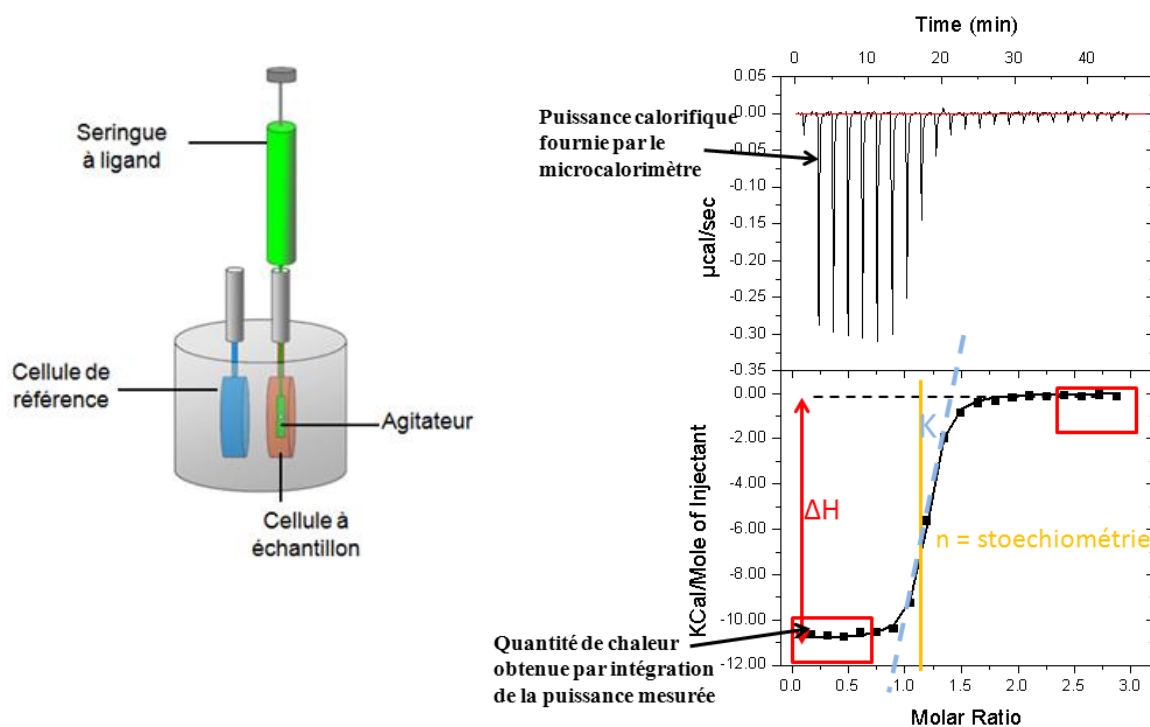


Figure 22 : (a) Représentation schématique du microcalorimètre. (b) Exemple de traitement d’une courbe de titration avec le logiciel Origin® 7.0. Exemple de détermination des paramètres thermodynamiques.

Afin de pouvoir déterminer les paramètres thermodynamiques, il est évidemment nécessaire de se placer à une température où la variation d’enthalpie est différente de 0. D’autre part, la chaleur absorbée ou émise doit être suffisamment importante pour permettre la détermination avec précision des paramètres de l’interaction. Pour cela, il faut la plupart du temps utiliser un échantillon relativement concentré. Compte tenu du volume nécessaire pour remplir la cuve de l’échantillon, l’importante consommation de matériel biologique représente le principal obstacle de l’ITC. Dans notre situation, cet inconvénient est minimisé parce que le laboratoire possède un microcalorimètre de haute sensibilité ITC₂₀₀ utilisant un faible volume d’échantillon (cuve de 203 μL).

Afin de pouvoir déterminer avec précision le ΔH d’une interaction, il est nécessaire d’obtenir un plateau en début d’analyse suivi d’un plateau de saturation en fin d’expérience. Pour obtenir cela, il faut impérativement avoir un coefficient de Wiseman (valeur « c ») compris entre 20 et 500 (**Fig. 23**) (Wiseman et al., 1989). La valeur « c », sans unité, est obtenue à partir de l’équation : $c = K_a \times M_{\text{tot}} \times N$ où K_a correspond à la constante

d'association (M^{-1}), M_{tot} à la concentration de la macromolécule dans la cellule à échantillon (M) et N à la stœchiométrie de l'interaction. Ainsi, la valeur « c » doit être comprise entre 20 et 500 pour que la détermination du ΔH soit précise (**Fig. 23**).

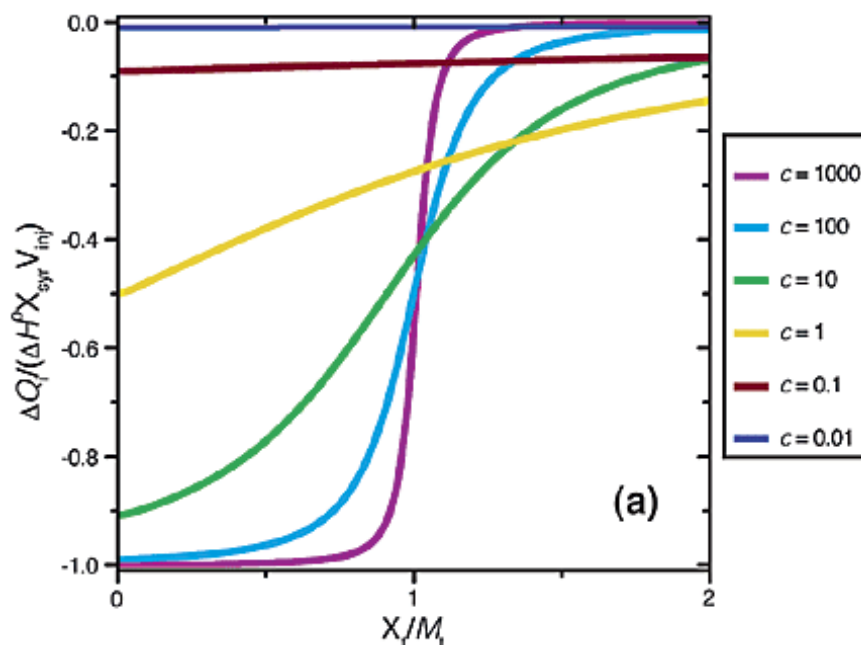


Figure 23 : (Tirée de (Turnbull and Daranas, 2003)). Représentation schématique de plusieurs courbes d'intégration après ITC en faisant varier la valeur du coefficient de Wiseman.

Ainsi, une analyse ITC fournit, en une seule expérience, une richesse d'information qui aide à mieux comprendre la nature des interactions entre les partenaires et peut permettre d'échafauder des hypothèses sur les forces intermoléculaires mises en jeu. C'est la raison pour laquelle l'ITC est une technique largement répandue dans le domaine de la recherche et le développement de médicaments.

3. Les bases de la thermodynamique

Afin de comprendre au mieux les différentes notions abordées par l'ITC, il est nécessaire de faire un bref rappel concernant les bases de la thermodynamique. D'après le premier principe de la thermodynamique, lors de toute transformation, il y a conservation toujours d'énergie. D'autre part, d'après le deuxième principe de la thermodynamique, on peut définir une quantité (l'entropie) qui ne peut qu'augmenter au cours de toute transformation spontanée. Il est capital que l'on puisse définir cette 'entropie' comme une

fonction d'état, c'est-à-dire comme une quantité dont la variation ne dépend pas du chemin suivi lors d'une transformation quelconque. Cette nouvelle quantité, propre à la thermodynamique, institue une différence fondamentale entre deux formes d'énergie, la chaleur et le travail, qui 'se valent' quantitativement pour le premier principe, mais que le 2^{ème} principe voit comme différentes. La chaleur est typique d'une forme d'énergie désordonnée (agitation thermique), tandis que le travail est la forme d'énergie qui peut agir 'dans un sens précis' (par exemple, faire se mouvoir un piston dans une machine). On comprend alors qu'à partir d'une quantité de chaleur donnée, on ne puisse utiliser qu'une partie de cette énergie désordonnée pour effectuer un travail. Ce concept d'entropie est sans doute un des concepts les plus universels de la physique : il peut être défini de plusieurs manières différentes et a des applications dans tous les domaines (depuis les machines thermiques jusqu'à la théorie de l'information).

La variation d'enthalpie libre de Gibbs définie par $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ mesure la partie de la variation d'énergie d'un système qui est utile pour réaliser un travail donné (pour être précis, autre qu'un travail d'expansion contre la pression ambiante). Les exemples abondent : travail mécanique dans les muscles, travail contre le champ électrique par un transporteur d'ions, travail 'chimique' lors de la synthèse d'ATP. En ce qui concerne l'objet de ce travail, on peut étendre la notion de 'travail' dans la cadre de la synthèse protéique à la lutte contre le désordre pour synthétiser un polypeptide de séquence donnée à partir d'un mélange des 20 acides aminés.

Par ailleurs, le ΔG nous indique si la réaction est spontanée ou non. Si $\Delta G < 0$ (réaction exergonique), la réaction est spontanée et on pourra récupérer de l'énergie pour effectuer un travail. En revanche, si $\Delta G > 0$ (réaction endergonique) la réaction ne peut pas se réaliser spontanément. Elle nécessitera un apport d'énergie sous la forme d'un couplage avec une autre réaction exergonique qui fournira l'énergie libre nécessaire pour que le ΔG global des deux réactions soit négatif. L'exemple typique d'un tel couplage est celui d'une réaction endergonique couplée à l'hydrolyse d'un nucléotide triphosphate. En ce qui concerne l'objet de ce travail, il est évident que la synthèse correcte d'une protéine par un ribosome qui représente une augmentation considérable d'ordre, donc une diminution d'entropie, ne peut s'effectuer qu'en consommant de l'énergie libre en hydrolysant des nucléotides triphosphate (en l'occurrence du GTP dont la synthèse nécessite de l'ATP). On évalue la consommation

globale à trois molécules d'ATP par liaison peptidique, ce qui représente la consommation de 8 molécules de glucose pour 100 liaisons peptidiques (Physical chemistry for the life sciences, P. Atkins & J. de Paula, Oxford university press, p.152). On doit localiser l'essentiel de l'utilisation de cette énergie libre dans toutes les étapes 'de vérification' nécessaires à l'assemblage correct de la machinerie et de la sélection du bon ARNt à chaque codon. La thermodynamique impose cette consommation d'énergie libre, sans détailler le déroulement au niveau moléculaire.

4. Mesure directe de la variation d'enthalpie par ITC

Au cours d'une expérience d'ITC, la pression est constante. Dans ces conditions, la variation d'enthalpie correspond directement à la chaleur dégagée ou absorbée par le système lors de l'interaction. Cette variation représente essentiellement la différence entre les liaisons de l'état initial et de l'état final. En effet, de l'énergie est dégagée sous forme de chaleur. De même, la rupture de liaisons entraîne une absorption de chaleur, le système nécessitant de l'énergie afin de casser ces interactions. Dans le cas d'une interaction moléculaire, le système peut donc soit absorber de la chaleur (réaction endothermique) soit en libérer (réaction exothermique) (**Fig. 24**). Les quantités de chaleur sont exprimées en Joule (J) ou en calorie (cal), sachant que $1 \text{ cal} = 4.184 \text{ J}$.

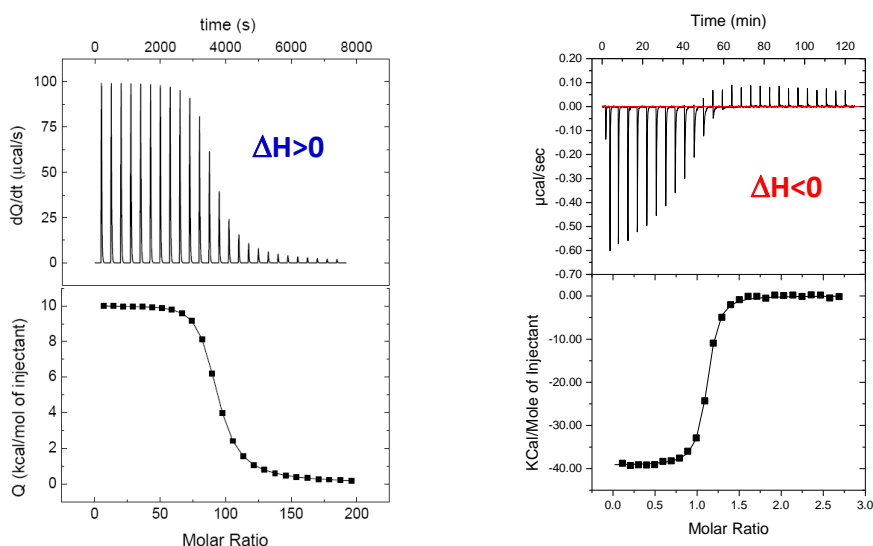


Figure 24 : Représentation des 2 cas de figure obtenu par ITC. A gauche réaction endothermique allant à l'encontre de l'interaction moléculaire. A droite, réaction exothermique favorisant la formation d'un complexe.

Le contenu thermique d'un système à pression constante est donc déterminé par son enthalpie. On définit alors la capacité calorifique de ce système C_p (à pression constante) par l'augmentation de son enthalpie par degré d'augmentation de la température, c'est-à-dire par la dérivée $C_p = \partial H / \partial T$. Le symbole ∂ signifie que la dérivation par rapport à T s'effectue en maintenant constantes toutes les autres variables indépendantes de la température (pression, pH, force ionique...). Dans le cas d'une réaction au cours de laquelle il y a une variation ΔH de l'enthalpie, on peut donc définir la variation de capacité calorifique comme étant égale à $\Delta C_p = \partial \Delta H / \partial T$. C'est également une notion importante en calorimétrie. Ce paramètre permet, entre autres, de faire le lien entre la thermodynamique et les réarrangements structuraux. Une abondante documentation montre que le ΔC_p est directement relié à la variation de la surface de contact entre le solvant et les résidus de la chaîne protéique (Livingstone et al., 1991).

Ainsi, un ΔC_p fortement négatif est caractéristique d'une importante réduction de la surface de contact entre le solvant et la protéine. Dans le cas des protéines, il y a donc soit le repliement de la chaîne polypeptidique, soit la formation d'un complexe protéine-protéine. La détermination du ΔC_p permet de calculer la variation de la surface de contact entre la protéine et le solvant à partir de la formule empirique : $\Delta C_p = 0,27 \Delta A_{\text{aromatique}} + 0,4 \Delta A_{\text{non-aromatique}}$. $\Delta A_{\text{aromatique}}$ et $\Delta A_{\text{non-aromatique}}$ correspondant respectivement à la surface protégée en \AA^2 pour les résidus aromatiques et non aromatiques (Connelly and Thomson, 1992). Sachant que la surface moyenne d'un acide aminé hydrophobe est d'environ 40\AA^2 , on arrive ainsi à estimer le nombre d'acide aminés hydrophobes ayant perdu le contact avec le solvant (Samanta et al., 2002).

Chapitre II. OBJECTIF PRINCIPAL DE LA THESE

L'objectif de mon travail de thèse consiste à étudier l'initiation et l'élongation de la traduction chez *Escherichia coli* par une approche thermodynamique systématique et grâce à des analyses structurales par cryo-microscopie électronique. L'approche thermodynamique qui utilise la titration calorimétrique isotherme (ITC), est fondée sur un travail précédent auquel j'ai participé. Ce travail visait à disséquer le fonctionnement de la transcriptase inverse du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) en phase d'élongation, prolongé par l'étude du mode d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques. Nous avons développé durant cette ce travail une nouvelle méthode appelée 'incremental ITC' (*iITC*). Cette méthode permet d'étudier les étapes successives d'une réaction au cours d'une seule expérience d'*iITC* par l'ajout successif des différents partenaires. Elle permet également de diminuer la consommation de matériel biologique grâce à la réutilisation du complexe formé dans la cellule à échantillon. Par la même occasion, ce travail nous a permis d'élucider le mode d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques. En effet, le modèle d'inhibition accepté depuis plus de 20 ans pour une des premières molécules à avoir été commercialisée, était erroné et notre étude thermodynamique a permis de préciser le mode d'action correct.

I. Etude thermodynamique de la formation du complexe d'initiation 30S (30SIC) par incremental ITC

L'approche thermodynamique de l'initiation et de l'élongation de la traduction a été initiée grâce à l'importante expérience acquise lors de l'étude thermodynamique de la transcriptase inverse (RT) du virus HIV-1. En particulier, l'approche novatrice *iITC* a été mise à contribution pour aborder l'objectif principal de ma thèse : l'étude thermodynamique de la traduction chez *Escherichia coli*.

Après la purification préalable de l'ensemble des partenaires en grande quantité, nous avons décidé d'analyser dans un premier temps la formation du complexe d'initiation 30S par *iITC* grâce à l'introduction successive des différents partenaires. L'objectif de ce travail est d'obtenir une carte thermodynamique complète de l'ensemble des différentes voies de formation possible, puis de proposer un ordre d'association privilégié par la bactérie concernant la formation du complexe d'initiation 30S (30SIC), sur la base des affinités mesurées par ITC.

Nous souhaitons également déterminer la structure du 30SIC par cryo-microscopie électronique en collaboration avec l'équipe de Bruno Klaholz à l'IGBMC. En effet, ce complexe n'a encore jamais pu être visualisé à haute résolution et le site de fixation d'IF3 sur la petite sous-unité n'est pas encore connu en détail.

II. Etude thermodynamique de la formation du complexe d'initiation 70S et de l'élongation

Nous souhaitons logiquement prolonger l'initiation de la traduction sur le 30SIC par l'étude de l'addition de la grande sous unité 50S pour former un ribosome complet. Enfin le cycle d'élongation de la traduction sera étudié à travers l'introduction d'un complexe EF-Tu/GTP - aminoacyl-ARNt sur le 70SIC précédemment formé. Le principal objectif de cette dernière approche est d'apporter les premières analyses thermodynamiques par ITC sur la formation d'un dipeptide.

III. Etude thermodynamique de la fixation d'antibiotiques spécifiques au ribosome

La fixation d'antibiotiques au ribosome 70S est un mécanisme biologique que nous souhaitons également aborder par ITC, cette technique ne dépendant pas de la taille respective des molécules étudiées. Ainsi, l'affinité des antibiotiques pour le ribosome n'a jamais été déterminée de manière directe. Ayant uniquement sélectionné des antibiotiques capables de se fixer dans le tunnel de sortie des peptides en cours de synthèse, notre objectif final est de réaliser une étude comparative des forces moléculaires mises en jeu lors de leur interaction avec le ribosome.

Chapitre III. MATERIELS ET METHODES

1. Purification des facteurs d'initiation :

Tampon de lyse : 10 mM Tris-HCl pH 7,7 ; 60 mM NH₄Cl ; 5 mM Mg Acétate ;

6 mM β-mercaptoéthanol

Tampon A : 20 mM Tris-HCl pH 7,1 ; 100 mM NH₄Cl ; 1 mM EDTA ; 10% glycérol ;

6 mM β-mercaptoéthanol

Tampon B : tampon A + 700 mM NH₄Cl

Tampon C : 20 mM Tris-HCl pH 7,1 ; 50 mM M NH₄Cl ; 1 mM EDTA ; 10% glycérol ;

6M Urée ; 6 mM β-mercaptoéthanol

Tampon D : tampon A + 700 mM NH₄Cl + 6M urée

Tampon E : 20 mM Tris-HCl pH 7,1 ; 0,1 mM EDTA ; 200 mM NH₄Cl ; 10% glycérol ;

1mM DTT

Tampon F : 20 mM Tris-HCl pH 7,9 ; 100 mM NH₄Cl ; 1 mM EDTA ; 10% glycérol ;

6 mM β-mercaptoéthanol

Tampon G : Tampon F + 600 mM NH₄Cl

Tampon Mono Q A : 20 mM Tris-HCl pH 7,9 ; 100 mM NaCl ; 0,1 mM EDTA ;

10% glycérol ; 6 mM β-mercaptoéthanol

Tampon Mono Q B : Tampon Mono Q A + 1 M NaCl

Les facteurs d'initiation sont synthétisés respectivement à partir des gènes *infA*, *infB* et *infC*. Afin de les surexprimer, nous avons utilisé la souche bactérienne E. Coli K12 UT5600.

Les bactéries ont été cotransformées avec les plasmides pCI857 et pPLC2883. Le plasmide pCI857 code pour le répresseur thermosensible CI ; il contient également le gène de résistance à la kanamycine. Le plasmide pPLC2883 code pour un des facteurs d'initiation. De plus, ce gène étant sous la dépendance du promoteur lambda pL, son expression est contrôlée par le répresseur thermosensible CI. Ce plasmide possède également le gène de résistance à l'ampicilline. Ainsi, par une simple élévation de la température, on arrive à induire la surexpression de chacun des facteurs d'initiation.

Qu'il s'agisse d'IF1, IF2 ou IF3, les étapes de surexpression, de lyses sont toujours identiques. On commence par réaliser une préculture sur la nuit dans 500 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 25 µg/mL de kanamycine à 30°C. Une partie de la préculture sert à inoculer 12 litres de milieu LB toujours en présence d'ampicilline et de kanamycine. Une fois que la culture atteint une densité optique (DO) comprise entre 0,8 et 1, on augmente la température à 42°C dans le but d'induire la surexpression. A cette température, le répresseur thermosensible est inactivé ce qui permet au gène d'intérêt d'être exprimé. Après 30 min, on diminue la température à 37°C dans le but d'avoir la meilleure surexpression possible. Après 1h30, la culture est arrêtée et les cellules sont culotées et lavées dans le tampon de lyse froid. En temps normal, on obtient environ 5,5 g de cellule/litre de culture.

Les cellules sont immédiatement resuspendues dans le tampon de lyse additionné de DNase I et d'inhibiteur de protéase. L'ensemble est ensuite lysé à la *french press* à une pression de 1,6 kbar. Puis les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation d'une heure à 10 000 g à 4°C. Afin de dissocier les facteurs d'initiation fixés sur les ribosomes, on ajoute ensuite du NH₄Cl en poudre pour arriver à une concentration finale de 1M. Une fois le sel dissout, le surnageant est ultracentrifugé sur la nuit à l'aide du rotor 50.2Ti pendant 16h à 35 000 rpm à 4°C.

a) Purification d'IF1 et d'IF3 :

Le lendemain, le surnageant est récupéré puis dilué avec 9 volumes de tampon A sans NH₄Cl. Le mélange est ensuite chargé sur une colonne de phosphocellulose (GE Healthcare) équilibrée préalablement avec le tampon A. La résine est alors lavée jusqu'à ce que la DO soit stable. La protéine d'intérêt est enfin éluée grâce à un gradient de NH₄Cl allant de 0,1 M à 0,7 M (tampon A et B). Les fractions contenant IF1 ou IF3 sont déterminées par un gel SDS-PAGE puis rassemblées. L'éluât est ensuite dénaturé à l'urée dialyse sur la nuit dans le tampon C.

Le lendemain, le dialysat est réinjecté sur la colonne de phosphocellulose (GE Healthcare) équilibrée préalablement avec le tampon C. La protéine d'intérêt est ensuite éluée à l'aide d'un gradient de NH₄Cl allant de 0,05 M à 0,7M (tampon C + tampon D). A nouveau, les fractions contenant IF1 ou IF3 sont identifiés sur gel SDS-PAGE puis rassemblées et les protéines renaturées par une dialyse dans le tampon E.

Le lendemain, le dialysat est concentré à l'aide d'un Centricon 3K pour IF1 et 10K pour IF3. Enfin, on réalise une étape de polissage à l'aide d'un tamis moléculaire Superdex 75 (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans le tampon E. Après un gel SDS-PAGE pour vérifier sa pureté (**Fig. 25**), la protéine d'intérêt est alors concentrée, aliquotée, congelée à l'azote liquide et conservée à -80°C.

Usuellement, on obtient 1,5 mg d'IF1 et 15 mg d'IF3 par litre de culture.

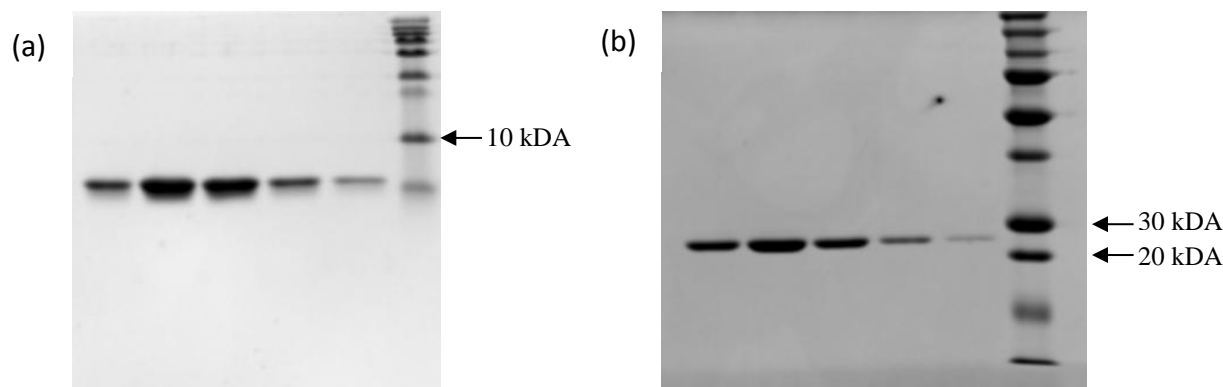


Figure 25 : Photo du gel SDS-PAGE démontrant la pureté des fractions contenant IF1 (a) et IF3 (b) après tamis moléculaire Superdex 75.

b) Purification d'IF2 :

Concernant la purification d'IF2, après ultracentrifugation, le surnageant est dilué avec 9 volumes de tampon A sans NH_4Cl puis chargé sur une colonne de phosphocellulose (GE Healthcare) équilibrée préalablement avec le tampon A. La résine est alors lavée jusqu'à ce que la DO soit stable. La protéine d'intérêt est enfin éluée grâce à un gradient de NH_4Cl allant de 0,1M à 0,6M (tampon A et B). Les fractions contenant IF2 sont déterminées sur gel SDS-PAGE puis rassemblées. L'ensemble est dialysé sur la nuit pendant laquelle le pH est changé. On utilise pour cela le tampon F.

Le lendemain, le dialysat est réinjecté sur une colonne de DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) équilibrée préalablement avec le tampon F. La protéine d'intérêt est ensuite éluée à l'aide d'un gradient de NH_4Cl allant de 0,05 M à 0,6M (tampon F + tampon G). Par l'intermédiaire d'un gel SDS-PAGE, on remarque qu'à ce stade IF2 est déjà quasiment pure. La prochaine étape de purification consiste à séparer les 3 isoformes d'IF2. En effet, étant donné la présence de 2 codons AUG interne en phase, il existe 3 isoformes d'IF2. Pour cela, les fractions sélectionnées sont dialysées une seconde fois sur la nuit pendant laquelle l'excès

de NH_4Cl est éliminé grâce au tampon Mono Q A (GE Healthcare). Le dialysat est ensuite injecté sur une colonne Mono Q préalablement équilibrée avec le tampon Mono Q A. Les 2 isoformes sont séparés suivant un gradient de NaCl allant de 170 mM à 500 mM (Tampon Mono Q A et B). Après un gel SDS-PAGE (**Fig. 26**), les fractions contenant IF2 α pure sont sélectionnées, concentrées et lavées dans le tampon E à l'aide d'un Centricon 50K. Enfin, IF2 α est congelée à l'azote liquide sous la forme d'aliqots puis conservée à -80°C . Après purification, on obtient environ 8,5 mg d'IF2 α pure par litre de culture.

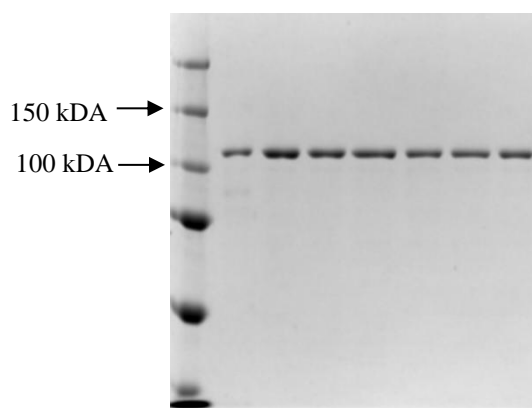


Figure 26 : Photo du gel SDS-PAGE démontrant la pureté des fractions contenant IF2 α après colonne Mono Q.

2. Purification du ribosome 70S

Tampon AE : 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 200 mM NH_4Cl ; 20 mM MgCl_2 ; 0,1 mM EDTA ;
6 mM β -mercaptoéthanol

Tampon 1E : 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 30% sucrose ; 10 mM MgCl_2 ; 500 mM NH_4Cl ;
0,1 mM EDTA ; 6 mM β -mercaptoéthanol

Tampon BE : 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM NH_4Cl ; 0,1 mM EDTA ;
6 mM β -mercaptoéthanol

Le ribosome 70S a été purifié à partir de la souche *E. Coli MRE600*. Il s'agit d'une souche où l'activité ribonucléase est quasi négligeable. En effet, étant déficiente en ribonucléase I, le ribosome ainsi purifié est donc intact, non dégradé.

Après avoir réalisé une préculture de 500 mL sur la nuit dans un milieu LB à 37°C, on ensemence 12L de milieu LB frais. L'ensemble est ensuite placé sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la DO soit égale à 1. Les cellules sont alors culotées et lavées dans le tampon AE froid. Le culot de cellules humides est enfin gardé dans la glace pendant la nuit. En temps normal, on obtient environ 24 g de cellule pour 12 litres de culture.

Le lendemain, les cellules sont resuspendues dans le tampon AE additionné de DNase I et d'inhibiteur de protéase. L'ensemble est ensuite lysé via la *french press* à une pression de 1,6 kbar. Les débris cellulaires sont éliminés par une ultracentrifugation de 30 minutes à 4°C à 18 200 rpm, puis le surnageant est ultracentrifugé une seconde fois pendant 4 heures à 4°C à 41 300 rpm. Le culot obtenu, contenant les ribosomes, est remis délicatement en suspension dans le tampon AE après avoir éliminé une légère couche vitreuse présente en surface du culot. Les ribosomes sont ensuite déposés sur un coussin de sucrose (tampon 1E) puis centrifugé pendant 19 heures à 4°C à 31 500 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot de ribosome translucide est délicatement resuspendu dans le tampon BE. Une ultracentrifugation de clarification peut s'avérer nécessaire si la resuspension des ribosomes donne à cette dernière un aspect brunâtre. Ainsi, cela permet d'éliminer les derniers débris cellulaires restant. Après cette étape, le surnageant est concentré à l'aide d'un Centricon 100K à une concentration finale de 50mg/mL. Enfin, le 70S est congelée à l'azote liquide sous la forme d'aliquot de 1mL. Les rendements sont en général d'environ 60 mg de 70S par litre de culture.

3. Purification du 30S

Tampon de dissociation 1X: 30 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM MgCl₂ ; 300 mM NH₄Cl ; 0,15 mM EDTA ; 1,5 mM DTT

Tampon de conservation : 20 mM Tris-HCL pH 7,5 ; 10 mM MgCl₂ ; 0,1 mM EDTA ; 50 mM KCl ; 1 mM DTT

50mg de ribosome 70S (soit un tube de 1mL) sont décongelés puis introduits dans une cassette de dialyse. Le tout est ensuite placé sous agitation dans le tampon de dissociation 1X à 4°C au moins pendant 4 heures. La faible concentration en Mg²⁺ permet la dissociation des sous-unités. Après dialyse, les ribosomes dissociés sont chargés sur des gradients de sucrose

10% - 30% de 36 mL puis centrifugés 15 heures à 4°C à 30 000 rpm afin de les séparer physiquement.

Le lendemain, les gradients sont aspirés par le haut du tube et fractionnés via l'utilisation d'une AKTA prime. Les fractions correspondantes aux sous-unités 30S et 50S pures sont regroupées. La pureté des fractions est également vérifiée sur gel d'agarose 1%. Enfin, les sous-unités sont concentrées et lavées dans le tampon de conservation à l'aide d'un Centricon 100K avant d'être congelées sous forme d'aliquot à l'azote liquide. En partant de 50 mg de 70S, on obtient environ 7 mg de 30S et 5 mg de 50S.

4. Obtention de l'ARNm

a) Transcription in vitro :

Le brin d'ADN matrice et son complémentaire, qui contient le promoteur T7, ont été synthétisés chimiquement (par IDT). Dans un premier temps, on hybride les 2 brins. Pour cela, on met une quantité équimolaire de chacun des brins dans une solution contenant 100 mM de NaCl. L'ADN est ensuite placé à 90°C pendant 5 min puis 5 min à 0°C et enfin 20 min à 54°C. De cette façon, on forme un hybride ADN qui sera utilisé comme matrice lors de l'étape de transcription in vitro.

Pour la transcription in vitro, on réalise une solution contenant :

- Tampon T7 1x
- 0,005 U/ μ L de pyrophosphatase
- 1,5 mM spermidine
- 0,15 mg/mL de BSA
- 50 mM DTT
- 4 mM de chacun de rNTP
- 0,01 % de Triton X-100
- 17 μ g d'hybride ADN / mL de transcription
- 20 μ L de T7 RNA polymérase / mL de transcription

Le mélange est placé 1h30 à 37°C. Ensuite 10 μ L de T7 RNA polymérase / mL de transcription sont rajoutés et la transcription est encore laissée 1h30 à 37°C.

Après transcription, un volume de phénolchloroforme est ajouté. On vortex le tout pendant 2 min puis on réalise une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm. 2 extractions au chloroforme isoamylique sont ensuite réalisées afin d'enlever toutes traces de phénol. Puis on ajoute 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol 100% froid. On entrepose les tubes à -80°C pendant au moins 20 min puis on les centrifuge 20 min à 14 000 rpm à 4°C. Les culots sont ensuite lavés à l'éthanol 70% froid par une centrifugation de 5 min à 14 000 rpm à 4°C. Ces derniers sont ensuite repris dans de l'eau sur la nuit et entreposé à 4°C.

b) Purification des ARNm par gel dénaturant :

Le lendemain, nous réalisons un lavage au Centricon. Cette étape permet d'éliminer l'ensemble des rNTPs en excès. Enfin, on prend une mesure de la DO, cela nous permet ainsi d'estimer la quantité d'ARNm potentielle présente.

Etant donné la présence de nombreux transcrits abortifs après transcription in vitro, nous avons décidé de passer par une purification sur gel dénaturant 10% contenant 8 M d'urée. Pour cela, nous réalisons un gel d'une épaisseur de 1,5 mm et ne présentant qu'une seule poche. Une fois polymérisé, le gel est chauffé à 23W pendant 30 min afin d'être le plus dénaturant possible. 5 mL de transcription sont concentrés dans un volume final de 150 µL par Centricon. A cela, on ajoute 150 µL de bleu urée afin de dénaturer l'ARNm. On chauffe le mélange 5 min à 90°C puis on dépose le tout sur le gel chaud en veillant à ce que le dépôt soit le plus fin possible.

Après migration, on visualise l'ARNm par UV shadowing. On découpe la bande de gel contenant l'ARNm et on réalise une élution passive sur la nuit dans un tampon contenant : 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 200 mM NaCl et 0,5 mM EDTA.

Le lendemain, l'ARNm a diffusé dans le tampon. Afin d'enlever les éventuels reste de polyacrylamide, le tampon est filtré puis l'ARNm est concentré et lavé dans de l'eau.

Tampon A : 20 mM MES pH 6,5 ; 4M Urée

Tampon B : Tampon A + 400 mM NaClO₄

Afin d'éliminer les derniers transcrits abortifs, on fixe l'ARNm sur une colonne DNAPac PA100 (Dionex) préalablement équilibrée dans le tampon A, on élue l'ARNm suivant un gradient de NaClO₄ allant de 120 à 260 mM (Tampon A+B).

Un aliquot de chaque fraction est déposé sur un gel dénaturant 10% et les fractions pures sont sélectionnées après détermination aux UV. L'ARNm est ensuite concentré et enfin lavé dans le tampon d'ITC avant d'être congelé.

Ainsi, à partir de 5mL de transcription, on obtient en moyenne 1 mg d'ARNm.

5. Purification de la méthionyl-ARNt-synthétase (MetRS)

Tampon de lyse : 20 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 10 mM 6 mM β-mercaptoéthanol

Tampon A : 20 mM K-PO₄ pH 8,0 ; 10 mM β-mercaptoéthanol

Tampon B: 20 mM K-PO₄ pH 8,0 ; 20 mM KCl ; 10 mM β-mercaptoéthanol

Tampon C : 20 mM K-PO₄ pH 8,0 ; 1 M KCl ; 10 mM β-mercaptoéthanol

Tampon de Stockage : 20 mM K-PO₄ pH 7,6 ; 150 mM KCl ; 1 mM DTT

Milieu M9 pour 1L : 6 g de Na₂HPO₄ ; 3 g de KH₂PO₄ ; 0,5 g NaCl ; 1 g NH₄Cl ;

2 mL MgSO₄ 1M ; 0,1 mL CaCl₂ à 1M ; 5 mL glucose à 40% ; 1 µg de thiamine

Afin de surexprimer la MetRS, nous avons utilisé la souche bactérienne E. Coli JM101Tr. Les bactéries ont été transformées avec le plasmide pNAV7, ce dernier code pour la MetRS et pour la β-galactosidase. La culture des bactéries a été réalisée dans un milieu minimum M9 additionné d'ampicilline et de ZnSO₄.

On commence par réaliser une préculture sur la nuit dans 100 mL de milieu M9 contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 15 µM ZnSO₄ à 37°C. Une partie de la préculture sert à inoculer 3 litres de milieu M9 contenant toujours l'ampicilline et le ZnSO₄ à 37°C. Une fois que la culture atteint une DO de 0,4, on induit la surexpression en ajoutant 1 mM d'IPTG. Après 4H de surexpression, la culture est arrêtée et les cellules sont culotées et lavées dans le tampon de lyse froid. Le culot de cellules humides est enfin entreposé dans la glace pendant la nuit.

Le lendemain, le culot est resuspendu dans le tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéase et de la DNase I. Le tout est ensuite lysé via la *french press* à une pression de 1,6 kbar puis le lysat est ultracentrifugé 1 H à 45 000 rpm à 4°C afin d'enlever les débris cellulaires. Dans le but d'enlever les acides nucléiques, on ajoute progressivement au

surnageant du sulfate de streptomycine pour arriver à une concentration finale de 3%. Le précipité est éliminé par une centrifugation de 30 min à 10 000 g à 4°C. La MetRS est ensuite précipitée par introduction progressive de sulfate d'ammonium à une concentration finale de 50%. Elle est récupérée par 30 min de centrifugation à 10 000 g à 4°C. Avant d'être injectée sur tamis moléculaire, le culot protéique est repris dans 12 mL de tampon A. L'extrait protéique est également lavé et concentré. L'ensemble est enfin purifié sur une colonne Superdex 200 (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans le tampon A.

Etant impossible de localiser la protéine d'intérêt vu sur gel SDS-PAGE 8%, on décide de passer par un test d'aminocyclation à la méthionine radioactive afin de détecter les fractions du tamis moléculaire contenant la MetRS (voir protocole du test d'aminocyclation). Une fois détectées, on regroupe l'ensemble des fractions contenant la MetRS puis on charge le tout sur une colonne Source Q (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans le tampon B. La protéine est éluée suivant un gradient de KCl allant de 100 à 400 mM (Tampon B et C). Dans ce cas, la MetRS est visible sur gel SDS-PAGE 8% et sa présence est confirmée par un test d'aminocyclation à la méthionine radioactive. Etant pure, la protéine est alors concentrée et lavée dans le tampon de stockage puis diluée avec du glycérol 100% pour arriver à une concentration finale en glycérol de 50%. Son activité spécifique est ensuite déterminée afin de savoir la quantité d'enzyme à utiliser lors d'une expérience d'aminocyclation.

Ainsi, à partir de 3L de culture, nous avons pu obtenir 8,2 mg de MetRS pure.

6. Test de d'aminocyclation

Tampon de dosage 5x : 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM KCl ; 75 mM MgCl₂ ;

2,5 mM DTT

ATP stock : 100 mM

Tampon de dilution de l'enzyme : 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 4 mg/mL BSA ;

10 mM β-mercaptoéthanol

ARNt total stock : 10 mg/mL

Pour éviter que la synthétase ne s'accroche aux parois du tube Eppendorf, on rajoute de la BSA dans le tampon de dilution. Les tests sont réalisés dans un volume final de 50 µL : 10 µL de tampon de dosage + 5 µL d'ATP + 2,9 µL de méthionine C14 du stock + 8 µL d'ARNt total + 14,1 µL d'eau + 10 µL de la fraction à tester.

Le mélange est laissé 10 min à 37°C.

Après incubation, chaque test d'aminacylation est déposé sur un papier Whatman 3MM. Ces derniers sont immédiatement plongés pendant 10 min dans une solution d'acide trichloroacétique 5% froide. Cette étape permet la précipitation des ARNt et en particulier du complexe aa-ARNt ; par conséquent, l'acide aminé libre reste en solution et la méthionine chargée sur l'ARNt coprécipite. Les papiers sont ensuite soumis à 3 autres lavages puis rapidement introduit dans l'éthanol 100% pour éliminer le TCA et faciliter leur séchage. Ils sont ensuite séchés sous des lampes chauffantes pendant 20 min. Une fois les papiers introduits dans des fioles de comptage contenant 2 mL de liquide de scintillation (Ecoscint), la radioactivité est enfin quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation.

7. Purification de la méthionyl-ARNt formyltransférase (FT)

Tampon de lyse : 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 100 mM KCl ; 10 mM β -mercaptoéthanol

Tampon A : 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 50 mM KCl ; 10 mM β -mercaptoéthanol

Tampon B : 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 500 mM KCl ; 10 mM β -mercaptoéthanol

Tampon C : 20 mM K-PO₄ pH 6,7 ; 10 mM β -mercaptoéthanol

Tampon D : 200 mM K-PO₄ pH 6,7 ; 10 mM β -mercaptoéthanol

Tampon de stockage : 20 mM Imidazole pH 7,6 ; 150 mM KCl ; 7 mM MgCl₂ ;
0,1 mM EDTA ; 10 mM β -mercaptoéthanol

Afin de surexprimer la FT, nous avons utilisé la souche bactérienne E. Coli JM101Tr. Les bactéries ont été transformées avec le plasmide pUC18 Fatg qui contient le gène de la FT et permet à la bactérie d'être résistante à l'ampicilline. La culture des bactéries a été réalisée dans un milieu LB classique.

