Université de Strasbourg

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UPR 9002 Architecture et Réactivité de l'ARN - IBMC

THÈSE présentée par :

Eva RENARD

Soutenue le : **09 décembre 2021**

Pour obtenir le grade de : **Docteure de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biophysique et Biologie Moléculaire

Études biophysiques et structurales d'antibiotiques ciblant le ribosome

THÈSE dirigée par :

Dr. ENNIFAR Éric — Directeur de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. YOSHIZAWA Satoko — Directrice de recherche, Université Paris-Saclay

Dr. INNIS Axel — Directeur de recherche, Université de Bordeaux

EXAMINATRICE :

Dr. SCHALK Isabelle — Directrice de recherche, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué dans l'UPR 9002 « ARN » du CNRS, dirigée par le Dr. Pascale Romby à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg. Ce travail a bénéficié du soutien de la région Grand Est.

Premièrement, j'aimerais remercier les membres du jury Dr. Axel Innis, Dr. Isabelle Schalk et Dr. Satoko Yoshizawa d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à Éric Ennifar, mon directeur de thèse, de m'avoir d'abord acceptée au sein de l'équipe et de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse. Merci de transmettre ta détermination, ton optimisme sans failles et merci d'avoir toujours valorisé mon travail.

Je remercie toute l'équipe « Structure et dynamique des machines biomoléculaires » Isabelle Lebars, Guillaume Bec, Philippe Wolff, Karl Brillet, Pascal Auffinger, Angelita Simonetti, Dominique Burnouf pour leurs nombreux conseils. Un merci particulier à Angelita pour la transmission de ton savoir de cryo-microscopiste électronique, pour tes encouragements et pour ton accueil toujours chaleureux. Un merci spécial aussi à Dominique pour ton aide avec ces fichues bactéries qui ne veulent pas toujours muter ou résister et pour ta bonne humeur toujours au rendez-vous !

Je remercie également tous les doctorants et stagiaires de l'IBMC que j'ai pu rencontrer et côtoyer durant ces trois années. Une chose est sûre ces rencontres nourrissent énormément la motivation nécessaire à la thèse. Merci à tous les habitués (et ceux de passage aussi) des PhD Seminar Nouvelle Génération pour ces moments « conviviaux » ! Merci à tous les mangeurs du RU pour ces discussions toujours passionnantes.

Un grand merci à Javier qui est devenu bien plus qu'un acolyte de labo mais bel et bien un ami. Il y a déjà tellement de souvenirs ensemble que je voudrais simplement te remercier pour ton soutien et ta présence. Tu es toujours motivé à faire les choses à fond, au travail ou en dehors, et c'est contagieux.

Un grand merci à Emma de m'avoir accompagnée pendant mes premiers pas de doctorante, merci de m'avoir transmis tout ton savoir de l'ITC et du ribosome. Tu fais également partie de mes amis désormais et je te remercie pour ta gentillesse et la façon que tu as de toujours voir le positif chez les gens.

Merci au dernier membre, mais pas des moindre, de cette team SeaYou, Elena. Je suis très heureuse d'avoir croisée ta route (chose pas si facile quand on y pense) et de te compter parmi mes amis aujourd'hui. Merci tout simplement d'être toi, à la fois douce et redoutable, sociale et antisociale, et d'avoir toujours été là depuis notre rencontre. Bientôt tu pourras le chanter et ce sera vrai « Eva maria se fue buscando el sol en la playa » !

Merci à tous les autres avec qui j'ai partagé de merveilleux moments à Strasbourg. Notamment Elenia, la plus italienne des Italiennes que j'ai pu rencontrer, je te remercie pour ces soirées et autres moments passés ensemble. Merci à Sophie, the Soph nationale, pour ce bout de

chemin en coloc et pour tout le reste, les concerts, les soirées, la vie quoi ! Merci d'avoir été la pendant ces années de Fac de Sciences également, sans toi je ne serais sûrement pas arrivée jusque-là !

Merci à mes amis de toujours, Audrey, Gagou, Lulu, David, Clémence et Soph (again) d'être toujours là, même de loin.

Merci à Aurélien. Merci pour ton amour, ton soutien et d'être toujours là pour me remonter le moral et me motiver. Ton calme et ta présence ont sans aucun doute participé à ma réussite.

Merci à mon père et à ma mère qui m'ont permis d'arriver jusque-là et d'être toujours curieux sur mon travail. Merci à ma mère qui a toujours confiance en moi et sera toujours fière de moi. Merci à mon grand frère et ma grande sœur d'être là et de me transmettre votre sagesse.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **i**