On commence par réaliser une préculture sur la nuit dans 50 mL de milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. Une partie de la préculture sert à inoculer 1 litre de milieu LB contenant toujours l'ampicilline. Une fois que la culture atteint une DO de 0,6, on induit la surexpression en ajoutant 0,5 mM d'IPTG. Après 3H de surexpression, la culture est arrêtée et les cellules sont culotées et lavées dans le tampon de lyse froid. Enfin, le culot de cellules humides est gardé dans la glace sur la nuit.

Le lendemain, le culot est resuspendu dans le tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéase et de la DNase I. Le tout est ensuite lysé via la *french press* à une pression de 1,6

kbar puis le lysat est ultracentrifugé 1 H à 45 000 rpm à 4°C afin d'enlever les débris cellulaires. Afin d'éliminer les acides nucléiques, on ajoute au surnageant du sulfate de streptomycine pour arriver à une concentration finale de 0,3%. Le précipité est éliminé par une centrifugation de 30 min à 10 000 g à 4°C. On réalise ensuite une purification par précipitation au sulfate d'ammonium. Dans un premier temps, on introduit progressivement du sulfate d'ammonium jusqu'à une concentration finale de 45%. Le précipité est éliminé par 30 min de centrifugation à 10 000 g à 4°C, en effet, à cette concentration, la FT reste soluble ; par conséquent des protéines contaminantes sont éliminées. On ajoute ensuite à nouveau du sulfate d'ammonium pour arriver à une concentration finale de 70%. A cette concentration, la FT finit par précipiter. Elle est ensuite récupérée sous la forme d'un culot par une nouvelle centrifugation de 30 min à 10 000 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans 7 mL de tampon de lyse. L'ensemble est injecté sur une colonne Superdex 75 (GE Healthcare) équilibrée au préalable avec le tampon de lyse. A ce stade, on réalise 8 injections successives de 900 µL.

La réalisation d'un gel SDS-Page 12,5% ne nous permet pas à ce stade de détecter précisément les fractions contenant la FT car beaucoup de protéines sont encore présentes dans le mélange. On réalise donc un test de formylation en utilisant de la méthionine radioactive afin de détecter les fractions du tamis moléculaire à sélectionner (voir test de formylation). Après détection, on rassemble ensuite l'ensemble des fractions contenant la FT, puis on charge le tout sur une colonne Source Q préalablement équilibrée dans le tampon A. La FT est alors éluée suivant un gradient de KCl allant de 50 mM à 500mM (Tampon A et B). A ce stade, la FT est visible sur gel SDS-PAGE 12,5% mais en revanche, elle est loin d'être pure. Sa présence est également confirmée par un test de formylation à la méthionine radioactive. Les fractions sont alors regroupées puis lavées dans le tampon C. Le mélange est ensuite injecté sur une colonne hydroxyapatite équilibrée au préalable dans le même tampon. Puis la FT est ensuite éluée suivant un gradient de K-PO₄ pH 6,75 allant de 20 à 200 mM (Tampon C et D). Après la réalisation d'un gel SDS-PAGE 12,5%, on peut observer que la protéine est maintenant pure et sa présence est confirmée par un test de formylation.

La protéine est enfin concentrée et lavée dans le tampon de stockage puis diluée avec du glycérol 100% pour arriver à une concentration finale en glycérol de 50%. Son activité spécifique est ensuite déterminée afin de savoir la quantité d'enzyme à utiliser afin de formyler l'ensemble de l'ARNt initiateur.

Ainsi, à partir de 1L de culture, nous avons pu obtenir 70 µg de FT pure. Le rendement est très faible mais la quantité obtenue est suffisante pour la formylation de l'ensemble de l'ARNt initiateur utilisé.

8. Formation du 10-formyl-tétrahydrofolate

Au départ, on utilise de l'acide folinique sous la forme d'une poudre ; ce dernier est dissout à une concentration finale de 6mM. On ajoute ensuite de l'acide chlorhydrique afin d'abaisser le pH à 1,5 et l'on incorpore également du β-mercaptoéthanol pour arriver à une concentration finale de 100 mM. A cette étape, on forme du 5,10-méthényltétrahydrofolate et il est possible de suivre la formation de ce produit en suivant la DO ; en effet, ce dernier absorbe à une longueur d'onde de 350nm. Après 3H30 à température ambiante, la DO reste stable. Le produit est ensuite conservé à -20°C.

Lors de l'utilisation du 5,10-méthényltétrahydrofolate, une fois décongelé, on l'introduit dans une solution contenant de l'imidazole pH 7,6. A ce pH, le 5,10-méthényltétrahydrofolate est enfin converti en 10-formyl-tétrahydrofolate. Ce dernier sera ensuite substrat de la FT.

9. Test de formylation

Dans un premier temps, l'ARNt initiateur est méthionylé ; pour cela on réalise une solution A contenant :

- 20 mM Imidazole pH 7,6
- 150 mM KCl
- 7 mM MgCl₂
- 100 µM ARNt total
- 400 µM ATP
- 0,1 mM EDTA
- 10 mM β-mercaptoéthanol
- 0,4 µM MetRS
- 75 µM Methionine C¹⁴

Le mélange A est laissé 30 min à 37°C afin de s'assurer que la méthionylation de l'ARNt initiateur soit complète. Les ARNt méthionine élongateurs sont bien entendu également méthionylés à cette étape.

Pendant ce temps, on prépare le mélange permettant la formylation de l'ARNt initiateur méthionylé. Pour cela, on réalise une solution B contenant :

- 20 mM Imidazole pH 7,6
- 150 mM KCl
- 7mM MgCl₂
- 0,1 mM EDTA
- 0,2 mg/mL de BSA
- 10 mM β-mercaptoéthanol
- 300 μM de 10-formyltétrahydrofolate

L'ensemble des fractions du tamis moléculaire, des colonnes source Q et hydroxyapatite susceptibles de contenir de la FT sont testées via cette méthode.

Une fois l'incubation réalisée, on mélange ensuite :

- 50 μL de solution A contenant l'ARNt initiateur méthionylé
- 40 μL de solution B contenant le substrat nécessaire à la formylation
- 10 μL de fraction susceptible de contenir la FT

Les fractions sont laissées 20 min à 30°C.

La réaction de formylation est ensuite arrêtée par l'ajout de 100 μL de CuSO₄ à 0,36 M contenu dans 1M tris-HCl pH 7,3. Après introduction du CuSO₄, la solution est encore laissée 7 min à 30°C. Le CuSO₄ va hydrolyser spécifiquement la liaison ester entre la méthionine et l'ARNt élongateur car cette dernière n'est pas formylée. Par conséquent si l'ARNt initiateur est méthionylé et formylé, la liaison ester reste intact. Ainsi, la présence de radioactivité correspond spécifiquement à celle de l'ARNt initiateur méthionylé et formylé.

Après incubation, 100 μL de réaction sont déposés sur un filtre Whatman 3MM. Une fois tout le liquide absorbé, les papiers sont plongés pendant 10 min dans une solution d'acide trichloroacétique 5% froide contenant également de la méthionine froide. Cette solution

permet de précipiter l'ARNt et en particulier le complexe formylméthionine-ARNt initiateur ; par conséquent, l'acide aminé libre reste en solution. Les papiers sont ensuite soumis à 3 autres lavages puis rapidement lavés à l'aide d'éthanol 100% pour éliminer le TCA et faciliter leur séchage. Les papiers sont séchés sous des lampes chauffantes pendant 20 min. Une fois secs, ils sont introduits dans des fioles de comptage contenant 2 mL de liquide de scintillation (Ecoscint), la radioactivité est enfin quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation.

10. Purification du fMet-ARNt

Ions mix 10x : 300 mM Imidazole pH 7,6 ; 100 mM Mg(Ac)₂ ; 1M KCl

Tampon A : 50 mM K-PO₄ pH 7,0 ; 1,7 M de Sulfate d'ammonium

Tampon B : 20 mM MOPS pH 8,0

Afin d'augmenter les rendements de purification, on réalise la méthionylation et la formylation en même temps. Pour cela, on réalise une solution contenant :

- 1x final ions mix
- 5 mM ATP
- 0,5 mM 10-formyltétrahydrofolate
- 2 mg/mL d'ARNt initiateur
- 10 µg/mL de méthionine
- 1/25 de FT diluée 800x dans notre cas
- 1/25 de MetRS dilué 1000x dans notre cas

Le mélange est divisé en aliquote de 250 µL dans des tubes Eppendorf. Puis ces derniers sont placés à 37°C pendant 30 min.

Pour arrêter la réaction, on ajoute ensuite : - 100 µL d'acétate de potassium pH 5,2 à 2M

- 120 µL de NaCl à 4M

- 1,75 mL d'éthanol 100%

Le mélange est entreposé à -80°C pendant 20 min puis centrifugé 25 min à 14 000 rpm à 4°C.

Le culot est ensuite repris dans : - 25 µL d'acétate de potassium pH 5,2 à 2M

- 62 µL de NaCl 4M

- 225 µL d'eau

Une fois dissout, la solution est centrifugée pendant 30 min à 14 000 rpm à 4°C. Puis on ajoute 3 volumes d'éthanol 100% dans chacun des tubes. On entrepose ensuite le mélange à -80°C sur la nuit.

Le lendemain, l'ARNt initiateur est culotté en centrifugeant le tout pendant 30 min à 14 000 rpm à 4°C. Ces derniers sont ensuite repris dans 50 µL d'acétate de sodium pH 5,2 à 5mM. Une fois bien dissous, on dilue les ARNt dans le tampon A puis on les charge sur une colonne phényl-sépharose (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans le même tampon. Cette colonne permet de séparer les ARNt initiateur non chargés des ARNt initiateur chargés et des ARNt initiateur chargés et formylés suivant un gradient inverse en sulfate d'ammonium et une légère augmentation du pH. Ainsi, on commence avec une concentration en sulfate d'ammonium de 1,6 M pour finir à 1,2 M.

Afin de s'assurer que le fmet-ARNt^{fmet} ne se déacyle pas après élution, on ajoute également un volume d'acétate de sodium pH 5,0 à 1M dans chaque tube de collecte.

Une fois élué, le fmet-ARNt^{fmet} est concentré et lavé à l'aide d'une solution contenant 5 mM d'acétate de sodium pH 5,0. Le fait de le maintenir dans des conditions acides permet d'éviter la déacylation de l'ARNt. Enfin, le fmet-ARNt^{fmet} est congelé à l'azote liquide.

11. Préparation d'une expérience ITC

Tampon ITC initiation : 50 mM Na Cacodylate pH 7,0 ; 70 mM NH₄Cl ; 30 mM KCl ;
7 mM MgCl₂ ; 1 mM DTT ; 5% glycérol

Tampon ITC élongation : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 70 mM NH₄Cl ; 30 mM KCl ;
7 mM MgCl₂ ; 1 mM DTT ; 5% glycérol

Après avoir décongelé le 30S, la première étape consiste à réactiver le ribosome. Pour cela, on ajoute du MgCl₂ à une concentration finale de 20 mM, puis on l'incube 30 min à 37°C. Le 30S est ensuite lavé dans le tampon ITC puis concentré. Il en est de même pour l'ensemble des partenaires. En moyenne, il faut 3,5 mg de 30S pour réaliser une expérience d'ITC.

Afin de réaliser les expériences d'élongation, le pH a été augmenté à 7,5. En effet, le facteur d'élongation EF-Tu précipite à pH 7,0.

La solution contenant le 30S est enfin rapportée à un volume final de 300 μL , en effet, la cuve à échantillon du microcalorimètre fait 280 μL . Au niveau de la seringue, le volume minimal est de 70 μL .

La taille des injections dépend de l'intensité du signal, elles varient entre 1,2 μL et 2 μL suivant la puissance dégagée par le facteur.

12. Test d'activité des sous-unités ribosomales purifiées : détection de la présence de luciférase

Afin de démontrer que les sous-unités ribosomales purifiées sont bien actives, nous avons réalisé un test de traduction *in vitro* de la rénilla luciférase. Pour cela, nous avons commencé par produire par PCR un ADN codant pour la rénilla luciférase et présentant un promoteur T7 en son extrémité 5'. Puis, par transcription *in vitro* T7 (voir la partie obtention de l'ARNm), nous avons obtenu l'ARNm correspondant à celui de la rénilla luciférase.

Un kit commercial de traduction *in vitro* dépourvu de ribosome (New England Biolabs) nous a ensuite permis de traduire l'ARNm de la rénilla luciférase en utilisant nos sous-unités 30S et 50S purifiées. En effet, ce kit contient l'ensemble des facteurs et des substrats nécessaires à la traduction excepté le ribosome.

Après 3H à 37°C, une partie des échantillons est prélevée pour être testée grâce au kit rénilla luciférase assay system (Promega). Ces derniers sont dilués à l'aide du tampon de la rénilla luciférase, transférés dans une plaque de comptage 96 puits et enfin introduits dans un luminomètre. Le substrat est alors injecté automatiquement par l'appareil. En présence de rénilla luciférase, ce dernier est alors oxydé, cette réaction s'accompagne de l'émission de photons ayant une longueur d'onde de 480 nm. L'appareil mesure alors les photons émis pendant 10 secondes. Ainsi, l'émission de photons nous indique la présence de rénilla luciférase dans l'échantillon et nous permet de conclure que les sous-unités ribosomales purifiées sont actives. Un test de traduction *in vitro* sans ajout de sous-unités a été réalisé en guise de contrôle négatif.

13. Test d'activité des facteurs d'initiation dans leur globalité

Tampon de traduction : 30 mM Tris-HCl pH 7,7 ; 80 mM NH₄Cl ; 16,6 mM KCl ;
16,6 mM acétate de Mg ; 3,3 mM DTT ; 1,6 mg/mL d'ARNt total ; 0,3 mM d'acide
folinique ; 0,33 mM d'un mix comprenant tous les acides aminés ; 3,3 mM ATP ;
0,66 mM GTP ; 16,6 phosphoenolpyruvate ; 0,04 mg/mL de pyruvate kinase

On réalise un test de traduction in vitro de l'ARNm de la rénilla luciférase à l'aide de la fraction S100, des facteurs d'initiation et du 70S purifiées dans un volume final de 25 µL :

- 5 µL de Tampon de traduction
- 5 µl de fraction S100 (sans glycérol)
- 5 pmol de 70S
- 5 pmol d'ARN rénilla luciférase
- 5 pmol de chaque facteur d'initiation

On incube le tout à 37°C pendant 45 min, puis la présence de la rénilla luciférase est testée au luminomètre. Pour cela, on prend 10 µL qu'on dilue dans le tampon de la rénilla luciférase. Le tout est ensuite transféré dans une plaque de comptage 96 puits et enfin introduit dans le luminomètre. Le substrat est alors injecté automatiquement par l'appareil. En présence de rénilla luciférase, ce dernier est alors oxydé ; cette réaction s'accompagne de l'émission de photons ayant une longueur d'onde de 480 nm. L'appareil mesure alors les photons émis pendant 10 secondes. Ainsi, l'émission de photons nous indique la présence de rénilla luciférase dans l'échantillon et nous permet de conclure que les facteurs d'initiations purifiés sont actifs. Un test de traduction in vitro sans ajout de facteurs d'initiation a été réalisé en guise de contrôle négatif.

14. Test d'activité d'IF3

Il est connu qu'en présence d'une importante concentration d'IF3, le 70S est dissocié (Subramanian and Davis, 1970). Ainsi, nous décidons d'incuber une quantité constante de 70S et d'augmenter progressivement les concentrations en IF3. 5 concentrations différentes sont ainsi testées. Le mélange est incubé 15 min à 37°C puis introduit sur de petits gradients (15 mL) de sucrose 10-30%. On centrifuge le tout 4H45 à 38 000 rpm à l'aide du rotor SW

41. Les gradients sont ensuite aspirés par le haut et l'on obtient un spectre UV pour chaque gradient. On constate effectivement que la présence de 70S diminue avec l'augmentation de la concentration en IF3. Par conséquent, si le ribosome se dissocie, la concentration en 30S et 50S augmente.

15. Hydrolyse du GTP par IF2

Tampon A : 20 mM Tris-HCl pH 7,9 ; 0,1 mM EDTA ; 10% glycérol ;

7 mM β -mercaptoethanol

Tampon B : Tampon A + 1M NaCl

On souhaite pouvoir déterminer la proportion de GTP hydrolysé par IF2 après 3H d'incubation. Une expérience d'ITC dure en moyenne 1H30 ; par conséquent on veut déterminer si du GTP est encore présent au moment où IF2 est injecté dans la cellule à échantillon. Pour cela, la protéine IF2 α est utilisée en présence d'un excès de 3 fois de GTP. L'ensemble est incubé 3H à 37°C, on dilue le mélange pour diminuer la concentration en sel, puis on centrifuge la solution car IF2 a précipité. On charge ensuite le surnageant sur une colonne CIMmultus™ QA-1 (BIA Separations). Le GTP est ensuite élué suivant un gradient de NaCl allant de 0 à 200 mM (Tampon A+B). On obtient alors un spectre présentant 2 pics : GDP et GTP.

Comme référence, on prend la même quantité de GTP qu'on incube 3H à 37°C mais sans IF2 α . Le contrôle est lui aussi dilué puis injecté sur la même colonne et élué suivant le même gradient.

16. Purification de EF-Tu

Tampon de Lyse : 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 200 mM NaCl ; 10 mM MgCl₂ ;

10 mM Imidazole pH 7,6 ; 5% glycérol ; 10 mM β -mercaptoethanol

Tampon de lavage : tampon de lyse + 500 mM NaCl

Tampon d'éluion : tampon de lyse + 200 mM Imidazole pH 7,6 + GDP à 50 μ M

Tampon A : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 50 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂ ;

7 mM β -mercaptoethanol

Tampon B : Tampon A + 1 M NaCl

Tampon de stockage : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 50 mM KCl ; 10 mM MgCl₂ ; 50 μM GDP ; 5 mM β-mercaptoethanol

Le gène *tufB* codant pour le facteur d'élongation a été introduit dans un vecteur pET-24b (+). Cette construction permet la surexpression du facteur avec une étiquette histidine en partie C-terminale. Ce plasmide contient également un gène de résistance à la kanamycine. Afin de surexprimer cette protéine, une souche *E. coli* BL21 Rosetta 2 a été transformée avec ce plasmide. A partir d'une colonie, nous avons réalisé une préculture avec de 100 mL de milieu LB contenant 40 μg/mL de kanamycine sur la nuit.

Le lendemain, une partie de la préculture nous a permis d'ensemencer 1,5 L de milieu LB toujours en présence de kanamycine. Une fois que la culture atteint une DO de 0,8, la surexpression de EF-Tu est induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Après 3H de surexpression, la culture est arrêtée et les cellules sont culotées et lavées dans le tampon de lyse froid. Enfin, le culot de cellules humides est gardé dans la glace sur la nuit. Le lendemain, le culot de bactérie est resuspendu dans le tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéase et de la DNase I. Le tout est ensuite lysé via la *french press* à une pression de 1,6 kbar, puis le lysat est ultracentrifugé 1H à 45 000 rpm à 4°C afin d'enlever les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite injecté sur une colonne Ni-NTA. Une fois l'ensemble injecté, on lave la colonne avec le tampon de lyse jusqu'à ce que la DO soit stable. On élimine ensuite des éventuels contaminants en augmentant la concentration en sel à 500 mM ; pour cela, on utilise le tampon de lavage. Ensuite la protéine EF-Tu est éluée en présence de GDP grâce au tampon d'éluion. A partir d'un gel SDS-PAGE 10%, on arrive à détecter la protéine d'intérêt. A ce stade, EF-Tu est déjà bien propre mais des contaminants sont encore présents. Pour cela, le mélange est dilué dans le tampon A puis chargé sur une colonne CIMmultus™ QA-1 (BIA Separations). Etant donné que la colonne est de faible taille, seul 2 mg de protéine peuvent être chargés à chaque fois. EF-Tu est ensuite éluée à partir d'un gradient de NaCl allant de 50 à 240 mM (Tampon A + B). La réalisation d'un gel SDS-Page 10% en sortie de colonne nous permet de conclure que la protéine est maintenant pure.

Enfin la protéine est concentrée et lavée dans le tampon de stockage puis diluée avec du glycérol 100% pour arriver à une concentration finale en glycérol de 50%. Ainsi, EF-Tu est conservé à -20°C sous une forme non active car complexé au GDP.

La détermination précise des rendements de purification est délicate car la protéine est en présence d'un excès en GDP qui absorbe également à 280 nm. Au final, on obtient environ 5 mg à partir de 1,5 L de culture.

17. Préparation de la fraction S100

Tampon de lyse : 100 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM KCl ; 10% glycérol ;

10 mM β -mercaptoéthanol

Tampon A : 20 mM K-PO₄ pH 7,2 ; 0,1 mM EDTA ; 10% glycerol ;

10 mM β -mercaptoéthanol

Tampon B : 250 mM K-PO₄ pH 6,8 ; 0,1 mM EDTA ; 10% glycerol ;

10 mM β -mercaptoéthanol

On commence par réaliser une préculture sur la nuit à 37°C de 100 mL de milieu LB contenant la bactérie sauvage MRE600. Le lendemain, cette préculture nous sert àensemencer 2L de milieu LB. Une fois que la culture atteint une DO de 2,6, elle est arrêtée. Les cellules sont alors culotées et lavées dans le tampon de lyse froid. Enfin, le culot de cellules humides est gardé dans la glace sur la nuit.

Le lendemain, les cellules sont resuspendues dans le tampon de lyse additionné de DNase I, d'inhibiteurs de protéase et de CaCl₂. L'ensemble est ensuite lysé via la *french press* à une pression de 1,6 kbar. Après lyse, on ajoute encore la même quantité d'inhibiteurs de protéase afin d'éviter toute protéolyse de l'extrait brut. Les débris cellulaires sont éliminés par une première centrifugation de 30 min à 4 000g à 4°C. Puis le surnageant est ultracentrifugé une deuxième fois pendant 2 heures à 45 000 rpm à 4°C à l'aide du rotor 50.2 Ti afin d'éliminer les ribosomes. A nouveau la même quantité d'inhibiteurs de protéase est ajoutée à l'extrait brut. Ce dernier est ensuite placé dans un boudin de dialyse afin de dialyser l'ensemble sur la nuit dans le tampon A.

Le lendemain, le dialysat est injecté sur une colonne DEAE-sépharose Fast Flow (GE Healthcare) équilibrée préalablement dans le tampon A. La colonne est ensuite extensivement lavée avec le même tampon A, puis les protéines sont éluées suivant un gradient de potassium allant de 20 à 250 mM (Tampon A+B). Les fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE 10%. Celles contenant des protéines sont rassemblées et concentrées à l'aide d'un Centricon 30K.

La fraction S100 est enfin diluée avec du glycérol 100% pour arriver à une concentration finale en glycérol de 50%. La présence de certaines aminoacyl-ARNt synthétases (PheRS, MetRS, GlyRS et ThrRS) est ensuite testée, ce qui permet de conclure que la fraction S100 est bien fonctionnelle et qu'elle contient l'ensemble des synthétases.

La fraction S100 est enfin conservée à -20°C.

18. Purification de l'ARNt glycine

Tampon A : 10 mM Na Acétate pH 5,0 ; 10 mM NaCl ; 2 mM MgCl₂

Tampon B : Tampon A + 1M NaCl

Tampon C : 10 mM Na-PO₄ pH 7,0 + 1 M NaFormate pH 5,3 + 8 mM MgCl₂

Tampon D : 10 mM Na-PO₄ pH 7,0 + 30% Méthanol

Tampon de stockage : 50 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 100 mM KCl ; 10 mM MgCl₂

Afin de surexprimer l'ARNt glycine, nous avons utilisé la souche bactérienne *E. Coli* JM101Tr. Les bactéries ont été transformées avec le plasmide pBSTNAV, ce dernier contient le gène codant pour l'ARNt glycine sous la dépendance d'un promoteur permettant une expression constitutive. Ce plasmide possède également le gène de résistance à l'ampicilline. La veille, on commence par réaliser une préculture à l'aide de 50 mL de milieu LB en présence de 100 µg/mL d'ampicilline. Le lendemain, cette préculture nous sert à ensemencer 8 L de milieu LB contenant toujours de l'ampicilline. L'ensemble est placé à 37°C pendant toute la journée. Le soir, les cellules sont culotées dans 2 tubes eppendorf 50mL et lavées dans un tampon froid contenant 20 mM tris pH 7,5 et 150 mM NaCl. En temps normal, on obtient environ 25 g de cellule/litre de culture.

Le lendemain, les culots de cellules sont repris dans 25 mL de tampon contenant 10 mM Na Acétate pH 5,0 et 10 mM Mg Acétate. Une fois homogénéisées, les cellules sont lysées par l'ajout de 20 mL de phénol saturé dans 0,1 M Na Acétate pH 5,0. On obtient un volume final de 45 mL par tube. Ces derniers sont vortexés 4 fois pendant 30 secondes, puis centrifugés 10 min à 5 000 g à 20°C. La phase aqueuse est mise de côté et la phase phénolique est réextraite par l'ajout de 20 mL par tube de tampon contenant 10 mM Na Acétate pH 5,0 + 10 mM Mg Acétate. Après 10 min à 5 000 g à 20°C, on récupère à nouveau la phase aqueuse. Les deux phases aqueuses sont ensuite réunies, on obtient ainsi 40 mL par tube. On ajoute ensuite 2 volumes d'éthanol 100%. Le mélange est centrifugé 25 min à 5 000g à 4°C, puis le

culot est resuspendu dans 20 mL d'une solution contenant 1 M NaCl. A ce stade, la solution reste laiteuse. Par conséquent, chaque tube est centrifugé 30 min à 8 000 rpm à 4°C. Une fois le surnageant récupéré, on ajoute 2,5 volumes d'éthanol 100%. Encore une fois, on centrifuge le tout 30 min à 8 000 rpm à 4°C. Le culot ainsi obtenu est repris dans le tampon A puis laissé durant à la nuit à -20°C.

La totalité du mélange est ensuite chargé successivement sur une colonne DEAE-sépharose Fast Flow. Les ARNt sont élués suivant un gradient de NaCl allant de 400 à 850 mM (Tampon A + B).

Un test d'aminoacylation permet de déterminer les fractions contenant l'ARNt glycine (voir partie test d'aminacylation). Pour réaliser ce test, nous avons utilisé les enzymes présentes dans la fraction S100 (voir partie préparation de la fraction S100). Ces dernières sont ensuite réunies, concentrées et dialysées contre le tampon C. Le dialysat est ensuite chargé sur une colonne Delta Pak C4 (Waters) puis les ARNt sont éluées suivant un gradient inverse de sel et une augmentation en méthanol (Tampon C + D). Les fractions contenant l'ARNt glycine sont déterminées par un test d'aminoacylation, puis ces dernières sont concentrées et lavées dans le tampon de stockage.

De cette façon, la pureté de l'éluât est également estimée. Au final, l'ARNt glycine a été purifié à hauteur de 37%. Ainsi à partir de 8L de culture, nous sommes arrivés à obtenir 4 mg d'ARNt glycine en prenant en compte le taux de pureté.

19. Purification du complexe ternaire aa-ARNt – EF-Tu/GTP

Tampon PM5x : 500 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM KCl ; 50 mM MgCl₂

Après avoir purifié l'ARNt glycine, on cherche maintenant à purifier le complexe ternaire gly-ARNt^{gly} – EF-Tu/GTP. Pour cela, il faut à la fois charger l'ARNt en glycine et changer le GDP présent sur EF-Tu par du GTP. On réalise donc une solution contenant :

- Tampon PM 1x
- 2 mM d'ATP
- 2 mM de phosphoénolpyruvate
- 0,15 mg/mL de phosphoénolpyruvate kinase
- 0,4 mg/mL d'aminoacyl-ARNt-synthétase (S100)

- 200 μ M de GTP
- 200 μ M glycine
- 2 μ M de complexe EF-Tu/GDP
- l'ARNt d'intérêt

Le mélange est placé à 37°C pendant 45 min puis concentré au Centricon 30K afin d'obtenir un volume final de 250 μ L. Puis la solution est injectée sur un tamis moléculaire Superdex 200 increase (GE Healthcare). De cette façon, on arrive à séparer le complexe ternaire des ARNt contaminants et du facteur EF-Tu/GTP présent en excès.

Le complexe ternaire ainsi récupéré est ensuite concentré, lavé dans le tampon ITC puis directement utilisé afin d'éviter toute déacylation.

Chapitre IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Etude thermodynamique de la formation du complexe d'initiation 30S (30SIC) par *incremental ITC*

A. Mise au point d'une nouvelle approche expérimentale : *l'incremental ITC (iITC)*

L'équipe de biophysique et de biologie structurale travaille depuis de nombreuses années sur le VIH-1 et en particulier sur la transcriptase inverse (RT). Les connaissances acquises sur le fonctionnement de cette enzyme et les très bons rendements de purification ont fait de la RT un parfait candidat pour une étude thermodynamique par ITC. L'équipe a développé une nouvelle approche expérimentale, *l'incremental ITC*, afin d'exploiter au mieux l'étude thermodynamique d'une enzyme réalisant des cycles itératifs d'incorporation de nucléotides en phase d'élongation.

1. Etudes de l'élongation de la transcription inverse du VIH-1 par *iITC*

La transcription inverse est une étape clé du cycle répliatif du VIH-1. Elle réalise la conversion de l'ARN viral simple brin en un ADN proviral double brin qui sera par la suite intégré dans le génome de la cellule hôte. La RT est l'enzyme multifonctionnelle responsable de cette étape. Elle possède à la fois une activité ADN polymérase ARN- ou ADN-dépendante mais également une activité RNase H.

Nous avons étudié dans un premier temps le mécanisme d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques de la RT par ITC. Bien qu'utilisé depuis plus de 20 ans dans les traitements de première ligne contre le VIH-1, notre travail a démontré que le modèle d'inhibition

couramment admis était en partie erroné. Notre étude détaillée par ITC nous a permis d'élucider le mécanisme réel d'action de cette classe d'inhibiteurs.

Nous avons ensuite entrepris de disséquer l'activité ADN polymérase ADN-dépendante de la RT en phase d'élongation. Cette étape est caractérisée par l'incorporation successive des nucléotides sur un double brin d'ADN matrice/amorce. Par cette étude, nous avons obtenu une description thermodynamique complète de l'ensemble des étapes constituant l'élongation. Ce travail a été réalisé grâce au développement d'une nouvelle approche expérimentale : *l'incremental ITC*, ou *iITC*. Cette méthode permet de suivre les étapes d'une réaction de polymérisation nucléotide après nucléotide au sein d'une même série d'expérience d'ITC (**Fig. 27**). Selon ce protocole, on forme dans un premier temps le complexe RT/ADN (**1**) ce qui permet de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre la RT et le duplex d'ADN. Le premier nucléotide entrant est ensuite introduit au cours d'une seconde titration ITC (**2**). Lors de cette 2^{ème} expérience, on mesure les paramètres thermodynamiques de l'incorporation du premier nucléotide. Puis le second nucléotide entrant est ajouté (**3**) ce qui permet de déterminer les paramètres thermodynamiques d'incorporation pour ce nouveau nucléotide (**Fig. 27**). On peut ainsi suivre une réaction de polymérisation en incorporant successivement de 3 nucléotides. Au-delà, la dilution et la complexité du mélange réactionnel, due aux ajouts successifs de chaque ligand (ADN puis les différents nucléotides), rendent les mesures délicates à interpréter.

Nous avons également utilisé au cours de ces expériences d'*iITC* des analogues de nucléotides de type didésoxyribonucléotide (ddNTP). Ces molécules, inaptes à la polymérisation sont néanmoins capables de se fixer sur la RT. Ainsi il a été possible de déchiffrer plus profondément encore le cycle réactionnel en distinguant l'étape d'association du nucléotide entrant de celle de son intégration dans l'ADN néosynthétisé.

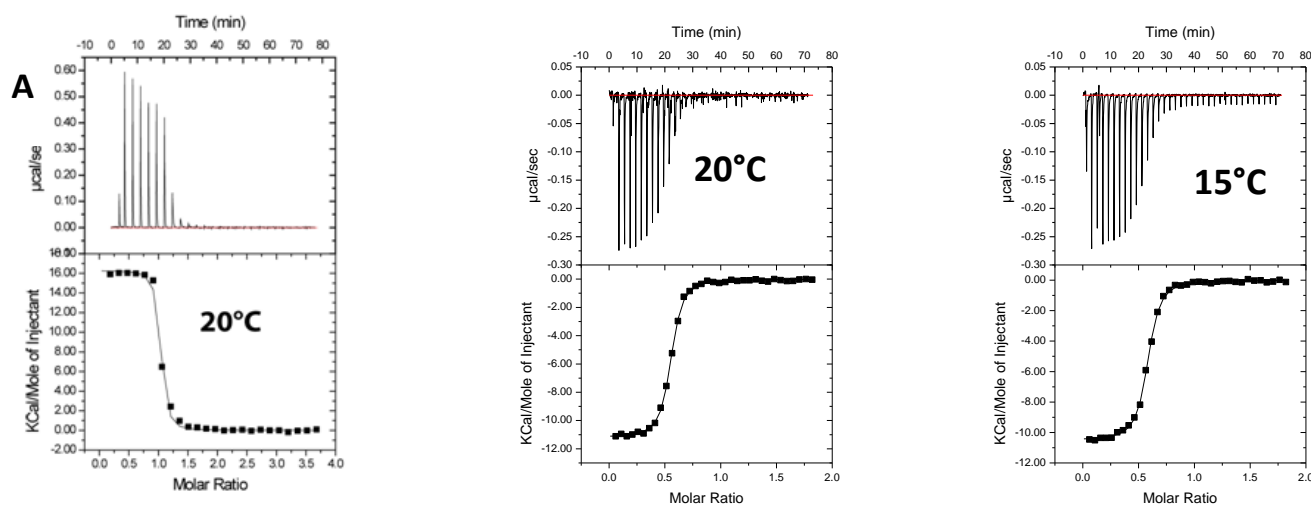
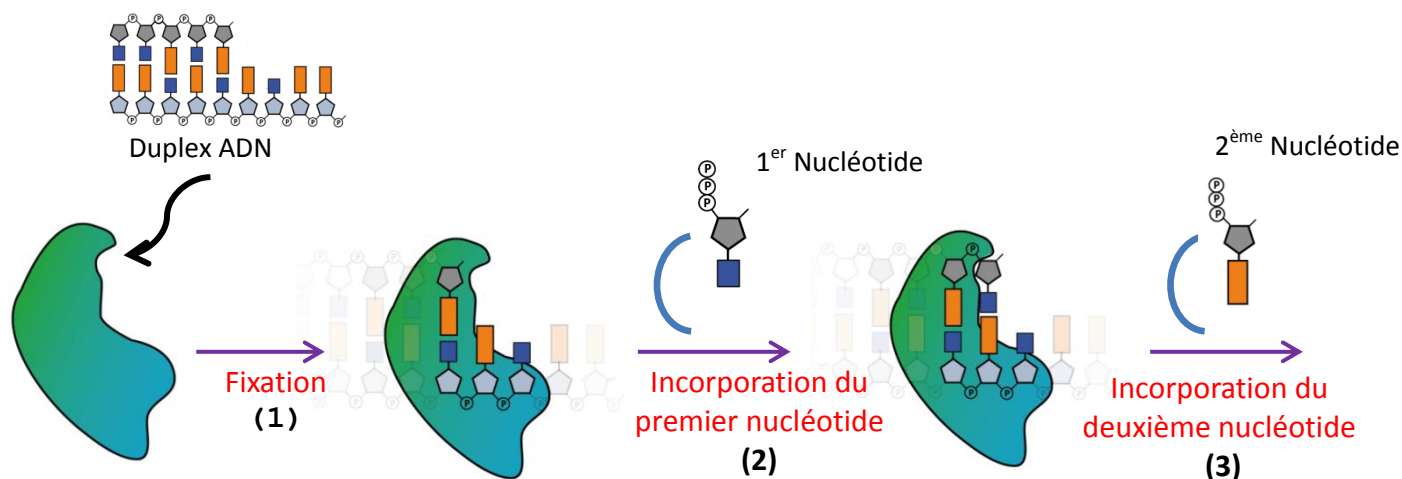


Figure 27 : Représentation schématique de l'incremental ITC. Chaque expérience d'ITC nous permet successivement de déduire les paramètres thermodynamiques de l'interaction des différents ligands.

Un autre intérêt de la méthode *iITC* est de diminuer très nettement la consommation de matériel biologique par réutilisation du complexe formé dans la cellule à échantillon. Cependant, l'*iITC* n'est réalisable qu'à partir du moment où les substrats présents en excès dans la cuve à échantillon n'interagissent pas entre eux. Dans notre cas, aucune interaction entre les différents nucléotides n'a été observée ; validant notre approche.

La parfaite connaissance thermodynamique du cycle de polymérisation de la RT nous a permis d'élucider le mécanisme d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques. L'effet de ces molécules inhibitrices a pu être précisément mesuré sur l'ensemble des étapes, conduisant à l'établissement d'un nouveau modèle d'inhibition. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication parue dans le journal JACS en 2013 (Bec et al., 2013).

Publication :

**Thermodynamics of HIV-1 Reverse Transcriptase in Action
Elucidates the Mechanism of Action of Non-Nucleoside Inhibitors**

Guillaume Bec, Benoit Meyer, Marie-Aline Gerard, Jessica Steger, Katja
Fauster, Philippe Wolff, Dominique Burnouf, Ronald Micura, Philippe Dumas,
and Eric Ennifar

Thermodynamics of HIV-1 Reverse Transcriptase in Action Elucidates the Mechanism of Action of Non-Nucleoside Inhibitors

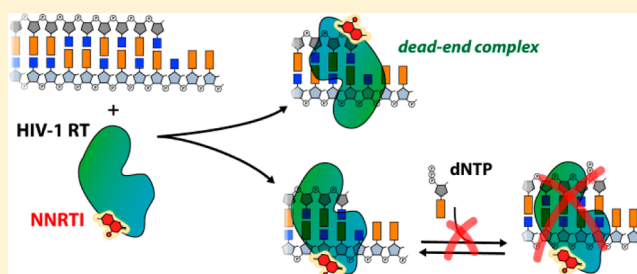
Guillaume Bec,^{†,⊥} Benoit Meyer,^{†,⊥} Marie-Aline Gerard,^{†,§} Jessica Steger,^{‡,||} Katja Fauster,[‡] Philippe Wolff,[†] Dominique Burnouf,[†] Ronald Micura,[‡] Philippe Dumas,[†] and Eric Ennifar^{*,†}

[†]Architecture et Réactivité des ARN, CNRS/Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

[‡]Institute of Organic Chemistry, Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), University of Innsbruck, 6020 Innsbruck, Austria

S Supporting Information

ABSTRACT: HIV-1 reverse transcriptase (RT) is a heterodimeric enzyme that converts the genomic viral RNA into proviral DNA. Despite intensive biochemical and structural studies, direct thermodynamic data regarding RT interactions with its substrates are still lacking. Here we addressed the mechanism of action of RT and of non-nucleoside RT inhibitors (NNRTIs) by isothermal titration calorimetry (ITC). Using a new incremental-ITC approach, a step-by-step thermodynamic dissection of the RT polymerization activity showed that most of the driving force for DNA synthesis is provided by initial dNTP binding. Surprisingly, thermodynamic and kinetic data led to a reinterpretation of the mechanism of inhibition of NNRTIs. Binding of NNRTIs to preformed RT/DNA complexes is hindered by a kinetic barrier and NNRTIs mostly interact with free RT. Once formed, RT/NNRTI complexes bind DNA either in a seemingly polymerase-competent orientation or form high-affinity dead-end complexes, both RT/NNRTI/DNA complexes being unable to bind the incoming nucleotide substrate.



■ INTRODUCTION

HIV-1 reverse transcriptase (RT) is a multifunctional enzyme that converts the genomic HIV RNA into proviral DNA by catalyzing RNA- and DNA-dependent DNA polymerase reactions in addition to a ribonuclease H (RNase H) activity. RT is an asymmetric heterodimer composed of p66 and p51 subunits, both produced by the cleavage of the Gag-Pol polyprotein by the viral protease. The p66 subunit contains both enzymatic active sites comprised of a polymerization and an RNase H domain.^{1,2} It contains four subdomains termed “fingers”, “palm”, “thumb”, and “connection” by analogy to a right hand. To date, RT remains an important target for antiretroviral therapy since half of the 26 individual agents licensed for the treatment of HIV-1 infection target the RT polymerization activity. These drugs are divided into two classes: (i) nucleoside- and nucleotide-analogue RT inhibitors (NRTIs), which compete with the natural nucleoside substrate and act as terminators of DNA synthesis after incorporation into the primer strand, and (ii) non-nucleoside RT inhibitors (NNRTIs). Five NNRTIs have been approved for clinical use by the U.S. Food and Drug Administration: nevirapine, delviradine, efavirenz, etravirine (TMC 125), and, more recently, rilpivirine (TMC 278). As revealed by numerous crystal structures, all NNRTIs target the same hydrophobic pocket (non-nucleoside inhibitor binding pocket, NNIBP)

located in the palm domain of the p66 subunit about 10 Å from the polymerase catalytic site.^{2–6}

Steady-state and presteady-state kinetic analyses have been used to elucidate the mechanism of action of various NNRTIs,^{7–9} suggesting that their interaction with RT does not prevent the dNTP substrate binding but rather dramatically reduces the rate of dNTP incorporation by interfering with the chemical step of DNA synthesis. However, recent studies performed using biophysical approaches have shown that the precise inhibition mechanism is still ambiguous. For example, a recent crystal structure of a RT/DNA/nevirapine complex revealed that the dNTP binding pocket is distorted in presence of the inhibitor, shifting the 3'-end of the DNA primer away from the polymerase active site,¹⁰ casting doubt on the ability of RT to bind dNTP in this state. In addition, single-molecule FRET (smFRET) assays showed that RT can slide between opposite termini on long duplexes and rapidly switches between two orientations (polymerization- or RNaseH-competent modes) when it binds polypurine RNA sequences that are primers for plus-strand synthesis. Flipping and sliding kinetics are modulated by binding of incoming dNTP and NNRTIs, which stabilize and destabilize the polymerization-competent orientation, respectively.^{11,12}

Received: February 20, 2013

Published: June 6, 2013

The enzymatic activities of RT and mechanisms of inhibition by RT inhibitors have been intensively investigated using biochemical and structural approaches over the past 30 years. Several advanced biophysical approaches, such as surface plasmon resonance,^{13–16} single molecule techniques,^{11,12,17,18} or mass spectrometry¹⁹ provided significant and complementary insights into the understanding of various processes involving RT. However, somewhat surprisingly, thermodynamic data regarding RT interactions are still lacking. When integrated with other experimental methodologies, thermodynamic data are essential for a complete description of any binding interaction, revealing forces driving complex formation and providing insights into mechanisms of action. Thermodynamic data are also essential for linking structural data with *in silico* modeling. In this study we report a detailed thermodynamic study of DNA polymerization by RT and of the mechanism of inhibition of NNRTIs using isothermal titration calorimetry (ITC). ITC is a label-free and true in-solution technique and is considered the “gold standard” assay for binding since it directly provides, in one single experiment, the complete binding profile between two molecules (binding affinity, enthalpy and entropy changes, stoichiometry).^{20–23} Using a novel “incremental ITC” strategy, the mechanism of DNA polymerization by RT was dissected step by step through successive additions in the ITC cell of consecutive RT substrates. We showed that, by providing a free-energy change almost similar to that of dNTP hydrolysis, the initial binding step of an incoming dNTP provides much of the driving force for DNA synthesis. Interactions between NNRTIs and RT or RT/DNA complex were also dissected thermodynamically. A joint processing of the titration curves at different temperatures together with a kinetic parameter determination was performed using the kinITC approach recently developed in our laboratory.²⁴ Unexpectedly, our results clearly show that the incoming nucleotide is unable to bind the RT/DNA complex in presence of NNRTI, in contradiction to the current model of NNRTI inhibition. In view of these results, we propose a reinterpretation of the mechanism of inhibition of NNRTIs highlighting two inhibition pathways. Consequences for the inhibition of RT by NNRTI *in vivo* are discussed.

RESULTS

Analysis of RT Binding to a DNA Primer-Template.

The first step in DNA polymerization involves binding of RT to a DNA primer-template. Using ITC microcalorimetry, we first investigated the binding of RT to a 20-/27-mer primer-template over the 5–30 °C temperature range (Figures S1 and S2). Our data (Table 1 and Figure 1) show that the RT-DNA interaction is endothermic ($\Delta H > 0$) in this temperature range, with an affinity in the low nanomolar range, in agreement with available biochemical data.^{25,26} The binding is therefore entropy driven, which might result from the predominance of minor groove over major groove interactions, leading to the displacement of ordered cations and water molecules from DNA by positively charged protein residues.^{22,27} A comparison with thermodynamic parameters of DNA binding by Taq and Klenow polymerases^{28,29} shows a similar affinity of all three enzymes for DNA. However, the entropic contribution to DNA binding is significantly more favorable in the case of RT, possibly due to the additional interactions provided by the RNaseH domain and the p51 subunit with the DNA minor groove.³⁰

Table 1. Thermodynamics of RT/DNA Binding^a

temp (°C)	ΔH (kcal·mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal·mol ⁻¹)	K_d (nM)
5 ^b	28.9 ± 0.9	-38.0 ± 1.0	70 ± 2
10 ^c	25.2 ± 1.8	-34.5 ± 1.7	60 ± 3
15 ^b	20.4 ± 1.9	-30.1 ± 1.8	48 ± 4
20 ^d	16.1 ± 0.1	-26.0 ± 0.2	41 ± 4
25 ^c	10.4 ± 0.1	-20.5 ± 0.1	38 ± 2
30 ^c	4.7 ± 0.2	ND	ND

^aAll data were obtained on a ODN20/MATODN27A DNA primer-template. ND denotes “not determinable” since the Wiseman parameter c is >1000. ^bAverage values and standard deviations of two independent experiments. ^cAverage values and standard deviations of three independent experiments. ^dAverage values and standard deviations of four independent experiments.

Interestingly, using our 20-/27-mer DNA sequence, only one binding configuration was observed (except at 5 °C where a minor secondary binding mode was also observed as shown in Figure S2), presumably the polymerization competent one according to the following experiments. However, for different primer-template sequences, two major modes of interactions were observed (Figure S3), in agreement with single molecules studies of RT/nucleic acid substrates.^{11,12,18} Analysis of the temperature dependence of the binding enthalpy $\Delta C_p = \partial\Delta H/\partial T$ (Figure 1b) reveals a large, nonconstant, negative heat capacity change (ΔC_p ranging from -0.74 to -1.14 kcal·mol⁻¹·K⁻¹ between 5 and 30 °C), similar to the one observed for the Taq DNA polymerase (-0.73 kcal·mol⁻¹·K⁻¹)²⁸ and for the Klenow fragment (-0.87 to -0.97 kcal·mol⁻¹·K⁻¹).²⁹ Because of this large negative heat capacity change, which is usually considered a hallmark of local folding coupled to binding,³¹ extrapolation of our data to higher temperatures shows that the binding enthalpy is 0 at 34 °C (Figure 1b). According to the van't Hoff equation ($\partial\ln K_d/\partial T = -\Delta H/(RT^2)$), a null ΔH implies that the binding affinity is at an extremum at that temperature, which turns out to be a maximum due to the sign of ΔC_p . Consequently, the optimal DNA binding affinity is close to the physiological temperature for the virus.

Following RT Polymerization Step by Step Using Incremental ITC. In order to follow each step of DNA elongation, we set up a novel ‘incremental-ITC’ protocol which enables one to monitor successive chemical reactions in the sample cell (Figure 2 and Figure S4). After the addition of DNA into protein in a first ITC experiment, the content of the cell is kept and the syringe is reloaded with the first incoming nucleotide substrate. The first round of polymerization is then followed by running another ITC experiment. After completion of this reaction, the syringe is loaded again with the second incoming nucleotide substrate (that should be different from the previous one) and a third successive ITC experiment is performed on the same sample to perform a second round of polymerization. Using this strategy, we could follow up to five consecutive reactions, including the addition of all four dNTPs.

By using natural dNTP nucleotides, one can only observe a complete round of polymerization (i.e., initial dNTP binding, chemical step, and translocation). However, by first incorporating a dideoxynucleotide (ddNTP) into the primer strand, further nucleotide incorporation is prevented, which allows one to observe the contribution of initial dNTP binding alone in absence of catalysis (Figure 2, ddATP is used in the fourth ITC experiment, and dGTP initial binding was thus observed in the

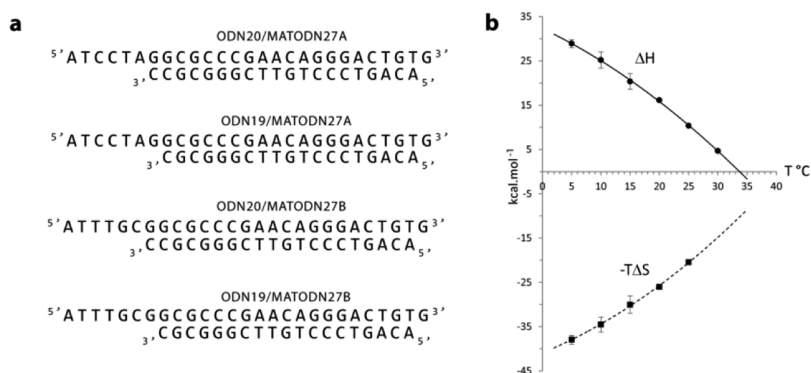


Figure 1. Thermodynamics of RT binding to a DNA primer-template. (a) Sequences of DNA primer-templates used in this study. (b) Temperature dependence of ΔH and $-T\Delta S$ for RT binding to a DNA primer-template ODN19/MATODN27B. The curves are merely the result of a quadratic fit. At 30 °C, where the Wiseman parameter c is >1000, only the binding enthalpy could be accurately determined.

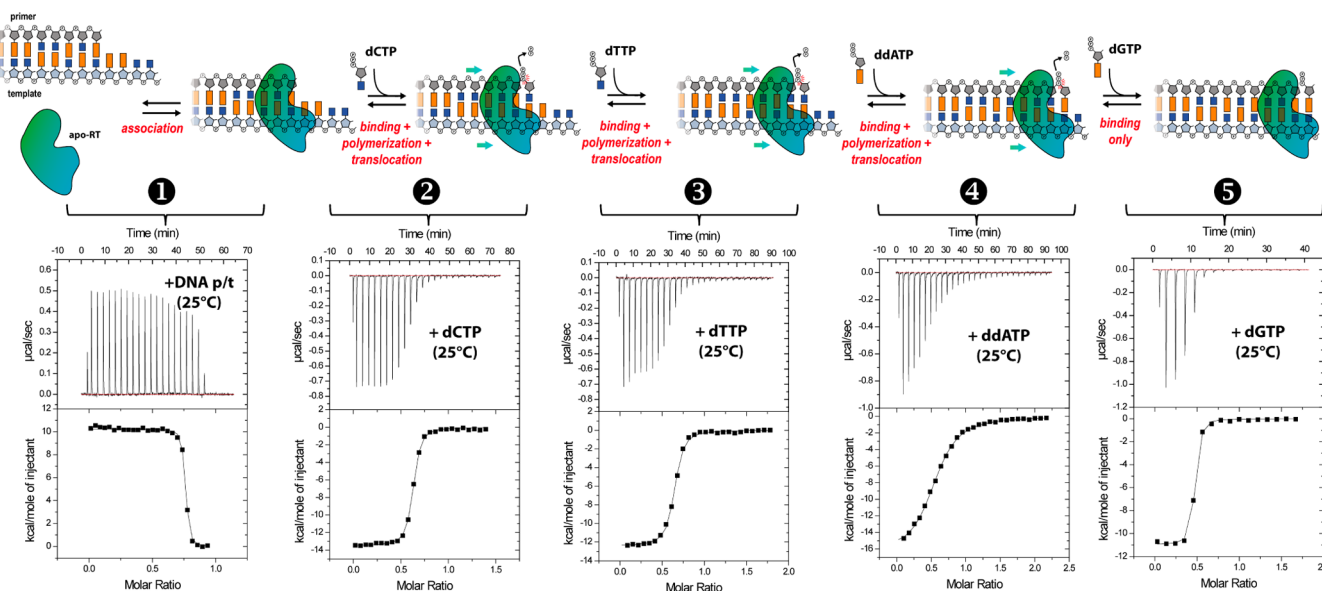


Figure 2. Example of incremental-ITC experiment. Five successive experiments were performed at 25 °C on the same sample: addition of (1) DNA primer-template ODN19/MATODN27B (560 μM) into RT (60 μM in the ITC cell), followed by sequential injection of the incoming nucleotides (2) dCTP, (3) dTTP, (4) ddATP, and (5) dGTP (900 μM).

fifth ITC experiment). Using this approach, it is therefore possible to obtain the thermodynamic parameters both of overall nucleotide incorporation (ΔH_{pol} , ΔS_{pol} and ΔG_{pol}) and of nucleotide binding only (ΔH_{bind} , ΔG_{bind} and ΔS_{bind}). Importantly, the difference between these two sets of terms yields the thermodynamic parameters for the chemical reaction and the protein translocation (which are inextricable in our experiments):

$$\Delta H_{\text{cstr}} = \Delta H_{\text{pol}} - \Delta H_{\text{bind}}$$

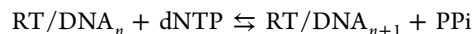
$$\Delta S_{\text{cstr}} = \Delta S_{\text{pol}} - \Delta S_{\text{bind}}$$

$$\Delta G_{\text{cstr}} = \Delta G_{\text{pol}} - \Delta G_{\text{bind}}$$

Incorporation of nucleotides into the DNA template following incremental-ITC experiments was assessed by mass spectrometry analysis (Figure S5).

Following formation of the RT/DNA primer-template complex, series of incremental-ITC experiments were performed with successive additions of dTTP and dATP (Figure S6), ddTTP and dATP (Figure S7), dTTP, ddATP and dGTP

(Figure S8), ddCTP and dTTP (Figure S9), and dGTP and dCTP (Figure S10). Finally, data for dCTP binding only were obtained on a ddG-terminated RT/DNA complex (Figure S11). Here, it is important to emphasize that if a reaction corresponding to the binding-only of a dNTP onto a previously incorporated ddNTP is correctly described by a dimensioned dissociation constant K_{d} , this is not the case with the full reaction leading to incorporation of a new nucleotide. Indeed, such a reaction amounts to



which, *a priori*, can only be described by a dimensionless equilibrium constant. However, we clearly established that, in our conditions, the amount of free pyrophosphate (PPi) remained sufficiently small (due to precipitation of insoluble magnesium pyrophosphate) that the latter description was not adequate, whereas an apparent dissociation constant described correctly our data (see Supporting Information).

Thermodynamic parameters were derived for dTTP, ddTTP, dATP, ddATP, dCTP, ddCTP and dGTP nucleotide incorporation and for the four natural dNTPs binding in

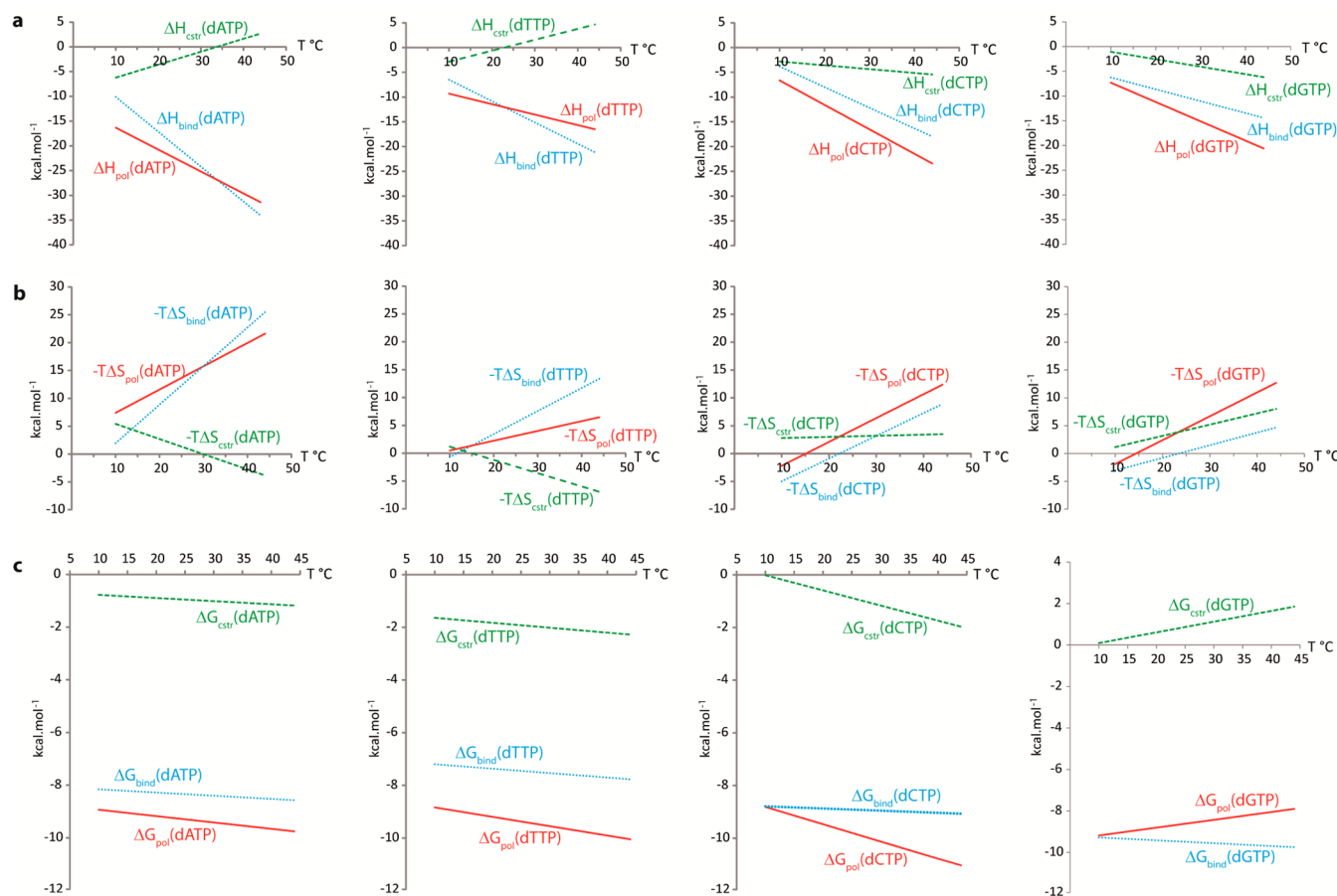


Figure 3. Thermodynamics of incoming nucleotide binding to RT/DNA complex. Temperature dependence of (a) ΔH , (b) $-T\Delta S$, and (c) ΔG are shown for incoming nucleotides dATP, dTTP, dCTP, and dGTP to the RT/DNA complex. Observed enthalpy, entropy, and Gibbs free energy changes for nucleotide initial binding only (ΔH_{bind} , $-T\Delta S_{\text{bind}}$, ΔG_{bind}) are represented with cyan dotted lines. Analogous parameters for overall nucleotide incorporation (ΔH_{pol} , $-T\Delta S_{\text{pol}}$, ΔG_{pol}) are represented with red solid bold lines. Deduced parameters for the chemical plus the translocation steps (ΔH_{cstr} , $-T\Delta S_{\text{cstr}}$, ΔG_{cstr}) are represented with green dashed lines. Experimental data are reported in Figure S12 and Tables S1 and S2 and were fitted with a linear least-squares regression.

absence of catalysis. (Figure 3, Tables S1 and S2 and Figure S12). Dissociation constants obtained by ITC are, after temperature correction, slightly lower than those obtained by biochemical approaches.^{25,32,33} Quite surprisingly, the binding of dTTP is significantly weaker than those of other dNTPs (Table S2), which might reflect a possible effect of sequence context effect. Unlike the RT-DNA interaction, which is endothermic, binding of dNTP or ddNTP to RT/DNA complex is exothermic (as expected). Enthalpy changes for nucleotide incorporation (between -10 and -24 kcal·mol⁻¹) are in good agreement with thermodynamic data obtained by stopped-flow calorimetry for DNA synthesis of the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I (between -10 and -16 kcal·mol⁻¹).³⁴ However, in the latter study, the enthalpic contribution of initial binding of dNTP could not be observed.

To assess that ΔH_{bind} is exclusively due to initial binding of dNTP and not to a possible polymerization of nonelongated DNA after dissociation of RT from the DNA template-primer +1, a control experiment was performed using a purified ddT-terminated RT/DNA cross-linked complex^{30,35} with incoming dATP. This experiment led to thermodynamic parameters for dATP binding that were remarkably similar to the results obtained with the noncovalent RT/DNA complex (Figure S13 and Table S2), thus validating the incremental-ITC strategy. We also performed control experiments with the addition of a

mismatched nucleotide, which did not show any significant binding (Figure S14).

Interestingly, for 20-/27-mer DNA primer-template sequences showing only one RT binding mode, the fraction of DNA-binding competent RT correlates well with the fraction of incoming nucleotide bound or elongated. This shows that the binding orientation adopted by the RT for this DNA sequence corresponds to the polymerization-competent binding observed in crystal structures.^{30,36} However, the two other DNA primer-template substrates used in our study led to two thermodynamically distinct RT binding modes, only one being catalytically competent (Figure S3). Most likely, the incompetent binding mode corresponds to an orientation of the RT where the RNaseH domain is close to the 3'-hydroxyl of the DNA template as observed by smFRET.^{11,12} In the case of the two modes of interaction observed with an RNA/DNA hybrid, neither RT-RNA/DNA complex is capable of proceeding with polymerization (Figure S3), in agreement with smFRET studies.¹¹

kinITC Analysis of Nevirapine Binding to Free RT and RT/DNA Primer-Template Complex. We recently examined the binding of nevirapine to free RT using our newly developed kinITC approach, which allows obtaining joint thermodynamic and kinetic data on a label-free system using ITC.²⁴ Data derived from kinITC have led to a determination of interaction

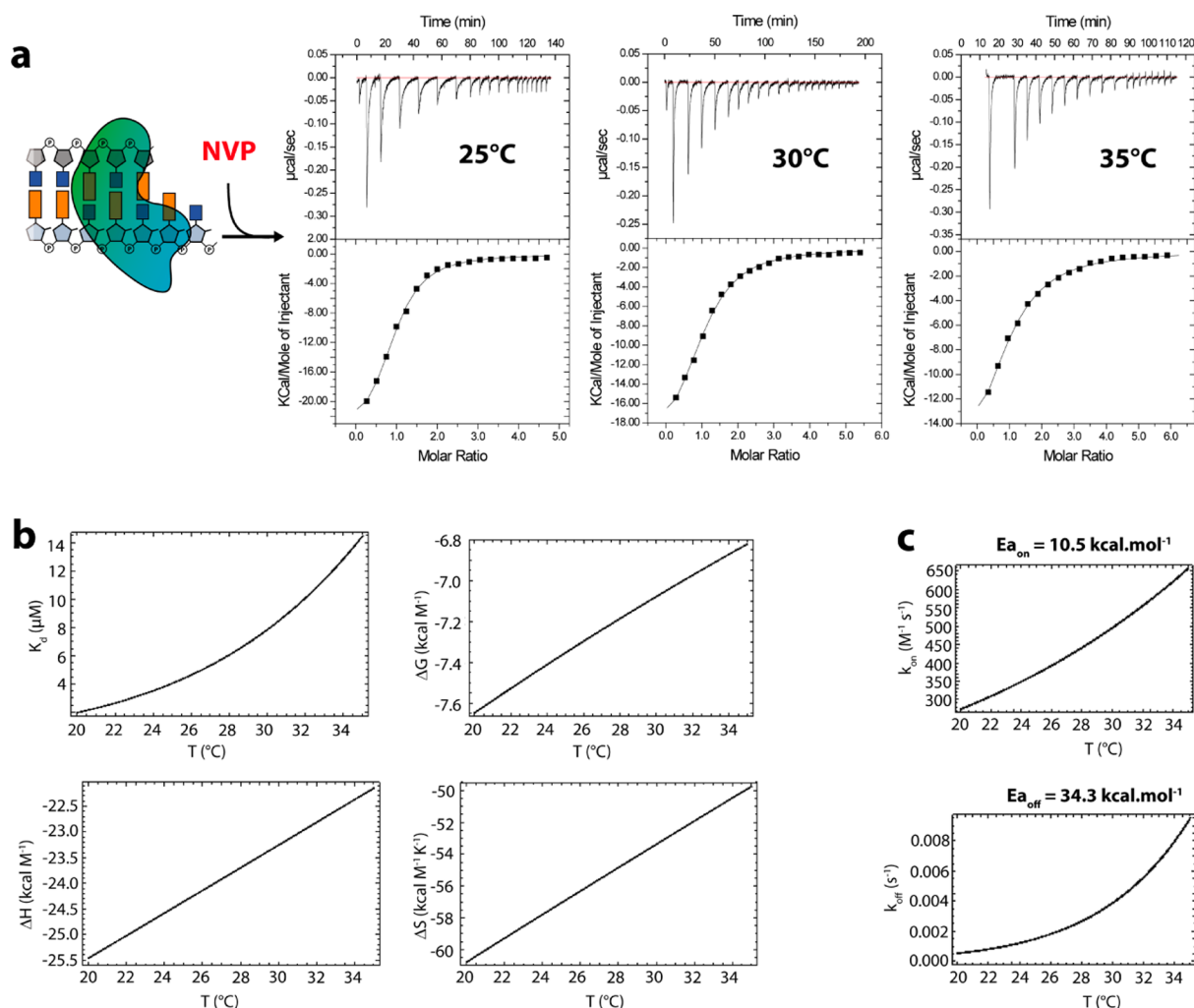


Figure 4. kinITC study of nevirapine binding to a RT/DNA primer-template complex. (a) ITC profiles at 25, 30, and 35 °C for nevirapine (546 μM in the injection syringe) binding to preincubated RT/DNA complex (22 μM in the cell, sequence ODN20/MATODN27A). (b) Thermodynamic parameters for nevirapine binding to a RT/DNA complex obtained by the 'global thermodynamic treatment' of titration curves at all temperatures. (c) Kinetic parameters k_{on} and k_{off} after fitting of the shape of all injection curves by kinITC.

kinetics in excellent agreement with surface plasmon resonance data.^{13,24} Here we extended our kinITC study to the interaction of nevirapine with preincubated RT/DNA complexes. Our previous experiments performed with the 20-/27-mer DNA primer-template showed that above 5 °C, 100% of the RT/DNA complexes formed with this construct are catalytically competent. Consequently, further experiments were performed using this construct to ensure the formation of a homogeneous population of complexes. As observed from raw thermograms at 25, 30, and 35 °C (Figure 4), the binding of nevirapine to the RT/DNA complex is exceptionally slow (up to 13 min were required to ensure full return to baseline after nevirapine injection into the RT/DNA complex at 25 °C, Figures 4 and S15). Our analysis showed that the affinity of nevirapine for the RT is affected by the presence of DNA: the dissociation constant of nevirapine at 35 °C increases from 5 μM for the free RT to 14 μM for the RT/DNA complex. This change in affinity is associated with a significant decrease (4.6-fold) of the association rate constant ($k_{on} = 650 M^{-1} s^{-1}$ at 35 °C) and a slight decrease (1.7-fold) of the dissociation rate constant ($k_{off} = 9.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ at 35 °C) (Figure 4) as compared to the binding of nevirapine to the free RT.²⁴ This might be attributed to the expected reduced mobility of the enzyme in presence of

DNA primer-template compared to the free enzyme, thus leading to a slower remodeling of the non-nucleoside binding pocket (which is required for nevirapine binding or dissociation). As previously observed for the RT/nevirapine interaction, the binding of nevirapine to the RT/DNA complex is associated with an anomalous positive heat capacity change $\Delta C_p = 0.48$ kcal $mol^{-1} K^{-1}$. This most likely results from the necessary disorganization of the clathrate-like water shell around the hydrophobic nevirapine to allow its entry into the binding pocket. The nevirapine binding affinity that we observed by ITC is significantly weaker than that obtained by previous biochemical approaches (from 25 to 400 nM).^{8,37} In addition to the different technique employed, these differences are likely to be due, at least partly, to variability in the lengths and sequences of DNA primer-template among these studies.³⁸

Because the binding of the nucleotide substrate induces changes in the structure of the RT/DNA complex (closing of the p66 fingers subdomain on the incoming dNTP),^{30,39} we also examined by ITC the binding of nevirapine onto a RT/DNA/dNTP complex. A ternary complex was obtained by mixing RT in presence of a ddT-terminated 20-/27-mer DNA primer-template and the next incoming nucleotide, dATP. ITC experiments were then performed by injection of nevirapine

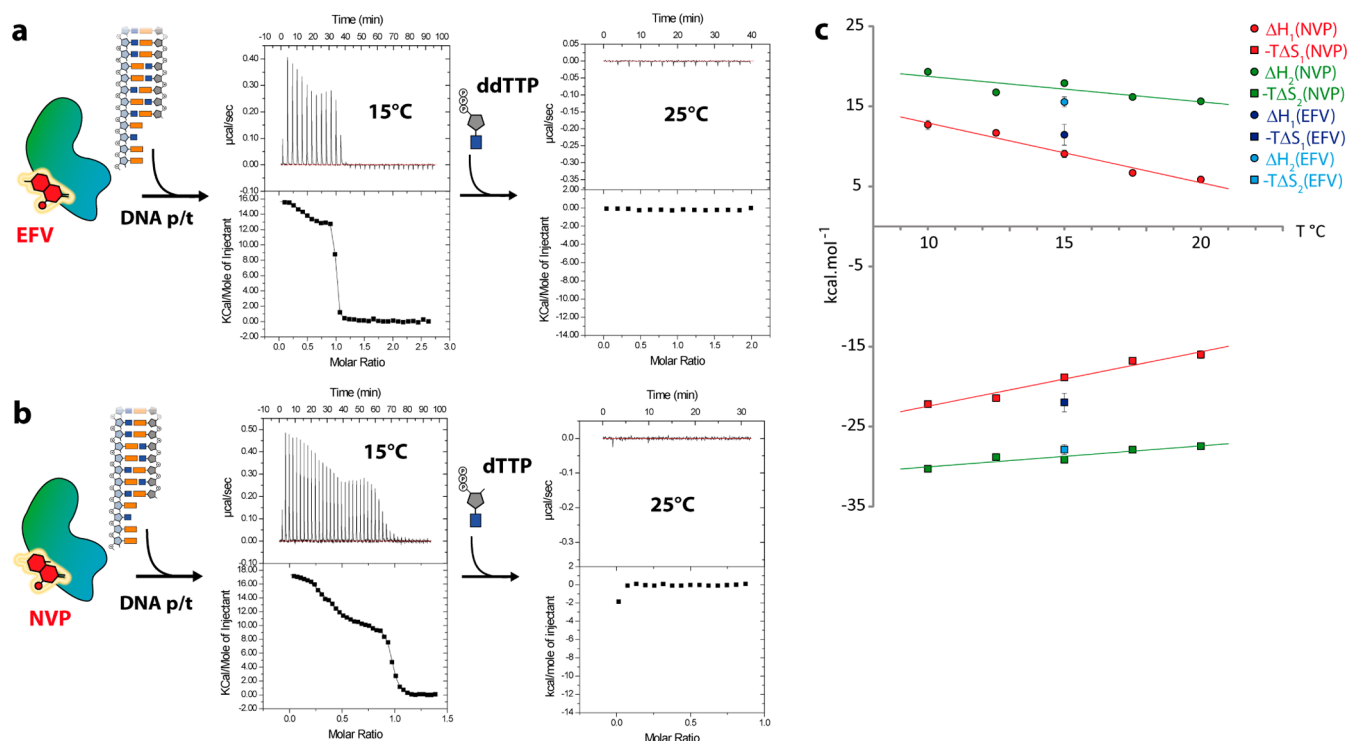


Figure 5. Thermodynamics of DNA primer-template binding to RT/NNRTI complex. (a) ITC profile at 15 °C for DNA primer-template (349 μM in the syringe, sequence ODN20/MATODN27A) binding to RT-efavirenz complex (20 μM RT and 40 μM efavirenz in the cell). The experiment was followed by the injection of ddTTP (600 μM in the injection syringe) at 25 °C. (b) ITC profile at 15 °C for DNA primer-template (295 μM in the syringe, sequence ODN20/MATODN27A) binding to preincubated RT-nevirapine complex (45 μM RT and 150 μM nevirapine in the cell). The experiment was followed by the injection of dTTP (500 μM in the injection syringe) at 25 °C. (c) Temperature dependence of ΔH (circles) and $-T\Delta S$ (squares) for DNA primer-template binding to RT/NNRTI complex. Data for RT-nevirapine complex were fitted with a linear least-squares regression.

Table 2. Thermodynamics of DNA Binding to RT/NNRTI Complex^a

temp (°C)	N_1	ΔH_1 (kcal·mol ⁻¹)	$-T\Delta S_1$ (kcal·mol ⁻¹)	K_{d_1} (nM)	N_2	ΔH_2 (kcal·mol ⁻¹)	$-T\Delta S_2$ (kcal·mol ⁻¹)	K_{d_2} (nM)
NVP								
10	0.6 ± 0.1	12.7 ± 0.6	-22.2 ± 0.3	49 ± 25	0.3 ± 0.1	19.3 ± 0.8	-30.3 ± 0.4	4.9 ± 3.9
12.5	0.6 ± 0.1	11.7 ± 0.1	-21.5 ± 0.3	35 ± 14	0.4 ± 0.1	16.8 ± 2.2	-28.8 ± 2.0	0.5 ± 0.1
15	0.6 ± 0.1	9.1 ± 0.5	-18.9 ± 0.1	42 ± 22	0.3 ± 0.1	17.9 ± 1.1	-29.1 ± 0.9	3.4 ± 1.3
17.5	0.7 ± 0.1	6.7 ± 0.2	-16.8 ± 0.4	26 ± 12	0.3 ± 0.1	16.2 ± 0.9	-27.9 ± 0.5	1.7 ± 1.2
20	0.7 ± 0.1	5.9 ± 0.1	-16.0 ± 0.5	34 ± 32	0.3 ± 0.1	15.6 ± 0.5	-27.4 ± 1.1	2.0 ± 1.8
EFV								
15	0.5 ± 0.1	11.5 ± 1.3	-22.0 ± 1.1	10 ± 4	0.4 ± 0.1	15.5 ± 0.6	-27.9 ± 0.6	0.4 ± 0.1

^aAverage values and standard deviations of two independent experiments. All data were obtained on a ODN20/MATODN27A DNA primer-template.

aliquots into the complex. Our results showed that nevirapine is not able to bind to the RT/DNA/dNTP complex (Figure S16), likely because the NNIBP is not flexible enough within the context of the ternary complex to allow ligand entry. This result, implying that inhibition by nevirapine is not possible after the start of DNA polymerization, is potentially of great therapeutic importance.

Binding of DNA Primer-Template to RT-NNRTI Complex Leads to Two Distinct Complexes. We next investigated the thermodynamics of DNA primer-template binding to RT/NNRTI complex. In these experiments, RT (22–45 μM) was preincubated with nevirapine (3- to 7-fold excess) or efavirenz (2-fold excess). Incremental-ITC titrations were performed over the 10–20 °C temperature range for nevirapine and at 15 °C for efavirenz (Figures 5 and S17 and Table 2). We observed that, in the presence of NNRTI, RT

interacts with a DNA primer-template in one of two mutually exclusive binding modes with different thermodynamic properties (sites number 1 and 2 in Table 2). The most populated (~66%) binding mode is characterized by a weakly endothermic interaction ($\Delta H = 6$ kcal·mol⁻¹ at 20 °C), and a dissociation constant of ca. 30 nM. Its heat capacity change ($\Delta C_p = -0.68$ kcal·mol⁻¹·K⁻¹) is in the low range of the DNA binding to the free RT. In contrast, the second binding mode (~33%) is more endothermic ($\Delta H = 16$ kcal·mol⁻¹ at 20 °C), with a less negative ΔC_p (-0.37 kcal·mol⁻¹·K⁻¹) and a dissociation constant in the very low- or subnanomolar range. Based on their thermodynamic properties, both binding modes can be associated with the two types of binding obtained with 19-/32- and 26-/26-mer DNA substrates (Figure S3), i.e., a polymerization-competent orientation and an opposite orientation placing the RNaseH domain close to the 3' end of the

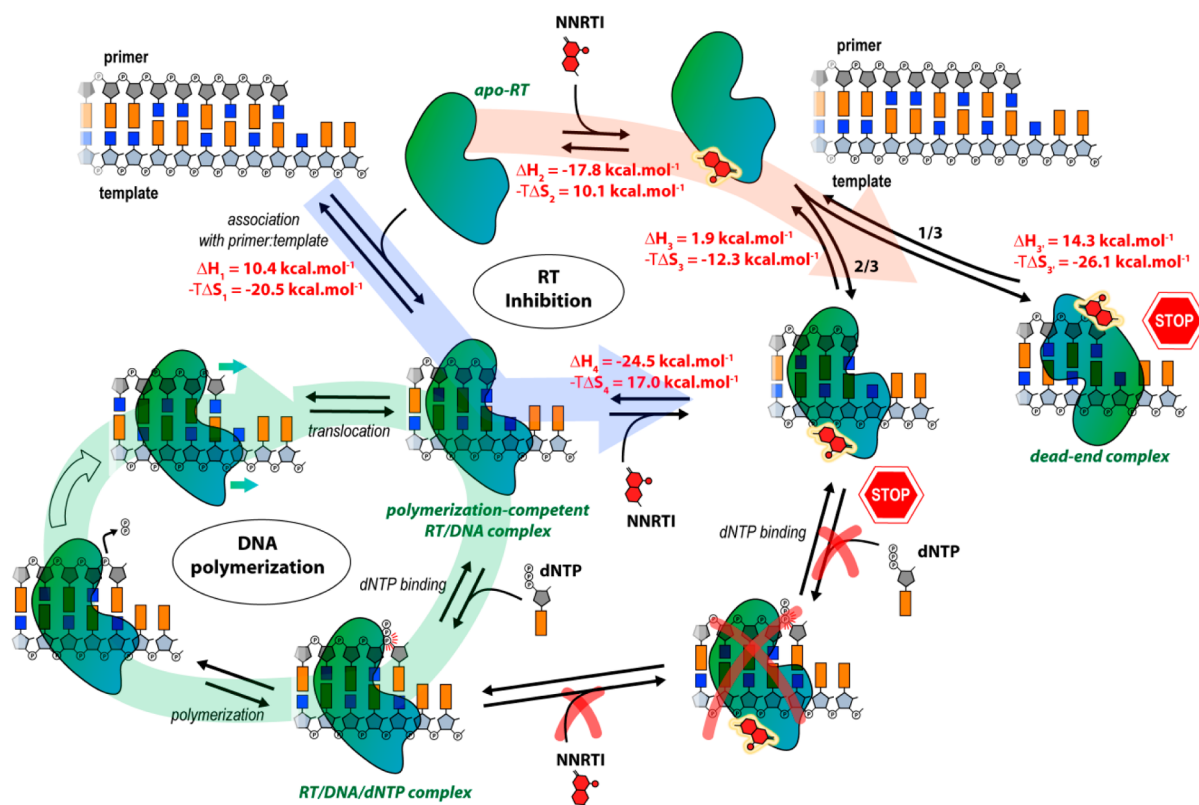


Figure 6. Mechanism of DNA polymerization by the HIV-1 reverse transcriptase and proposed inhibition mechanism for NNRTI. Variations of binding enthalpies observed at 25 °C are indicated in red. The DNA polymerization pathway is schematized on the left part of the diagram (light green). The first NNRTI inhibition pathway (light blue) involves the binding of the inhibitor to a polymerization-competent RT/DNA complex (ΔH_1 , ΔS_1 and ΔH_4 , ΔS_4). The second inhibition pathway (light red) involves the binding of RT to the NNRTI (ΔH_2 , ΔS_2), followed by binding of the DNA primer-temple. This second pathway leads to the formation of two kinds of complexes: One is a NNRTI-inhibited polymerization-competent RT/DNA complex (ΔH_3 , ΔS_3), and the second one is a nonproductive dead-end complex (ΔH_5 , ΔS_5). None of the RT/DNA/NNRTI complexes are able to bind the incoming dNTP substrate.

template, presumably an RNaseH-active conformation of RT. This interpretation would be consistent with previous reports showing that the polymerization-competent binding of RT onto the DNA primer-temple is destabilized in favor of an RNaseH-active RT in presence of NNRTI^{11,12} and by an increased RNaseH activity of RT in presence of nevirapine.⁴⁰

Incoming Nucleotide Substrates Are Not Able to Bind the RT/DNA/NNRTI Complexes. Following addition of nevirapine to a catalytically competent RT/DNA complex (Figure 4), initial binding of the incoming nucleotide was evaluated by incremental-ITC. As seen from our previous experiments (Figure S9 and Table S2), in the absence of inhibitor, the initial binding step (without catalysis) of the incoming nucleotide (dTTP or ddTTP) is clearly observable by ITC. Therefore, if the initial binding of the incoming nucleotide can equally happen with nevirapine bound to the RT/DNA complex, this should also appear with ITC. However, we observed that only a rather small fraction of the complex was able to bind the incoming nucleotide (Figures S18 and S19). Our interpretation is that the bound nevirapine prevents initial binding of the incoming nucleotide and that the residual signal can be attributed to the residual fraction of RT/DNA complex that is not bound to nevirapine (Figure S19).

In order to test whether the order of addition of the DNA and of the nevirapine substrates could be significant, initial binding of the incoming dNTP was also investigated by incremental-ITC after preincubation of RT/NNRTI, followed

by addition of DNA primer-temple during a first ITC titration. As seen previously (Figure 5a,b), the addition of DNA to RT/NNRTI complex implies the formation of two distinct RT/NNRTI/DNA complexes. Again, no signal could be observed after addition of the incoming nucleotide (ddTTP or dTTP), neither for RT/DNA/nevirapine, nor for RT/DNA/efavirenz complexes (Figures 5 and S17), showing that in presence of these non-nucleoside inhibitors, the RT/DNA complex does not bind the nucleotide substrate.

DISCUSSION

Here we dissected thermodynamics of the mechanism of nucleotide incorporation by RT using a novel ‘incremental-ITC’ strategy. This approach is well-suited for the study of successive chemical reactions, such as nucleic acid polymerization by DNA- or RNA-polymerases. Two requirements, however, are to be fulfilled for a successful experimental framework: (i) the starting concentration of compound in the cell should be sufficient to ensure good data quality in the subsequent experiments and (ii) there should be no significant competition between the ligands added successively. As observed from single molecule studies,^{11,12,18} our thermodynamic data also show that RT can adopt two binding modes on a nucleic acid primer-temple, only one being able to bind incoming dNTP and thus corresponding to a DNA-polymerization competent orientation. The second orientation does not bind the incoming dNTP and is therefore nonproductive

(Figures S2 and S3). The population of each binding mode strongly depends on the primer-template sequence and length.

Complete nucleotide incorporation can be modeled as a three step process: initial binding, chemical reaction, and translocation. Thermodynamics of the two last steps (which cannot be dissociated in a simple way) could be obtained by subtracting thermodynamic data for the initial binding of dNTP in absence of nucleotide incorporation from the complete DNA incorporation process. We showed that dNTP binding is mostly enthalpy driven but with significant differences between various nucleotides (-20.8 to -9.7 kcal·mol $^{-1}$ at 25 °C). The enthalpy change following the chemical plus the translocation steps also depends on the nucleotide: it is poorly exothermic for dCTP and dGTP, but extrapolation of ITC data at 37 °C indicates that it might be endothermic at physiological temperature for dATP and dTTP (Figure 3). Since the chemical step is expected to be the same for all dNTPs, this difference likely relies on the translocation step. In this frame, the role of the sequence context remains to be tested. Furthermore, the use of compounds inhibiting the translocation step⁴¹ might be useful to isolate the thermodynamic contribution of the translocation from that of the chemical reaction in DNA elongation.