TABLE DES MATIÈRES ..... **iii**

ABRÉVIATIONS ..... **ix**

I. INTRODUCTION **1**

A. Histoire des antibiotiques **1**

1. Histoire et usage **1**

2. Antibiotiques et résistances **5**

2.1. Les différentes classes d'antibiotiques 5

2.2. Émergence des résistances 7

2.3. Types de résistances 9

2.3.1. Pompes à efflux 9

2.3.2. Mutation et modification de la cible 10

2.3.3. Modification et dégradation du médicament 11

2.3.4. Protection de la cible 11

2.3.5. Surexpression de la cible 12

3. Antibiotiques dans la recherche d'aujourd'hui **12**

3.1. Molécules synthétiques et semi-synthétiques 12

3.2. Approches alternatives 13

B. Antibiotiques ciblant le ribosome **15**

1. Les principaux antibiotiques ciblant le ribosome **15**

1.1. Antibiotiques ciblant la petite sous-unité du ribosome (30S) 17

1.1.1. Inhibiteurs se fixant au centre de décodage du 30S 17

1.1.2. Inhibiteurs se fixant aux sites P et E du 30 S 18

1.2. Antibiotiques ciblant la grande sous-unité du ribosome (50S) 20

1.2.1. Inhibiteurs se fixant au centre peptidyle-transférase du 50S 20

1.2.2. Inhibiteurs se fixant au tunnel de sortie des peptides du 50S 21

2. Macrolides **23**

2.1. Structure et classification 23

2.2. Mécanisme d'action 24

2.3. Usage 27

2.4. Mécanismes de résistance 28

2.4.1. Diminution de la concentration cellulaire en macrolides 29

2.4.2. Modification de la cible, le ribosome 29

2.4.3. Protection de la cible 30
2.4.4. Modification du macrolide 30
3. Aminoglycosides 32
3.1. Structure et classification 32
3.2. Mécanisme d'action 33
3.3. Usage 37
3.4. Mécanismes de résistance 40
3.4.1. Modification des aminoglycosides 40
3.4.2. Modification de la cible 41
3.4.3. Assimilation et efflux 42
3.4.4. Perméabilité 43
3.5. Sélectivité et effets secondaires 43
3.5.1. Sélectivité des aminoglycosides pour le site A bactérien 43
3.5.2. Effets secondaires 47
3.5.3. Mutation du site A mitochondrial et sensibilité accrue aux aminoglycosides 49
3.6. Développement d'aminoglycosides semi-synthétiques 50
3.6.1. Dérivés résistants aux AMEs 51
3.6.2. Augmentation de la sélectivité pour le ribosome bactérien 51
3.6.3. Résistance aux 16S-RMTases 52
II. APPROCHE INTÉGRATIVE 55
A. Objectifs de la thèse 55
B. Techniques pour étudier l'interaction entre un antibiotique et sa cible 56
1. Intérêt d'une étude intégrative 56
2. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) 57
2.1. Principes thermodynamiques 57
2.2. Microcalorimétrie par titration isotherme 58
2.3. Utilisation de l'ITC pour étudier des interactions biologiques 61
2.4. Caractérisation thermodynamique et design de médicaments 63
2.5. ITC et ARN 64
2.6. ITC par compétition 64
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES 67
A. Étude de l'interaction de ribosomes bactériens avec différents antibiotiques 67
1. Purification du ribosome bactérien 67
2. Dissociation des deux sous-unités du ribosome bactérien 68
3. Expérience ITC ribosome 70S - dérivés de Néomycine 68
4. Expérience ITC ribosome 70S compétition peptide antimicrobien – macrolide 69

5. Hybridation d'oligonucléotides aux ARNr pour l'étude des modifications 69
B. Étude ITC de l'interaction des dérivés de Néomycine avec leur cible 70
1. Transcription *in vitro* à grande échelle des oligonucléotides imitant les sites A 70
2. Purification des sites A transcrits 71
3. Préparation des sites A transcrits pour une expérience d'ITC 71
4. Expérience d'ITC site A - dérivés de Néomycine 72
C. Test *in vitro* d'inhibition de la traduction 72
1. Amplification du plasmide reporter luciférase pBESTluc 72
2. Production d'extraits bactériens à partir de la souche SL119 73
3. Traduction *in vitro* de la protéine reporter Luciférase 74
D. Production de ribosomes hybrides (Recht et al. 1999) 74
1. Souche TA531 74
2. Préparation des bactéries TA531 compétentes 74
3. Plasmide pKK3535 75
4. Maxi-préparation du plasmide pKK3535 75
5. Mutagénèse dirigée par PCR 76
6. Mini-préparation du plasmide pKK3535 muté 77
7. Transformation de la souche TA531 et perte de plasmide 78
E. Cristallisation de l'ARN DIS du VIH en présence de dérivés de Néomycine 78
1. Co-cristallisation ARN DIS / dérivés de Néomycine (structure boucle-boucle du DIS) 78
2. Co-cristallisation ARN DIS / dérivés de néomycine (structure en duplex du DIS) 79
3. Acquisition et traitement des données de cristallographie 80
F. Cryo-microscopie électronique 80
1. Complexe E. cloacae-TG196 80
1.1. Préparation des grilles pour la cryo-microscopie électronique 80
1.2. Acquisition des images 81
1.3. Analyse des images 81
2. Complexe E. coli-Érythromycine-Pyrrhocoricine 82
2.1. Acquisition des images 82
2.2. Analyse des images 82
IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION 85
A. Études des paramètres d'interaction des macrolides avec des ribosomes ESKAPE 85
1. Expériences d'ITC par compétition 85
1.1. Un peu d'histoire 85
1.2. Compétition pyrrhocoricine-macrolides pour des ribosomes ESKAPE 87

1.3. Étude des modifications au site d'interaction des macrolides 91

2. Étude de la co-fixation de la pyrrhocoricine et d'un macrolide dans le ribosome par Cryo-microscopie électronique 93

2.1. Motivations 93

2.2. Analyse des images obtenues par cryo-EM 94

2.3. Interprétation des résultats et hypothèses 99

2.4. Conclusions sur la co-fixation d'un peptide et d'un macrolide dans le tunnel de sortie ..102

B. Études des paramètres d'interaction des aminoglycosides avec le ribosome 104

1. Limites de l'étude des paramètres thermodynamiques de l'interaction des aminoglycosides avec le ribosome entier 106

2. Étude des paramètres d'interaction de dérivés de la néomycine avec le site A 108

2.1. Profils thermodynamiques 108

2.1.1. Profils thermodynamiques d'interaction avec le site A bactérien 108

2.1.2. Profils thermodynamiques d'interaction avec les sites A eucaryotes 111

2.2. Sélectivité des dérivés 112

2.2.1. Affinités d'interaction avec le site A bactérien 112

2.2.2. Affinités d'interaction avec les sites A eucaryotes 115

3. Étude du potentiel inhibiteur des dérivés 116

3.1. Tests d'inhibition de la traduction in vitro 116

3.2. Perspectives d'étude de l'inhibition de la traduction in vitro par les dérivés de néomycine119

4. Les composés les plus intéressants ? 121

5. Études structurales 123

5.1. Observation de l'interaction d'un dérivé avec un ribosome entier par cryo-EM 123

5.1.1. Motivations 123

5.1.2. Analyse des images obtenues par Cryo-EM 123

5.1.3. Conclusions et perspectives 125

5.2. Observation de l'interaction des dérivés avec un petit ARN par cristallographie 126

5.2.1. Études thermodynamiques 127

5.2.2. Études structurales des dérivés 130

V. CONCLUSION 137

ANNEXES 140

AUTRES TRAVAUX 152

Article 1 153

Article 2 165

Article 3 179

BIBLIOGRAPHIE 190

ABRÉVIATIONS

°C = degrés Celsius

2D = Deux dimensions

2-DOS = 2-désoxystreptamine

2D = Trois dimensions

5 S = ARN ribosomal de la grande sous-unité

16 S = ARN ribosomal de la petite sous-unité

23 S = ARN ribosomal de la grande sous-unité

30 S = petite sous-unité du ribosome

30 SIC = 30 S Initiation Complex

50 S = grande sous-unité du ribosome

70 S = ribosome entier

70 SIC = 70 S Initiation Complex

Δ = Delta

μg = microgrammes

μl = microlitres

μM = micro Molaires

Å = Angström

A = Adénine

AACs = Aminoglycoside Acetyltransferases

ABC = ATP Binding Cassette

ADN = Acide Désoxyribonucléique

AMEs = Aminoglycosides Modifying Enzymes

Amp = Ampicilline

AMP = Adénosine Mono Phosphate

ANTs = Aminoglycoside Nucleotidyltransferases

APHs = Aminoglycoside Phosphotransferases

Arg = Arginine

ARN = Acide Ribonucléique

ARNm = ARN messager

ARNr = ARN ribosomique(s)