Our data also show that dNTP binding to the polymerization-competent RT/DNA complex provides a significant amount of the free-energy change required for catalysis, with ΔG ranging from -7.5 to -9.0 kcal·mol $^{-1}$. As previously suggested, this energy produced by dNTP binding might be stored in a displacement of the conserved Y₁₈₃MDD₁₈₆ motif so that it can be later released during the translocation step.⁴² In contrast, ITC data show that events including the chemical step and the RT translocation are only poorly exergonic for dATP, dTTP, and dCTP and endergonic for dGTP (Figure 3). Since the hydrolysis of dNTP produced during the chemical step is highly exergonic and provides about -10.9 kcal·mol $^{-1}$ of free-energy change,⁴³ our data show that incoming nucleotide binding is a major driving force for DNA polymerization. This is in agreement with the observation that the conformational change involving closure of the p66 finger domain on the active site is the rate-limiting step in single nucleotide incorporation experiments.^{25,33}

Previous kinetic analysis suggested that binding of NNRTI interferes with the chemical step of DNA polymerization but would not directly prevent binding of the incoming dNTP.^{7–9} However, in a recent crystal structure of a cross-linked RT/DNA complex bound to nevirapine, grown in presence of AZTTP as an incoming nucleotide, the latter could not be observed in electron density maps.¹⁰ This structure indeed shows that the dNTP binding site is highly distorted by the presence of nevirapine, shifting the 3'-hydroxyl of the DNA primer by more than 5 Å away from the polymerase active site, thus preventing a binding of the dNTP as observed in the RT/DNA/dNTP complex.³⁰ Moreover, smFRET studies have shown that NNRTI binding to the RT destabilizes the polymerization-competent binding of the enzyme to the DNA primer-template in favor of the RNaseH-active orientation.^{11,12}

Thermodynamic data provided by the present study make a perfect bridge between these studies, clarifying the NNRTI inhibition mechanism. Two NNRTI inhibition pathways should be discerned. The first one (in blue in Figure 6) involves the binding of RT to the DNA primer-template first (characterized by ΔH_1 and ΔS_1), followed by the binding of NNRTI (ΔH_4 ,

ΔS_4). The second pathway (in red in Figure 6) requires first binding of NNRTI to the apo-RT (ΔH_2 , ΔS_2) and subsequent binding of DNA (binding mode 1 with ΔH_3 , ΔS_3 and binding mode 2 with $\Delta H_3'$, $\Delta S_3'$). The presence of NNRTI alters the binding of RT on the DNA primer-template, resulting in a destabilization of the polymerization-competent orientation of the RT onto the DNA in favor of an opposite orientation unable to bind the incoming dNTP^{11,12,18,44} (dead-end complex in Figure 6). Because the second binding mode is characterized by a thermodynamic signature quite different from the first one, it likely corresponds to a structure significantly different from catalytically competent RT/DNA complexes reported by X-ray crystallography. Finally, our data, obtained using a direct and label-free assay, showed that none of the binding modes of RT/NNRTI on the DNA primer-template are able to bind incoming dNTP (Figures 5 and S17), in contradiction with previous kinetic studies. Likely, the dNTP binding and the slow DNA polymerization observed in these studies in presence of NNRTI were due to the activity of a remaining fraction of free RT not bound to the inhibitor.

Analysis of the thermodynamics for both NNRTI inhibition pathways shows that the second pathway involving ΔH_3 and ΔS_3 (binding mode 1 in Table 2) is analogous to the first pathway ($\Delta H_1 + \Delta H_4 \sim \Delta H_2 + \Delta H_3$ and $T\Delta S_1 + T\Delta S_4 \sim T\Delta S_2 + T\Delta S_3$). In contrast, the pathway involving $\Delta H_3'$ and $\Delta S_3'$ (binding mode 2 in Table 2) leads to a different final state. Consequently, binding mode 1 can be assigned to the polymerization-competent orientation of RT on the DNA primer-template and binding mode 2 to the dead-end complex (Figure 6). Since the latter conformation is characterized by a 10-fold tighter affinity (Table 2), RT should preferentially interact through this binding mode with DNA when bound to a NNRTI. Furthermore, because the kinetics of NNRTI association with the catalytically competent RT/DNA complex is very slow compared to dNTP binding, and since NNRTI is not able to bind the RT/DNA/dNTP complex, our results strongly suggest, in line with an earlier report,⁴⁵ that a polymerizing elongation complex might be little susceptible to inhibition. As a consequence, RT should be targeted preferentially by NNRTIs as a free protein rather than bound to DNA.

CONCLUSION

In conclusion, our thermodynamic analysis of RT/NNRTI interactions suggests that NNRTI inhibition is mainly due to the binding of the inhibitor to the free RT, thus preventing a correct binding of RT to the DNA in a catalytically competent manner and leading to the formation of dead-end RT/DNA/NNRTI complexes that are unable to bind the incoming nucleotide substrate. Further thermodynamic studies of RT bound to viral RNA and to cellular tRNA^{Lys}₃ will be needed to clarify the role of NNRTIs during the initiation of reverse transcription.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation. The RT (HIV-1, BH10 isolate) was expressed and purified as described previously.⁴⁶ The protein was then stored as a suspension in a 2 M (NH₄)₂SO₄ solution. Nevirapine and efavirenz were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division AIDS, NIAID, NIH and were both dissolved in DMSO. The sequences of SeqB RNA and DNA primers are the same as that used in a previous smFRET study.¹¹ SeqB DNA template is a slightly shorter version of the SeqB DNA template

according to the reference 11. Unmodified DNA and RNA sequences were purchased from Integrated DNA Technologies, purified by HPLC on a Dionex Nucleopac PA-100 by HPLC, and stored into water.

RT/DNA Cross-Linking. RT construct Q258C was expressed and purified as described.³⁵ The 20-mer primer DNA (5' ACAGTCCCTGTTCCGGGCGCC 3') bearing a cross-linkable modified guanine was synthesized as described in the Supporting Information.

ITC. ITC measurements were performed on a MicroCal ITC200 (GE Healthcare) in R1 buffer (Mes-NaOH 10 mM, pH 6.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM). DMSO (0.8–1.8%) was added to the buffer in experiments involving nevirapine and efavirenz. ITC data were analyzed using the dedicated software by Microcal (Origin 7.0) and homemade software (written with Mathematica, Wolfram Research) for all aspects linked to 'global thermodynamic treatment' and kinITC. All data with dNTP addition were fitted with a single binding site model, except data with dGTP where two independent binding sites were used (one specific binding site and a weak unspecific binding site). Global thermodynamic treatment and kinITC analysis were performed as described.²⁴ For incremental-ITC experiments, after addition of 20–40 μ L of the first substrate (DNA primer-template) into the RT (280 μ L loaded in the sample cell), the syringe was washed and loaded with the first incoming nucleotide without removing RT/DNA sample from the cell. The cell concentration for the second experiment was adjusted to the concentration of the RT/DNA complex. Starting from the third incremental-ITC experiment, 40 μ L of the elongated-RT/DNA complex was removed from the cell prior the experiment. The syringe was washed and loaded with the second incoming nucleotide, and the concentration in the cell was set to the concentration of elongated RT/DNA+1 complex. Blanks were performed by injecting the various ligands used (dNTPs, ddNTPs, nucleic acids, or NNRTIs) into buffer in order to subtract the heat of dilution from the reaction heat data.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

ITC profiles, thermodynamic data for dNTP binding, description of the chemical synthesis of the cross-linkable modified guanine, and methods for mass spectrometry analysis. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

e.ennifar@ibmc-cnrs.unistra.fr

Present Addresses

[§]Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK), Bern, Switzerland

^{||}Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

Author Contributions

[†]These authors contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Stephen H. Hughes (NCI-Frederick) for providing the Q258C RT construct and to Dr. Redmond Smyth for critical reading of the manuscript. This project was supported by the 'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA' (ANRS) and the Austrian Science Fund FWF (P21641 to R.M.). M.A.G. was supported by an ANRS postdoctoral fellowship. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division AIDS, NIAID, NIH: nevirapine, efavirenz.

■ REFERENCES

- (1) Jacobo-Molina, A.; Ding, J.; Nanni, R. G.; Clark, A. D., Jr.; Lu, X.; Tantillo, C.; Williams, R. L.; Kamer, G.; Ferris, A. L.; Clark, P.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 6320.
- (2) Kohlstaedt, L. A.; Wang, J.; Friedman, J. M.; Rice, P. A.; Steitz, T. A. *Science* **1992**, *256*, 1783.
- (3) Das, K.; Bauman, J. D.; Clark, A. D., Jr.; Frenkel, Y. V.; Lewi, P. J.; Shatkin, A. J.; Hughes, S. H.; Arnold, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 1466.
- (4) Das, K.; Clark, A. D., Jr.; Lewi, P. J.; Heeres, J.; De Jonge, M. R.; Koymans, L. M.; Vinkers, H. M.; Daeyaert, F.; Ludovici, D. W.; Kukla, M. J.; De Corte, B.; Kavash, R. W.; Ho, C. Y.; Ye, H.; Lichtenstein, M. A.; Andries, K.; Pauwels, R.; De Bethune, M. P.; Boyer, P. L.; Clark, P.; Hughes, S. H.; Janssen, P. A.; Arnold, E. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2550.
- (5) Ren, J.; Esnouf, R.; Hopkins, A.; Ross, C.; Jones, Y.; Stammers, D.; Stuart, D. *Structure* **1995**, *3*, 915.
- (6) Smerdon, S. J.; Jager, J.; Wang, J.; Kohlstaedt, L. A.; Chirino, A. J.; Friedman, J. M.; Rice, P. A.; Steitz, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 3911.
- (7) Rittinger, K.; Divita, G.; Goody, R. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 8046.
- (8) Spence, R. A.; Kati, W. M.; Anderson, K. S.; Johnson, K. A. *Science* **1995**, *267*, 988.
- (9) Xia, Q.; Radzio, J.; Anderson, K. S.; Sluis-Cremer, N. *Protein Sci.* **2007**, *16*, 1728.
- (10) Das, K.; Martinez, S. E.; Bauman, J. D.; Arnold, E. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 253.
- (11) Abbondanzieri, E. A.; Bokinsky, G.; Rausch, J. W.; Zhang, J. X.; Le Grice, S. F.; Zhuang, X. *Nature* **2008**, *453*, 184.
- (12) Liu, S.; Abbondanzieri, E. A.; Rausch, J. W.; Le Grice, S. F.; Zhuang, X. *Science* **2008**, *322*, 1092.
- (13) Geitmann, M.; Unge, T.; Danielson, U. H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2375.
- (14) Geitmann, M.; Unge, T.; Danielson, U. H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2367.
- (15) Gorshkova, I.; Rausch, J. W.; Le Grice, S. F.; Crouch, R. *J. Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 198.
- (16) Radi, M.; Maga, G.; Alongi, M.; Angeli, L.; Samuele, A.; Zanolli, S.; Bellucci, L.; Tafi, A.; Casaluce, G.; Giorgi, G.; Armand-Ugon, M.; Gonzalez, E.; Este, J. A.; Baltzinger, M.; Bec, G.; Dumas, P.; Ennifar, E.; Botta, M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 840.
- (17) Liu, S.; Harada, B. T.; Miller, J. T.; Le Grice, S. F.; Zhuang, X. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 1453.
- (18) Rothwell, P. J.; Berger, S.; Kensch, O.; Felekyan, S.; Antonik, M.; Wohrl, B. M.; Restle, T.; Goody, R. S.; Seidel, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 1655.
- (19) Kvaratskhelia, M.; Miller, J. T.; Budihis, S. R.; Pannell, L. K.; Le Grice, S. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 15988.
- (20) Feig, A. L. *Biopolymers* **2007**, *87*, 293.
- (21) Leavitt, S.; Freire, E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 560.
- (22) Privalov, P. L.; Dragan, A. I. *Biophys. Chem.* **2007**, *126*, 16.
- (23) Velazquez Campoy, A.; Freire, E. *Biophys. Chem.* **2005**, *115*, 115.
- (24) Burnouf, D.; Ennifar, E.; Guedich, S.; Puffer, B.; Hoffmann, G.; Bec, G.; Disdier, F.; Baltzinger, M.; Dumas, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 559.
- (25) Kati, W. M.; Johnson, K. A.; Jerva, L. F.; Anderson, K. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 25988.
- (26) Schuckmann, M. M.; Marchand, B.; Hachiya, A.; Kodama, E. N.; Kirby, K. A.; Singh, K.; Sarafianos, S. G. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 38700.
- (27) Manning, G. S. Q. *Rev. Biophys.* **1978**, *11*, 179.
- (28) Datta, K.; LiCata, V. J. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5590.
- (29) Datta, K.; Wowor, A. J.; Richard, A. J.; LiCata, V. J. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1739.
- (30) Huang, H.; Chopra, R.; Verdine, G. L.; Harrison, S. C. *Science* **1998**, *282*, 1669.
- (31) Spolar, R. S.; Record, M. T., Jr. *Science* **1994**, *263*, 777.
- (32) Krebs, R.; Immendorfer, U.; Thrall, S. H.; Wohrl, B. M.; Goody, R. S. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10292.

- (33) Reardon, J. E. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4473.
- (34) Minetti, C. A.; Remeta, D. P.; Miller, H.; Gelfand, C. A.; Plum, G. E.; Grollman, A. P.; Breslauer, K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 14719.
- (35) Huang, H.; Harrison, S. C.; Verdine, G. L. *Chem Biol* **2000**, *7*, 355.
- (36) Sarafianos, S. G.; Clark, A. D., Jr.; Tuske, S.; Squire, C. J.; Das, K.; Sheng, D.; Ilankumaran, P.; Ramesha, A. R.; Kroth, H.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; Arnold, E. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16280.
- (37) Maga, G.; Amacker, M.; Ruel, N.; Hubscher, U.; Spadari, S. *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 738.
- (38) Sluis-Cremer, N.; Tachedjian, G. *Virus Res.* **2008**, *134*, 147.
- (39) Sarafianos, S. G.; Das, K.; Ding, J.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; Arnold, E. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R137.
- (40) Palaniappan, C.; Fay, P. J.; Bambara, R. A. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4861.
- (41) Michailidis, E.; Marchand, B.; Kodama, E. N.; Singh, K.; Matsuoka, M.; Kirby, K. A.; Ryan, E. M.; Sawani, A. M.; Nagy, E.; Ashida, N.; Mitsuya, H.; Parniak, M. A.; Sarafianos, S. G. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 35681.
- (42) Sarafianos, S. G.; Clark, A. D., Jr.; Das, K.; Tuske, S.; Birktoft, J. J.; Ilankumaran, P.; Ramesha, A. R.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; Arnold, E. *EMBO J.* **2002**, *21*, 6614.
- (43) Frey, P. A.; Arabshahi, A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11307.
- (44) Wohrl, B. M.; Krebs, R.; Goody, R. S.; Restle, T. *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 333.
- (45) Grobler, J. A.; Dornadula, G.; Rice, M. R.; Simcoe, A. L.; Hazuda, D. J.; Miller, M. D. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 8005.
- (46) Freisz, S.; Bec, G.; Radi, M.; Wolff, P.; Crespan, E.; Angeli, L.; Dumas, P.; Maga, G.; Botta, M.; Ennifar, E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 1805.

2. Etudes de l'initiation de la traduction bactérienne par *iITC*

Riches de l'expérience accumulée lors de l'étude de l'élongation par la RT, nous avons décidé de transposer cette approche à l'étude d'un système bien plus complexe : la traduction dans la synthèse protéique. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur la traduction chez *Escherichia coli*. En effet, la traduction chez les procaryotes est encore relativement simple comparativement à celle des eucaryotes qui implique nettement plus de facteurs de traduction.

La première étape de l'initiation de la traduction bactérienne consiste en la formation d'un complexe d'initiation 30S. Ce dernier est composé de la petite sous-unité ribosomale (30S), de 3 facteurs d'initiation (IF1, IF2 et IF3), d'un ARNm ainsi que d'un aa-ARNt initiateur : le fMet-ARNt^{fMet}. Après la purification en grande quantité de chacun de ces partenaires, nous avons vérifié dans un premier temps que tous les facteurs d'initiation et l'ARNm interagissent exclusivement avec le 30S afin de confirmer que la méthode *iITC* était adaptée à cette étude. La carte thermodynamique détaillée des différentes voies de formation du complexe d'initiation 30S a ainsi été obtenue par *iITC*. La quasi-totalité des combinaisons possibles d'assemblage a été testée en changeant l'ordre d'injection des différents substrats (**Fig. 28**). Chaque expérience a été testée au moins deux fois à une température différente afin d'obtenir une redondance de données et des informations sur l'influence de la température sur les paramètres thermodynamiques.

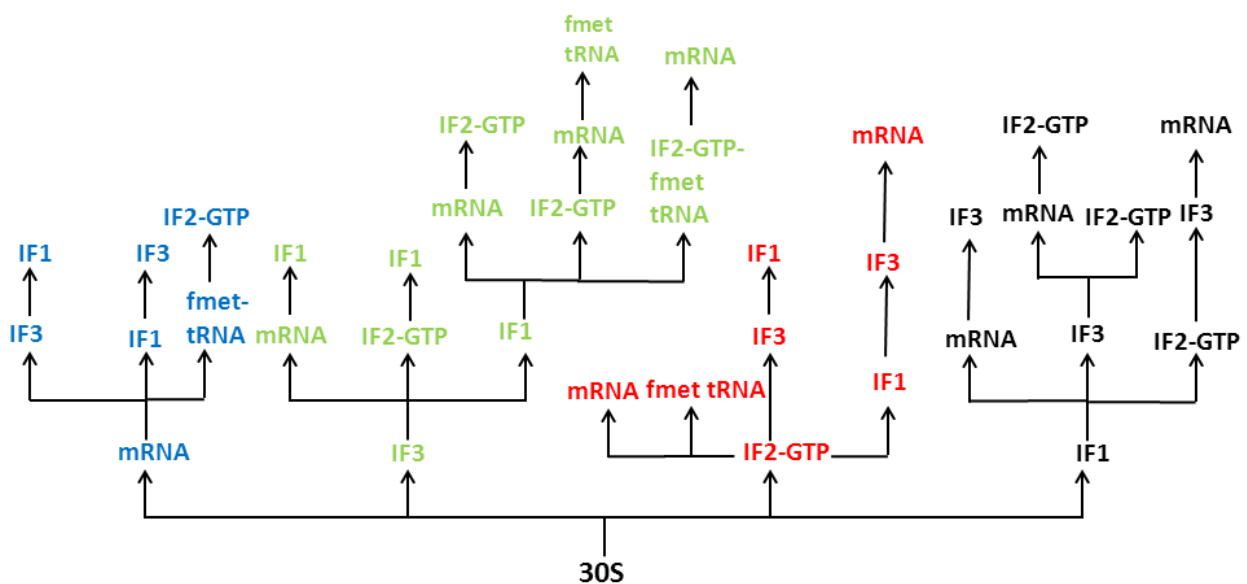


Figure 28 : Représentation de l'ensemble des combinaisons réalisées par *incremental ITC*.

L'utilisation de la méthode *iITC* nous a permis de diminuer considérablement les consommations en 30S, ce qui a été d'une grande importance pratique du fait de la difficulté à purifier de grandes quantités cette sous-unité. Après avoir réalisé la quasi-totalité des combinaisons possibles, nous avons analysé chacune des expériences dans le but de mettre en évidence un ordre d'association privilégié des différents partenaires du complexe d'initiation 30S sur la base des affinités mesurées par ITC. Il est donc très important de mentionner ici que cette approche est purement thermodynamique, c'est-à-dire qu'elle ne prend pas en compte les éventuels facteurs cinétiques qui peuvent avoir une importance déterminante.

B. Détermination des paramètres thermodynamiques de la fixation des facteurs d'initiation sur le 30S

1. Paramètres thermodynamiques de la fixation d'IF3 sur le 30S

Dans un premier temps, nous avons décidé d'étudier l'interaction entre IF3 et le 30S seul. Puis nous avons déterminé les effets induits par la présence d'IF1 et d'IF2 sur la fixation d'IF3. Pour cela, nous avons comparé les paramètres thermodynamiques de fixation d'IF3 sur un complexe 30S-IF1, 30S-IF2 et 30S-IF1-IF2 aux paramètres thermodynamiques de fixation d'IF3 sur le 30S seul. La même démarche a été réalisée pour l'étude thermodynamique des deux autres facteurs d'initiation.

a) Fixation d'IF3 sur le 30S seul

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
15	$-16,7 \pm 0,1$	-22,2	6,4	$0,35 \pm 0,01$	$15,1 \pm 1,5$	$-10,31 \pm 0,06$
20	$-19,4 \pm 0,1$	-28,7	8,4	$0,58 \pm 0,01$	$6,2 \pm 1,1$	$-11,0 \pm 0,1$
25	$-21,9 \pm 0,2$	-38,9	11,6	$0,40 \pm 0,01$	$26,4 \pm 3,2$	$-10,33 \pm 0,07$
30	$-24,55 \pm 0,2$	-46,1	14,0	$0,43 \pm 0,01$	$21,8 \pm 3,7$	$-10,6 \pm 0,1$
32	$-24,8 \pm 1$	-45,8	14,0	$0,27 \pm 0,01$	$17,1 \pm 6,2$	$-10,8 \pm 0,3$
35	$-24,1 \pm 0,2$	-44,0	13,6	$0,87 \pm 0,01$	$32,1 \pm 3,1$	$-10,56 \pm 0,06$
37	$-23,7 \pm 0,3$	-42,3	13,1	$0,91 \pm 0,01$	$35,0 \pm 6,1$	$-10,6 \pm 0,1$

Table 1 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction IF3 - 30S mesurés par ITC.

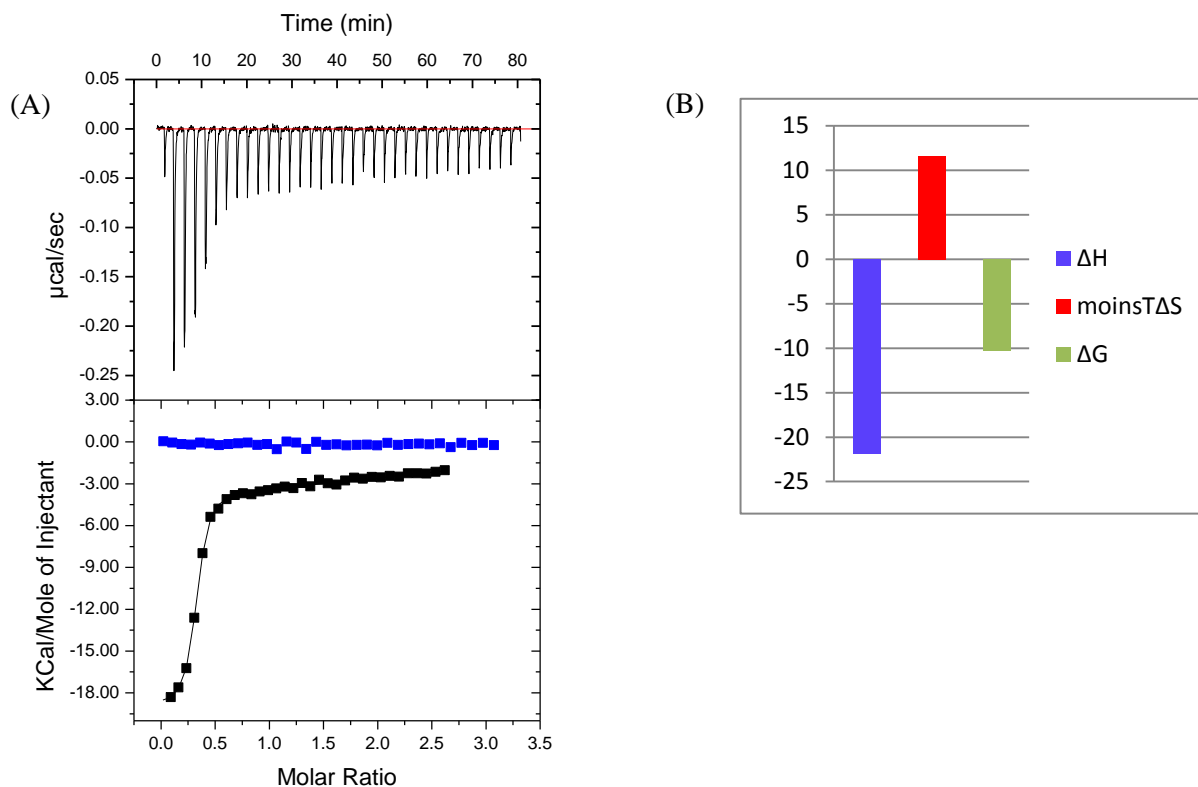


Figure 29 : (A) Exemple de courbe ITC obtenue lors de l'interaction entre IF3 et le 30S à 25°C. Représentation en bleu de l'injection d'IF3 dans le tampon à 25°C. (B) Histogramme représentant la contribution de chacun des paramètres thermodynamiques (ΔH et ΔS) par rapport au ΔG .

Il apparaît que la réaction est nettement exothermique ($\Delta H < 0$) et, d'autre part, que le ΔS est également négatif (**Fig. 29A**). L'entropie du système diminuant lors de la formation du complexe, l'interaction entre IF3 et le 30S s'accompagne donc d'une perte de degrés de liberté des partenaires, comme attendu lors de la formation d'un complexe (**Fig. 29A, Table 1**). Le ΔG devant être négatif pour que la réaction soit spontanée, le ΔH est donc la force motrice de l'interaction entre IF3 et le 30S (**Fig. 29B**).

En fin d'expérience, on observe toujours un signal qui décroît très lentement (**Fig. 29A**). Suite à la réalisation d'un contrôle où on a injecté IF3 dans le tampon, on a constaté que ce signal ne correspond pas à un signal de dilution (**Fig. 29A**). Devant une telle situation, on invoque communément un modèle avec deux sites d'interaction, un site de haute affinité correspondant à la partie rapidement variable de la courbe de titration, et un (ou des) site(s) 'non spécifique(s)' de basse affinité correspondant à la variation lente, ici au-delà de la stœchiométrie 0,5 (**Fig. 29A**). De fait, ce modèle a permis de déterminer, à 25°C, un K_d de 26 nM pour le site spécifique et un K_d de l'ordre de 10 μM pour le site aspécifique supposé

(**Table 1**). Cependant, ce modèle requiert la détermination de deux K_d et deux ΔH et il n'a pas été possible de laisser libres ces 4 paramètres *a priori* indépendants sans éviter des résultats aberrants. Ainsi, la valeur de 10 μM est peut-être largement sujette à caution, il en est certainement de même pour le ΔH correspondant.

Dans ce cas, on peut invoquer une autre explication au retour très lent de la courbe de titration vers son asymptote. En effet, nous avons observé par cryo-EM (en collaboration avec B. Klaholz à l'IGBMC) que les sous-unités 30S pouvaient former des dimères. De plus, il a clairement été décrit que la préparation de sous-unités 30S conduisaient effectivement à deux formes de particules, une forme restant monomérique et une forme dimérisant (Guerin and Hayes, 1987). Il serait donc tout à fait possible que le système étudié implique deux équilibres concurrents, l'un correspondant à la formation-dissociation des dimères de 30S à partir d'une fraction de la population des sous-unités 30S, et l'autre correspondant à la formation-dissociation du complexe 30S-IF3. Ainsi, le retour très lent de la courbe en fin de titration pourrait être dû à une fixation d'IF3 sur le 30S provenant de la dissociation progressive des dimères (**Fig. 29A**).

Pour prouver définitivement cette hypothèse, il faudrait vérifier la présence des dimères de 30S dans les conditions de l'expérience ITC et démontrer que ces dimères disparaissent progressivement au cours de la titration.

On peut également remarquer que cette nouvelle hypothèse est en accord avec d'autres observations pour le système IF3 + 30S, ainsi que pour les systèmes impliquant le 30S et les autres facteurs d'initiation.

La variation de ΔH en fonction de la température montre une diminution linéaire jusqu'à 30°C suivie d'un palier. Par conséquent, le ΔC_p a une valeur constante de -0,52 kcal mole⁻¹ K⁻¹ jusqu'à 30°C (ce qui est une valeur importante mais nullement exceptionnelle), et change brutalement à partir de 32°C où il devient positif, ce qui est plutôt surprenant (**Fig. 30**).

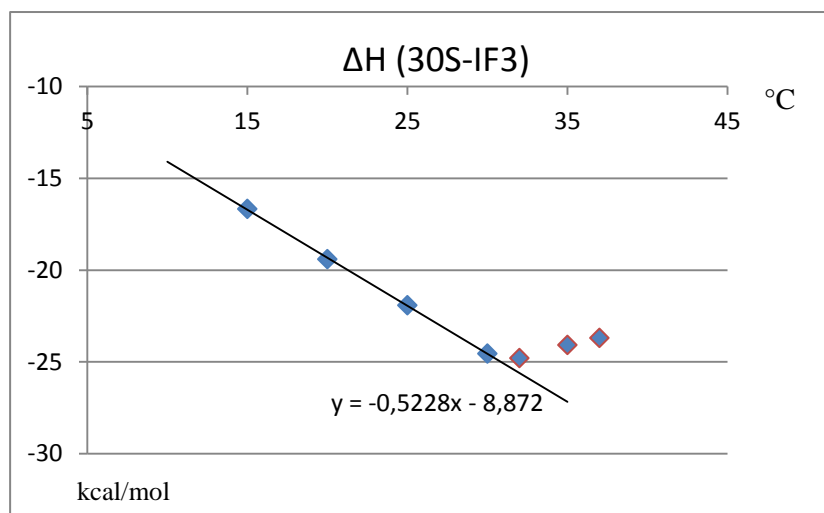


Figure 30 : Variation de ΔH en fonction de la température et détermination de ΔC_p .

On remarque également qu'à partir de 35°C, la stœchiométrie augmente nettement ; en effet, on passe subitement de 0,4 à 0,8 (**Table 1**). Dans la quasi-totalité des expériences d'ITC avec le 30S et les différents partenaires d'initiation, le même phénomène s'est toujours produit. Une fois que la température excède 32°C, la stœchiométrie augmente de façon significative et reste constante. Si l'association des monomères est exothermique (comme c'est habituellement le cas), les dimères de 30S devraient se dissocier lorsque la température augmente (en accord avec l'équation de van't Hoff), rendant le site de fixation aux IFs à nouveau accessible et augmentant ainsi la stœchiométrie de la réaction comme il a été observé.

Si cette hypothèse est correcte, le traitement des expériences d'ITC par le seul équilibre d'association 30S-IF3 devient inapproprié, surtout à partir de 30°C. En effet, le système doit alors être décrit par la compétition entre deux équilibres, (i) l'association-dissociation des dimères de 30S et (ii) l'association-dissociation d'IF3 à la sous-unité 30S libre. Il est même tout à fait possible que la dissociation des dimères de 30S apparaisse brutalement autour de 30°C pour des raisons purement cinétiques (le k_{off} deviendrait suffisamment grand autour de cette température). Ainsi, la partie linéaire de la variation de ΔH jusqu'à 30°C est certainement significative de l'association 30S-IF3 et la rupture de pente après 30°C résulterait de la dissociation des dimères de 30S.

Si l'on s'en tient à des températures inférieures à 30°C, on peut noter que l'affinité que nous avons déterminée par ITC (26 nM à 25°C) est tout à fait comparable à celle obtenue par

d'autres techniques. Ainsi, par polarisation de fluorescence, il a été possible de déterminer un K_d pour l'interaction IF3-30S de 32 nM (Weiel and Hershey, 1981), ces données sont en très bon accord avec nos résultats.

Une autre étude par diffusion de lumière a montré une variation du K_d de 25 à 40 nM entre 25°C et 37°C (Grunberg-Manago et al., 1975). Ces valeurs sont également très proches de ce que nous avons mesuré par ITC. Cette bonne concordance avec des mesures totalement indépendantes conforte la conclusion précédente selon laquelle les données ITC sont interprétables classiquement pour des températures inférieures à 30°C.

Enfin, on remarque également que le ΔG ne varie pas significativement en fonction de la température (**Table 1**). En effet, les variations du ΔH et du ΔS semblent se compenser complètement. Or, selon un résultat fondamental de la thermodynamique ($\partial\Delta G/\partial T = -\Delta S$), le ΔG doit varier avec la température car $\Delta S \neq 0$ et donc $\partial\Delta G/\partial T \neq 0$. Il serait donc souhaitable de faire un traitement global, c'est-à-dire un traitement où toutes les expériences sont traitées simultanément, et non pas séparément. Ce type de traitement a été développé par l'équipe et décrit dans l'article où la méthode kinITC a été présentée (Burnouf et al., 2012). Par ce traitement la relation fondamentale $\partial\Delta G/\partial T = -\Delta S$ est rigoureusement respectée, ainsi que l'équation de van't Hoff ($R \partial \ln K_d / \partial T = -\Delta H/T^2$) qui impose l'évolution de chaque K_d avec la température selon le ΔH attaché à ce K_d . Cette méthode est donc beaucoup plus exigeante que les traitements multiples habituels car elle doit expliquer simultanément plus de données expérimentales avec moins de paramètres libres. Dans l'état actuel du développement des logiciels publiquement accessibles, ce type de traitement n'est pas encore disponible, particulièrement pour un tel cas impliquant deux équilibres simultanés. Il ne pourra donc être effectué qu'ultérieurement par un(e) spécialiste de ces questions.

b) Effet d'IF1 sur la fixation d'IF3 au 30S

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
10	-13,48 ± 0,09	-3,03	0,9	0,43 ± 0,01	0,2 ± 0,1	-12,6 ± 0,5
25	-25,60 ± 0,15	-46,3	13,8	0,37 ± 0,01	2,2 ± 0,5	-11,80 ± 0,15
30	-27,37 ± 0,09	-49,3	15,0	0,88 ± 0,01	1,1 ± 0,2	-12,4 ± 0,1
35	-31,76 ± 0,14	-62,2	19,2	1,01 ± 0,01	1,1 ± 0,2	-12,6 ± 0,1

Table 2 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre IF3 et le complexe 30S-IF1 mesurés par ITC.

En présence d'IF1, on remarque que le ΔH est légèrement inférieur. Comme précédemment, c'est le ΔH qui représente la force motrice de l'interaction entre IF3 et le 30S. Etant donné que le ΔS diminue quand IF1 est présent, on en déduit que le complexe 30S-IF1-IF3 est encore plus ordonné, moins flexible. Enfin, vu que le ΔG diminue en présence d'IF1, la fixation d'IF3 est donc favorisée et par conséquent, on observe une augmentation de l'affinité. En moyenne, la présence d'IF1 augmente d'environ 20 fois l'affinité d'IF3 pour le 30S. On en déduit qu'IF1 modifie la manière dont IF3 se fixe au 30S.

Par FRET, il a été démontré qu'IF1 augmente 30 fois l'affinité d'IF3 pour le 30S en diminuant la vitesse de dissociation d'IF3 (Milon et al., 2012). Ces résultats sont donc en adéquation avec ce nous avons mesuré par ITC.

Comme cela a été décrit pour IF3-30S, la stœchiométrie augmente très nettement à partir de 30°C (Table 2). Ici aussi, on peut supposer que l'augmentation de la température est responsable de la dissociation des dimères de 30S ce qui rend le site de fixation d'IF3 accessible.

c) Effet d'IF2 sur la fixation d'IF3 au 30S

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
20	$-21,4 \pm 0,3$	-36,9	10,8	$0,43 \pm 0,01$	$13,5 \pm 2,3$	$-10,6 \pm 0,1$
25	$-22,2 \pm 0,3$	-39,7	11,8	$0,41 \pm 0,01$	$24,8 \pm 3,5$	$-10,4 \pm 0,1$
30	$-23,9 \pm 0,1$	-43,2	13,1	$0,78 \pm 0,01$	$15,7 \pm 0,8$	$-10,82 \pm 0,03$

Table 3 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre IF3 et le complexe 30S-IF2 mesurés par ITC.

En présence d'IF2, aucun changement thermodynamique significatif n'est visible, les ΔH et les ΔS étant globalement les mêmes et les affinités augmentant très légèrement (1,2 fois en moyenne) (**Table 3**). La fixation d'IF2 sur le 30S ne modifie donc pas significativement le site de fixation d'IF3.

Comme dans les deux cas précédents, la stœchiométrie augmente considérablement à partir de 30 °C, en accord avec l'hypothèse de dimérisation d'une fraction des sous-unités 30S.

d) Fixation d'IF3 sur le complexe 30S-IF1-IF2

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
25	$-25,36 \pm 0,15$	-43,8	13,1	$0,61 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,3$	$-12,3 \pm 0,2$
35	$-37,91 \pm 0,12$	-80,4	24,8	$0,97 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,1$	$-13,2 \pm 0,2$

Table 4 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre IF3 et le complexe 30S-IF1-IF2 mesurés par ITC.

En présence d'IF1 et d'IF2, les ΔH et ΔS mesurés sont inférieurs à ceux obtenus lors de la fixation d'IF1 sur le 30S-IF3 (**Table 4**). La présence simultanée d'IF1 et d'IF2 modifie donc le site de fixation d'IF3 ce qui favorise l'interaction du facteur avec le 30S. Par conséquent, contrairement à IF2 qui n'a aucun effet et IF1 qui augmente l'affinité d'IF3 pour le 30S de 20 fois, la présence simultanée des 2 facteurs, IF1 et IF2, augmente l'affinité d'IF3 pour le 30S de 32 fois. Ceci est en accord avec un phénomène de coopérativité car IF1 et IF2 modifient ensemble le site de fixation d'IF3.

A nouveau, en accord avec l'hypothèse de dimérisation des sous-unités 30S, la stœchiométrie augmente à 35°C,

2. Paramètres thermodynamiques de la fixation d'IF1 sur le 30S

Comme pour l'étude d'IF3, nous avons analysé dans un premier temps l'interaction entre IF1 et le 30S seul, puis nous avons déterminé les effets induits par la présence d'IF2 et d'IF3 sur la fixation d'IF1. Pour cela, nous avons comparé les paramètres thermodynamiques de fixation d'IF1 sur un complexe 30S-IF3, 30S-IF2 et 30S-IF3-IF2 aux paramètres thermodynamiques de fixation d'IF1 sur le 30S seul.

a) Fixation d'IF1 sur le 30S seul

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
5	$10 \pm 0,4$	64,1	-17,8	$0,47 \pm 0,01$	694 ± 110	$-7,8 \pm 0,1$
10	$9,6 \pm 0,3$	61,9	-17,5	$0,52 \pm 0,01$	806 ± 90	$-7,89 \pm 0,06$
25	$2,8 \pm 0,1$	37,3	-11,1	$0,36 \pm 0,01$	775 ± 129	$-8,3 \pm 0,1$
35	$-5,4 \pm 0,1$	11,5	-3,6	$0,73 \pm 0,01$	403 ± 43	$-9,01 \pm 0,07$

Table 5 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre IF1 et le 30S seul mesurés par ITC.

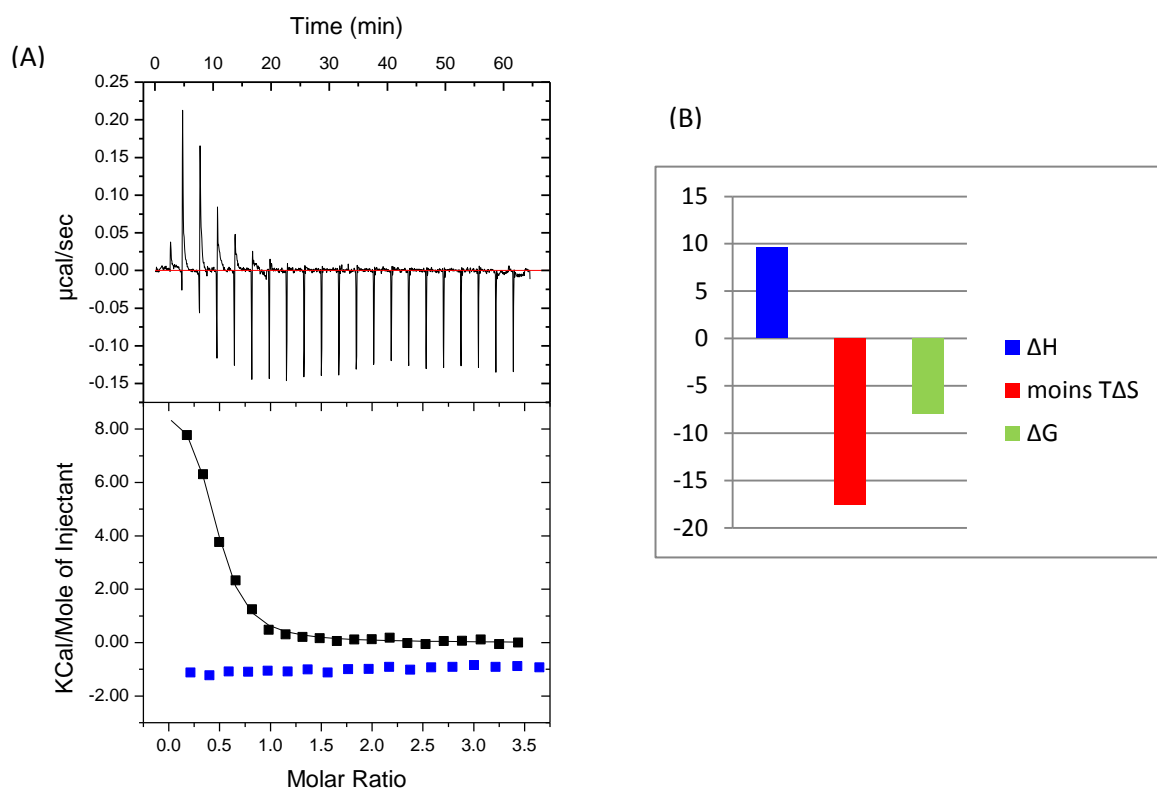


Figure 31 : (A) Exemple de courbe ITC obtenue lors de l'interaction entre IF1 et le 30S seul à 10°C. Représentation en bleu de l'injection d'IF1 dans le tampon d'ITC. (B) Histogramme représentant la contribution de chacun des paramètres thermodynamiques (ΔH et ΔS) par rapport au ΔG .

Lors de l'interaction entre IF1 et le 30S, on voit qu'à faible température, le ΔS représente la force motrice de l'interaction (**Fig. 31B**). En effet, contrairement aux cas précédents, la réaction est endothermique entre 5 et 25°C (**Fig. 31A**). Cette énergie consommée implique que plus de liaisons sont cassées que formées lors de la complexation (**Table 5**). Ce $\Delta S > 0$, étant le signe d'une augmentation de désordre lors de l'association de

deux complexes moléculaires, ne correspond pas à une situation habituelle. IF1 possède un domaine OB fold synonyme d'une fixation aux acides nucléiques (Sette et al., 1997). Il est donc possible que ce dernier en interagissant avec le 30S au niveau de la région du site A, expulse des molécules d'eau ou des contre-ions présents et ordonnés au niveau de l'ARNr 16S. Ce solvant se retrouve donc dans un état plus désordonné que lorsqu'il était fixé à l'ARNr. Cette explication par le biais du solvant est classique. Cependant, on ne peut pas la considérer comme définitive ; en effet, on ne peut exclure une désorganisation partielle d'IF1 lors de l'interaction avec le 30S. (**Fig. 6C**).

A partir de 35°C, c'est le ΔH qui représente la force motrice principale de l'interaction. Il est possible qu'en augmentant la température, la solvation du site de fixation change ce qui diminuerait la quantité de molécules expulsées lors de la fixation d'IF1. Ainsi l'augmentation du désordre diminue et l'on forme plus de liaison qu'on en casse ce expliquerait pourquoi le ΔH est négatif dans cette expérience. On observe également que l'affinité d'IF1 pour le 30S ne varie que très peu en fonction de la température (**Table 5**).

Une étude précédente a mesuré l'affinité d'IF1 pour le 30S par polarisation de fluorescence, obtenant un K_d de 2 μM (Zucker and Hershey, 1986). Ceci est en accord avec nos résultats obtenu par ITC. On en conclut que l'affinité d'IF1 pour le 30S seul est plutôt faible. Par ultracentrifugation couplée à un marquage radioactif, il a également été démontré que l'entropie représente la principale force motrice de l'interaction entre IF1 et le 30S et que l'affinité d'IF1 ne varie que très peu en fonction de la température (Celano et al., 1988). Une fois de plus, ces résultats sont en adéquation avec nos données obtenues par ITC.

A nouveau, en accord avec l'hypothèse de dimérisation des sous-unités 30S, la stœchiométrie est maximale à 35°C.

b) Fixation d'IF1 sur le complexe 30S-IF3

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
20	$2,18 \pm 0,05$	43,9	-12,9	$0,80 \pm 0,06$	$10,9 \pm 36,0$	$-10,7 \pm 1,1$
25	$-3,35 \pm 0,03$	21,5	-6,4	$0,58 \pm 0,01$	$70,4 \pm 7,9$	$-9,80 \pm 0,07$
30	$-5,65 \pm 0,14$	17,8	-5,4	$0,42 \pm 0,01$	$11,0 \pm 10,3$	$-11,0 \pm 1,0$
35	$-8,62 \pm 0,06$	6,34	-2,0	$0,79 \pm 0,01$	$27,2 \pm 5,0$	$-10,7 \pm 0,1$
37	$-11,87 \pm 0,11$	-5,15	1,6	$0,76 \pm 0,01$	$57,1 \pm 8,9$	$-10,3 \pm 0,1$

Table 6 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre IF1 et le complexe 30S-IF3 mesurés par ITC.

En présence d'IF3, l'affinité d'IF1 augmente d'environ 13 fois et le ΔH et le ΔS diminuent (**Table 6**). Par conséquent, soit IF1 forme plus de liaisons avec le complexe 30S-IF3, soit moins de molécule d'eau sont expulsées lors de la fixation d'IF1. Dans tous les cas, on peut conclure que le site de fixation d'IF1 est différent quand IF3 est présent sur le 30S. De plus, étant donné que le ΔG diminue, on en déduit que la présence d'IF3 favorise nettement la fixation d'IF1 sur la petite sous-unité.

Par ITC, l'affinité d'IF1 pour le complexe 30S-IF3 présente un K_d de 27,2 nM à 35°C (**Table 6**). Une étude cinétique analysant la fixation d'IF1 sur le complexe 30S-IF3 par FRET a obtenu des valeurs semblables (35 nM) (Milon et al., 2012). De même, par polarisation de fluorescence, il a été observé qu'IF1 présente une affinité de 28 nM pour le complexe 30S-IF3 (Zucker and Hershey, 1986). Enfin, par ultracentrifugation, il a été démontré que l'affinité d'IF1 pour le 30S est augmentée de 11 fois en présence d'IF3 (Celano et al., 1988). Par conséquent, l'ensemble de ces résultats est donc cohérent avec nos données obtenues par ITC.

Ici aussi, on constate que la stœchiométrie augmente nettement au-delà de 30°C. Cependant, on observe également qu'elle est maximale à 20°C, ce qui représente une exception notable à ce qui a été observé dans tous les autres cas (y compris les cas suivants). Il se pourrait qu'il s'agisse simplement d'une légère surestimation de la concentration de 30S ou d'IF1.

c) Effet d'IF2 sur la fixation d'IF1 au 30S

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
25	11,28 ± 0,14	70,9	-21,1	0,55 ± 0,01	74,6 ± 6,1	-9,72 ± 0,05
35	-18,84 ± 0,28	-28,9	8,9	0,85 ± 0,01	90,9 ± 18,3	-9,9 ± 0,1

Table 7 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre IF1 et le complexe 30S-IF2 mesurés par ITC.

La présence d'IF2 induit également une diminution du ΔH et du ΔS . De plus, on remarque que le ΔH et le ΔS varie bien plus en fonction de la température. Le ΔG est également plus favorable en présence d'IF2 et reste stable (**Table 7**). On en déduit qu'IF2 favorise lui aussi la fixation d'IF1 sur le 30S et modifie le site de fixation du facteur. Ainsi, IF2 augmente d'environ 7 fois l'affinité d'IF1 pour le 30S. Les effets d'IF2 sur la fixation d'IF1 sont en revanche moins prononcés quand on les compare à ceux induits par IF3.

Dans ce cas, l'affinité mesurée par FRET et par ITC est légèrement différente. En effet, par ITC, on observe que l'affinité d'IF1 pour le complexe 30S-IF2 est meilleure (74,6 nM par ITC contre 290 nM par FRET) (Milon et al., 2012). Par polarisation de fluorescence, un K_d de 90 nM a été obtenu (Zucker and Hershey, 1986). De plus, par ultracentrifugation, il a également été démontré que la présence d'IF2 augmente l'affinité d'IF1 pour le 30S de 6 fois (Celano et al., 1988). A nouveau, ces valeurs sont très proches de celles que nous avons pu obtenir par ITC, ce qui confirme nos résultats.

Les différences avec les mesures réalisées par FRET peuvent être dues au marquage de la protéine. IF1 étant très petit (8 kDa) il est probable que le fluorophore altère légèrement l'affinité du facteur pour le complexe 30S-IF1 étant donné que les sites d'IF2 et d'IF1 sont très proches.

d) Fixation d'IF1 sur le complexe 30S-IF3-IF2

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
25	$3,44 \pm 0,03$	50,0	-14,9	$0,64 \pm 0,01$	$4,0 \pm 2,4$	$-11,5 \pm 0,6$
35	$-15,45 \pm 0,12$	-10,9	3,4	$0,87 \pm 0,01$	$2,7 \pm 2,2$	$-12,1 \pm 0,9$

Table 8 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre IF1 et le complexe 30S-IF3-IF2 mesurés par ITC.

En présence d'IF3 et d'IF2, l'affinité d'IF1 pour le 30S est maximale (**Table 8**) : elle augmente d'environ 150 fois, ce qui représente une variation favorable d'énergie libre $\Delta\Delta G \approx -3 \text{ kcal mole}^{-1}$ ($\Delta\Delta G = -R T \text{ Ln } 150$ avec $R = 1.99 \text{ cal mole}^{-1} \text{ K}^{-1}$ et $T \sim 300\text{K}$). En effet, on retrouve à 25°C:

$$\Delta G (\text{IF1}+30\text{S-IF2-IF3}) - \Delta G (\text{IF1}+30\text{S}) = (-11,5 \pm 0,6) + (8,3 \pm 0,1)$$

$$= - (3,2 \pm 0,6) \text{ kcal mole}^{-1}.$$

Il ne s'agit ici que d'une simple vérification de la cohérence entre les valeurs de ΔG et le K_d . Il est en revanche intéressant, et nullement trivial, de vérifier si les valeurs de :

$$\Delta\Delta G_2 = \Delta G(\text{IF1}+30\text{S-IF2-IF3}) - \Delta G (\text{IF1}+30\text{S-IF2}) = (-11,5 \pm 0,6) + (9,72 \pm 0,05) = - (1,78 \pm 0,6) \text{ kcal mole}^{-1} \text{ et}$$

$$\Delta\Delta G_3 = \Delta G(\text{IF1}+30\text{S-IF2-IF3}) - \Delta G(\text{IF1}+30\text{S-IF3}) = (-11,5 \pm 0,6) + (9,75 \pm 0,07) = - (1,75 \pm 0,6) \text{ kcal mole}^{-1}$$

ont une somme égale ou non à $\Delta\Delta G$ (toujours à 25°C). On obtient $\Delta\Delta G_2 + \Delta\Delta G_3 = - (3,53 \pm 0,8) \text{ kcal mole}^{-1}$ qui est bien en accord avec $\Delta\Delta G \approx - (3,2 \pm 0,6) \text{ kcal mole}^{-1}$. Cependant, les erreurs relatives sur les différents $\Delta\Delta G$ étant toujours assez importantes (puisque $\Delta\Delta G$ est toujours petit en valeur absolue), cette concordance peut ne pas être considérée comme décisive. Quoiqu'il en soit, en absence de preuves contraires, ces données supportent la conclusion que les effets de la fixation de chaque facteur sont cumulatifs et qu'il n'apparaît donc pas de coopérativité. Il est notable que les effets d'IF2 et d'IF3 sont quasiment identiques.

Etant donné que le site de fixation d'IF2 est très proche du site de fixation d'IF1, on peut émettre l'hypothèse qu'IF2 agit directement sur le site de fixation ou directement sur le facteur. En revanche, le site de fixation d'IF3 étant relativement éloigné du site de fixation d'IF1, il est donc plus probable que le changement d'affinité d'IF1 soit plutôt dû à un changement de conformation du site à longue distance.

Une étude par FRET a obtenu une affinité d'IF1 pour le complexe 30S-IF3-IF2 de 2 nM (Milon et al., 2012). De plus, un K_d de 4 nM a également été obtenu par polarisation de fluorescence (Zucker and Hershey, 1986). Enfin, il a été démontré par ultracentrifugation que l'affinité d'IF1 pour le 30S est maximale quand IF2 et IF3 sont déjà présents sur la petite sous-unité (Celano et al., 1988). Ces résultats sont donc parfaitement cohérents avec les valeurs que nous avons obtenues par ITC.

3. Paramètres thermodynamiques de la fixation d'IF2 sur le 30S

Comme pour l'étude d'IF3 et d'IF1, nous avons décidé d'étudier dans un premier temps l'interaction entre IF2 et le 30S seul. Puis nous avons déterminé les effets induits par la présence d'IF3 et d'IF1 sur la fixation d'IF2. Pour cela, nous avons comparé les paramètres thermodynamiques de fixation d'IF2 sur un complexe 30S-IF3, 30S-IF1 et 30S-IF3-IF1 aux paramètres thermodynamiques de fixation d'IF2 sur le 30S seul. De plus, étant donné la présence d'une hydrolyse du GTP intrinsèque en absence de 50S (Huang et al., 2010), l'ensemble des expériences d'ITC impliquant le complexe IF2-GTP ont été réalisées en présence d'un excès en GTP de 3,5 fois par rapport à IF2. Afin d'éviter les différences de tampon, nous avons toujours introduit la même concentration en GTP dans la seringue et dans la cellule à échantillon.

a) Paramètres thermodynamiques de la fixation de GTP sur IF2

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (μM)	ΔG (kcal/mol)
15	$-3,96 \pm 0,23$	6,4	-1,8	$0,95 \pm 0,05$	$41,2 \pm 3,2$	$-5,79 \pm 0,04$
20	$-5,48 \pm 0,12$	2,4	-0,7	$1,00 \pm 0,02$	$25,1 \pm 1,4$	$-6,18 \pm 0,03$
25	$-8,20 \pm 0,33$	-7,3	2,2	$0,72 \pm 0,04$	$39,1 \pm 2,2$	$-6,01 \pm 0,03$
30	$-13,10 \pm 0,81$	-23,6	7,2	$0,75 \pm 0,04$	$50,5 \pm 3,3$	$-5,94 \pm 0,04$
35	$-14,65 \pm 0,26$	-27,6	8,5	$0,52 \pm 0,03$	$44,1 \pm 3,7$	$-6,11 \pm 0,05$

Table 9 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre le GTP et IF2 mesurés par ITC.

Etant donné qu'IF2 se fixe au 30S sous la forme d'un complexe IF2-GTP, nous avons dans un premier temps étudié la formation du complexe IF2-GTP par ITC. Ces résultats ont ensuite été confrontés à ceux obtenus ultérieurement par ITC (Hauryliuk et al., 2009). Quand on compare l'affinité mesurée à celle déjà déterminée par l'équipe de Mans Ehrenberg, on observe dans notre cas, que le GTP présente un K_d nettement plus grand pour IF2. En effet, l'affinité déterminée est de 30 μM comparé au 7 μM de l'étude (Hauryliuk et al., 2009). Cette variation est probablement due à une différence au niveau de la composition des tampons. En effet, notre tampon contient 7 mM de magnésium contre 5 mM pour celui de la publication. Le magnésium influence la fixation d'IF2 sur le 30S et il est fort possible qu'il affecte aussi la fixation du GTP sur IF2. De plus, le pH utilisé est différent : 7,0 au lieu de 7,5 ; cela pourrait également expliquer ces différences de K_d .

Nous avons pu observer que la stœchiométrie obtenue est très proche de 1 jusqu'à 30°C (**Table 9**). A 35°C, on observe que cette dernière diminue très nettement ; il est probable que cela soit dû à l'agrégation du facteur à partir de 35°C. Les mêmes problèmes d'agrégation ont été rencontrés par Hauryliuk et ses collaborateurs. C'est la raison pour laquelle, ils ont extrapolés les droites jusqu'à 37°C pour en déduire les paramètres thermodynamiques (Hauryliuk et al., 2009). Ainsi, nous avons décidé d'éviter de réaliser nos expériences d'ITC à 35°C.

Nous avons également comparé les ΔC_p ; dans notre cas, ce dernier est de -580 cal/mol/deg tandis que celui de l'étude précédente est de -868 cal/mol/deg (Hauryliuk et al., 2009). Le ΔS et le ΔH étant chacun linéaire, il y a donc une compensation et par conséquent, comme on peut l'observer dans notre cas, le ΔG varie très peu avec la température (**Table 9**). Le ΔH diminuant avec l'augmentation de la température, la fixation du GTP réduit la surface d'exposition des acides aminés non polaire, ce qui est compatible avec une plus grande structuration de la protéine en présence de ligand. Ainsi, mise à part la différence aux niveaux des valeurs déterminées par ITC, nous obtenons des conclusions similaires à celles de la publication de Hauryliuk et al., 2009.

b) Fixation du complexe IF2-GTP sur le 30S seul

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
10	$-17,38 \pm 0,85$	-37,5	10,6	$0,60 \pm 0,02$	6172 ± 483	$-6,76 \pm 0,05$
20	$-14,91 \pm 0,68$	-26,9	7,9	$1,15 \pm 0,03$	5620 ± 433	$-7,04 \pm 0,04$
25	$-13,8 \pm 0,20$	-21,2	6,3	$1,02 \pm 0,02$	1980 ± 106	$-7,49 \pm 0,03$

Table 10 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre le complexe IF2-GTP et le 30S seul mesurés par ITC.

Nous avons ensuite étudié l'association du complexe IF2-GTP avec le 30S seul. Dans ce cas, nous avons observé que le ΔH permet à la réaction d'être spontanée. Le ΔS étant négatif, le désordre diminue avec la formation du complexe, ainsi le degré de flexibilité des partenaires diminue (**Table 10**). D'autre part, nous avons pu observer que l'affinité d'IF2 pour le 30S est extrêmement faible quand on la compare à celle retrouvée dans la littérature. En effet, par polarisation de fluorescence, l'affinité d'IF2 pour le 30S dans un tampon comparable au notre (100 mM NH_4Cl), présente un K_d de 66 nM (Weiel and Hershey, 1982). Dans cette même publication, il est également mentionné que la concentration en sel fait énormément varier l'affinité d'IF2 pour le 30S. En effet, si on se place à une concentration en NH_4Cl de 150 mM, le K_d sera de 500 nM (Weiel and Hershey, 1982). Le fait d'avoir un pH plus faible (7,0 au lieu de 7,4) pourrait également expliquer pourquoi dans notre cas, l'affinité d'IF2 pour le 30S est nettement plus faible.

D'autre part, une étude par ultracentrifugation a permis de déterminer une forte affinité d'IF2 pour le 30S. Dans ce cas, le K_d obtenu était de 47 nM. A nouveau le pH était de 7,7 et la concentration NH_4Cl était de 50 mM ce qui pourrait éventuellement expliquer les différences d'affinités observées (Caserta et al., 2006).

En revanche, une récente étude par FRET a permis de déterminer une affinité d'IF2 pour un complexe 30S-mRNA de l'ordre de 70 μM (Wang et al., 2015). Il s'agit de la seule étude ayant obtenue une affinité semblable à ce que nous avons déterminé par ITC.

c) Fixation du complexe IF2-GTP sur le complexe 30S-IF1

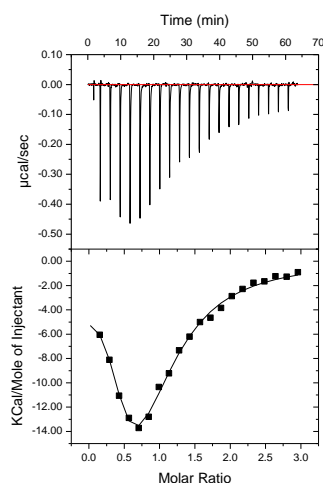


Figure 32 : Expérience d'ITC représentant le type de courbe de saturation que nous avons obtenue pour la fixation du complexe IF2-GTP sur le complexe 30S-IF1 à 25°C.

Dès lors qu'IF1 est présent sur le 30S, la forme de la courbe après intégration des pics d'ITC présente toujours un profil particulier. En effet, on observe tout d'abord une augmentation de la quantité de chaleur émise puis cette dernière diminue progressivement (**Fig. 32**). La forme de la courbe ITC ne nous permet pas de déterminer les paramètres thermodynamiques en utilisant un modèle à un seul site de fixation. Nous supposons que ce comportement non standard soit lié à une hydrolyse du GTP par IF2 pendant la titration, mais une analyse particulière serait nécessaire pour en dire plus.

Ayant obtenus des résultats difficilement interprétables, nous avons décidé de réaliser une détermination de la masse d'IF2 par spectrométrie de masse à ionisation électrospray en conditions dénaturantes afin de contrôler l'intégrité du facteur. En effet, il a été démontré qu'IF2 est très sensible à la protéolyse. D'après la séquence peptidique, nous avons calculé qu'IF2 présente une masse théorique de 97350 Da. Nos résultats montrent qu'à la fois sur gel SDS-PAGE et par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes, la protéine était complète et sans trace de dégradation (**Fig. 33**). La différence entre la masse théorique et la masse réelle observée par spectrométrie de masse en conditions natives provient certainement du fait que la méthionine présente à l'extrémité N-ter a été éliminée de manière post-traductionnelle. En effet, la différence de masse est de 128 Da et si on enlève la méthionine en N-ter, la différence est de 131 Da. La protéine étant intacte, cela ne permet pas d'expliquer le profil de la courbe d'ITC (**Fig. 32**).

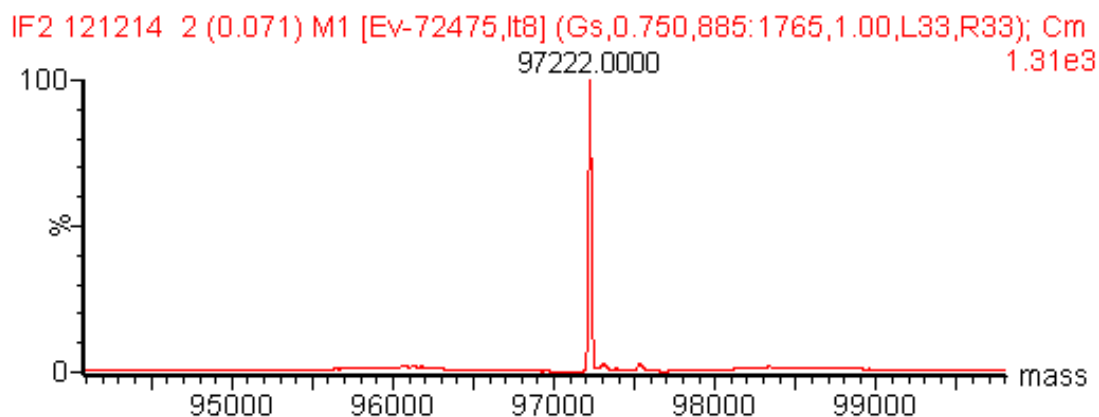


Figure 33 : Spectre d'IF2 obtenu par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes.

d) Fixation du complexe IF2-GTP sur le complexe 30S-IF3

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
15	$-34,34 \pm 3,93$	-96,1	27,7	$0,49 \pm 0,05$	9170 ± 752	$-6,64 \pm 0,04$
25	$-15,15 \pm 0,20$	-26,6	7,9	$1,09 \pm 0,01$	4460 ± 303	$-7,22 \pm 0,04$

Table 11 : Représentation de la moyenne de l'ensemble des paramètres thermodynamiques de l'interaction entre le complexe IF2-GTP et le complexe 30S-IF3 mesurés par ITC.

Quand on introduit IF2 sur un complexe 30S-IF3, on observe que l'affinité du facteur pour le 30S reste toujours très faible ; en effet, on détermine un K_d d'environ 5 μM (Table 11). De plus, aucun des paramètres thermodynamiques n'a significativement changé. On en conclue que la présence d'IF3 ne modifie pas le site de fixation d'IF2 sur le 30S.

e) Fixation du complexe IF2-GTP sur le complexe 30S-IF3-IF1

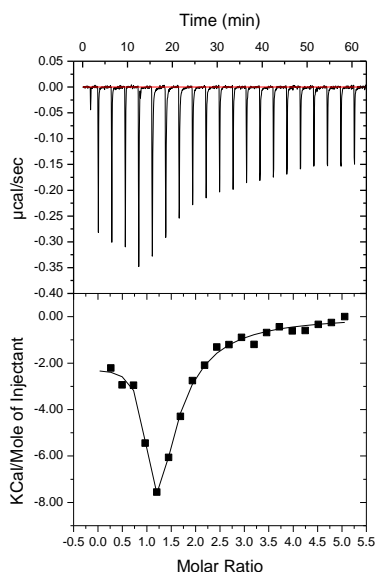
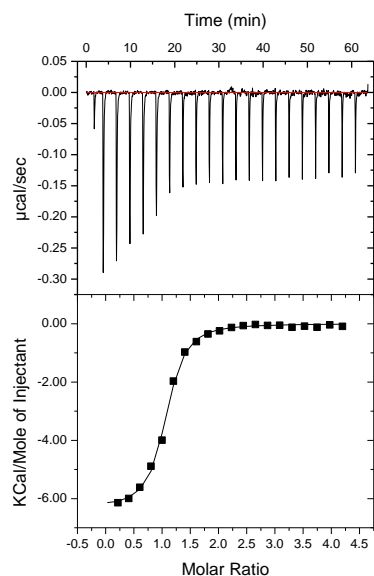


Figure 34 : Expérience d'ITC représentant le type de courbe de saturation que nous avons obtenue pour la fixation du complexe IF2-GTP sur le complexe 30S-IF1-IF3 à 25°C.

Comme lors de la fixation d'IF2-GTP sur le complexe 30S-IF1, on observe après titration d'IF2-GTP sur le complexe 30S-IF3-IF1, une courbe d'ITC ayant une allure particulière (**Fig. 34**). A nouveau, la détermination des paramètres thermodynamiques est impossible avec un modèle simple à un seul site de fixation.

Comme mentionné précédemment, nous supposons que les données ITC obtenues ici, reflètent l'hydrolyse du GTP par IF2 en cours de titration. C'est pourquoi la même expérience a été réalisée, mais cette fois-ci sans GTP. Comme on peut le voir, en absence de GTP, ces données sont parfaitement analysables avec un modèle simple à un seul site de fixation (**Fig. 35**).



ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
$-6,32 \pm 0,08$	8,7	-2,6	$1,01 \pm 0,01$	292 ± 31	$-8,91 \pm 0,06$

Figure 35 : Expérience d’ITC représentant la fixation d’IF2 **sans GTP** sur le complexe 30S-IF1-IF3 à 25°C et table représentant les paramètres thermodynamiques de l’interaction à 25°C.

Ainsi, nous avons observé qu’IF2 présente une bonne affinité pour le complexe 30S-IF3-IF1 (**Fig. 35**). Mais étant donné que la structure d’IF2 varie suivant que le facteur soit couplé ou non au GTP (Hauryliuk et al., 2009), nous avons choisi de réitérer les expériences précédentes avec un analogue non hydrolysable du GTP : le GMPPCP. Ainsi, cela nous a permis de mimer le complexe IF2-GTP tout en évitant l’hydrolyse du GTP.

f) Fixation du complexe IF2-GMPPCP sur le 30S

Complexe	T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
30S seul	25	$-11,61 \pm 0,29$	-13,6	4,1	$0,85 \pm 0,02$	$2262,4 \pm 214,4$	$-7,55 \pm 0,05$
30S-IF3	25	$-13,8 \pm 0,25$	-19,3	5,8	$0,99 \pm 0,01$	$1342,3 \pm 101,7$	$-8,04 \pm 0,04$
30S-IF1	25	$-3,34 \pm 0,03$	19,6	-5,8	$0,81 \pm 0,01$	183,5 $\pm 15,0$	$-9,18 \pm 0,04$
30S-IF3-IF1	25	$-5,37 \pm 0,06$	15,6	-4,7	$0,88 \pm 0,01$	45,5 $\pm 9,6$	$-10,0 \pm 0,1$

Table 12 : Paramètres thermodynamiques des combinaisons de l’interaction entre le complexe IF2-GMPPCP et le 30S mesuré par ITC.

En présence de GMPPCP, on observe que l'affinité d'IF2 augmente d'environ 2 fois en présence d'IF3 (**Table 12**), mais reste toujours très faible comparée aux valeurs retrouvées dans la littérature. En revanche, une fois qu'IF1 est présent sur le 30S, l'affinité d'IF2 pour la petite sous-unité ribosomale augmente de 16 fois (**Table 12**). De plus, en présence d'IF1 et d'IF3, l'affinité augmente de 63 fois. Dans ce cas, il y a donc à nouveau un phénomène de coopérativité des facteurs. Par conséquent, la présence simultanée d'IF1 et d'IF3 modifie le site de fixation d'IF2 et augmente très nettement l'affinité de ce facteur pour le 30S. De plus, quand IF1 est présent sur le 30S, on observe que les paramètres thermodynamiques de la fixation d'IF2 sont très différents. En effet, c'est le ΔS qui devient la force motrice de l'interaction dans ce cas (**Table 12**).

Une étude de la fixation d'IF2 sur le complexe 30S-IF3-IF1 a permis d'obtenir par FRET un K_d de 40 nM (Milon et al., 2012). Ces résultats sont donc cohérents avec nos données obtenues par ITC.

Concernant la fixation d'IF2, on en conclue par ITC que l'affinité du facteur pour le 30S augmente drastiquement à partir du moment où IF1 est déjà présent sur la petite sous-unité.

4. Détermination de l'ordre préférentiel d'assemblage des facteurs d'initiation lors de la formation du complexe d'initiation 30S

a) Fixation des facteurs sur le 30S seul

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
30S-IF1 à 25°C	$2,77 \pm 0,12$	37,3	-11,1	$0,36 \pm 0,01$	$775,2 \pm 129,2$	$-8,35 \pm 0,1$
30S-IF2-GTP à 25°C	$-13,80 \pm 0,20$	-21,2	6,3	$1,02 \pm 0,02$	$1980,3 \pm 106,4$	$-7,49 \pm 0,03$
30S-IF3 à 25°C	$-21,91 \pm 0,19$	-38,9	11,6	$0,40 \pm 0,01$	$26,4 \pm 3,2$	$-10,31 \pm 0,07$

Table 13 : Paramètres thermodynamiques des 3 facteurs d'initiation pour le 30S seul à 25°C.

Quand on compare l'affinité de chacun des facteurs pour le 30S seul, on remarque que c'est clairement IF3 qui présente la meilleure affinité pour le 30S aussi bien à 25°C (**Table**

13) qu'à 35°C. Par conséquent, sur les bases des affinités mesurées par ITC, on peut en conclure que c'est IF3 qui viendra se fixer en premier sur le 30S.

On sait qu'IF3 est également impliqué dans l'étape de recyclage. En effet, il participe à la dissociation de l'ARNt déacylé présent dans le site P et en empêche la réassociation des 2 sous-unités ribosomales (Singh et al., 2005). Par conséquent, le fait de le retrouver en premier sur le 30S n'a rien de surprenant.

b) Fixation d'IF1 et d'IF2-GTP sur le complexe 30S-IF3

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
30S-IF3-IF1 à 25°C	-3,35 ± 0,03	21,5	-6,4	0,58 ± 0,01	70,4 ± 7,9	-9,76 ± 0,06
30S-IF3-IF2-GTP à 25°C	-15,15 ± 0,20	-26,6	7,9	1,09 ± 0,01	4460,3 ± 303,2	-7,22 ± 0,4

Table 14 : Paramètres thermodynamiques d'IF1 et d'IF2-GTP pour le complexe 30S-IF3 à 25°C.

En partant ainsi d'un complexe 30S-IF3, il s'agit maintenant d'ajouter IF1 ou IF2-GTP. Nos résultats montrent que l'affinité du complexe IF2-GTP pour le 30S ne varie pas avec la présence d'IF3 (**Table 14**). En revanche l'affinité d'IF1 augmente très fortement (de 775 nM à 70,4 nM à 25°C). Ainsi, en se basant sur l'affinité mesurée par ITC, on en conclue qu'IF1 viendra se fixer au 30S en deuxième position. Par élimination, on en déduit également qu'IF2 est le facteur d'initiation qui viendra se fixer en dernier sur le 30S. Notons également que l'affinité d'IF2 ne varie que très peu en présence de GMPPCP.

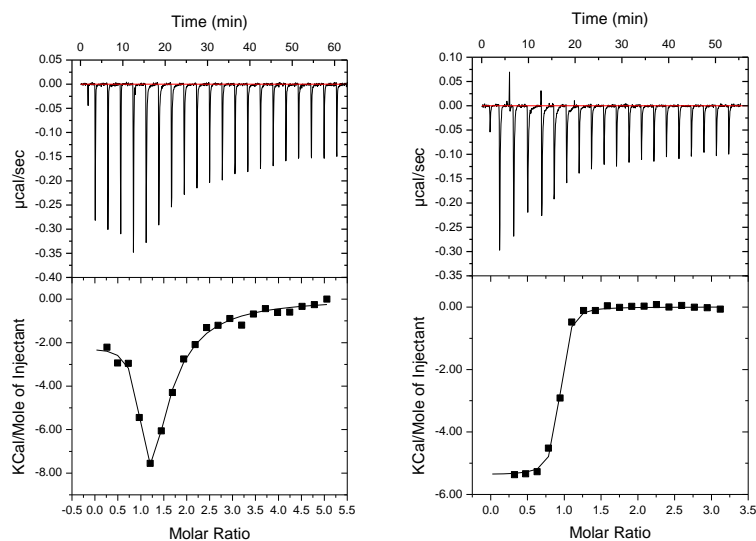
c) Fixation d'IF2 sur le complexe 30S-IF3-IF1

30S-IF3-IF1 + IF2-GTP à 25°C
30S-IF3-IF1 + IF2-GMPPCP à 25°C

Figure 36 : Représentation des courbes de titration d'IF2 couplé au GTP à droite et d'IF2 couplé au GMPPCP à gauche.

Comme nous l'avons vu précédemment, à partir du moment où IF1 est présent sur le 30S, la courbe de titration du complexe IF2-GTP sur le 30S n'est pas interprétable avec un modèle à un seul site de fixation (**Fig. 36**). En revanche, si on échange le GTP par du GMPPCP, on observe que la courbe est analysable par un tel modèle, ce qui nous a permis de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction. Ainsi, nous observons que l'affinité d'IF2 augmente très nettement en présence d'IF1. Dans ce cas, nous avons pu observer que l'affinité d'IF2 pour la petite sous-unité est maximale quand ce facteur vient se fixer en dernier (**Table 12**).

En se basant sur les affinités mesurées par ITC il a donc été possible de déduire un ordre préférentiel d'association des facteurs d'initiation pour la formation du complexe d'initiation 30S. Nos résultats montrent que c'est IF3 qui est le premier facteur à venir se fixer au 30S, suivi d'IF1 puis d'IF2.

Une étude similaire a été réalisée en 2012 par une approche utilisant le FRET. Dans ce cas, l'ordre de fixation des facteurs a été obtenu suivant la vitesse d'association de ces derniers (Milon et al., 2012). Les résultats de cette étude montrent qu'IF3 vient en premier sur le 30S suivi d'IF2 et enfin d'IF1. L'ordre obtenu est donc différent de celui que nous avons

déterminé par ITC. Cette différence provient principalement du fait que les affinités d'IF2 pour le 30S divergent énormément selon les techniques employées.

Par utilisation d'un nouvel appareil disposant de la technologie switchSENSE, nous espérons déterminer les vitesses de fixation et de dissociation des différents partenaires du complexe d'initiation 30S. Il sera alors possible de comparer les résultats mesurés par ITC à ceux obtenus par l'approche switchSENSE. Ainsi, on espère pouvoir confirmer l'ordre de fixation déterminé par ITC et surtout l'importante variation d'affinité d'IF2 pour le 30S.

5. Paramètres thermodynamiques de la fixation de l'ARNm sur le 30S

a) Fixation de l'ARNm sur le 30S seul

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
15	$-34,4 \pm 1,4$	-91,7	26,4	$0,34 \pm 0,01$	877 ± 107	$-7,99 \pm 0,07$
20	$-41,5 \pm 1,0$	-125	36,7	$0,43 \pm 0,01$	1795 ± 135	$-4,89 \pm 0,04$
25	$-48,8 \pm 2,1$	-139	41,5	$0,58 \pm 0,01$	3378 ± 175	$-7,31 \pm 0,03$
30	$-53,1 \pm 2,5$	-151	45,8	$0,53 \pm 0,02$	5917 ± 337	$-7,34 \pm 0,03$
35	$-61 \pm 9,0$	-176	54,2	$0,46 \pm 0,06$	13351 ± 951	$-6,75 \pm 0,04$

Table 15 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre l'ARNm et le 30S seul mesurés par ITC.

L'ARNm que nous avons choisi (56 nucléotides) a la séquence suivante :

GGAAAUUAAUAAUAAAAGGAGAGUAGCAAUGGGCACGUCCGUCAGAGAAAAUAAAA

Il est caractérisé par une séquence Shine & Dalgarno (SD) forte (**AAGGAG**) et par un espaceur de 7 nucléotides avant le codon d'initiation AUG. Comme attendu pour ce type d'interaction mettant en jeu la formation de paires de bases, l'enthalpie est élevée et de loin la force motrice de l'interaction. On constate cependant que l'affinité de l'ARNm pour le 30S est assez faible (**Table 15**). La mise en place de l'interaction SD-aSD (3 paires A-U et 3 paires G-C) correspond à 15 liaisons hydrogènes. Sur la base d'environ -3 kcal/mol par liaison hydrogène, la formation de l'interaction SD-aSD devrait représenter un ΔH d'environ -45 kcal/mol, ce qui est très proche de la valeur observée à 25°C (**Table 15**). Par conséquent,

nous pouvons supposer que l'interaction SD-aSD s'est bien mise en place. Cependant, on constate un ΔH nettement plus petit à 15 °C et nettement plus grand à 35 °C. Il est particulièrement intéressant dans ce cas d'examiner l'évolution des différents paramètres avec la température. L'évolution de ΔH (**Fig. 37**) montre une variation linéaire parfaite conduisant à la détermination d'un ΔC_p de $-(1,31 \pm 0,07)$ kcal mole⁻¹ K⁻¹, ce qui est une valeur élevée mais habituelle pour la formation de paires de base.

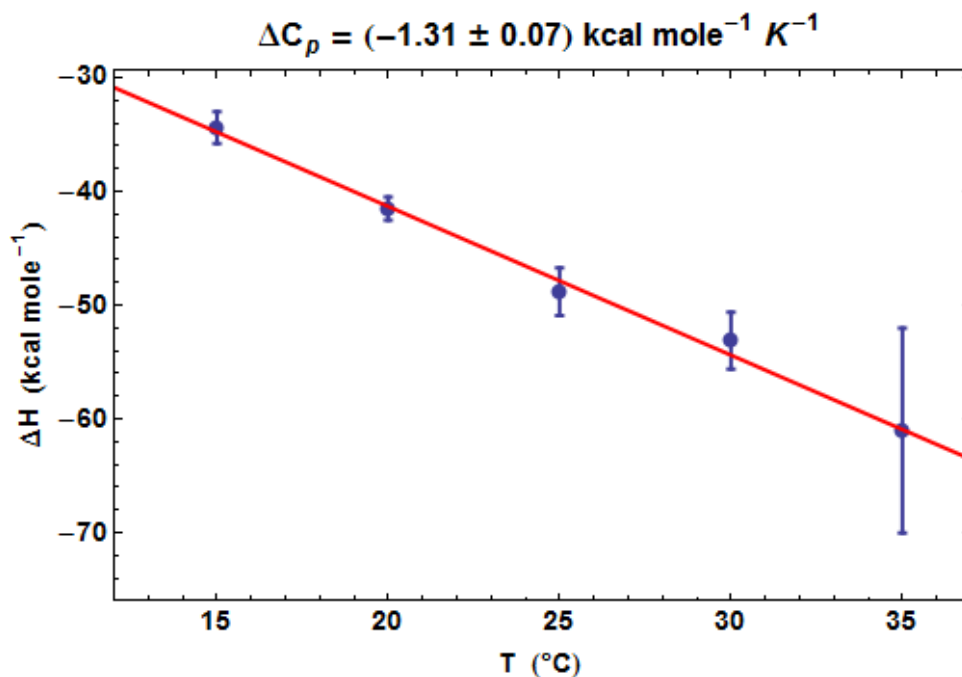
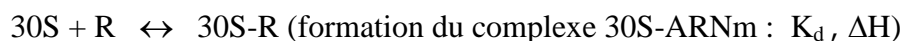
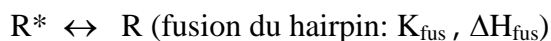
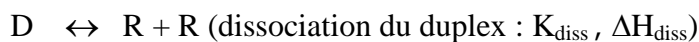


Figure 37 : Evolution du ΔH en fonction de la température et détermination de ΔC_p .

L'évolution de K_d , représentée sous la forme d'un van't Hoff plot (**Fig. 38**), permet de dériver un ΔH_{VH} de $-(23,3 \pm 1,2)$ kcal mole⁻¹, qui est très différente des valeurs mesurées expérimentalement. Il est donc clair que l'interaction entre le 30S et l'ARNm ne se fait pas selon un mécanisme simple de type $30S + \text{ARNm} \leftrightarrow 30S\text{-ARNm}$, mais selon un mécanisme plus complexe, ce qui n'est pas étonnant compte tenu de la taille et la complexité des partenaires mis en jeu.

Au niveau de l'ARNm, le programme RNA Fold met effectivement en évidence la formation d'une tige boucle impliquant la séquence SD (**Fig. 39**) qui doit être défait pour que l'interaction ARNm-30S se mette en place. Le ΔG théorique pour cette tige boucle obtenu par Mfold, est de -3,80 kcal/mol. Deux brins d'ARNm peuvent également former un duplex stable (ΔG de -14,3 kcal mole⁻¹ dans les conditions standard de 1 M en brins, soit après

correction, de $-9,2 \text{ kcal mole}^{-1}$ pour $200 \mu\text{M}$ dans la seringue et $-7,8 \text{ kcal mole}^{-1}$ pour $20 \mu\text{M}$ dans la cuve). Un mécanisme possible à envisager dans les conditions ITC serait donc :



Cela explique pourquoi le ΔH mesuré par ITC est significativement différent du ΔH_{VH} . Cependant, l'interprétation complète de cette expérience ITC nécessiterait une analyse plus poussée qui n'a pas pu être entreprise ici. Il faut mentionner que, *in vivo*, seule la forme d'une tige boucle est susceptible d'exister du fait d'une concentration beaucoup plus faible en ARNm. D'autre part, la protéine ribosomale S1 pourrait aider à défaire une structuration de l'ARNm. Il faudrait donc envisager des expériences ITC où S1 est soit présente, soit absente (alors qu'ici une fraction des 30S seulement est associée à S1). On ne peut éluder que l'interprétation d'une telle expérience ITC serait très compliquée (trois partenaires) et nécessiterait d'être entreprise en parallèle avec d'autres informations expérimentales.

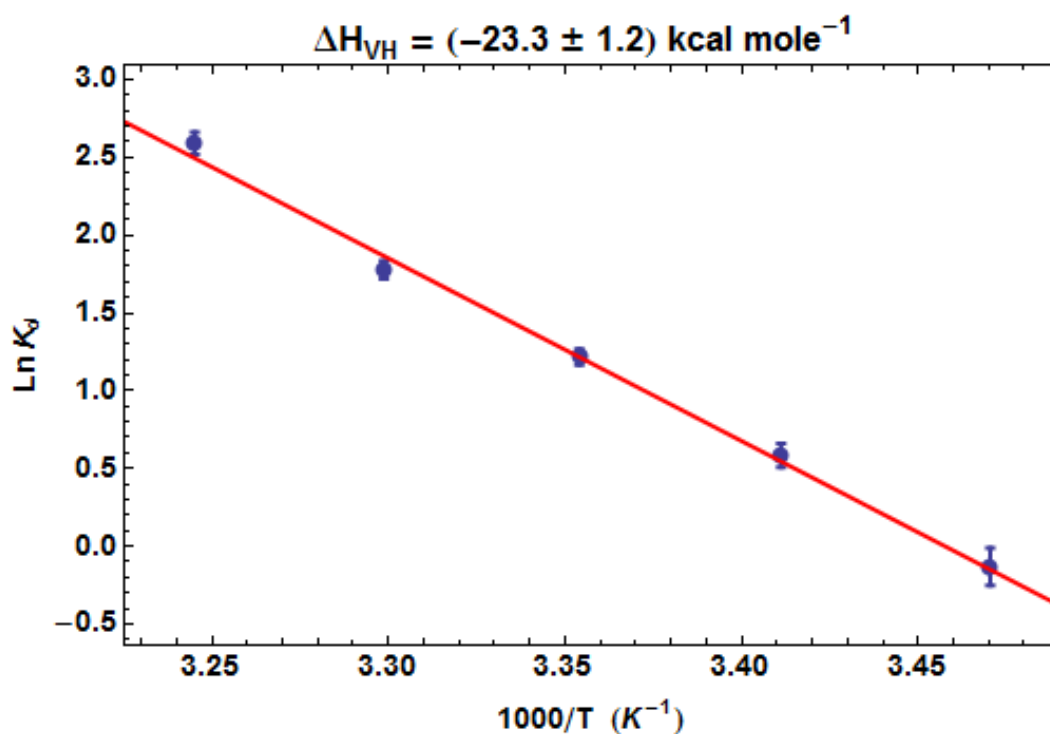


Figure 38 : Evolution du K_d en fonction de la température sous la forme d'un van't Hoff plot et détermination de ΔH_{VH} expliquant la droite de van 't Hoff (en rouge) ajustée aux points expérimentaux.