ARNt = ARN de transfert

ATCC = American Type Culture Collection

ATP = Adénosine Triphosphate

AZI = Azithromycine

C = Cytidine

Ca = Calcium

Caco = Cacodylate

CD = Centre de Décodage

Cl = chlorure

CHL = Chloramphénicol

Cryo-EM = Cryo-Electron Microscopy (Cryo-microscopie électronique)

CTF = Contrast Transfer Function

CTP = Cytidine Triphosphate

CVMP = Committee for Medicinal Products for Veterinary Use

Da = Daltons

DIS = Dimerization Initiation Site

dNTP = désoxyribonucléoside triphosphate

DO = Densité optique

DTT = Dithiothréitol

e = électrons

Ecl = E. cloacae

E. coli = *Escherichia coli*

EDTA = acide éthylènediaminetétraacétique

EF-G = Elongation Factor G

EF-Ts = Elongation Factor Ts

EF-Tu = Elongation Factor Tu

Eres = Estérases

Erms = Erythromycin-resistant methyltransferases

ERY = Érythromycine

FDA = Food and Drug Administration

FRET = Fluorescence Resonance Energy Transfer

g = grammes

G = Guanine

GDP = Guanosine Diphosphate

Gly = Glycine

GTP = Guanosine Triphosphate

h = heures

H = Hydrogène

h44 = hélice 44

H69 = Hélice 69

ITC = Isothermal Titration Calorimetry

k ou K = Kilo (mille)

K = Potassium

Kan = Kanamycine

K_D = Constante de dissociation

kDa = kilo Daltons

Kpn = *K. pneumoniae, Klebsiella pneumoniae*

KSG = Kasugamycine

kV = kilovolts

L = Litres

LB = Lysogeny Broth

Lys = Lysine

LZD = Linézolide

M = Molaires

mA = milliampères

MAMs = Macrolide Arrest Motifs

MATE = Multidrug and Toxic compound Extrusion

Mes = acide 2-éthanosulfonique

MFS = Major Facilitator Superfamily

mg = milligrammes

Mg = magnésium

min = minutes

ml = millilitres

MLS_BK = Macrolides, Lincosamides, Streptogramines B, Kétolides

mM = milli Molaires

MOPS = acide 3-morpholino-1-propanesulfonique

MPD = Méthyl-pentanediol

MPHs = Macrolides Phosphotransférases

N = Azote

Na = Sodium

Néo = Néomycine

ng = nanogrammes

nm = nanomètres

nM = nano Molaires

NPET = Native Peptide Exit Tunnel

O = Oxygène

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

PAC = Pactamycine

Pae = *P. aeruginosa, Pseudomonas aeruginosa*

PCR = Polymerase Chain Reaction

PDB = Protein Data Bank

PET = Peptide Exit Tunnel

pH = potentiel hydrogène

PLP = Protéines Liant la Pénicilline

PrAMP = Proline-rich AntiMicrobial Peptide

Pro = Proline

PYR = Pyrrhocoricine

ram = ribosomal ambiguity

RF = Release Factor

rpm = Rotations par minute

RRF = Ribosome Recycling Factor

RMTases = rRNA methyltransferases

RND = Resistance Nodulation Division

S = Svedberg

SARM = *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline

SDS = Sodium Dodecyl Sulfate

sec = secondes

Site A = Site Aminoacyl

Site E = Site Exit

Site P = Site Peptidyl

SMR = Small Multidrug Resistance

Spc = Spectinomycine

T = Thymine

Tris-HCl = Tris (hydroxymethyl) aminomethane (THAM) hydrochloride

Tyr = Tyrosine

U = Unités

U = Uracile

UTP = Uridine Triphosphate

V = Volts

WHO = World Health Organization

WT = Wild-type

X = fois

I. INTRODUCTION

A. Histoire des antibiotiques

1. Histoire et usage

Les antibiotiques sont apparus dans la recherche et la médecine il y a plus d'un siècle et demi. L'histoire de leur découverte jusqu'à la fin de l'âge d'or des antibiotiques peut être retracée au travers de différentes dates et noms marquants (Mohr 2016). La définition d'antibiotique est donnée par S. A. Waksman (prix Nobel de physiologie ou médecine en 1952) dans les années quarante :

> « *Un antibiotique est une substance chimique, produite par des micro-organismes, qui a la capacité d'inhiber la croissance et même de détruire les bactéries et autres micro-organismes.* ».

Cette définition est aujourd'hui à nuancer, car trop restrictive. L'usage du mot antibiotique étant étendu aux composés synthétiques ou produits par les plantes, insectes et animaux. De plus, cette définition ne prend pas en compte la toxicité sélective des antibiotiques ni leur aspect thérapeutique (Bentley et Bennett, 2003). La cause des maladies infectieuses était longtemps ignorée, et malgré les observations d'inhibition de croissance bactérienne par des moisissures, le potentiel thérapeutique des antibiotiques restait méconnu. Effectivement les premières identifications de micro-organismes par Antonie van Leeuwenhoek au 17ème siècle ne furent pas immédiatement suivies par leur corrélation avec les maladies. Le pouvoir d'inhibition des bactéries par les moisissures fut mis en évidence de nombreuses fois avant le 19ème siècle. Mais il fallut attendre les postulats de Robert Koch sur le lien entre les bactéries et les infections pour y voir un potentiel thérapeutique. Ces postulats ont été publiés en 1884, à la suite des travaux de Koch sur l'agent de la tuberculose. Sa thèse ne fut pas immédiatement reconnue mais un des précurseurs de la recherche sur les antibiotiques est Ernest Duchesne qui fut un des premiers à essayer de comprendre le fonctionnement de l'inhibition de la croissance bactérienne par des moisissures, de nombreuses fois observée (Duchesne 1897).

Le premier antibiotique est décrit par Bartolomeo Gosio en 1893, c'est l'acide mycophénolique, qui est produit par *Penicillium brevicompactum* et agit contre *Bacillus anthracis.* Il est synthétisé pour la première fois en 1912. Le premier antibiotique synthétique est un dérivé de l'arsenic connu sous le nom de Salvarsan (***Figure 1***). Il est créé

par Paul Ehrlich et Alfred Bertheim en 1912 et devient un pionnier de la thérapie ciblée car sa découverte est issue d'un programme rationnel de sélection.

Après la première guerre mondiale, un effort commun de sélection d'antibiotiques synthétiques, plus précisément des composés sulfurés, est déployé car les blessés de guerre et les civils malnutris sont plus sensibles aux infections. Il en ressort notamment le sulfanilamide, commercialisé sous le nom de Prontosil. Cet antibiotique est en fait un précurseur, dégradé *in vivo*, qui cible un enzyme de la voie de l'acide folique.

En 1940, ont été découverts la quinine pour soigner la Malaria, le Salvarsan contre la syphilis et les composés sulfurés qui agissent contre la plupart des infections à un Cocci Gram +.

C'est alors que les antibiotiques de la classe des **β-lactamines** apparaissent en thérapie, avec la découverte de la pénicilline. Décrite par Alexander Fleming, sa structure établie par Florey et Chain, et sa production à grande échelle appréhendée par Heatley, la pénicilline apparait sur le marché du médicament en 1941. Rapidement apparaissent des résistances à ces antibiotiques causées par des β-lactamases. Commence alors l'âge d'or des recherches sur les antibiotiques, après la seconde guerre mondiale. La découverte de la pénicilline couplée à la reconnaissance des bactéries du sol en tant que source de nouveaux antibiotiques font qu'à cette époque toutes les entreprises pharmaceutiques se concentrent sur la recherche de nouveaux antibiotiques (Drews 2000).

Plusieurs classes d'antibiotiques naturels ont pu être identifiées grâce à ce programme de sélection. Le premier antibiotique mis sur le marché par l'industrie pharmaceutique américaine est la tyrothricine, polypeptide issu de *Bacillus brevis*, découvert par René Dubos en 1939. L'actinomycine, est le premier polypeptide antibiotique isolé à partir d'une souche de l'ordre des Actinomycètes (genre *Streptomyces*). Ce composé trop toxique pour un usage antibactérien est un des premiers antibiotiques découverts ayant des propriétés anticancéreuses. La bacitracine est également un mélange de polypeptides, issu de *Bacillus subtilis,* qui inhibe la synthèse des peptidoglycanes des bactéries à Gram positif.

La streptomycine, premier antibiotique de la famille des **aminoglycosides**, est découvert en 1944 (Schatz et al. 2005). Il est isolé à partir d'une souche de *Streptomyces anulatus.*

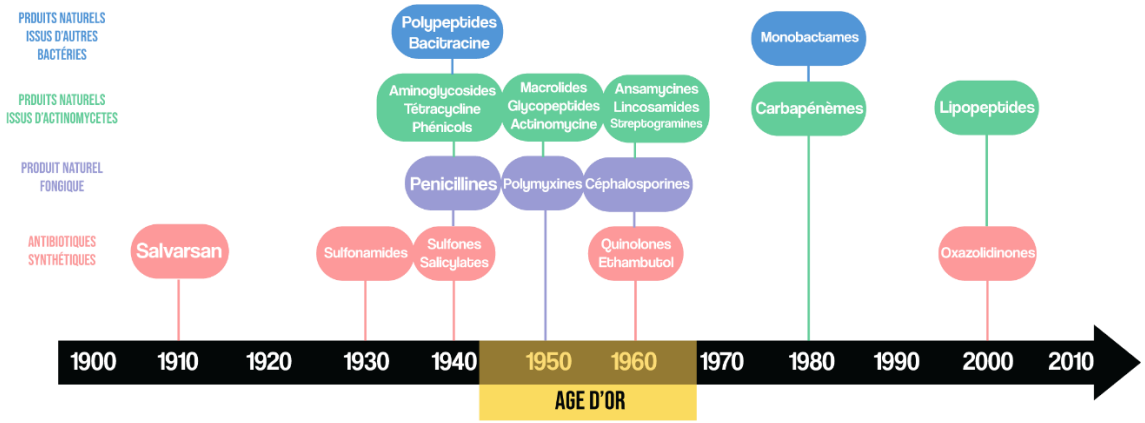


Figure 1 - Chronologie des arrivées sur le marché thérapeutique de nouvelles classes d'antibiotiques (adapté de Hutchings, Truman, et Wilkinson 2019). La source, synthétique ou naturelle, des antibiotiques est indiquée par une couleur : vert = actinomycètes, bleu = autres bactéries, violet = champignons et orange = synthétique.

Les aminoglycosides sont des antibiotiques à large spectre très puissants qui se lient à la sous-unité ribosomique 30S pour inhiber la synthèse des protéines bactériennes. La streptomycine fut le premier composé anti-tuberculose mis sur le marché, en 1946, et permis également de soigner des infections incurables avec la pénicilline. D'autres composés ont marqué l'histoire des aminoglycosides, comme la kanamycine, la gentamicine et la tobramycine, importants acteurs du traitement des infections à Gram négatif (Mingeot-Leclercq, Glupczynski, et Tulkens 1999). En 1949, la néomycine est isolée à partir d'une souche de *Streptomyces fradiae,* ce composé est actif contre des bactéries résistantes à la streptomycine, y compris *M. tuberculosis* (Waksman et Lechevalier, 1949). Cette famille d'antibiotiques est toujours utilisée en clinique, mais en raison de leurs propriétés médicinales insuffisantes et de leurs effets secondaires graves, ils sont réservés pour des thérapies combinées ou une application locale.

Une autre famille d'antibiotiques issues d'une bactérie du genre *Streptomyces* est la famille des **phénicols**, comprenant notamment le chloramphénicol, isolé à partir d'une souche de *Streptomyces venezuelae* (Ehrlich et al. 1947). Cet antibiotique est le premier à être synthétisé chimiquement (Controulis, Rebstock, et Crooks 1949).

Issue de différentes souches de *Streptomyces* également, la famille des **tétracyclines** représentait un choix intéressant en thérapie humaine et même en vétérinaire où ces composés étaient utilisés en tant que promoteurs de croissance pour les animaux (Chopra et Roberts 2001) car ils induisaient peu d'effets secondaires.

Cependant, l'émergence des résistances a freiné leur potentiel thérapeutique et industriel.

La classe majeure d'antibiotiques des **macrolides**, dont le premier composé découvert fut l'érythromycine, issue de *Streptomyces erythreus* (McGuire et al. 1952). Aujourd'hui, l'érythromycine reste un antibiotique de référence chez les patients allergiques à la pénicilline, contre les infections des voies respiratoires et contre la coqueluche. Plusieurs générations de macrolides ont été créées par la suite, les dérivés semi-synthétiques de seconde et troisième génération (les kétolides) permettent de contrer les mauvaises caractéristiques pharmacologiques et l'émergence des résistances (Dinos 2017).

Les **glycopeptides**, découverts au cours des années 50, sont des peptides non ribosomaux inhibant un stade tardif de la synthèse des peptidoglycanes. Le premier composé de cette famille est la vancomycine (Mccormick et al. 1955), isolé à partir de *Streptomyces orientalis*. Provoquant des effets secondaires, aujourd'hui, la vancomycine et le second composé de cette famille, la téicoplanine (Bochud-Gabellon et Regamey 1988) sont utilisées principalement pour soigner des infections graves à des bactéries à Gram positif résistantes notamment aux β-lactamines et des infections à *S. aureus* résistants à la méticilline.