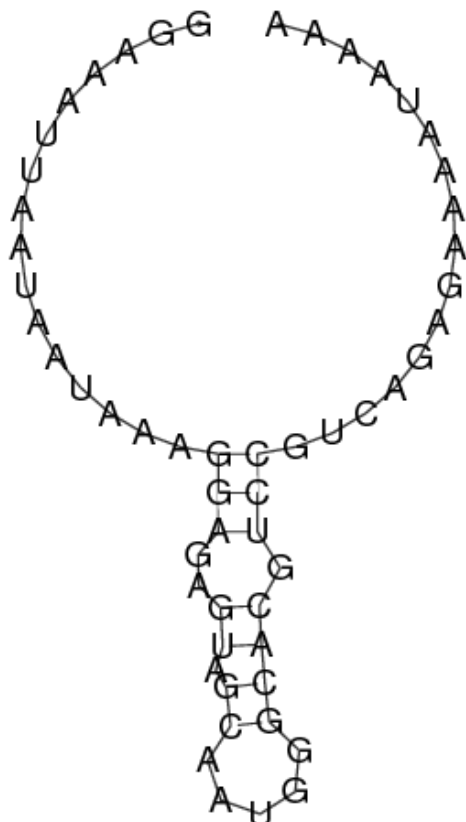


Figure 39 : Structure secondaire de l'ARNm prédite par RNAFold.

b) Comparaison des paramètres thermodynamiques de la fixation de l'ARNm sur différents complexes à 25°C

Complexe	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
30S seul + ARNm	$-48,8 \pm 2,1$	-139	41,5	$0,58 \pm 0,01$	3378 ± 175	$-7,31 \pm 0,03$
30S-IF1 + ARNm	$-47 \pm 2,7$	-132	39,4	$0,55 \pm 0,03$	2762 ± 236	$-7,62 \pm 0,05$
30S-IF2 + ARNm	$-37,2 \pm 0,4$	-98,6	29,4	$0,92 \pm 0,01$	2012 ± 78	$-7,77 \pm 0,02$
30S-IF3 + ARNm	$-33,6 \pm 0,4$	-84,4	25,2	$0,72 \pm 0,01$	694 ± 29	$-8,41 \pm 0,03$
30S-IF3-IF1-IF2-GTP + ARNm	$-36,6 \pm 0,7$	-95,6	28,5	$1,06 \pm 0,02$	1178 ± 76	$-8,08 \pm 0,04$
30S-IF3-IF1-IF2-GTP-ARNt initiateur + ARNm	$-32,89 \pm 0,6$	-84	25,1	$1,29 \pm 0,02$	1761 ± 133	$-7,84 \pm 0,04$

Table 16 : Paramètres thermodynamiques pour la fixation de l'ARNm sur les différents complexes de 30S à 25°C.

D'après les valeurs de la table ci-dessus, on peut constater que l'affinité de l'ARNm ne varie que très faiblement en fonction du complexe considéré. Seule l'affinité de l'ARNm

pour le complexe 30S-IF3 est légèrement meilleure. Ces résultats sont en accord avec l'influence importante de la structuration de l'ARNm détaillé précédemment, cette influence étant indépendante des autres partenaires. D'autre part, ils sont en adéquation avec les résultats du groupe de Gualerzi (Gualerzi 2001 Cold Spring Harb Symp Quant Biol). Par une approche FRET, deux études ont également montré que la fixation de l'ARNm est indépendante de la présence des facteurs d'initiation (Milon et al., 2012; Studer and Joseph, 2006). Seule la séquence gouvernant la présence de structure secondaire dans la région SD-AUG peut donc faire varier significativement l'affinité d'un ARN messager pour le 30S.

Pour notre étude, la comparaison des affinités n'a été possible qu'à 25°C car à 35°C le signal est parasité par une autre réaction (**Fig. 40**). Il se pourrait que la dissociation des dimères d'ARNm ou le dépliement de l'ARNm entraîne l'apparition d'un pic endothermique (**Fig. 40**).

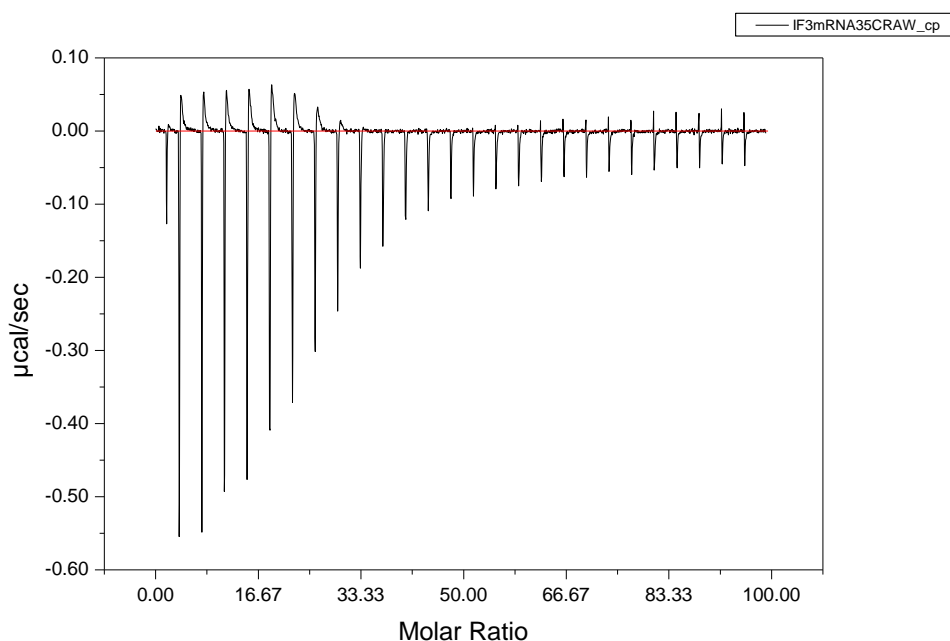


Figure 40 : Expérience d'ITC où l'on observe la fixation de l'ARNm au 30S seul à 35°C. A cette température, on observe la présence d'un signal en début d'expérience que nous avons attribué à un possible dépliement de l'ARNm lors de sa fixation sur le 30S, mais difficile à interpréter.

c) Fixation d'autres ARNm sur le 30S

Nous avons ensuite étudié la variation de la force de la séquence SD sur la fixation au 30S. Pour cela, nous sommes partis de la même séquence d'ARN mais nous avons fait varier la séquence SD en diminuant ou en augmentant de 2 nucléotides la longueur de l'interaction SD-aSD. Malheureusement, pour les 2 constructions, un signal de dépliement ou de dissociation de dimères d'ARNm a bruité l'expérience, rendant impossible toute analyse par un modèle simple, même à 25°C.

Par la suite, nous avons également changé la séquence de l'ARNm. Pour cela, nous avons choisi la séquence de l'ARNm 022 de la publication (Milon et al., 2012) en modifiant les nucléotides en aval de l'AUG. L'ARNm 022 est caractérisé par une SD plus faible que celui utilisé précédemment (5 nucléotides au lieu de 6) et par un espaceur plus grand d'un nucléotide. Les structures secondaires possibles ont été estimées grâce à Mfold. Sous une forme simple brin, l'ARNm est capable de faire une structure faible ayant un ΔG de -1,00 kcal/mol. Deux brins en solutions peuvent former une structure ayant un ΔG de -3,87 kcal/mol. Comparé à l'ARNm précédent, la structure secondaire que peut former deux brins en solution est donc bien plus faible.

La Séquence SD de l'ARNm est AGGUA ; l'interaction SD-aSD met donc en place 12 liaisons hydrogènes et on devrait donc mesurer un ΔH d'environ -36 kcal/mol. C'est effectivement ce que l'on retrouve lors des expériences d'ITC (**Table 17**).

Complexe	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
30S + ARNm 022	$-34,6 \pm 0,65$	-84,6	25,2	$0,39 \pm 0,01$	$141,2 \pm 20,4$	$-9,37 \pm 0,08$
30S-IF3 + ARNm 022	$-34,2 \pm 0,59$	-82,4	24,6	$0,45 \pm 0,01$	$96,2 \pm 16,4$	$-9,63 \pm 0,10$
30S-IF3-IF1-IF2-GTP + ARNm 022	$-34,3 \pm 0,74$	-84	25,1	$0,37 \pm 0,01$	$168,4 \pm 30,3$	$-9,25 \pm 0,11$

Table 17 : Paramètres thermodynamiques pour l'interaction de l'ARNm 022 sur différents complexes de 30S à 25°C.

De plus, on constate que l'ARNm 022 présente une affinité 10 fois supérieure à celle de l'ARNm précédent. L'ARNm 022 ayant une séquence SD plus faible, il devrait interagir

moins fortement avec le 30S. Selon la littérature, l'espaceur permettant une traduction maximale fait 5 nucléotides de long (Chen et al., 1994). Dans ce cas, l'espaceur fait 8 nucléotides, soit un nucléotide de plus que l'ARNm précédent. Sur ces bases, l'affinité devrait donc également être plus faible. L'absence de structure secondaire significative est donc l'explication la plus probable de ce gain d'affinité par rapport à l'ARNm précédent.

D'autre part, on observe à nouveau qu'en présence d'IF3, que l'affinité de l'ARNm pour le 30S est légèrement meilleure. On remarque également que le ΔH ne varie pas suivant les complexes, par conséquent le site de fixation de l'ARNm reste le même et comme précédemment, on en conclut que la fixation de l'ARNm n'est pas (ou très peu) influencée par la présence des facteurs d'initiation sur le 30S. Par conséquent, durant l'initiation, l'ARNm peut donc se fixer à tout moment au 30S.

6. Caractérisation de la fixation du fMet-ARNt^{fMet}

a) Fixation de l'ARNt initiateur sur IF2

Isoforme	T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
IF2 β	20	-13,3 ± 0,14	-19,5	5,7	1,3 ± 0,01	2257 ± 116	-7,57 ± 0,03
IF2 α	20	-13,35 ± 0,22	-18,9	5,5	1,12 ± 0,01	1484 ± 202	-7,81 ± 0,08

Table 18 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre le fMet-ARNt^{fMet} et les isoformes IF2 α et IF2 β .

Étant donné que le fMet-ARNt^{fMet} peut former un complexe avec IF2, nous avons dans un premier temps étudié l'interaction entre l'ARNt initiateur et ce facteur par ITC. On constate que les paramètres thermodynamiques de la fixation du fMet-ARNt^{fMet} sur IF2 α et sur IF2 β sont identiques (**Table 18**). Cela n'est pas étonnant puisque la différence entre les 2 isoformes se situe au niveau de la partie N-ter et que le site de fixation du fMet-ARNt^{fMet} est localisé au niveau de la partie C-ter.

La stœchiométrie légèrement supérieure à 1 indique que la totalité des protéines purifiées est capable de fixer l'ARNt initiateur et qu'il y a eu une légère surestimation de la concentration de l'ARNt initiateur ou d'IF2. On observe également que c'est le ΔH qui permet à la réaction d'être spontanée car le ΔS est négatif (**Table 18**). La formation du complexe s'accompagne donc d'une perte de degrés de liberté des partenaires, comme attendu. D'autre part, l'affinité du fMet-ARNt^{fMet} pour IF2 est relativement faible (entre 1 et 2 μM).

La même affinité a été déterminée par d'autres techniques. En effet, une étude avec IF2 de *B. stearothermophilus* a permis de montrer que l'interaction avec le fMet-ARNt^{fMet} présentait un K_d de 1,8 μM (Wu and RajBhandary, 1997). D'autre part, une étude sur la vitesse de déacylation de l'ARNt initiateur chez *E. coli* a également permis de mesurer un K_d entre IF2 et le fMet-ARNt^{fMet} d'environ 1 μM (Petersen et al., 1979).

Une étude précédente par ITC a également observé l'interaction entre IF2 et le fMet-ARNt^{fMet}. L'affinité qui avait été mesurée dans ce cas est cependant légèrement différente de nos résultats avec un K_d de 0,3 μM (Mitkevich et al., 2012), ce qui pourrait être dû à une différence de pH utilisé (7,5 contre 7 dans nos expériences).

b) Fixation de l'ARNt initiateur sur le complexe 30S-ARNm

Nous avons débuté par mesurer l'affinité de l'ARNt initiateur pour le complexe 30S-mRNA. L'interaction a montré un signal trop faiblement exothermique à 25°C. L'expérience a donc été répétée à 35°C (**Table 18**) dans le but de gagner éventuellement en intensité.

Complexe	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
30S-ARNm + ARNt initiateur à 35°C	$-4,76 \pm 0,38$	12,5	-3,9	$0,57 \pm 0,03$	763 ± 247	$-8,61 \pm 0,21$

Table 19 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre l'ARNt initiateur et le complexe 30S-mRNA.

On observe que la réaction est exothermique, mais à la fois le ΔH et le ΔS contribuent à la fixation de l'ARNt initiateur (**Table 19**). Comme dans le cas d'IF1, il se peut que la fixation de l'ARNt initiateur entraîne l'expulsion de molécules d'eau ou de contre-ions présents au niveau de l'ARN ce qui augmente le désordre du système et donc le ΔS .

c) Fixation de l'ARNt initiateur sur différents complexes

Complexe	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
30S-IF2-GTP + ARNt initiateur	$-8,2 \pm 0,1$	0,4	-0,1	$1,03 \pm 0,01$	855 ± 54	$-8,28 \pm 0,04$
30S-mRNA-IF2-GTP + ARNt initiateur	$-27,1 \pm 2,9$	-62,7	18,7	$0,19 \pm 0,02$	685 ± 119	$-8,40 \pm 0,10$
30S-IF3-IF1-GTP-mRNA-IF2-GTP + ARNt initiateur	$-17,9 \pm 0,24$	-29,6	8,8	$0,22 \pm 0,01$	235 ± 15	$-9,07 \pm 0,04$

Table 20 : Paramètres thermodynamiques de l'interaction entre l'ARNt initiateur et différents complexes d'initiation à 25°C.

On observe que c'est toujours le ΔH qui représente la force motrice de la fixation de l'ARNt initiateur sur le 30S. De plus, on peut remarquer que l'affinité de l'ARNt initiateur augmente quand l'ARNm messenger est déjà associé au 30S. En effet, la variation du ΔH en valeur absolue est de (19 ± 3) kcal mole⁻¹ suivant que l'ARNm soit présent ou non. Cette valeur correspond à la différence entre le ΔH (30S-IF2-GTP + ARNt initiateur) et le ΔH (30S-mRNA-IF2-GTP + ARNt initiateur). Ainsi, ces données sont en accord avec l'augmentation attendue lors de la formation des trois paires de base codon-anticodon. Il s'agit donc d'une vérification intéressante de la pertinence des mesures.

Il est également frappant de noter qu'en passant de 30S-ARNm + ARNt initiateur (**Table 19**) à 30S-ARNm-IF2-GTP + ARNt initiateur (**Table 20**), l'augmentation du ΔH en valeur absolue est très conséquente, mais que le K_d reste quasiment inchangé. Quand les 3 facteurs d'initiation sont présents sur le 30S, l'affinité est nettement augmentée. Ainsi, sur les bases de l'affinité, on peut en conclure que l'ARNt initiateur se fixe au 30S en dernier.

Enfin, les expériences d'ITC montrent que le temps de retour à la ligne de base après injection est relativement lent. En effet, il est nécessaire d'attendre près de 100 secondes pour un retour à la ligne de base en début de titration et ce temps augmente quand on se rapproche de la saturation (**Fig. 41**). Cette observation permet d'envisager l'utilisation de la méthode *kinITC* développée par l'équipe (Burnouf et al., 2011 ; Dumas et al., 2016). Malheureusement, cette expérience ne montre que très peu d'injections utilisables (stœchiométrie faible), ce qui est défavorable pour l'utilisation de *kinITC*.

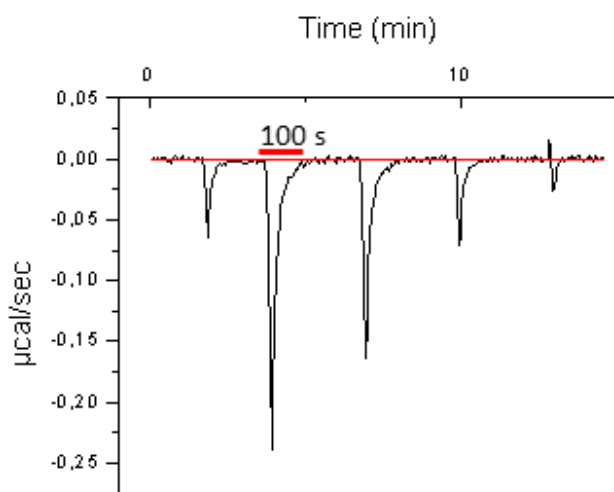


Figure 41 : Temps de retour de la ligne de base après injection de l'ARNt initiateur sur le complexe 30S-IF2-GTP.

Ainsi, étant donné que l'affinité est maximale quand les 3 facteurs d'initiation sont présents et que la fixation de l'ARNt initiateur semble être plutôt lente, on peut supposer que l'ARNt initiateur se fixe au 30S en dernier.

Enfin, ces résultats sont en accord avec des études cinétiques par FRET. En effet, il a démontré que l'ARNt initiateur prend 100 ms pour se fixer au 30S et qu'il est de loin le partenaire le plus lent à se fixer. Par conséquent, cette étude en déduit que l'ARNt initiateur vient se fixer au 30S en dernière position (Milon et al., 2012).

7. Détermination de la structure du complexe d'initiation 30S

La structure du complexe 30SIC n'étant pas connue à haute résolution, nous avons décidé de déterminer par cryo-EM la structure de ce complexe, en collaboration avec l'équipe de Bruno Klaholz à l'IGBMC.

Etant donné qu'un excès en facteur d'initiation peut engendrer des problèmes dans la formation du 30SIC (communication personnelle de Bruno Klaholz), nous avons décidé d'avoir recours à l'ITC pour former ce complexe. En effet, par cette technique, il est possible d'observer en temps réel la stœchiométrie de chaque facteur et donc la saturation du 30S au fur et à mesure des injections. De plus, en sortie d'ITC, le complexe n'étant pas détruit, il peut être réutilisé pour d'autres études. Nous avons donc utilisé le protocole d'*iITC* afin de former le complexe 30SIC. A chaque fois que le 30S est saturé avec un des partenaires, nous avons injecté le partenaire suivant.

Une fois le complexe 30SIC formé par *iITC*, nous sommes allés collecter nos données à l'IGBMC avec Alexander Myasnikov. Afin de s'assurer de l'intégrité de l'échantillon, nous avons tout d'abord commencé par réaliser différentes grilles de microscopie électronique que nous avons analysé au microscope Polara F30. Etant donné la présence de dimères de 30S a été observée (**Fig. 42**), nous avons cherché dans un premier temps à réduire la présence de ces dimères. Pour cela, nous avons ionisé faiblement les grilles en réalisant une décharge électrique sous faible vide. En effet, il a été démontré que cela peut permettre un meilleur étalement du matériel biologique. Nous avons également testé l'ajout de détergent, le N-Dodecyl- β -D-Maltopyranoside à une concentration finale de 0,002 %. Malheureusement aucun de ces tests n'a permis de diminuer la présence des dimères. Enfin, nous avons déterminé par la même occasion les concentrations optimales pour une acquisition de l'échantillon avec le microscope Titan Krios.

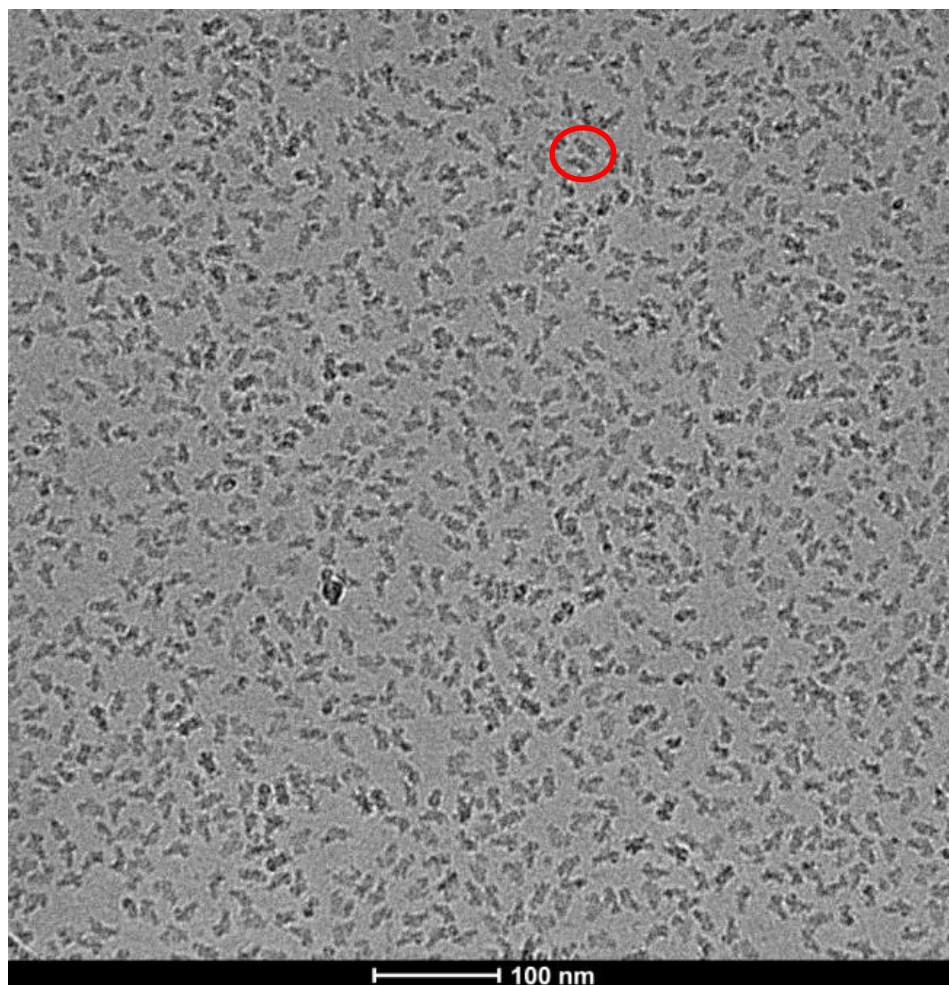


Figure 42 : Photo des complexes 30SIC prise avec le microscope Polara F-30 avec un grossissement de 59 000 x. Dans le rond rouge figure un dimère de 30S.

Par la suite, nous avons réalisé de nouvelles grilles que nous avons observées cette fois-ci avec le microscope Titan Krios. Après avoir déterminé les meilleures zones présentes sur les grilles et calibré la caméra, nous avons commencé l'acquisition automatique des complexes. Une fois les images obtenues, ces dernières ont été classifiées au niveau 2D puis triées au niveau 3D afin d'enlever les mauvaises particules et les 30S seuls. Puis après plusieurs cycles d'affinement, il a été possible de déterminer la structure de 2 complexes (**Fig. 43**). Afin de déterminer la composition de ces 2 complexes, nous avons utilisé le logiciel Chimera. En superposant la densité de la structure cryo-EM du 30S de Grigorieff (PDB 4V7C) sur les 2 complexes obtenus, nous avons pu observer que la structure du 30S épouse parfaitement la densité des 2 complexes obtenus dans notre cas excepté au niveau de 2 régions (entourées en rouge) (**Fig. 43**). En utilisant la structure cristallographique de la partie C-terminale d'IF3 (PDB 1TIG), il a été possible d'ajuster parfaitement cette structure dans la

densité non attribuée d'un des 2 complexes (**Fig. 43A**). On a donc conclu qu'il s'agissait d'un complexe composé de la petite sous-unité ribosomale et de la partie C-terminale d'IF3. Concernant l'autre complexe, il a été possible de mettre en évidence que la densité excédentaire correspond exactement à celle de la structure de l'ARNt initiateur (PDB 1ZO1). Nous avons donc déduit que le deuxième complexe est constitué du 30S, de l'ARNt initiateur ainsi que de l'ARNm (**Fig. 43B**). En effet, l'interaction SD-aSD a clairement pu être identifiée mais elle n'est pas visible sur la figure présentée ci-dessous.

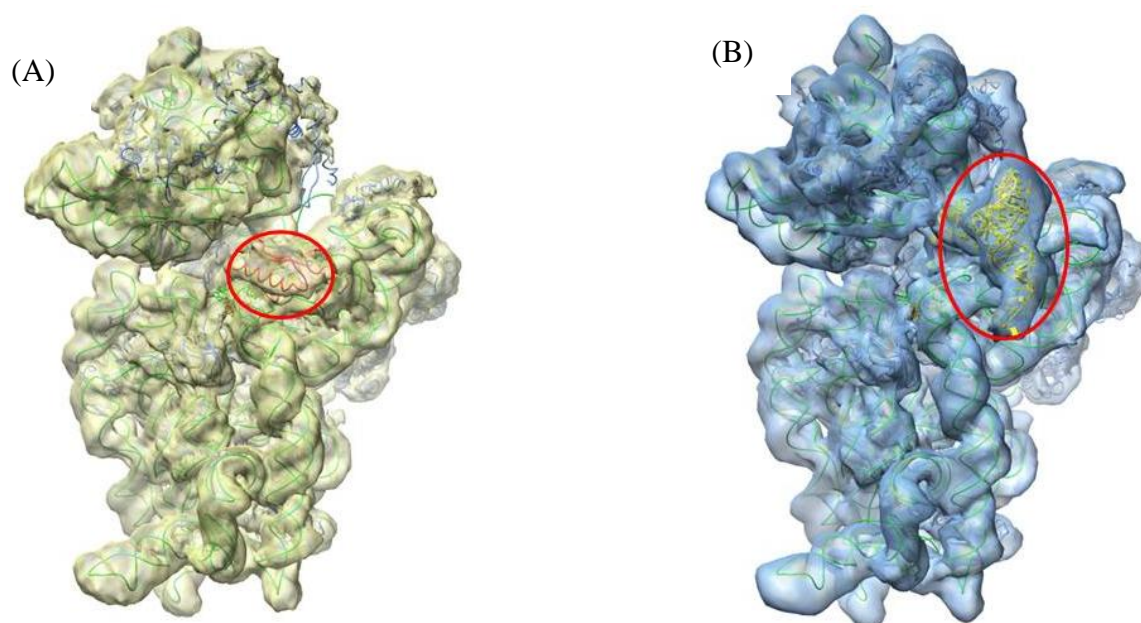


Figure 43 : Représentation des complexes obtenus par cryo-EM après analyse avec chimera. En (A) représentation du complexe 30S-IF3 C-terminale, en (B) représentation de la structure du complexe 30S-ARNm-ARNt initiateur.

Quand on regarde plus attentivement les 2 structures, on peut observer que la densité de la tête du ribosome est plus importante pour le complexe 30S-ARNm-ARNt initiateur (**Fig. 43**). On peut donc supposer que cette partie du 30S est moins flexible quand l'ARNm et l'ARNt initiateur sont présents. De plus, on peut noter que les sites de fixation du domaine C-terminale d'IF3 et de l'ARNt initiateur sont très proches (ils semblent même se chevaucher). On peut donc supposer que la fixation de l'ARNt initiateur déplace la partie C-terminale d'IF3.

Ainsi, l'analyse des données acquises par cryo-EM a permis après affinement, l'obtention de la structure de 2 complexes avec une résolution d'environ 8 Angström. Etant donné que l'échantillon était resté 5 jours sur la glace, il est fort possible que le complexe

30SIC se soit partiellement dissocié. C'est probablement la raison pour laquelle la structure de ce complexe n'a pu être déterminée. Malgré tout, c'est la première fois qu'il a été possible d'obtenir en sortie d'ITC la structure d'un complexe par cryo-EM.

II. Etude thermodynamique de la formation du complexe d'initiation 70S et de l'élongation

1. Fixation du 50S sur le complexe d'initiation 30S

Après avoir étudié la formation du 30SIC dans son ensemble, nous nous sommes intéressés aux paramètres thermodynamiques de la formation du 70SIC par ITC. Pour cela, nous avons d'abord réalisé un complexe comprenant le 30S, l'ensemble des facteurs d'initiation et l'ARNm. Après 15 min d'incubation à 37°C, le complexe a été introduit dans la cuve à échantillon. Afin de s'assurer que ce complexe est bien actif, on commence par réaliser une première expérience d'ITC où l'on injecte le fMet-ARNt^{fMet}. Cette première expérience, notamment par la mesure de la stœchiométrie, nous permet de s'assurer de l'intégrité et de la fonctionnalité du complexe. La sous-unité 50S est ensuite injectée selon le protocole d'*iITC*. Les résultats bruts obtenus sont présentés ci-dessous (**Fig. 44**).

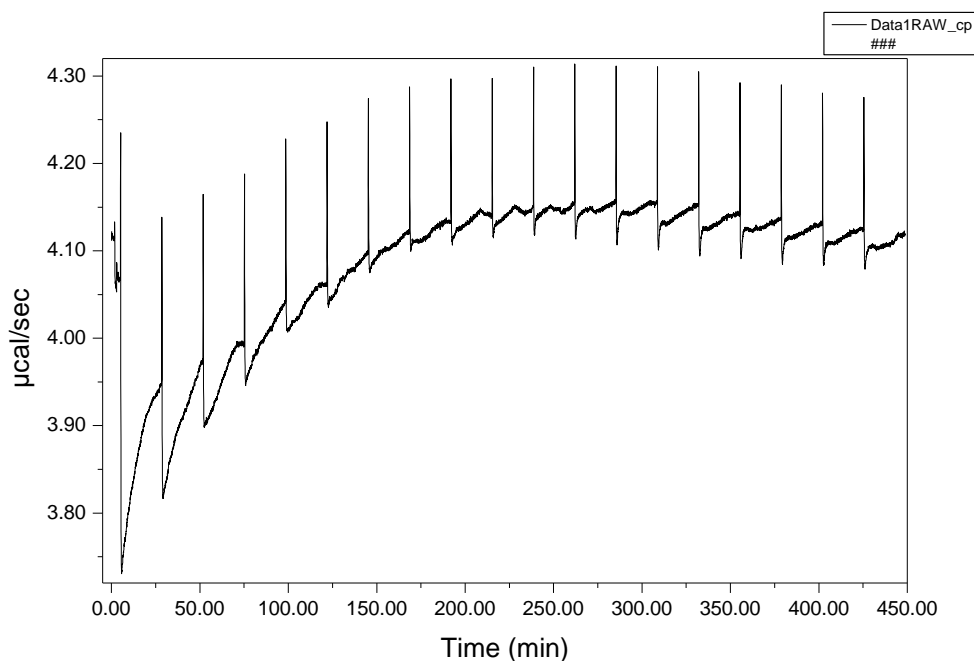


Figure 44 : Représentation de la courbe d'ITC brute de l'injection de 50S sur le complexe 30S-IF1-IF2-GTP-IF3-mRNA- fMet-ARNt^{fMet} à 25°C.

On constate qu'après la première injection, le retour à la ligne de base est extrêmement lent, l'équilibre n'étant toujours pas atteint après 25 min (il est donc impossible de faire une correction de ligne de base satisfaisante) (**Fig. 44**). Un tel délai n'est bien entendu pas compatible avec les données disponibles *in vivo* ou même *in vitro*. Il a été démontré en effet, que le passage du 30SIC au 70SIC nécessite 300 millisecondes (Goyal et al., 2015). Par conséquent, on suppose qu'une réaction parasite a lieu. Nous avons incriminé une hydrolyse mutiple du GTP par IF2 et la littérature nous conforte dans cette idée. Ainsi, il a été démontré qu'IF2 possède la particularité de réaliser un cycle d'hydrolyse 'futile' une fois le 70S formé. Dans ce cas, IF2 se dissocie du complexe, échange son GDP pour un GTP puis se réassocie au 70SIC où il hydrolyse à nouveau son GTP (Gualerzi et al., 2001; Tomsic et al., 2000). Cette hydrolyse continue tant que du GTP est présent dans l'échantillon et est relativement lente. En effet, il a été démontré que la vitesse maximale d'hydrolyse du GTP par IF2 en présence d'un excès de 70S est de 2,2 mole de GTP par mole de IF2 par min (Gualerzi et al., 1991). Etant donné que l'hydrolyse du GTP est accélérée plus de 40 fois en présence du 70S (Huang et al., 2010), la puissance calorifique produite par l'hydrolyse du GTP est donc plus importante, ce qui pourrait expliquer le signal parasite observé lors de l'expérience d'ITC. Dans notre cas, étant en large excès de GTP à la fois dans la cuve et dans la seringue, cette réaction pourrait continuer durant plusieurs dizaines de minutes. De plus, en début d'expérience, la concentration en 70S étant limitante, la vitesse d'hydrolyse du GTP se retrouve ralentie mais reste suffisante pour être détectée par ITC.

Aucune donnée thermodynamique n'a pu malheureusement être déduite de ces expériences du fait de ces problèmes. Il serait nécessaire de réitérer l'étude en présence d'un analogue non-hydrolysable du GTP, le GMPPCP, ou éventuellement sans excès de GTP.

Après ITC, l'absence d'agrégats a été vérifiée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (**Fig. 45**). Cette technique permet de calculer la taille des différentes molécules présentes en solution et donc de vérifier la pureté et l'absence d'agrégation des molécules d'intérêt. Ainsi, malgré les hautes concentrations utilisées durant les expériences d'ITC (25 mg/mL en ribosome par exemple), aucune agrégation des sous-unités n'est visible par DLS sur le matériel sorti des cuves d'ITC.

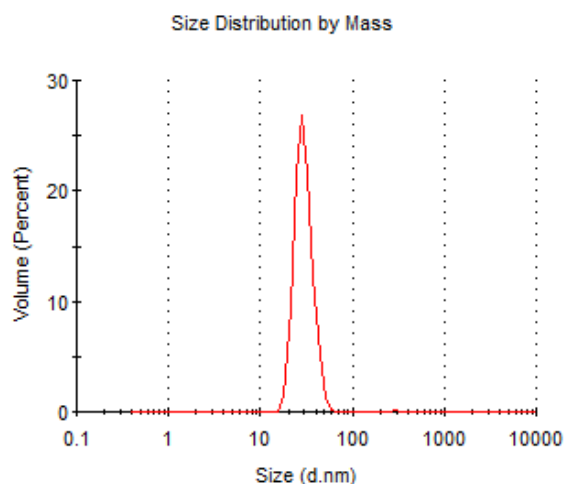


Figure 45 : Courbe représentant la distribution de l'intensité du signal de diffusion de la lumière par 70SIC en fonction de la taille. La courbe est clairement unimodale, ce qui est en faveur de l'absence d'espèces de tailles très différentes.

2. Fixation du complexe EF-Tu/GTP-Gly-ARNt^{gly} sur le complexe d'initiation 70SIC

Afin d'étudier la fixation du complexe ternaire EF-Tu/GTP - aa-ARNt au 70SIC, il a tout d'abord été nécessaire de purifier un ARNt élongateur. Pour cela, nous avons choisi l'ARNt^{gly} car, ce dernier est naturellement très faiblement modifié, ce qui minimise les risques de sous-modification lors de la surexpression de l'ARNt. De fait, après purification (voir matériel et méthodes), la présence des modifications a été vérifiée par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes, la masse calculée étant compatible avec la masse théorique (Fig. 46).

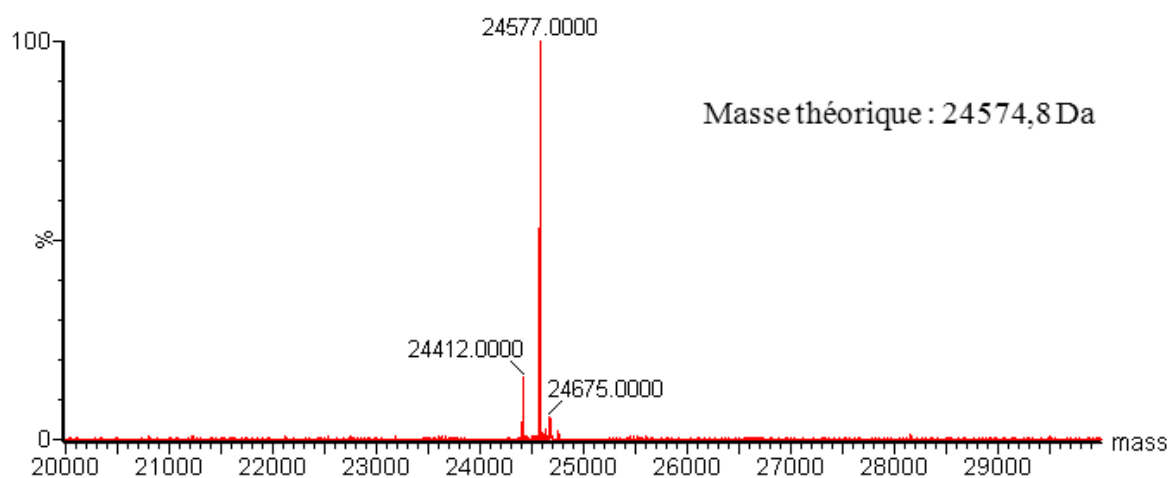


Figure 46 : Spectre de l'ARNt^{gly} obtenu par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes.

L'ARNt purifié a été aminoacylé à l'aide d'un extrait contenant des aminoacyl-tRNA synthétases, puis associé au facteur ET-Tu. Le complexe ternaire EF-Tu/GTP - Gly-ARNt^{gly} a ensuite été séparé des constituants non associés par chromatographie (voir matériel et méthodes). Une expérience d'*iITC* a été réalisée au préalable en injectant le 50S sur le 30SIC, puis nous avons injecté le complexe ternaire EF-Tu/GTP - aa-ARNt. Afin d'éviter les différences de tampon entre la cellule à échantillon et la seringue, ce complexe a également été injecté en présence d'un excès de GTP.

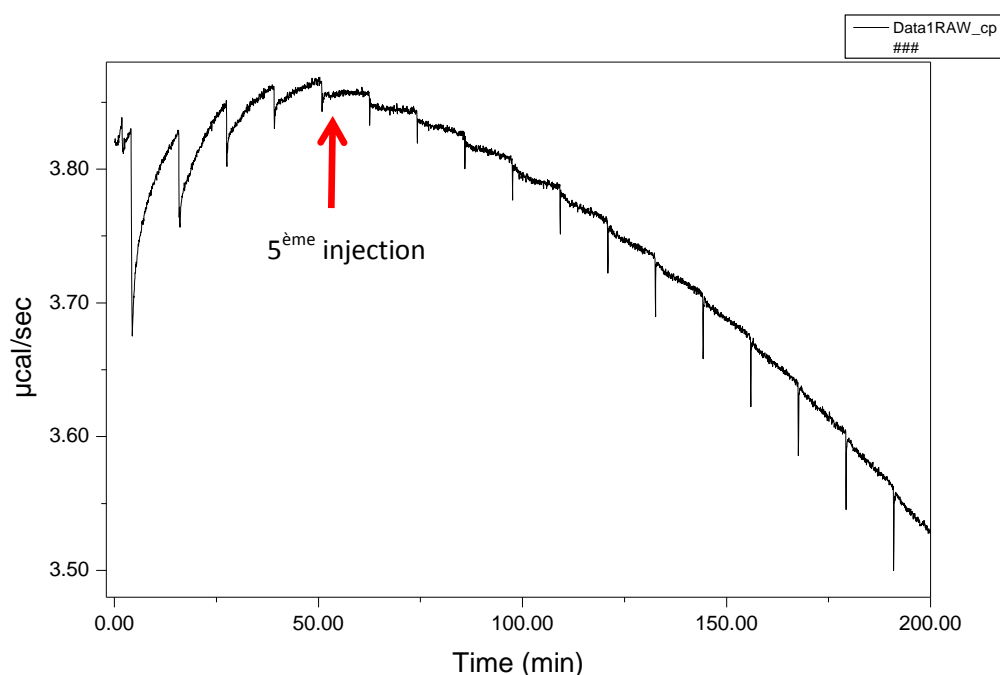


Figure 47 : Représentation de la courbe d'ITC avant intégration de l'injection du complexe EF-Tu/GTP-Gly-ARNt^{gly} sur le complexe 70SIC à 25°C.

Comme précédemment, on remarque que le retour à la ligne de base est extrêmement lent (**Fig. 47**). A nouveau, il est peu probable que la fixation du complexe EF-Tu/GTP - Gly-ARNt^{gly} sur le 70SIC soit aussi lente. En effet, il a été démontré que la vitesse de traduction *in vitro* est de 3,6 aminoacides incorporés par seconde à 37°C (Holtkamp et al., 2015) et de 2,3 aminoacides incorporés par seconde à 20°C (Goyal et al., 2015). On suppose donc que l'hydrolyse du GTP par IF2 parasite encore cette expérience. En revanche, on observe qu'au bout de la 5^{ème} injection, le retour à la ligne de base est extrêmement rapide. Par conséquent, on peut supposer qu'à ce stade, le GTP n'est plus hydrolysé.

On peut donc formuler l'hypothèse que l'hydrolyse du GTP par IF2 a été active tant que le complexe 70SIC était présent et que, une fois l'acide aminé incorporé et le dipeptide formé, ce complexe 70SIC a progressivement disparu et avec lui, « l'hydrolyse futile » du GTP.

Afin de s'assurer de l'intégrité du 70S formé, nous avons introduit une partie de l'échantillon provenant de l'expérience d'ITC, sur un gradient de sucrose 10% - 30%. Le profil d'absorbance du gradient (**Fig. 48**) montre un pic majoritaire contenant très probablement du 70S et l'analyse sur gel d'agarose confirme sa composition. Les pics minoritaires correspondent, dans l'ordre d'éluion, au complexe ternaire EF-Tu/GTP - Gly-ARNt^{gly} en excès, à du 30S puis du 50S non associés (ce dernier étant également en excès).

Ces observations confirment que même si l'association du 50S au 30SIC n'est pas visible par ITC, il y a néanmoins formation d'un ribosome 70S fonctionnel capable d'effectuer les étapes du cycle d'élongation.

Si l'on peut supposer que l'incorporation de l'acide aminé a bien eu lieu au cours de l'expérience, l'hydrolyse parasite du GTP interdit encore de déduire les paramètres thermodynamiques de la fixation du complexe EF-Tu/GTP - Gly-ARNt^{gly} sur le 70SIC. Evidemment, il serait nécessaire de faire une analyse par spectrométrie de masse du produit en fin d'expérience pour vérifier la synthèse du dipeptide. En utilisant une glycine marquée au ¹⁴C, il serait également possible de vérifier la formation du dipeptide par rétention sur filtre de nitrocellulose suivit d'un comptage de la radioactivité retenue. De même, il sera intéressant de reproduire l'expérience sans l'ajout de GTP ou en présence de GMPPCP, analogue non hydrolysable de GTP.