Les **streptogramines** sont des peptides cycliques appartenant à différentes classes, composées d'au moins trois molécules de structures différentes (Charney et al. 1953). L'avantage apporté par un mélange complexe de molécule est que l'apparition de résistances pourrait être plus lente. Mais des résistances aux streptogramines ont quand même émergées à la suite de leur utilisation en thérapie. Les résistances ajoutées à des effets secondaires et l'arrivée sur le marché de composés simples comme le linézolide, un **oxazolidinone** (***Figure 1***) (Leach et al. 2011) ou la daptomycine, ont participé à la progressive inutilité de ces composés en thérapie.

La famille des **lincosamides** est constituée d'un composé naturel, la lincomycine découvert dans les années 60 et issue d'une souche de *Streptomyces lincolnensis,* et d'un composé semi-synthétique la clindamycine, qui est plus active que son homologue naturel. Leur activité est proche de celle des macrolides, ils agissent principalement sur des bactéries à Gram positif (Spížek et Řezanka 2017).

Les **ansamycines** est également une famille dont les membres dérivent d'un composé naturel issu de *Streptomyces mediterranei,* la rifamycine (Sensi, Greco, et Ballotta 1959). Certains de ces composés, comme la rifampicine, sont actifs contre *M. tuberculosis* et *M. leprae.* Aujourd'hui, ils sont utilisés en thérapie combinées à cause de l'émergence de résistances.

Le genre *Streptomyces* est donc un des producteurs les plus importants d'antibiotiques naturels. Près de deux tiers des antibiotiques connus sont issus de ce genre (Bérdy 2005). Cependant, aucun nouveau composé n'a été découvert à partir de *Streptomyces* depuis le milieu des années 80, époque à laquelle les carbapénèmes, composés de la famille des bêta-lactamines, furent découverts (Birnbaum et al. 1985).

Les années 60 ont vu apparaitre également les **quinolones**, produits synthétiques dont le premier, l'acide nalidixique, fut découvert accidentellement à partir d'un sous-produit de la synthèse de la chloroquine, un composé antimalarique (Lesher et al. 1962).

La famille découverte le plus récemment est celle des **oxazolidinones**, dont le premier composé est le linézolide permettent aujourd'hui de soigner de nombreuses infections dues à des bactéries à Gram positif multi-résistantes. Ce sont des composés synthétiques déjà découverts en 1987 (Ford et al. 1997) mais dont le premier dérivé fut accepté sur le marché en 2000.

Mais globalement, très peu de nouveaux antibiotiques sont apparus sur le marché au cours des 40 dernières années et l'émergence de résistances à toutes les familles d'antibiotiques conduisent vers un manque de thérapie contre les infections par des bactéries multi-résistantes.

2. Antibiotiques et résistances

2.1. Les différentes classes d'antibiotiques

Parmi les différents antibiotiques agissant contre les bactéries, certains ciblent la paroi bactérienne et plus précisément la synthèse des éléments qui la compose. La famille comportant le plus de membres est celle des β-lactamines. Ces composés interagissent avec les protéines liant les pénicillines (PLP), des enzymes impliquées dans la synthèse des peptidoglycanes. La paroi bactérienne est majoritairement composée de peptidoglycanes qui forment un maillage entourant la bactérie. Ces protéines, les PLPs, catalysent la formation de dipeptides permettant l'assemblage des couches de peptidoglycanes.

D'autres ciblent la membrane plasmidique, c'est le cas des polymyxines et des lipopeptides. Les polymyxines sont des polypeptides cycliques qui interagissent avec les phospholipides de la membrane bactérienne, induisant sa destruction. Les lipopeptides ont un mécanisme semblable, l'insertion de leur queue lipophile dans la membrane

cellulaire bactérienne, provoque une dépolarisation rapide de la membrane et un efflux des ions potassium conduisant à la mort de la bactérie (Steenbergen et al. 2005).

Certains ciblent la synthèse d'acides nucléiques. Les fluoroquinolones se lient à l'ADN et interfèrent dans la synthèse d'ADN en inhibant l'activité de l'ADN gyrase et de topoisomérases. Les rifamycines inhibent la synthèse d'ARN car ont une forte affinité pour l'ARN polymérase bactérienne.

D'autres encore ont pour cible des voies métaboliques. Les sulfonamides bloquent la voie de synthèse de l'acide folique, leur structure étant similaire au substrat naturel que la bactérie utilise pour produire la vitamine B9. Ce blocage conduit à l'inhibition de la synthèse des bases nucléiques et par conséquent à la mort cellulaire. Les isoniazides inhibent la voie de synthèse des acides mycoliques, composants essentiels de la paroi mycobactérienne (exemple de mycobactérie : *Mycobacterium tuberculosis,* agent responsable de la tuberculose).

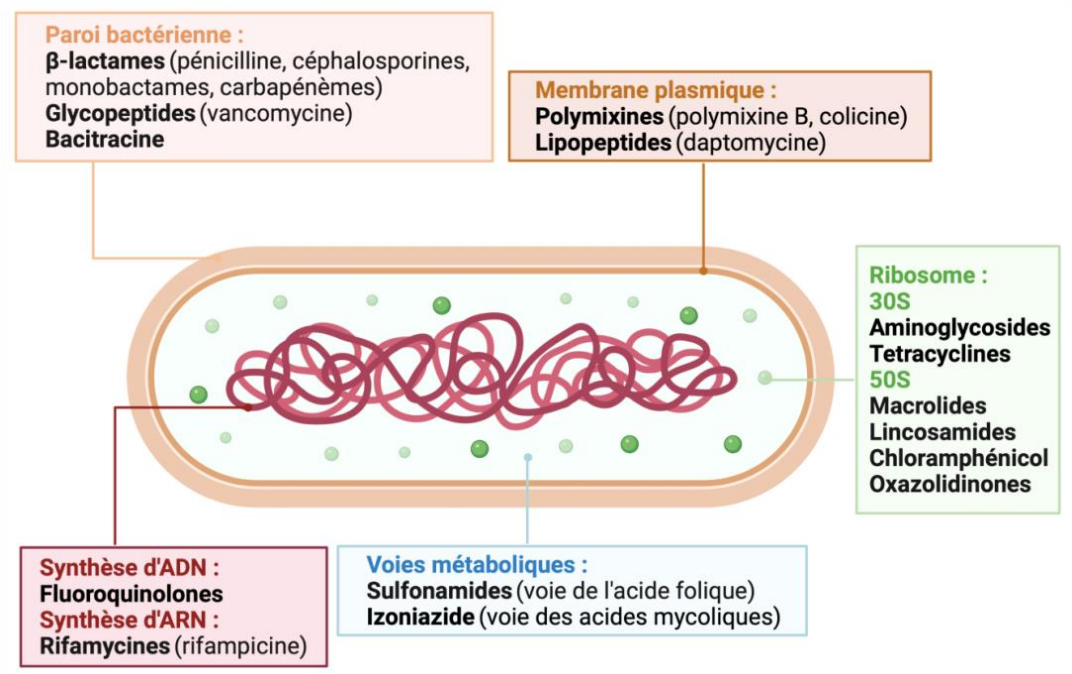


Figure 2 - Les différentes classes d'antibiotiques et leurs cibles (adapté de « Ch. 1 Introduction - Microbiology | OpenStax », créé avec BioRender.com). Représentation schématique d'une bactérie. La paroi bactérienne est représentée par un trait orange épais, la membrane bactérienne par un trait fin orange. Les traits rouges symbolisent l'ADN génomique. Les billes vertes représentent les ribosomes.

Enfin, la grande majorité des antibiotiques actuellement sur le marché ont pour cible le ribosome et par conséquent la traduction bactérienne, c'est-à-dire le mécanisme de décodage d'un ARN messager en protéine (***Figure 2***). Les principaux antibiotiques ciblant le ribosome et notamment deux grandes familles, les macrolides et les aminoglycosides, seront exposés en détail dans cette thèse.

2.2. Émergence des résistances

L'apparition d'une résistance est due à l'apparition spontanée de celle-ci dans un membre d'une colonie bactérienne. Si tous les membres sensibles de la colonie se retrouvent en présence de l'antibiotique, alors ne survivra que le membre résistant qui aura toute la place pour se multiplier et faire grossir une colonie résistante, la résistance se transmettant entre générations. Cela correspond au transfert de gêne vertical. De plus, les bactéries sont capables d'effectuer des échanges de patrimoine génétique par transfert de gêne horizontal, de bactérie à bactérie. La plupart des gènes de résistances étant encodés sur des transposons, des intégrons ou des plasmides.

La résistance aux antibiotiques est mise en évidence dès la découverte des premiers antibiotiques et dans un nombre croissant d'espèces bactériennes au cours des 50 dernières années.

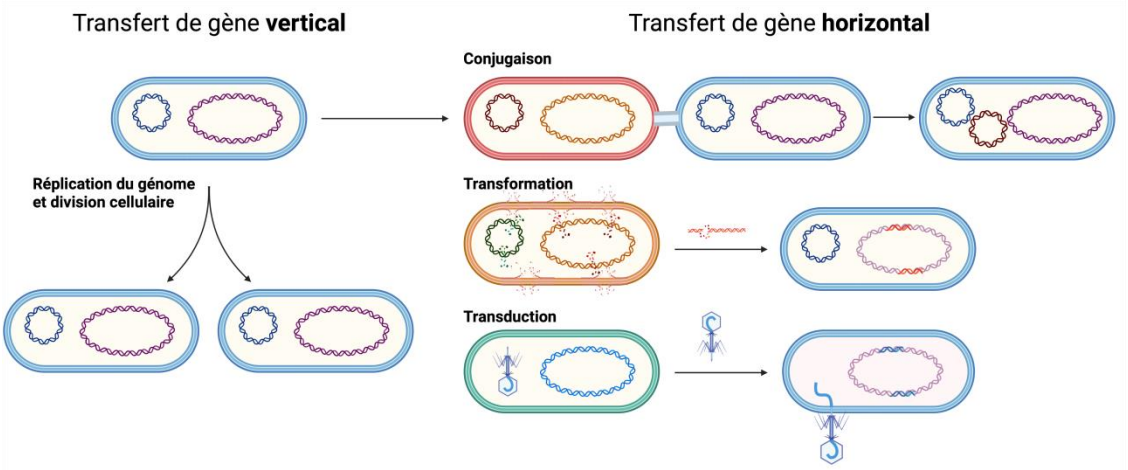


Figure 3 - Transferts de gènes entre bactéries (créé avec BioRender.com)

De nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont devenues multirésistantes. Notamment, le nombre croissant de souches responsables de la tuberculose en fait une des infections les plus importantes et les plus inquiétantes au

regard de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Beyer et al. 2020). Pourtant, la résistance aux antibiotiques est un phénomène qui a été décrit et anticipé avant même la mise sur le marché des premiers antibiotiques. Dès que les premiers médicaments ont été accessibles, des souches résistantes ont été identifiées. Les souches résistantes ne sont plus seulement nosocomiales mais émergent et se propagent également dans la communauté. Ce phénomène étant amplifié avec la mondialisation qui augmente les mouvements internationaux des personnes pour le commerce ou les voyages (Fernandes 2006). Le phénomène est aussi accentué par l'usage intensif d'antibiotiques dans l'agriculture, l'élevage et l'utilisation pour la médecine non contrôlée dans certains pays. Les antibiotiques sont souvent prescrits pour des maladies virales et peuvent parfois être mal utilisés par la population. La résistance se développe si le temps de traitement et le nombre de doses ne sont pas respectés. L'effet de contagion doit être pris en compte dans l'explication de l'augmentation des cas de résistance. Dans un premier temps, la résistance se développe par des mutations ou des transferts de gênes horizontaux puis elle se dissémine et ce sont les facteurs environnementaux, sociaux et économiques qui influent sur le taux de cette dissémination (Vikesland et al. 2019).

La plupart des mécanismes de résistance sont originellement issus de souches productrices d'antibiotiques, comme les actinomycètes (Davies et Davies 2010). Des preuves d'échange de gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries du sol et les agents pathogènes cliniques ont été mises en évidence (Allen et al. 2010), appuyant l'importance de l'environnement dans l'émergence de résistances. Aujourd'hui, la recherche sur certaines familles d'antibiotiques a été déclarée de première urgence et des bactéries multi-résistantes ont été mises sur liste rouge par l'OMS (Beyer et al. 2020). En effet, la dissémination des résistances aux antibiotiques est un phénomène mondial, qui n'est pas contraint géographiquement au sein des villes. Il a été montré, par exemple, que des isolats de bactéries (*E. coli*) provenant d'oiseaux de l'Arctique portaient des déterminants de résistance à un grand nombre de médicaments. Ce constant indique que des gènes de résistance peuvent être trouvés même dans une région isolée, sans pression de sélection pour la résistance aux antibiotiques (Sjölund et al. 2008).

Ce qui rend l'émergence des multirésistances très inquiétante est le fait que les antibiotiques ne servent pas seulement à soigner les infections mais aussi à les prévenir lors d'autres interventions telles que la chimiothérapie ou les césariennes. En Europe, il est estimé qu'au moins 25 000 personnes décèdent chaque année des suites d'infections hospitalières. Ces infections sont généralement causées par ces bactéries résistantes : *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. Pneumoniae*), *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) résistant à la méticilline (SARM) (Public Health England 2015).