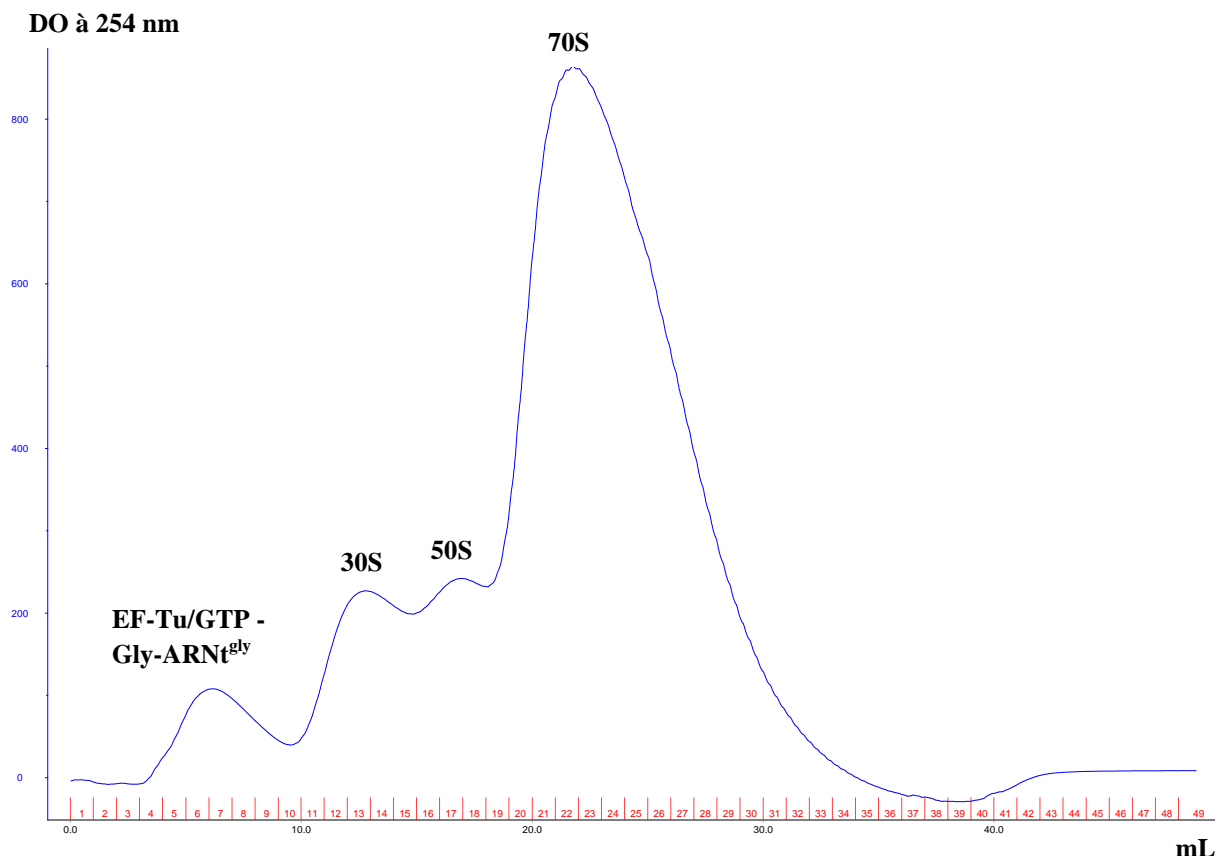


Figure 48 : Spectre UV après aspiration du gradient de sucrose 10-30 % sur lequel un échantillon après expérience d'ITC 70SIC + EF-Tu/GTP-Gly-ARNt^{gly} a été déposé.

III. Contrôle de l'ensemble des partenaires de l'initiation de la traduction

1. Vérification de la masse du 30S après purification

Afin de voir si le ribosome purifié est intègre, nous avons décidé de déterminer la masse du ribosome par spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons mis en place une collaboration avec le laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes dirigé par Emmanuelle LEIZE-WAGNER.

Le 30S a été analysé par un couplage entre une électrophorèse capillaire suivie d'une mesure par spectrométrie de masse en condition native. De cette manière, il a été possible

d'obtenir deux pics majoritaires dont les masses ont été déterminées (**Fig. 49**). La comparaison entre la masse théorique et la masse calculée permet de supposer que le premier correspond au 30S dépourvu de la protéine S1 et le second pic à du 30S complet. En effet, il a été démontré que la protéine S1 est présente en sous-stœchiométrie comparé au 30S (van Knippenberg et al., 1974). D'autre part, le 30S étant déplété en protéine S1 par une simple augmentation de la concentration en sel (Labischinski and Subramanian, 1979), il est fort probable qu'une partie de cette protéine se soit dissociée lors de la purification du 70S. La différence entre les 2 pics étant d'environ 57 kDa et la masse de la protéine S1 étant de 61 kDa, on peut conclure que le premier pic majoritaire correspond probablement à du 30S sans protéine S1.

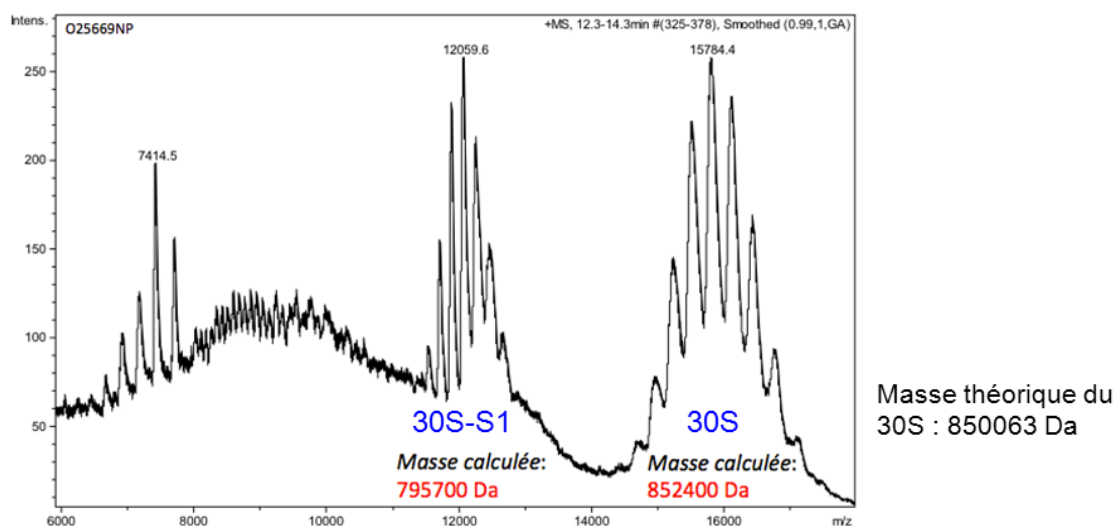


Figure 49 : Représentation du spectre obtenu par spectrométrie de masse native après électrophorèse capillaire.

2. Vérification de la qualité du 30S et du 50S purifié par DLS

Afin de vérifier l'absence d'agrégats dans l'échantillon contenant les sous-unités ribosomales concentrées avant expérience d'ITC, le 30S et le 50S ont été observés par diffusion DLS. Cette technique permet de calculer la taille des différentes molécules présentes en solution et donc de vérifier la pureté et l'absence d'agrégation des molécules d'intérêt. A partir de la taille de la molécule, il est possible d'en calculer une masse approximative.

Pour le 30S, deux pics ont été obtenus (**Fig. 50**), un étant très largement majoritaire (99,9 %) avec une masse calculée de (830 ± 180) kDa très proche de la masse théorique (850 kDa). Ces résultats montrent que le 30S ne présente donc pas d'agrégats de manière significative.

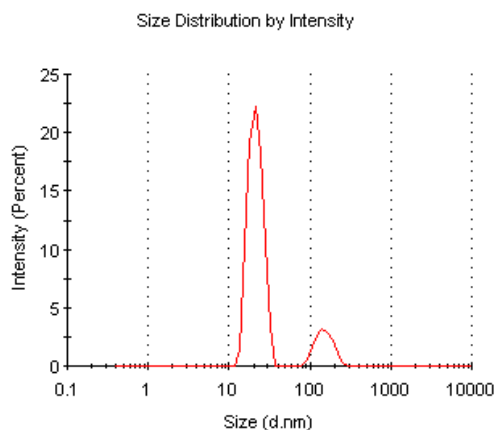


Figure 50 : Distribution de l'intensité du signal de diffusion de la lumière par le 30S en fonction de la taille

Pour le 50S, la masse calculée par DLS est de 1170 ± 240 Kda. Cette valeur est légèrement plus éloignée de la masse théorique qui est de 1500 kDa. Il s'agit peut-être d'un effet de forme car le 50S n'est pas vraiment globulaire. Dans ce cas, un seul pic a été obtenu (**Fig. 51**). On en conclut que le 50S est monodisperse, et donc qu'aucune agrégation n'a pu être identifiée par DLS.

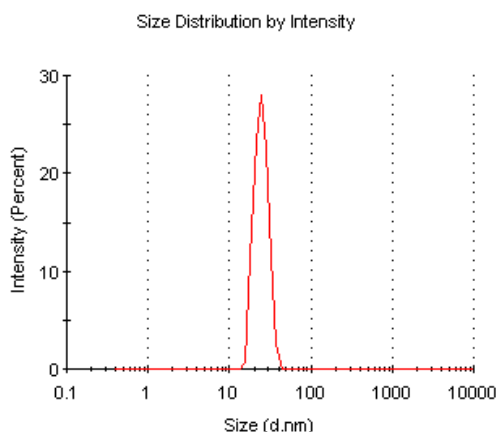


Figure 51 : Distribution de l'intensité du signal de diffusion de la lumière par le 50S en fonction de la taille.

3. Test d'activité des sous-unités ribosomales après séparation

Afin de démontrer que les sous-unités 30S et 50S préalablement purifiées sont bien fonctionnelles, nous avons réalisé un test de traduction *in vitro* (voir matériel et méthodes). Pour cela, un ARNm codant pour la rénilla luciférase a été traduit à l'aide d'un kit de traduction *in vitro* dépourvu de ribosome auquel les sous-unités purifiées ont été rajoutées. La présence ou non d'activité luciférase marquant l'activité de synthèse protéique a été déterminée par mesure de l'intensité lumineuse au luminomètre (**Fig. 52**).

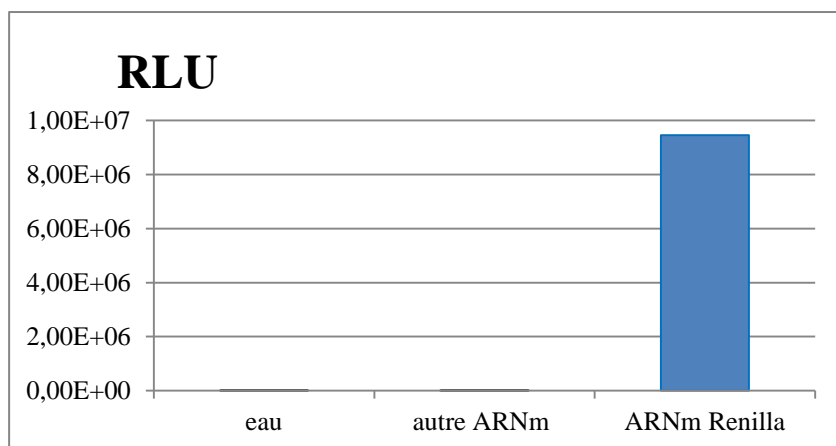


Figure 52 : Mise en évidence de l'activité luciférase ; intégration de l'intensité lumineuse pendant 10 s après injection du substrat de la rénilla luciférase (RLU = Unité Relative de Lumière).

Il a ainsi été mis en évidence qu'au moins une partie des sous-unités ribosomales est bien fonctionnelle après purification (**Fig. 52**). On ne peut pas en dire plus ici car ce test n'a pas été quantitatif.

4. Test d'activité des facteurs d'initiation après purification

Un second test de traduction *in vitro* de l'ARNm rénilla luciférase a été réalisé pour vérifier la fonctionnalité des facteurs d'initiation. Dans ce cas, nous avons utilisé notre 70S, nos facteurs d'initiation et une partie de la fraction S100 (voir matériel et méthodes). La fraction S100 est considérée comme étant dépourvue de ribosome et de facteurs d'initiation. En revanche, elle est sensée contenir l'ensemble des aminoacyl-tRNA synthétases

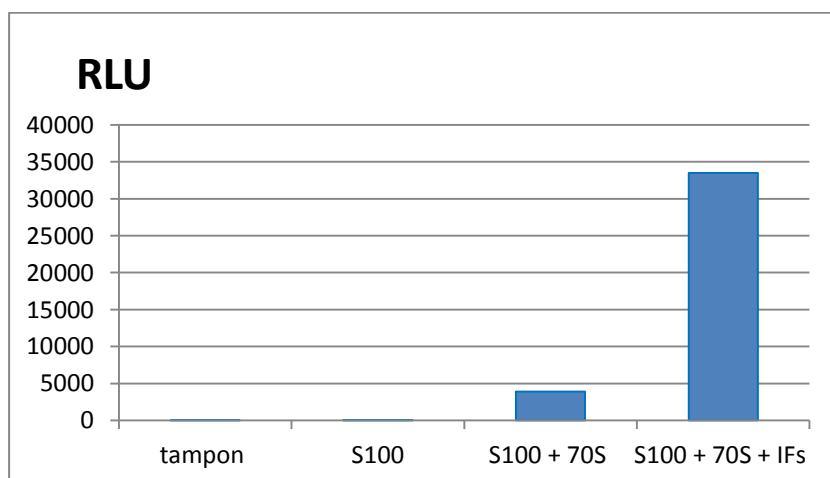


Figure 53 : Intégration de l'intensité lumineuse pendant 10 s après injection du substrat de la rénilla luciférase.

Par l'intermédiaire de ce test, il a donc été possible de vérifier que la fraction S100 était bien dépourvue de ribosome (**Fig. 53**) Une légère présence d'activité luciférase a été observée après ajout de 70S seul. L'introduction des trois facteurs d'initiation purifiés a très nettement augmenté la production de rénilla luciférase (**Fig. 52**), ce qui montre qu'ils étaient bien actifs. Cependant, il ne s'agit que d'une activité globale et on ne peut rien dire sur l'activité de chacun des facteurs séparément.

5. Test d'activité d'IF3

Il est connu qu'en présence d'un important excès d'IF3, le 70S est dissocié (Subramanian and Davis, 1970). Même si de telles concentrations ne sont pas physiologiques, la vérification de la dissociation du 70S constitue un test de l'activité de IF3. Cinq concentrations différentes de IF3 ont ainsi été testées (**Fig. 54**).

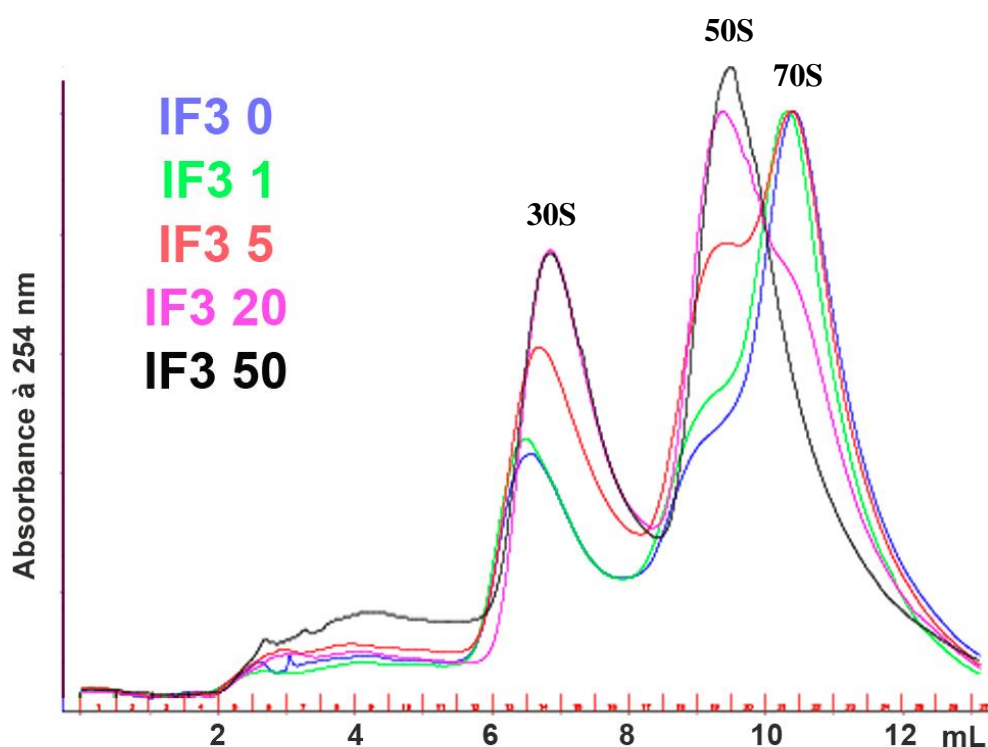


Figure 54 : Profil d'absorption à 260 nm de chaque concentration en IF3. IF3 0 représente le 70S sans IF3 ; IF3 1 représente une quantité équimolaire en IF3 et en 70S ; IF3 5 20 et 50 compte respectivement une concentration en IF3 5, 20 et 50 fois en excès par rapport à la concentration en 70S.

Les spectres d'absorption montrent effectivement que la présence de 70S diminue avec l'augmentation de la concentration en IF3, ce qui montre (au moins qualitativement) que IF3 était bien actif.

Le facteur d'initiation IF3 a été également observé par DLS, ce qui a montré une population monodisperse et donc l'absence d'agrégats (**Fig. 55**).

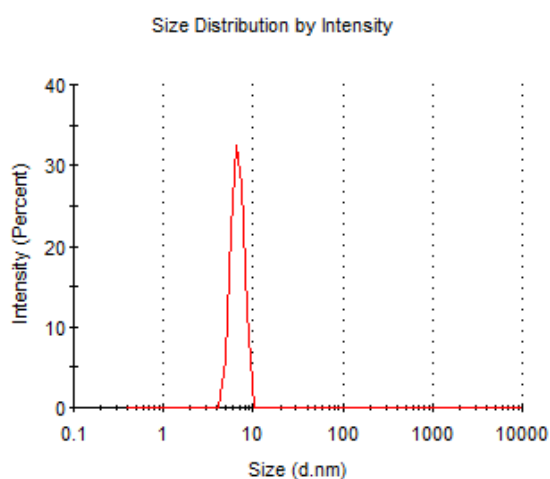


Figure 55 : Distribution de l'intensité du signal de diffusion de la lumière par IF3 en fonction de la taille.

6. Test d'activité d'IF2

Précédemment, il a été observé par ITC qu'IF2 est capable de fixer à la fois le GTP et le fMet-ARNt^{fMet}. D'autre part, suite à l'introduction de 50S sur le 30SIC par ITC, nous avons pu détecter l'hydrolyse du GTP par IF2 (voir chapitre IV, partie II).

La solubilité d'IF2 à haute concentration a également été contrôlée par DLS. (**Fig. 56**). Ainsi il a été possible de vérifier l'absence d'agrégats dans l'échantillon en visualisant la présence d'une seule population.

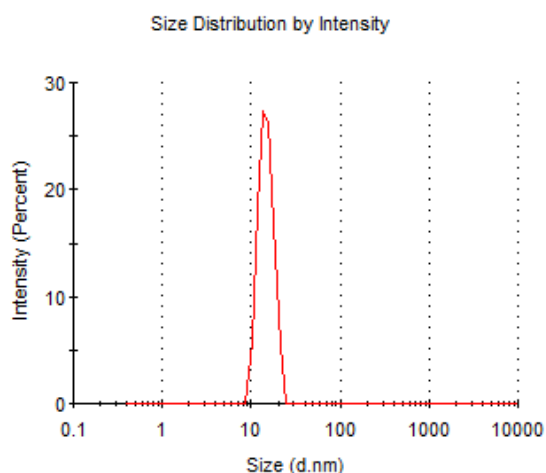


Figure 56 : Distribution de l'intensité du signal de diffusion de la lumière par IF2 en fonction de la taille.

Un test d'hydrolyse du GTP par IF2 a ensuite été réalisé (voir matériel et méthodes). Pour cela, une quantité constante de GTP (250 μ M) a été incubée en présence ou en absence d'IF2 (70 μ M). Puis, le tout a été chargé sur colonne et les pics correspondant au GDP et au GTP ont pu être identifiés lors de l'élution (**Fig. 57**).

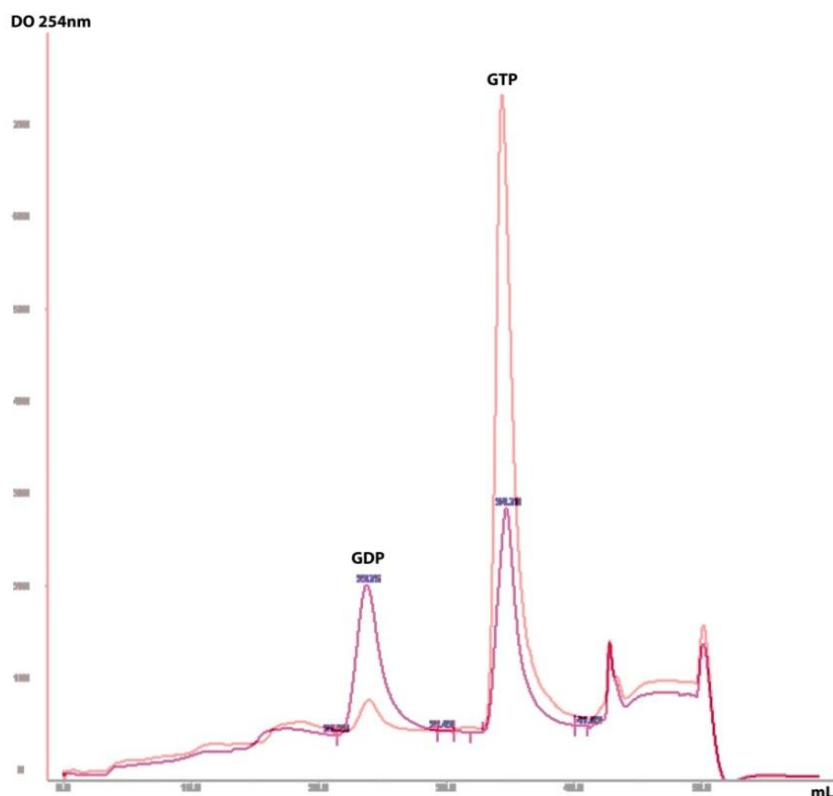


Figure 57 : Spectres UV montrant les proportions en GDP et en GTP après incubation avec IF2 à 37°C. GTP incubé seul à 37°C (rouge), GTP après 3h d'incubation à 37°C en présence d'IF2 (magenta).

Ce test a montré qu'au bout de 3 heures d'incubation à 37°C, 45 % du GTP présent au départ dans l'échantillon a été hydrolysé par IF2 (pourcentage calculé par rapport à l'aire des pics). C'est la raison pour laquelle nous nous sommes toujours placés en excès de 3,5 fois en GTP par rapport à IF2. D'autre part, l'introduction de GTP a toujours été réalisée immédiatement avant le chargement dans la seringue pour éviter une hydrolyse avant le début de l'expérience. Ainsi, par ce test, il a également pu être démontré qu'IF2 est bien fonctionnel.

7. Vérification de la présence de la formyl-méthionine sur l'ARNt initiateur

Par utilisation du spectromètre MALDI-TOF, il a été possible après digestion trypsique, d'identifier l'extrémité 3' de l'ARNt initiateur (analyse a été effectuée par P. Wolff). La présence du CCA en 3' portant une méthionine formylée a pu ainsi être détectée et la masse déterminée correspond exactement à la masse attendue (**Fig. 58**). Cela confirme donc bien que l'ARNt initiateur a été purifié dans sa forme méthionylée et formylée. Par conséquent, il est utilisable pour former le complexe 30SIC.

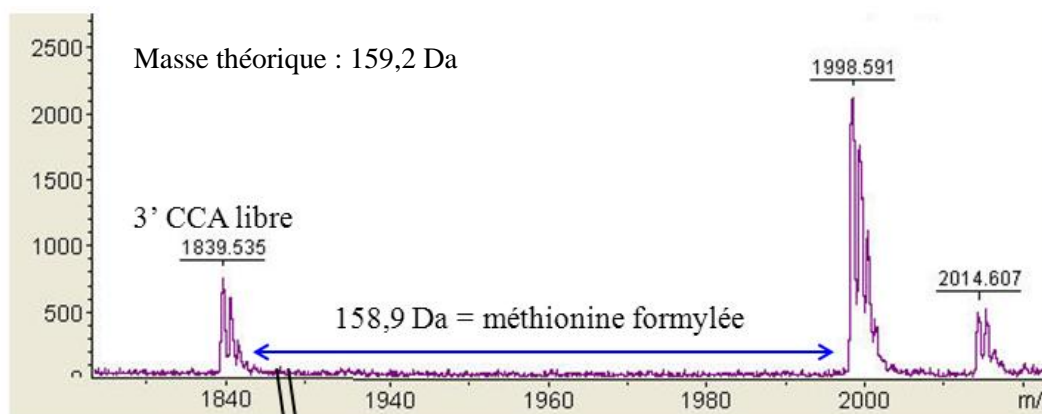


Figure 58 : Spectre de masse MALDI-TOF de l'extrémité CCA 3' de l'ARNt initiateur. Détection de la présence d'une méthionine formylée sur l'extrémité CCA.

8. Vérification de la solubilité d'IF1

Un échantillon contenant IF1 a été observé par DLS (**Fig. 59**). L'obtention d'un seul pic permet de conclure que l'échantillon était monodisperse et donc sans agrégats.

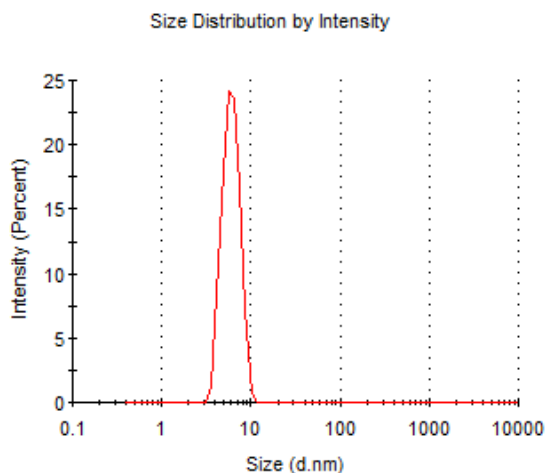


Figure 59 : Distribution de l'intensité du signal de diffusion de la lumière par IF1 en fonction de la taille.

IV. Etude thermodynamique de la fixation d'antibiotiques spécifiques du tunnel de sortie des polypeptides du ribosome

L'ITC est une technique qui permet également d'aider au développement de nouveaux médicaments. Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi d'étudier 4 antibiotiques capables de se fixer au ribosome au niveau du tunnel de sortie des peptides en cours de synthèse. Ayant le même site de fixation, nous avons pu comparer leurs caractéristiques thermodynamiques et émettre des hypothèses sur les interactions moléculaires mises en jeu lors de leur interaction avec le 70S.

Pour cela, nous avons sélectionné 2 macrolides : l'érythromycine et l'azithromycine, ainsi qu'un peptide antimicrobien riche en proline, Bac 7 (1-16). Ce peptide a été obtenu par la mise en place d'une collaboration avec le laboratoire de Daniel Wilson à Munich (Seefeldt et al., 2016). Bac 7 (1-16) correspond aux 16 premiers acides aminés de la bacténécine 7 (Bac 7). Il fait partie des premiers peptides antimicrobiens riches en proline à avoir été découvert chez les mammifères (Scocchi et al., 2011). Bien qu'il soit composé de 60 acides aminés, il a

été démontré que Bac 7 (1-16) présente une activité antimicrobienne similaire à la bacténécine complète ce qui justifie que nous ayons utilisé la forme tronquée (Podda et al., 2006).

1. Etude thermodynamique de la fixation de l'érythromycine au 70S

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
25	$-1,33 \pm 0,01$	29,4	-8,77	$1,17 \pm 0,005$	$40,3 \pm 5,2$	$-10,1 \pm 0,2$
35	$-2,38 \pm 0,03$	28,6	-8,81	$1,11 \pm 0,008$	$11,4 \pm 8,7$	$-11,2 \pm 1,2$

Table 21 : Paramètres thermodynamiques de la fixation de l'érythromycine au 70S à 25 °C et 35°C.

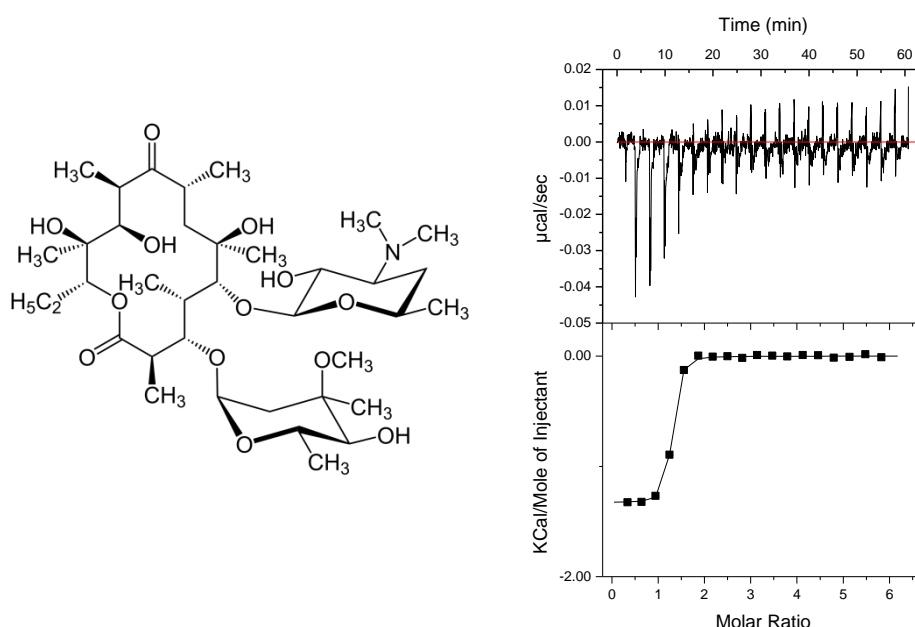


Figure 60 : Représentation de la formule chimique de l'érythromycine et représentation de la courbe de titration ITC correspondant à la fixation de l'érythromycine au 70S à 25°C.

Nos résultats montrent que la réaction est très légèrement exothermique (**Fig. 60**), avec un ΔS assez fortement positif (**Table 21**). L'entropie est donc la principale force motrice de l'interaction entre l'antibiotique et le 70S. Il a été démontré par cartographie en solution à l'aide de sondes chimiques que l'érythromycine se fixe au niveau des adénines 2058, 2059 ainsi qu'au niveau de la guanine 2505 (Moazed and Noller, 1987). En général, l'interaction entre molécules s'accompagne d'une perte de degrés de liberté des partenaires et donc d'une

diminution de l'entropie. Ici, l'augmentation nette d'entropie (**Table 21**) peut faire supposer que plusieurs molécules d'eau liées avant l'interaction sont libérées dans le solvant désordonné après interaction.

D'autres études ont également mesuré le K_d de l'interaction entre l'érythromycine et le 50S. Ainsi, il a été démontré par filtration et par dialyse à l'équilibre que l'interaction présente un K_d de 10 nM à 24°C (Pestka, 1974). La valeur obtenue par ITC lors de l'expérience à 25°C (40.3 ± 5.2 nM) est donc raisonnablement proche de ces résultats.

2. Etude thermodynamique de la fixation de l'azithromycine au 70S

T °C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
25	$-3,0 \pm 0,06$	31,3	-9,33	$0,73 \pm 0,009$	$0,9 \pm 1,4$	$-12,3 \pm \text{n.d.}$

Table 22 : Paramètres thermodynamiques de la fixation de l'azithromycine au 70S à 25°C.

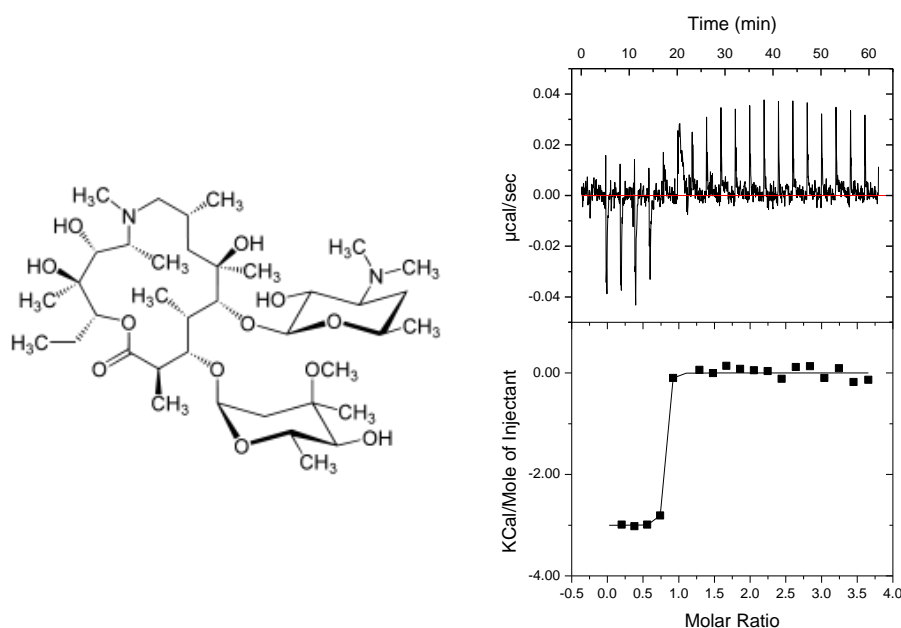


Figure 61 : Représentation de la formule chimique de l'azythromycine et représentation de la courbe d'ITC correspondant à la fixation de l'azythromycine au 70S à 25°C.

L'azithromycine étant un dérivé de l'érythromycine on peut supposer que les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre l'antibiotique et le 70S sont semblables à ceux obtenus précédemment. Effectivement, nos résultats montrent que l'interaction est également favorisée majoritairement par un gain d'entropie, avec une faible contribution enthalpique favorable à 25°C (**Table 22 et Fig. 61**).

Comme pour l'érythromycine, il a été démontré par cartographie en solution que l'azithromycine interagit au niveau des adénines 2058 et 2059 mais aussi avec la guanine 2505 (Petropoulos et al., 2009). De plus, cet antibiotique interagit également avec l'uridine 2609 et avec la cytosine 2611 (Petropoulos et al., 2009). Etant donné que l'azithromycine crée plus d'interactions avec le ribosome, cela expliquerait pourquoi on retrouve ici un ΔH plus grand en termes de valeurs absolue. Les interactions supplémentaires s'expliqueraient par le fait que l'azithromycine est un macrolide légèrement plus grand. En effet, l'érythromycine est un macrolide possédant un cycle à 14 carbones tandis que l'azithromycine possède un cycle à 15 carbones (**Fig. 61**).

Des travaux antérieurs ont permis de mesurer un K_d de 7 nM entre l'azithromycine et le ribosome (Dinos et al., 2001). Ces résultats sont raisonnablement proches de ce que nous avons obtenu par ITC compte tenu de l'incertitude sur le K_d du fait de la forte affinité de l'antibiotique. L'incertitude sur la mesure de l'affinité est en effet très grande ($K_d = 0,9 \pm 1,4$) (**Table 22**) compte tenu de l'allure abrupte de la sigmoïde des données ITC après intégration. Le coefficient de Wiseman « c » étant de plus de 10 000, ce dernier est donc bien au-delà des valeurs permettant une détermination précise du K_d (1 à 1 000) (Velazquez-Campoy and Freire, 2006). Il serait donc nécessaire de diminuer la concentration en 70S dans la cellule à échantillon afin de baisser significativement le coefficient de Wiseman. Malheureusement, cela n'est pas faisable dans ce cas car la puissance calorifique liée à la fixation de l'azithromycine ne sera plus détectable.

Enfin, quand on compare ces données ITC à celles obtenues avec l'érythromycine, nous pouvons également en déduire que l'azithromycine présente une meilleure affinité pour le 70S.

3. Etude thermodynamique de la fixation de Bac 7 (1-16) au 70S

T°C	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
20	$-9,35 \pm 0,05$	1,63	-0,48	$1,43 \pm 0,004$	$46,7 \pm 5,3$	$-9,9 \pm 0,1$
25	$-12,9 \pm 0,10$	-10,5	3,13	$0,99 \pm 0,005$	$69,4 \pm 7,7$	$-9,8 \pm 0,1$
30	$-15,3 \pm 0,08$	-19,2	5,82	$1,2 \pm 0,004$	$142,2 \pm 9,1$	$-9,5 \pm 0,1$
35	$-16,5 \pm 0,10$	-23	7,09	$1,22 \pm 0,005$	$216,9 \pm 14,5$	$-9,4 \pm 0,1$

Table 23 : Représentation des paramètres thermodynamiques de la fixation du peptide Bac 7 (1-16) au 70S à différentes températures.

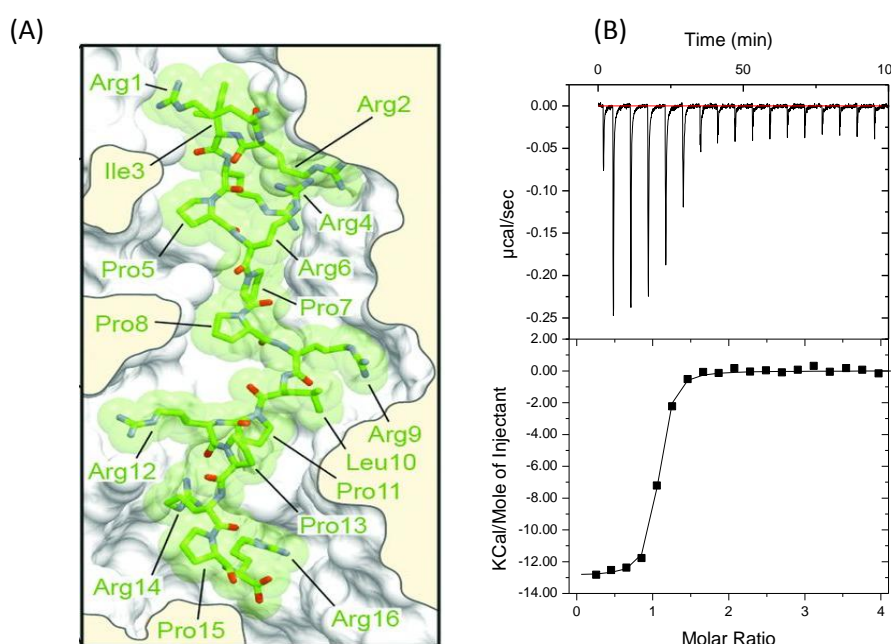


Figure 62 : (A) (Tirée de Seefeldt et al., 2016) Représentation de la structure du peptide Bac 7 (1-16) à l'intérieur du tunnel de sortie du ribosome 70S de *T. thermophilus*. Bac 7 (1-16) de séquence RRIRPRPPRLPRPRPR est coloré en vert. (B) Représentation de la courbe d'ITC correspondant à la fixation de Bac 7 (1-16) au 70S à 25°C.

Contrairement aux deux macrolides vus précédemment, la force motrice de l'interaction de Bac 7 (1-16) avec le ribosome est fortement enthalpique (**Fig. 62**), avec une contribution cette fois négative de l'entropie à 25°C et au-delà (**Table 23**). Cette valeur négative est ici en accord avec une perte de degrés de liberté lors de la fixation de ce peptide de taille importante, comme attendu. Cependant, on remarque que la variation d'entropie est au contraire positive à 20 °C, ce qui peut laisser supposer que ce peptide est déjà fortement structuré à basse température. Cela est plausible étant donné que la séquence compte de

nombreuses prolines. Il serait par conséquent intéressant de faire une étude de fusion de ce peptide seul pour évaluer cette hypothèse. De plus, une telle étude permettrait d'atteindre les parts relatives d'un changement de conformation du peptide et de l'interaction avec le ribosome dans le bilan thermodynamique.

La structure cristallographique du complexe 70S – Bac 7 (1-16) a permis de mettre en évidence 3 régions d'interactions entre le 50S et le peptide. Ainsi, le peptide interagit avec la poche de fixation de l'ARNt du site A, avec la crevasse du site A et au niveau de la partie supérieure du tunnel de sortie du polypeptide (Seefeldt et al., 2016).

Etant donné la composition du peptide (riche en arginine 50% et en proline 37,5 %), les types de contacts de Bac 7 (1-16) avec le 70S sont plutôt restreints. A partir de la structure, il a été possible de mettre évidence un ensemble de liaisons hydrogènes, de liaisons ioniques et quelques interactions d'empilement (Seefeldt et al., 2016). Par conséquent, ces interactions reflètent plutôt bien le signe du ΔH que l'on retrouve par ITC.

Enfin, bien que l'affinité de Bac 7 (1-16) soit très élevée pour le 70S, nos résultats ITC montrent que l'interaction est assez lente comme le montre le retour à la ligne de base qui nécessite environ 200 seconde après injection du peptide dans la cellule.

4. Comparaison des 3 antibiotiques interagissant avec le tunnel de sortie du peptide du 70S

Antibiotique	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)
érythromycine	$-1,33 \pm 0,01$	29,4	-8,77	$1,17 \pm 0,005$	$40,3 \pm 5,2$	$-10,1 \pm 0,2$
azithromycine	$-3,0 \pm 0,06$	31,3	-9,33	$0,73 \pm 0,009$	$0,9 \pm 1,4$	$-12,3 \pm n.d.$
Bac 7 (1-16)	$-12,9 \pm 0,10$	-10,5	3,13	$0,99 \pm 0,005$	$69,4 \pm 7,7$	$-9,8 \pm 0,1$

Table 24 : Comparaison des paramètres thermodynamiques de la fixation d'antibiotiques pour le 70S à 25°C.

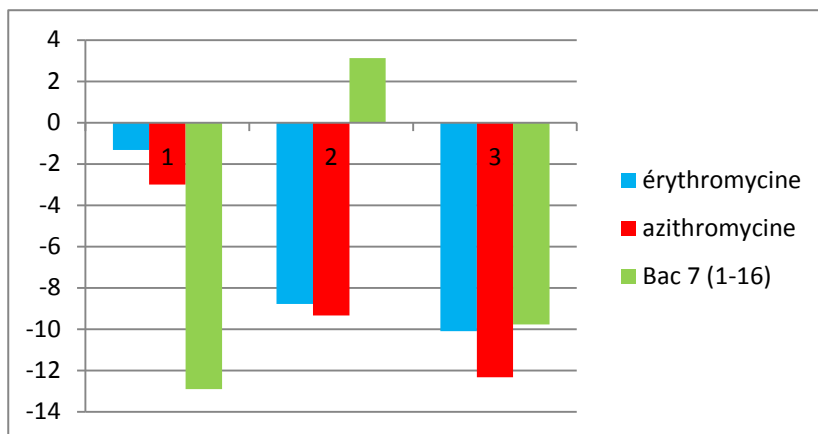


Figure 63 : Représentation graphique des ΔH en 1, des ΔS en 2 et des ΔG en 3 de chacun des antibiotiques étudiés par ITC.

Nos données thermodynamiques montrent que les forces moléculaires responsables de la fixation des macrolides d'une part, et du peptide d'autre part, sont complètement différents. Au niveau des macrolides, c'est la variation d'entropie qui est la force motrice principale de l'interaction. On peut supposer qu'au moment où les 2 macrolides se fixent, il y a un phénomène de désolvation de la molécule. En revanche, l'enthalpie est la force motrice de l'interaction entre Bac 7 (1-16) et le 70S (**Table 24**).

On peut donc conclure que l'étude de ces 3 antibiotiques a permis de montrer 2 modes de fixations différents. Le ΔS représente la force motrice principale des macrolides, alors que pour Bac 7 (1-16), le ΔH permet seul l'interaction (**Fig. 63**). Bien que les forces motrices soient différentes, on peut observer que les affinités des différents antibiotiques sont du même ordre de grandeur.

Enfin, étant donné que les 3 antibiotiques interagissent avec le ribosome au niveau du même site de fixation, il serait possible de tirer profit du profil thermodynamique de fixation de Bac 7 (1-16) afin de déterminer précisément l'affinité de l'azithromycine pour le 70S par compétition. En effet, vu que Bac 7 (1-16) a une affinité 10 fois inférieure à l'azithromycine (**Table 24**) et que son enthalpie de fixation au ribosome est bien plus endothermique que celle du macrolide (**Fig. 63**), ce peptide antimicrobien serait un parfait candidat pour une telle expérience (Velazquez-Campoy and Freire, 2006). On commencera donc par effectuer une première titration par ITC afin de saturer le 70S en Bac 7 (1-16), puis une seconde expérience d'ITC sera réalisée avec l'azithromycine afin de déplacer Bac 7(1-16) et de saturer cette fois

le ribosome avec le macrolide. Ainsi, on pourra suivre le déplacement du ligand faible par le ligand fort et en déduire l'affinité précise de l'azithromycine pour le 70S.

Si cette expérience d'ITC par compétition nous permet d'obtenir des résultats satisfaisants, il serait alors possible de la généraliser à d'autres macrolides possédant une enthalpie de liaison très faible.

Chapitre V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le but d'étudier la thermodynamique du fonctionnement de la transcriptase inverse du VIH-1 en phase d'élongation et, en particulier, le mode d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques, l'équipe a développé une nouvelle approche expérimentale nommée *incremental ITC (iITC)*. Nous avons ensuite transposé cette approche à un modèle plus complexe, la traduction bactérienne. Grâce à l'absence d'interaction entre les facteurs d'initiation de la traduction, nous avons en effet pu appliquer l'approche *iITC* et ainsi disséquer de manière originale la thermodynamique de formation du complexe d'initiation 30S. L'étude de l'ensemble des voies de formation du complexe d'initiation 30S a permis d'obtenir une description thermodynamique complète ainsi qu'une détermination précise de l'effets des facteurs entre eux. Les nombreuses expériences répétées à différentes températures ont été traitées une à une selon la méthode habituelle. Cependant, l'équipe a également développé une méthode globale grâce à laquelle les données à différentes températures d'une même expérience sont traitées collectivement, ce qui permet de réduire le nombre de paramètres libres. Il serait également souhaitable de procéder à un tel traitement global chaque fois que c'est possible, mais ce genre de traitement nécessite encore un travail de spécialiste.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence un ordre d'association privilégié des différents facteurs lors de la formation du complexe d'initiation. Sur la base des affinités mesurées par ITC, nous avons déduit qu'IF3 est le premier facteur à venir se fixer sur le 30S seul. Il est ensuite suivi par IF1. En effet, la coopérativité des facteurs a permis de démontrer que la présence d'IF3 augmente très significativement l'affinité d'IF1. Par déduction, IF2 est donc le dernier facteur à venir se fixer au 30S. Nous avons également observé que la présence simultanée d'IF3 et d'IF1 favorise très fortement la fixation d'IF2 pour le 30S.

En accord avec des résultats connus, nous avons également pu constater que l'ARNm est capable de se fixer au 30S indépendamment de la présence des facteurs d'initiation.

D'autre part, nous avons observé que l'affinité de l'ARNt initiateur pour le 30S est maximale à partir du moment où tous les facteurs d'initiation sont présents sur le 30S. Nos données ITC suggèrent également que la vitesse de fixation de l'ARNt initiateur est plus lente comparée à celle des autres partenaires de l'initiation. Par conséquent, il est probable que l'ARNt initiateur soit le dernier facteur à venir se fixer sur le 30S.

Après avoir formé le complexe d'initiation 30S par ITC, nous avons essayé d'en déterminer sa structure à haute résolution par cryo-microscopie électronique. Pour cela, nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe de Bruno Klaholz à l'IGBMC. Ainsi, il a été possible d'obtenir un complexe contenant la partie C-terminale d'IF3 fixé au 30S et un autre complexe composé du 30S, de l'ARNm et de l'ARNt initiateur. Nos résultats encore préliminaires n'ont pour le moment pas permis de dépasser 8 Angströms de résolution pour chacun des deux complexes. Nous espérons améliorer la résolution de ces 2 complexes mais également déterminer la structure du complexe d'initiation 30S complet à haute résolution.

Au cours de l'étude de l'élongation par ITC nous avons été confrontés à l'hydrolyse du GTP par IF2. En effet, étant à chaque fois en présence d'un excès de GTP, cette réaction parasite ne nous a pas permis d'obtenir des données ITC analysables. Par conséquent, aucune donnée thermodynamique n'a pu être obtenue sur la phase d'élongation elle-même. Afin d'y parvenir il sera nécessaire de réitérer les expériences en utilisant une quantité limitante en GTP, ou d'un analogue non hydrolysable. Par la même occasion, nous espérons pouvoir observer la fixation de plusieurs aa-ARNt au ribosome pour étudier la phase d'élongation en détails. Nous espérons donc pouvoir déterminer les paramètres thermodynamiques de la fixation du complexe ternaire EF-Tu/GMPPCP - aa-ARNt et ceux de la fixation du complexe EF-G/GMPPCP. A terme, nous espérons pouvoir visualiser l'incorporation successive de plusieurs aa-ARNt par *iITC*.

Enfin, l'étude de la fixation de trois antibiotiques au ribosome nous a permis de montrer toute la puissance de l'ITC. L'analyse de la fixation de deux macrolides nous a permis de montrer que c'est la variation d'entropie qui représente la force motrice de l'interaction. En revanche, nous avons pu observer que la fixation de Bac 7 (1-16), un peptide antimicrobien riche en proline, est dirigée par la variation d'enthalpie. Ainsi, bien que le site de fixation soit le même pour ces deux macrolides et pour ce peptide, il a été possible de

montrer que les forces motrices étaient différentes. Dans le futur, nous espérons pouvoir tester la fixation d'autres futurs antibiotiques potentiels par la mise en place de collaboration.

L'équipe a récemment fait l'acquisition d'un nouvel appareil disposant de la technologie switchSENSE permettant de déterminer les cinétiques des interactions. Cette technologie pourrait nous permettre d'obtenir les vitesses de fixation et de dissociation des différents partenaires du complexe d'initiation 30S. Il sera alors intéressant de combiner les résultats obtenus par ITC, particulièrement par l'utilisation de la méthode kinITC quand se sera possible, à ceux obtenus par l'approche switchSENSE.

BIBLIOGRAPHIE

Antoun, A., Pavlov, M.Y., Andersson, K., Tenson, T., and Ehrenberg, M. (2003). The roles of initiation factor 2 and guanosine triphosphate in initiation of protein synthesis. *EMBO J* 22, 5593-5601.

Antoun, A., Pavlov, M.Y., Lovmar, M., and Ehrenberg, M. (2006). How initiation factors maximize the accuracy of tRNA selection in initiation of bacterial protein synthesis. *Mol Cell* 23, 183-193.

Appelt, K., Dijk, J., Reinhardt, R., Sanhuesa, S., White, S.W., Wilson, K.S., and Yonath, A. (1981). The crystallization of ribosomal proteins from the 50 S subunit of the *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus* ribosome. *J Biol Chem* 256, 11787-11790.

Asano, K. (2014). Why is start codon selection so precise in eukaryotes? *Translation (Austin)* 2, e28387.

Bec, G., Meyer, B., Gerard, M.A., Steger, J., Fauster, K., Wolff, P., Burnouf, D., Micura, R., Dumas, P., and Ennifar, E. (2013). Thermodynamics of HIV-1 reverse transcriptase in action elucidates the mechanism of action of non-nucleoside inhibitors. *J Am Chem Soc* 135, 9743-9752.

Belardinelli, R., Sharma, H., Caliskan, N., Cunha, C.E., Peske, F., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2016). Choreography of molecular movements during ribosome progression along mRNA. *Nat Struct Mol Biol* 23, 342-348.

Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., and Piddock, L.J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42-51.

Bock, L.V., Blau, C., Vaiana, A.C., and Grubmuller, H. (2015). Dynamic contact network between ribosomal subunits enables rapid large-scale rotation during spontaneous translocation. *Nucleic Acids Res* 43, 6747-6760.

Buckstein, M.H., He, J., and Rubin, H. (2008). Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 718-726.

Burnouf, D., Ennifar, E., Guedich, S., Puffer, B., Hoffmann, G., Bec, G., Disdier, F., Baltzinger, M., and Dumas, P. (2012). kinITC: a new method for obtaining joint thermodynamic and kinetic data by isothermal titration calorimetry. *J Am Chem Soc* 134, 559-565.

- Butler, J.S., Springer, M., and Grunberg-Manago, M. (1987). AUU-to-AUG mutation in the initiator codon of the translation initiation factor IF3 abolishes translational autocontrol of its own gene (infC) in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4022-4025.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Jr., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Hartsch, T., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2001). Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* 291, 498-501.
- Carvalho, A.T., Szeler, K., Vavitsas, K., Aqvist, J., and Kamerlin, S.C. (2015). Modeling the mechanisms of biological GTP hydrolysis. *Arch Biochem Biophys* 582, 80-90.
- Caserta, E., Ferrara, C., Milon, P., Fabbretti, A., Rocchetti, A., Tomsic, J., Pon, C.L., Gualerzi, C.O., and La Teana, A. (2010). Ribosomal interaction of *Bacillus stearothermophilus* translation initiation factor IF2: characterization of the active sites. *J Mol Biol* 396, 118-129.
- Caserta, E., Tomsic, J., Spurio, R., La Teana, A., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (2006). Translation initiation factor IF2 interacts with the 30 S ribosomal subunit via two separate binding sites. *J Mol Biol* 362, 787-799.
- Celano, B., Pawlik, R.T., and Gualerzi, C.O. (1988). Interaction of *Escherichia coli* translation-initiation factor IF-1 with ribosomes. *Eur J Biochem* 178, 351-355.
- Chen, H., Bjercknes, M., Kumar, R., and Jay, E. (1994). Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res* 22, 4953-4957.
- Connelly, P.R., and Thomson, J.A. (1992). Heat capacity changes and hydrophobic interactions in the binding of FK506 and rapamycin to the FK506 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4781-4785.
- Crick, F.H. (1968). The origin of the genetic code. *J Mol Biol* 38, 367-379.
- Cummings, H.S., and Hershey, J.W. (1994). Translation initiation factor IF1 is essential for cell viability in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176, 198-205.
- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A., and Moore, P.B. (1994). The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J* 13, 3661-3668.
- Dahlquist, K.D., and Puglisi, J.D. (2000). Interaction of translation initiation factor IF1 with the *E. coli* ribosomal A site. *J Mol Biol* 299, 1-15.

- Dallas, A., and Noller, H.F. (2001). Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Mol Cell* 8, 855-864.
- de Cock, E., Springer, M., and Dardel, F. (1999). The interdomain linker of Escherichia coli initiation factor IF3: a possible trigger of translation initiation specificity. *Mol Microbiol* 32, 193-202.
- de Narvaez, C.C., and Schaup, H.W. (1979). In vivo transcriptionally coupled assembly of Escherichia coli ribosomal subunits. *J Mol Biol* 134, 1-22.
- de Smit, M.H., and van Duin, J. (1990). Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7668-7672.
- Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* 27, 344-351.
- Dinos, G.P., Michelinaki, M., and Kalpaxis, D.L. (2001). Insights into the mechanism of azithromycin interaction with an Escherichia coli functional ribosomal complex. *Mol Pharmacol* 59, 1441-1445.
- Doerfel, L.K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., and Rodnina, M.V. (2013). EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339, 85-88.
- Draper, D.E., and von Hippel, P.H. (1979). Interaction of Escherichia coli ribosomal protein S1 with ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1040-1044.
- Dreyfus, M. (1988). What constitutes the signal for the initiation of protein synthesis on Escherichia coli mRNAs? *J Mol Biol* 204, 79-94.
- Dulebohn, D., Choy, J., Sundermeier, T., Okan, N., and Karzai, A.W. (2007). Trans-translation: the tmRNA-mediated surveillance mechanism for ribosome rescue, directed protein degradation, and nonstop mRNA decay. *Biochemistry* 46, 4681-4693.
- Dumas, P., Ennifar, E., Da Veiga, C., Bec, G., Palau, W., Di Primo, C., Pineiro, A., Sabin, J., Munoz, E., and Rial, J. (2016). Extending ITC to Kinetics with kinITC. *Methods Enzymol* 567, 157-180.
- Dunkle, J.A., Wang, L., Feldman, M.B., Pulk, A., Chen, V.B., Kapral, G.J., Noeske, J., Richardson, J.S., Blanchard, S.C., and Cate, J.H. (2011). Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. *Science* 332, 981-984.

Duval, M., Korepanov, A., Fuchsbauer, O., Fechter, P., Haller, A., Fabbretti, A., Choulier, L., Micura, R., Klaholz, B.P., Romby, P., *et al.* (2013). Escherichia coli ribosomal protein S1 unfolds structured mRNAs onto the ribosome for active translation initiation. *PLoS Biol* *11*, e1001731.

Fabbretti, A., Pon, C.L., Hennelly, S.P., Hill, W.E., Lodmell, J.S., and Gualerzi, C.O. (2007). The real-time path of translation factor IF3 onto and off the ribosome. *Mol Cell* *25*, 285-296.

Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A.L., Bock, L.V., Ficner, R., Rodnina, M.V., and Stark, H. (2015). Structure of the E. coli ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature* *520*, 567-570.

Frank, J., Zhu, J., Penczek, P., Li, Y., Srivastava, S., Verschoor, A., Radermacher, M., Grassucci, R., Lata, R.K., and Agrawal, R.K. (1995). A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome. *Nature* *376*, 441-444.

Freistroffer, D.V., Pavlov, M.Y., MacDougall, J., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (1997). Release factor RF3 in E.coli accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *EMBO J* *16*, 4126-4133.

Freyer, M.W., and Lewis, E.A. (2008). Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol* *84*, 79-113.

Garcia, C., Fortier, P.L., Blanquet, S., Lallemand, J.Y., and Dardel, F. (1995). Solution structure of the ribosome-binding domain of E. coli translation initiation factor IF3. Homology with the U1A protein of the eukaryotic spliceosome. *J Mol Biol* *254*, 247-259.

Gillet, R., and Felden, B. (2007). [Lost in translation]. *Med Sci (Paris)* *23*, 633-639.

Giuliodori, A.M., Brandi, A., Gualerzi, C.O., and Pon, C.L. (2004). Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. *RNA* *10*, 265-276.

Goyal, A., Belardinelli, R., Maracci, C., Milon, P., and Rodnina, M.V. (2015). Directional transition from initiation to elongation in bacterial translation. *Nucleic Acids Res* *43*, 10700-10712.

Grigoriadou, C., Marzi, S., Pan, D., Gualerzi, C.O., and Cooperman, B.S. (2007). The translational fidelity function of IF3 during transition from the 30 S initiation complex to the 70 S initiation complex. *J Mol Biol* *373*, 551-561.

- Grill, S., Gualerzi, C.O., Londei, P., and Blasi, U. (2000). Selective stimulation of translation of leaderless mRNA by initiation factor 2: evolutionary implications for translation. *EMBO J* *19*, 4101-4110.
- Gromadski, K.B., Wieden, H.J., and Rodnina, M.V. (2002). Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry* *41*, 162-169.
- Grunberg-Manago, M., Dessen, P., Pantaloni, D., Godefroy-Colburn, T., Wolfe, A.D., and Dondon, J. (1975). Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol* *94*, 461-478.
- Gualerzi, C., Risuleo, G., and Pon, C.L. (1977). Initial rate kinetic analysis of the mechanism of initiation complex formation and the role of initiation factor IF-3. *Biochemistry* *16*, 1684-1689.
- Gualerzi, C.O., Brandi, L., Caserta, E., Garofalo, C., Lammi, M., La Teana, A., Petrelli, D., Spurio, R., Tomsic, J., and Pon, C.L. (2001). Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *66*, 363-376.
- Gualerzi, C.O., and Pon, C.L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* *29*, 5881-5889.
- Gualerzi, C.O., Severini, M., Spurio, R., La Teana, A., and Pon, C.L. (1991). Molecular dissection of translation initiation factor IF2. Evidence for two structural and functional domains. *J Biol Chem* *266*, 16356-16362.
- Guenneugues, M., Caserta, E., Brandi, L., Spurio, R., Meunier, S., Pon, C.L., Boelens, R., and Gualerzi, C.O. (2000). Mapping the fMet-tRNA(f)(Met) binding site of initiation factor IF2. *EMBO J* *19*, 5233-5240.
- Guerin, M.F., and Hayes, D.H. (1987). Comparison of active and inactive forms of the *E. coli* 30S ribosomal subunits. *Biochimie* *69*, 965-974.
- Hartz, D., McPheeters, D.S., and Gold, L. (1989). Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes Dev* *3*, 1899-1912.
- Hauryliuk, V., Mitkevich, V.A., Draycheva, A., Tankov, S., Shyp, V., Ermakov, A., Kulikova, A.A., Makarov, A.A., and Ehrenberg, M. (2009). Thermodynamics of GTP and GDP binding to bacterial initiation factor 2 suggests two types of structural transitions. *J Mol Biol* *394*, 621-626.

- Hennelly, S.P., Antoun, A., Ehrenberg, M., Gualerzi, C.O., Knight, W., Lodmell, J.S., and Hill, W.E. (2005). A time-resolved investigation of ribosomal subunit association. *J Mol Biol* 346, 1243-1258.
- Hoffmann, A., Bukau, B., and Kramer, G. (2010). Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim Biophys Acta* 1803, 650-661.
- Holtkamp, W., Kokic, G., Jager, M., Mittelstaet, J., Komar, A.A., and Rodnina, M.V. (2015). Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time. *Science* 350, 1104-1107.
- Hua, Y., and Raleigh, D.P. (1998). On the global architecture of initiation factor IF3: a comparative study of the linker regions from the Escherichia coli protein and the Bacillus stearothermophilus protein. *J Mol Biol* 278, 871-878.
- Huang, C., Mandava, C.S., and Sanyal, S. (2010). The ribosomal stalk plays a key role in IF2-mediated association of the ribosomal subunits. *J Mol Biol* 399, 145-153.
- Janosi, L., Hara, H., Zhang, S., and Kaji, A. (1996). Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF)--an important but overlooked step of protein biosynthesis. *Adv Biophys* 32, 121-201.
- Jiang, J., Seo, H., and Chow, C.S. (2016). Post-transcriptional Modifications Modulate rRNA Structure and Ligand Interactions. *Acc Chem Res* 49, 893-901.
- Julian, P., Milon, P., Agirrezabala, X., Lasso, G., Gil, D., Rodnina, M.V., and Valle, M. (2011). The Cryo-EM structure of a complete 30S translation initiation complex from Escherichia coli. *PLoS Biol* 9, e1001095.
- Kaczanowska, M., and Ryden-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in Escherichia coli. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 477-494.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S., and Leberman, R. (1996). The structure of the Escherichia coli EF-Tu.EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature* 379, 511-518.
- Keller, E.B., Zamecnik, P.C., and Loftfield, R.B. (1954). The role of microsomes in the incorporation of amino acids into proteins. *J Histochem Cytochem* 2, 378-386.
- Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* 47, 1-45.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234, 187-208.

- Krab, I.M., and Parmeggiani, A. (1998). EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochim Biophys Acta* *1443*, 1-22.
- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., and Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 589-597.
- La Teana, A., Gualerzi, C.O., and Brimacombe, R. (1995). From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors. *RNA* *1*, 772-782.
- La Teana, A., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (1996). Late events in translation initiation. Adjustment of fMet-tRNA in the ribosomal P-site. *J Mol Biol* *256*, 667-675.
- Laalami, S., Putzer, H., Plumbridge, J.A., and Grunberg-Manago, M. (1991). A severely truncated form of translational initiation factor 2 supports growth of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* *220*, 335-349.
- Labischinski, H., and Subramanian, A.R. (1979). Protein S1 from *Escherichia coli* ribosomes: an improved isolation procedure and shape determination by small-angle X-ray scattering. *Eur J Biochem* *95*, 359-366.
- Laursen, B.S., Kjaergaard, A.C., Mortensen, K.K., Hoffman, D.W., and Sperling-Petersen, H.U. (2004). The N-terminal domain (IF2N) of bacterial translation initiation factor IF2 is connected to the conserved C-terminal domains by a flexible linker. *Protein Sci* *13*, 230-239.
- Laursen, B.S., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U., and Hoffman, D.W. (2003). A conserved structural motif at the N terminus of bacterial translation initiation factor IF2. *J Biol Chem* *278*, 16320-16328.
- Laursen, B.S., Sorensen, H.P., Mortensen, K.K., and Sperling-Petersen, H.U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* *69*, 101-123.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* *12*, 371-387.
- Littlefield, J.W., Keller, E.B., Gross, J., and Zamecnik, P.C. (1955). Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J Biol Chem* *217*, 111-123.
- Livingstone, J.R., Spolar, R.S., and Record, M.T., Jr. (1991). Contribution to the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface area. *Biochemistry* *30*, 4237-4244.

- Luchin, S., Putzer, H., Hershey, J.W., Cenatiempo, Y., Grunberg-Manago, M., and Laalami, S. (1999). In vitro study of two dominant inhibitory GTPase mutants of Escherichia coli translation initiation factor IF2. Direct evidence that GTP hydrolysis is necessary for factor recycling. *J Biol Chem* 274, 6074-6079.
- Ma, J., Campbell, A., and Karlin, S. (2002). Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J Bacteriol* 184, 5733-5745.
- Maar, D., Liveris, D., Sussman, J.K., Ringquist, S., Moll, I., Heredia, N., Kil, A., Blasi, U., Schwartz, I., and Simons, R.W. (2008). A single mutation in the IF3 N-terminal domain perturbs the fidelity of translation initiation at three levels. *J Mol Biol* 383, 937-944.
- MacDougall, D.D., and Gonzalez, R.L., Jr. (2015). Translation initiation factor 3 regulates switching between different modes of ribosomal subunit joining. *J Mol Biol* 427, 1801-1818.
- Mace, K., Giudice, E., and Gillet, R. (2015). [Protein synthesis by the ribosome: a pathway full of pitfalls]. *Med Sci (Paris)* 31, 282-290.
- Marzi, S., Myasnikov, A.G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M., and Klaholz, B.P. (2007). Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell* 130, 1019-1031.
- Mechulam, Y., Schmitt, E., Maveyraud, L., Zelwer, C., Nureki, O., Yokoyama, S., Konno, M., and Blanquet, S. (1999). Crystal structure of Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase highlights species-specific features. *J Mol Biol* 294, 1287-1297.
- Milon, P., Carotti, M., Konevega, A.L., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., and Gualerzi, C.O. (2010). The ribosome-bound initiation factor 2 recruits initiator tRNA to the 30S initiation complex. *EMBO Rep* 11, 312-316.
- Milon, P., Konevega, A.L., Gualerzi, C.O., and Rodnina, M.V. (2008). Kinetic checkpoint at a late step in translation initiation. *Mol Cell* 30, 712-720.
- Milon, P., Maracci, C., Filonava, L., Gualerzi, C.O., and Rodnina, M.V. (2012). Real-time assembly landscape of bacterial 30S translation initiation complex. *Nat Struct Mol Biol* 19, 609-615.
- Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, M.V., Pon, C.L., Boelens, R., and Gualerzi, C.O. (2006). The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13962-13967.

- Mitkevich, V.A., Shyp, V., Petrushanko, I.Y., Soosaar, A., Atkinson, G.C., Tenson, T., Makarov, A.A., and Hauryliuk, V. (2012). GTPases IF2 and EF-G bind GDP and the SRL RNA in a mutually exclusive manner. *Sci Rep* 2, 843.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1987). Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA. *Biochimie* 69, 879-884.
- Moazed, D., Samaha, R.R., Gualerzi, C., and Noller, H.F. (1995). Specific protection of 16 S rRNA by translational initiation factors. *J Mol Biol* 248, 207-210.
- Monro, R.E. (1967). Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 26, 147-151.
- Moreno, J.M., Drskjotersen, L., Kristensen, J.E., Mortensen, K.K., and Sperling-Petersen, H.U. (1999). Characterization of the domains of *E. coli* initiation factor IF2 responsible for recognition of the ribosome. *FEBS Lett* 455, 130-134.
- Murzin, A.G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J* 12, 861-867.
- Myasnikov, A.G., Marzi, S., Simonetti, A., Giuliodori, A.M., Gualerzi, C.O., Yusupova, G., Yusupov, M., and Klaholz, B.P. (2005). Conformational transition of initiation factor 2 from the GTP- to GDP-bound state visualized on the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1145-1149.
- Nakamura, Y., and Ito, K. (2003). Making sense of mimic in translation termination. *Trends Biochem Sci* 28, 99-105.
- Neubauer, C., Gillet, R., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2012). Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. *Science* 335, 1366-1369.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Clark, B.F., and Nyborg, J. (1996). The ternary complex of aminoacylated tRNA and EF-Tu-GTP. Recognition of a bond and a fold. *Biochimie* 78, 921-933.
- Nyengaard, N.R., Mortensen, K.K., Lassen, S.F., Hershey, J.W., and Sperling-Petersen, H.U. (1991). Tandem translation of *E. coli* initiation factor IF2 beta: purification and characterization in vitro of two active forms. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 1572-1579.

- Orgel, L.E. (1968). Evolution of the genetic apparatus. *J Mol Biol* 38, 381-393.
- Osterman, I.A., Evfratov, S.A., Sergiev, P.V., and Dontsova, O.A. (2013). Comparison of mRNA features affecting translation initiation and reinitiation. *Nucleic Acids Res* 41, 474-486.
- Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (1998). Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *EMBO J* 17, 7490-7497.
- Pech, M., Karim, Z., Yamamoto, H., Kitakawa, M., Qin, Y., and Nierhaus, K.H. (2011). Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg²⁺ concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3199-3203.
- Peske, F., Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2005). Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Mol Cell* 18, 403-412.
- Pestka, S. (1974). Binding of [¹⁴C]erythromycin to Escherichia coli ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 6, 474-478.
- Petersen, H.U., Roll, T., Grunberg-Manago, M., and Clark, B.F. (1979). Specific interaction of initiation factor IF2 of E. coli with formylmethionyl-tRNA f Met. *Biochem Biophys Res Commun* 91, 1068-1074.
- Petrelli, D., LaTeana, A., Garofalo, C., Spurio, R., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (2001). Translation initiation factor IF3: two domains, five functions, one mechanism? *EMBO J* 20, 4560-4569.
- Petropoulos, A.D., Kouvela, E.C., Starosta, A.L., Wilson, D.N., Dinos, G.P., and Kalpaxis, D.L. (2009). Time-resolved binding of azithromycin to Escherichia coli ribosomes. *J Mol Biol* 385, 1179-1192.
- Petrov, A., Chen, J., O'Leary, S., Tsai, A., and Puglisi, J.D. (2012). Single-molecule analysis of translational dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011551.
- Pingoud, A., Urbanke, C., Krauss, G., Peters, F., and Maass, G. (1977). Ternary complex formation between elongation factor Tu, GTP and aminoacyl-tRNA: an equilibrium study. *Eur J Biochem* 78, 403-409.
- Podda, E., Benincasa, M., Pacor, S., Micali, F., Mattiuzzo, M., Gennaro, R., and Scocchi, M. (2006). Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide. *Biochim Biophys Acta* 1760, 1732-1740.

- Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (1984). Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. Effect of initiation factor IF1 on the initial rate of 30 S initiation complex formation. *FEBS Lett* 175, 203-207.
- Pulk, A., and Cate, J.H. (2013). Control of ribosomal subunit rotation by elongation factor G. *Science* 340, 1235970.
- RajBhandary, U.L. (1994). Initiator transfer RNAs. *J Bacteriol* 176, 547-552.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557-572.
- Ratje, A.H., Loerke, J., Mikolajka, A., Brunner, M., Hildebrand, P.W., Starosta, A.L., Donhofer, A., Connell, S.R., Fucini, P., Mielke, T., *et al.* (2010). Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature* 468, 713-716.
- Rheinberger, H.J., Sternbach, H., and Nierhaus, K.H. (1981). Three tRNA binding sites on Escherichia coli ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5310-5314.
- Richards, J., Mehta, P., and Karzai, A.W. (2006). RNase R degrades non-stop mRNAs selectively in an SmpB-tmRNA-dependent manner. *Mol Microbiol* 62, 1700-1712.
- Rodnina, M.V., Pape, T., Fricke, R., Kuhn, L., and Wintermeyer, W. (1996). Initial binding of the elongation factor Tu.GTP.aminoacyl-tRNA complex preceding codon recognition on the ribosome. *J Biol Chem* 271, 646-652.
- Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2016). Protein Elongation, Co-translational Folding and Targeting. *J Mol Biol* 428, 2165-2185.
- Sacerdot, C., Vachon, G., Laalami, S., Morel-Deville, F., Cenatiempo, Y., and Grunberg-Manago, M. (1992). Both forms of translational initiation factor IF2 (alpha and beta) are required for maximal growth of Escherichia coli. Evidence for two translational initiation codons for IF2 beta. *J Mol Biol* 225, 67-80.
- Samanta, U., Bahadur, R.P., and Chakrabarti, P. (2002). Quantifying the accessible surface area of protein residues in their local environment. *Protein Eng* 15, 659-667.
- Savelsbergh, A., Mohr, D., Wilden, B., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2000). Stimulation of the GTPase activity of translation elongation factor G by ribosomal protein L7/12. *J Biol Chem* 275, 890-894.

- Schmeing, T.M., and Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* *461*, 1234-1242.
- Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S., and Mechulam, Y. (1998). Crystal structure of methionyl-tRNA^{fMet} transformylase complexed with the initiator formyl-methionyl-tRNA^{fMet}. *EMBO J* *17*, 6819-6826.
- Scocchi, M., Tossi, A., and Gennaro, R. (2011). Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* *68*, 2317-2330.
- Seefeldt, A.C., Graf, M., Perebaskine, N., Nguyen, F., Arenz, S., Mardirossian, M., Scocchi, M., Wilson, D.N., and Innis, C.A. (2016). Structure of the mammalian antimicrobial peptide Bac7(1-16) bound within the exit tunnel of a bacterial ribosome. *Nucleic Acids Res* *44*, 2429-2438.
- Seong, B.L., and RajBhandary, U.L. (1987). Escherichia coli formylmethionine tRNA: mutations in GGGCCC sequence conserved in anticodon stem of initiator tRNAs affect initiation of protein synthesis and conformation of anticodon loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 334-338.
- Sette, M., Spurio, R., van Tilborg, P., Gualerzi, C.O., and Boelens, R. (1999). Identification of the ribosome binding sites of translation initiation factor IF3 by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *RNA* *5*, 82-92.
- Sette, M., van Tilborg, P., Spurio, R., Kaptein, R., Paci, M., Gualerzi, C.O., and Boelens, R. (1997). The structure of the translational initiation factor IF1 from E.coli contains an oligomer-binding motif. *EMBO J* *16*, 1436-1443.
- Shimizu, Y. (2012). ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes. *J Mol Biol* *423*, 624-631.
- Shine, J., and Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 1342-1346.
- Simonetti, A., Marzi, S., Billas, I.M., Tsai, A., Fabbretti, A., Myasnikov, A.G., Roblin, P., Vaiana, A.C., Hazemann, I., Eiler, D., *et al.* (2013). Involvement of protein IF2 N domain in ribosomal subunit joining revealed from architecture and function of the full-length initiation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 15656-15661.
- Singh, N.S., Das, G., Seshadri, A., Sangeetha, R., and Varshney, U. (2005). Evidence for a role of initiation factor 3 in recycling of ribosomal complexes stalled on mRNAs in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* *33*, 5591-5601.

- Song, H., Parsons, M.R., Rowsell, S., Leonard, G., and Phillips, S.E. (1999). Crystal structure of intact elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli* in GDP conformation at 2.05 Å resolution. *J Mol Biol* 285, 1245-1256.
- Stagg, S.M., Mears, J.A., and Harvey, S.C. (2003). A structural model for the assembly of the 30S subunit of the ribosome. *J Mol Biol* 328, 49-61.
- Stark, H., Mueller, F., Orlova, E.V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., Zemlin, F., Brimacombe, R., and van Heel, M. (1995). The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure* 3, 815-821.
- Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.J., Zemlin, F., Wintermeyer, W., and van Heel, M. (2002). Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nat Struct Biol* 9, 849-854.
- Steffensen, S.A., Poulsen, A.B., Mortensen, K.K., and Sperling-Petersen, H.U. (1997). *E. coli* translation initiation factor IF2--an extremely conserved protein. Comparative sequence analysis of the *infB* gene in clinical isolates of *E. coli*. *FEBS Lett* 419, 281-284.
- Studer, S.M., and Joseph, S. (2006). Unfolding of mRNA secondary structure by the bacterial translation initiation complex. *Mol Cell* 22, 105-115.
- Subramanian, A.R., and Davis, B.D. (1970). Activity of initiation factor F3 in dissociating *Escherichia coli* ribosomes. *Nature* 228, 1273-1275.
- Sundari, R.M., Stringer, E.A., Schulman, L.H., and Maitra, U. (1976). Interaction of bacterial initiation factor 2 with initiator tRNA. *J Biol Chem* 251, 3338-3345.
- Takyar, S., Hickerson, R.P., and Noller, H.F. (2005). mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* 120, 49-58.
- Tomsic, J., Vitali, L.A., Daviter, T., Savelsbergh, A., Spurio, R., Striebeck, P., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., and Gualerzi, C.O. (2000). Late events of translation initiation in bacteria: a kinetic analysis. *EMBO J* 19, 2127-2136.
- Turnbull, W.B., and Daranas, A.H. (2003). On the value of *c*: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J Am Chem Soc* 125, 14859-14866.
- van Knippenberg, P.H., Hooykaas, P.J., and van Duin, J. (1974). The stoichiometry of *E. coli* 30S ribosomal protein S1 on in vivo and in vitro polyribosomes. *FEBS Lett* 41, 323-326.
- Varshney, U., Lee, C.P., and RajBhandary, U.L. (1993). From elongator tRNA to initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2305-2309.

- Velazquez-Campoy, A., and Freire, E. (2006). Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nat Protoc* 1, 186-191.
- Vivanco-Dominguez, S., Bueno-Martinez, J., Leon-Avila, G., Iwakura, N., Kaji, A., Kaji, H., and Guarneros, G. (2012). Protein synthesis factors (RF1, RF2, RF3, RRF, and tmRNA) and peptidyl-tRNA hydrolase rescue stalled ribosomes at sense codons. *J Mol Biol* 417, 425-439.
- von Bohlen, K., Makowski, I., Hansen, H.A., Bartels, H., Berkovitch-Yellin, Z., Zaytzev-Bashan, A., Meyer, S., Paulke, C., Franceschi, F., and Yonath, A. (1991). Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui* diffracting to 3 Å resolution. *J Mol Biol* 222, 11-15.
- Voorhees, R.M., Schmeing, T.M., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2010). The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome. *Science* 330, 835-838.
- Wang, J., Caban, K., and Gonzalez, R.L., Jr. (2015). Ribosomal initiation complex-driven changes in the stability and dynamics of initiation factor 2 regulate the fidelity of translation initiation. *J Mol Biol* 427, 1819-1834.
- Weickert, M.J., and Apostol, I. (1998). High-fidelity translation of recombinant human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 64, 1589-1593.
- Weiel, J., and Hershey, J.W. (1981). Fluorescence polarization studies of the interaction of *Escherichia coli* protein synthesis initiation factor 3 with 30S ribosomal subunits. *Biochemistry* 20, 5859-5865.
- Weiel, J., and Hershey, J.W. (1982). The binding of fluorescein-labeled protein synthesis initiation factor 2 to *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunits determined by fluorescence polarization. *J Biol Chem* 257, 1215-1220.
- Weijland, A., Harmark, K., Cool, R.H., Anborgh, P.H., and Parmeggiani, A. (1992). Elongation factor Tu: a molecular switch in protein biosynthesis. *Mol Microbiol* 6, 683-688.
- Wieden, H.J., Gromadski, K., Rodnin, D., and Rodnina, M.V. (2002). Mechanism of elongation factor (EF)-Ts-catalyzed nucleotide exchange in EF-Tu. Contribution of contacts at the guanine base. *J Biol Chem* 277, 6032-6036.
- Wilson, D.N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 12, 35-48.
- Wilson, D.N. (2016). The ABC of Ribosome-Related Antibiotic Resistance. *MBio* 7.

- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407, 327-339.
- Wintermeyer, W., and Gualerzi, C. (1983). Effect of *Escherichia coli* initiation factors on the kinetics of N-AcPhe-tRNA^{Phe} binding to 30S ribosomal subunits. A fluorescence stopped-flow study. *Biochemistry* 22, 690-694.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 179, 131-137.
- Woese, C.R., Dugre, D.H., Saxinger, W.C., and Dugre, S.A. (1966). The molecular basis for the genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55, 966-974.
- Wright, G.D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol* 8, 123.
- Wright, G.D. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun (Camb)* 47, 4055-4061.
- Wu, X.Q., and RajBhandary, U.L. (1997). Effect of the amino acid attached to *Escherichia coli* initiator tRNA on its affinity for the initiation factor IF2 and on the IF2 dependence of its binding to the ribosome. *J Biol Chem* 272, 1891-1895.
- Yoo, J.H., and RajBhandary, U.L. (2008). Requirements for translation re-initiation in *Escherichia coli*: roles of initiator tRNA and initiation factors IF2 and IF3. *Mol Microbiol* 67, 1012-1026.
- Yuan, J., O'Donoghue, P., Ambrogelly, A., Gundllapalli, S., Sherrer, R.L., Palioura, S., Simonovic, M., and Soll, D. (2010). Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems. *FEBS Lett* 584, 342-349.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292, 883-896.
- Yusupova, G.Z., Yusupov, M.M., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* 106, 233-241.

Zhang, D., Yan, K., Zhang, Y., Liu, G., Cao, X., Song, G., Xie, Q., Gao, N., and Qin, Y. (2015). New insights into the enzymatic role of EF-G in ribosome recycling. *Nucleic Acids Res* 43, 10525-10533.

Zhang, W., Dunkle, J.A., and Cate, J.H. (2009). Structures of the ribosome in intermediate states of ratcheting. *Science* 325, 1014-1017.

Zucker, F.H., and Hershey, J.W. (1986). Binding of Escherichia coli protein synthesis initiation factor IF1 to 30S ribosomal subunits measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* 25, 3682-3690.

Benoît MEYER

**Etude thermodynamique de
l'initiation de la traduction
et de l'élongation chez
*Escherichia coli***

Résumé

La traduction est un processus itératif réalisé par le ribosome. Chez *Escherichia coli*, le ribosome est composé d'une grande sous-unité 50S et d'une petite sous-unité 30S (S correspondant au coefficient de sédimentation). La traduction débute par la mise en place d'une interaction entre le codon d'initiation de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt initiateur. Cette interaction, finement régulée par les facteurs d'initiations IF1, IF2 et IF3, conduit à la formation du complexe d'initiation 30S (30SIC).

Par titration calorimétrique isotherme (ITC), nous avons disséqué la thermodynamique de l'ensemble des voies possibles de formation du 30SIC. Sur la base des affinités mesurées, il a été possible d'en déduire un ordre d'assemblage préférentiel. Par cryo-microscopie électronique, nous avons ensuite essayé d'obtenir la structure de ce complexe à haute résolution.

La fixation du 50S représente la dernière étape de l'initiation. Par ITC, nous avons cherché à en déterminer les paramètres thermodynamiques, puis nous avons poursuivi avec l'élongation en commençant par étudier l'incorporation d'un aminoacyl-ARNt.

Enfin, la réalisation d'une étude comparative par ITC de trois antibiotiques capables de se fixer au tunnel de sortie du peptide, nous a permis d'identifier les forces moléculaires mises en jeu lors de leur interaction avec le ribosome.

Mots clés : *Escherichia coli*, ribosome, thermodynamique, ITC, complexe d'initiation 30S

Summary

Translation is an iterative process achieved by the ribosomal machinery. In *Escherichia coli*, the ribosome is composed of a large 50S subunit and a small 30S subunit (S being the sedimentation coefficient). Translation begins with the establishment of the interaction between the mRNA codon and the initiator tRNA anticodon. This interaction, under the control of initiation factors IF1, IF2 and IF3, leads to the formation of the 30S initiation complex (30SIC).

Using isothermal titration calorimetry (ITC), we explored the thermodynamic landscape of all possible pathways for 30SIC formation. Based on affinities derived from ITC, we propose a preferred assembly pathway. Using cryo-electron microscopy, this knowledge was used to obtain high-resolution structures of 30SIC intermediates.

Binding of the 50S is the last step for initiation. Using ITC, thermodynamic parameters were derived followed by the incorporation of an aminoacyl-tRNA.

Lastly, we realized, using ITC, a comparative study of three antibiotics binding to the nascent peptide exit tunnel of the ribosome. This study leads us to determine the molecular forces involved in their interaction with the ribosome.

Keywords: *Escherichia coli*, ribosome, thermodynamics, ITC, 30S initiation complex