2.3. Types de résistances

Les mécanismes de résistance communs aux antibiotiques sont la modification du composé, la modification ou la mutation de la cible et l'efflux du composé hors de la bactérie. De plus certaines souches sont naturellement résistantes à certains antibiotiques (***Figure 4***). C'est le cas des bactéries à Gram négatif et les mycobactéries qui sont naturellement résistantes aux macrolides, grâce à la faible perméabilité membranaire empêchant ces composés d'entrer dans la cellule.

2.3.1. Pompes à efflux

De nombreuses pompes à efflux sont responsables de l'extraction des antibiotiques présents dans le cytoplasme de la cellule. Elles sont classées en plusieurs familles selon les relations phylogénétiques, la structure et le mode d'action. Parmi elles, les **MFS** (« Major Facilitators Superfamily »), les **ABC** (« ATP Binding Cassette »), les **MATE** (« Multidrug And Toxic compound Extrusion »), les **RND** (« Resistance Nodulation Division ») et les **SMR** (« Small Multidrug Resistance ») qui peuvent être encodées sur le génome ou des plasmides et induire l'efflux de diverses familles d'antibiotiques (Li, Plésiat, et Nikaido 2015).

La plupart des pompes encodées sur le génome permettent l'efflux d'antibiotiques variés et leurs rôles au sein de la cellule ont été démontrés comme étant divers. Ces pompes servent à l'export de toxines environnementales ou l'excrétion de molécules utiles à la virulence ou à l'homéostasie (Martinez et al. 2009). Chez les bactéries à Gram positif, qui ne possèdent qu'une membrane externe, les pompes sont composées d'une seule protéine transmembranaire. La famille ABC est responsable de l'export de nombreux composés, la famille MATE permet l'efflux des aminoglycosides des fluoroquinolones et plus généralement des composés cationiques. Chez les bactéries à Gram négatif les pompes à efflux sont localisées sur la membrane interne et des facteurs, localisés dans l'espace périplasmique, permettent de relier ces pompes à une porine de la membrane externe, qui est dans la plupart des cas la porine TolC. La famille RND est responsable de l'export de nombreux composés, la famille ABC permet l'efflux des macrolides (Piddock 2006).

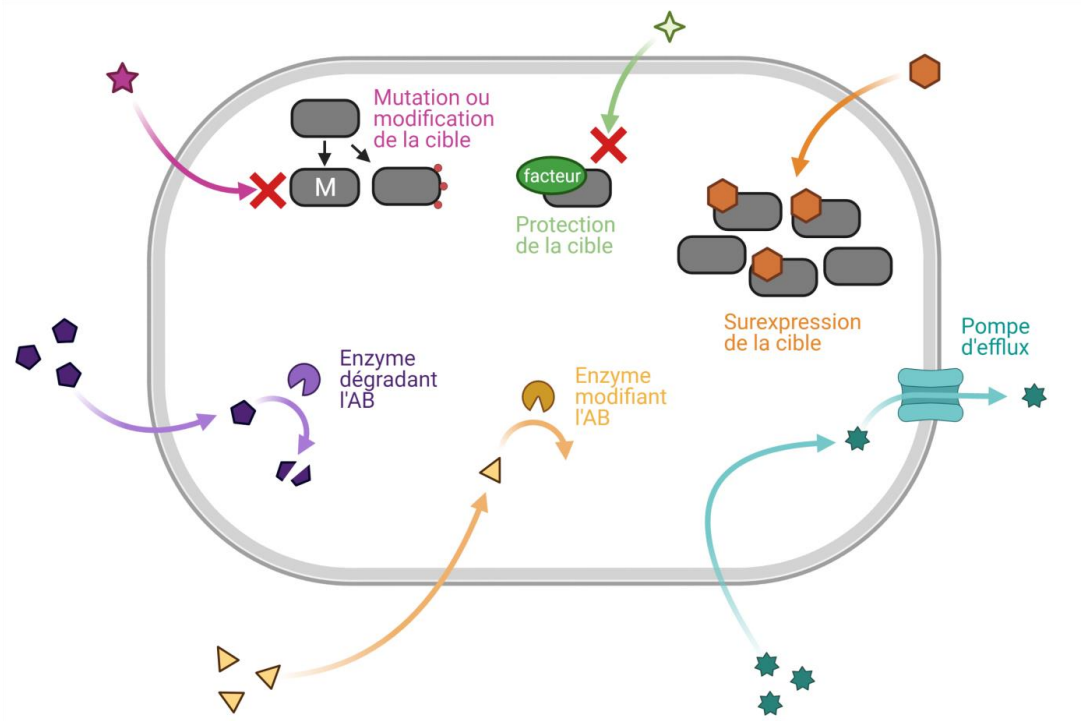


Figure 4 – Mécanismes de résistance aux antibiotiques (créé avec BioRender.com)

2.3.2. Mutation et modification de la cible

Un autre mécanisme de résistance consiste en la mutation de la cible conduisant à une affinité réduite pour l'antibiotique. Des mutations dans l'ARN polymérase et l'ADN gyrase, les enzymes ciblées par la rifampicine et les fluoroquinolones, respectivement, ont conduit à l'émergence d'une résistance à ces médicaments. L'affinité des bêta-lactamines pour leur cible, les PLPs, peut être diminuée par une mutation chromosomique (McManus 1997). Les antibiotiques qui ciblent le ribosome, c'est-à-dire le cœur de la machinerie cellulaire permettant la production de protéines, ciblent de manière générale l'ARN ribosomique (ARNr). Le ribosome est essentiellement composé d'ARN qui est donc la cible majeure des antibiotiques ciblant le ribosome. Une mutation du site d'interaction peut donc induire un fort taux de résistance. Cependant, la plupart des souches bactériennes comportent plusieurs copies des ARN ribosomaux et par conséquent un fort taux de résistance n'est possible que si la majorité des opérons sont mutés. Les mutations des protéines ribosomales peuvent aussi induire une résistance mais la plupart du temps de manière indirecte car peu de composés interagissent directement avec les protéines du ribosome. Cependant comme la plupart des antibiotiques actuellement utilisés ciblent des parties conservées du ribosome, la mutation de ces sites entrainent également un coût énergétique pour la cellule. Ce coût

peut parfois être diminué par l'apparition de mutations compensatoires permettant de restaurer une production de protéines suffisante (Wilson 2014).

La modification de la cible et notamment la méthylation des ARN ribosomaux par des ARNr méthyltransférases est l'un des mécanismes de résistance les plus caractérisés et représentés dans les souches cliniques. L'exemple des Erm méthyltransférases explique cette profusion. Ces enzymes catalysent la mono- ou di-méthylation le nucléotide A2058 de l'ARNr 23S et induisent une résistance à la fois aux macrolides, aux kétolides, aux lincosamides et aux streptogramines B.

La cible peut également être totalement remplacée. Par exemple, *S. aureus* a acquis une PLP exogène codée par le gène *mecA* ayant une faible affinité aux bêta-lactamines et conférant une résistance à tous les membres de cette classe (Hiramatsu et al. 2013).

2.3.3. Modification et dégradation du médicament

Les antibiotiques peuvent également être les cibles d'enzymes modificatrices qui peuvent induire une phosphorylation, une acétylation, une adénylation, une glycosylation ou une hydroxylation du composé. D'autres enzymes peuvent dégrader les antibiotiques. Les estérases clivent le macrocycle des macrolides, les rendant linéaires (Morar et al. 2012). L'exemple le plus connu est celui des bêta-lactamases qui ciblent les bêta-lactamines, l'activité de ces enzymes étant d'hydrolyser les composés chimiques contenant un cycle lactame (Bush 2018).

2.3.4. Protection de la cible

La cible de l'antibiotique peut interagir avec des facteurs qui induisent la dissociation du médicament du site d'interaction. Par exemple, les protéines TetO et TetM, des paralogues du facteur de traduction EF-G, se fixent à des ribosomes bloqués car liés à la tétracycline. Ils induisent la dissociation de la tétracycline et un changement de conformation empêchant le médicament de se fixer à nouveau (Dönhöfer et al. 2012). Une autre forme de protection est illustrée par la protéine Qnr, ayant une structure mimant l'ADN, qui interagit avec la gyrase et la topoisomérase IV et confère une résistance aux quinolones (Hooper 2002).

2.3.5. Surexpression de la cible

La surexpression du gène codant pour la cible d'un antibiotique est un mécanisme de résistance permettant d'annuler l'effet bactéricide ou bactériostatique de ce dernier. Le principe consiste à augmenter le nombre de cibles, ce qui permet à certaines d'entre elles de ne pas être liée par un antibiotique et de fonctionner normalement. Dans la plupart des cas, cette surexpression est liée à une mutation dans le promoteur du gène (Chopra 1998). Par exemple, la surexpression du facteur de traduction EF-Tu, cible de l'amythiamycine, permet de rétablir un niveau de traduction viable pour la bactérie (Gross et al. 2013).

3. Antibiotiques dans la recherche d'aujourd'hui

A cause de l'émergence trop rapide de résistances et de la difficulté de découvrir de nouveaux composés antibiotiques qui peuvent à la fois surmonter les résistances, être efficaces, non toxiques pour l'animal et assimilables facilement, le combat semble trop grand et perdu d'avance. Les antibiotiques en phase d'essai clinique aujourd'hui sont des dérivés de classes connues ou d'antibiotiques synthétiques (exemples télithromycine et solithromycine de la classe des macrolides). La plupart des entreprises pharmaceutiques ne s'intéressent plus à la recherche sur les antibiotiques, à cause de leur faible rendement. En effet, les nouveaux antibiotiques sont réservés au traitement d'infections graves à des pathogènes multi-résistant et le dosage est limité (Fair et Tor 2014).

3.1. Molécules synthétiques et semi-synthétiques

La production de molécules semi-synthétiques à partir de classes existantes semble une solution efficace car les risques toxicologiques ou de mauvaises efficacités peuvent être mieux anticipés. Cependant, ces nouveaux composés sont plus susceptibles d'être les cibles des mêmes résistances que les antibiotiques parents. Le développement de nouvelles classes d'antibiotiques serait nécessaire.

Depuis les années soixante, seulement six antibiotiques avec des squelettes différents des précédents ont été introduits sur le marché thérapeutique. Parmi eux, deux sont totalement synthétiques, le linézolide, un oxazolidinone accepté en 2000 (Leach et al. 2011) et la bédaquiline, un diarylquiniline accepté en 2012 (Goulooze, Cohen, et

Rissmann 2015). Mais la majorité des antibiotiques introduits au cours des trente dernières années sont d'origine semi-synthétique. Aujourd'hui il existe de nombreux exemples d'antibiotiques désormais utilisés ou prometteurs eux-mêmes dérivés de composés semi-synthétiques (Fair et Tor 2014). Il existe des composés semi-synthétiques dans la plupart des classes d'antibiotiques, par exemple le méropénème (bêta-lactamines), la tigécycline (tétracycline), l'amikacine (aminoglycoside), l'azithromycine (macrolide) ou la rifampicine (rifamycine) (Newman et Cragg 2007).

3.2. Approches alternatives

Le besoin d'approches alternatives pour créer de nouveaux antimicrobiens a donné naissance à différentes stratégies. La création de conjugués avec des molécules est une stratégie permettant de contrecarrer les points faibles de certains antibiotiques. Par exemple, si un composé ne peut pas pénétrer les cellules à Gram négatif, en le conjuguant à un autre reconnu par les systèmes de transport, l'efficacité du premier pourra être augmentée (Dassonville-Klimpt et Sonnet 2020). Ainsi, la conjugaison d'un antibiotique à un sidérophore permet de faire pénétrer l'antibiotique en utilisant les systèmes de transport du fer chez des bactéries à Gram négatif (Paulen et al. 2017, Negash, Norris, et Hodgkinson 2019).

La conjugaison d'un antibiotique avec un anticorps est aussi une stratégie utilisée. Un composé antibiotique-anticorps combine les attributs de l'anticorps et de l'antibiotique dans une seule molécule. Plus précisément, cela permet d'obtenir l'effet combiné antibactérien d'un antibiotique avec les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination associées aux anticorps. Une propriété importante étant notamment la longue demi-vie des anticorps. Un conjugué de ce type a été récemment rapporté comme prometteur dans le traitement d'infections à *Staphylococcus aureus* (Lehar et al. 2015, Mariathasan et Tan 2017).

Un antibiotique lié à une molécule photoactivable permet également d'améliorer l'efficacité bactéricide. Par exemple, la conjugaison de la gentamicine avec la porphycène, une molécule photosensible, permet de réduire la concentration d'antibiotique requise pour obtenir un effet bactéricide lors de l'exposition à la lumière pour laquelle la molécule est sensible (Nieves et al. 2020).

L'utilisation d'un peptide antimicrobien conjugué à un antibiotique est une stratégie envisagée car les peptides antimicrobiens sont une classe d'antibiotiques avec une plus faible propension à développer une résistance (Reinhardt et Neundorf 2016).

L'association des deux peut permettre d'augmenter l'activité antibactérienne ou la sélectivité pour la cible.

Un aspect plus lointain des connaissances scientifiques fondamentales qui permettrait d'augmenter potentiellement la découverte de nouveaux antibiotiques se trouve dans le partage des connaissances. Notamment le partage de connaissances concernant des recherches qui ont abouti sur des « échecs ». Cela permettrait de mettre en commun les voies déjà explorées et d'éviter la duplication de projets conduisant à des résultats négatifs (Yu 2021).

B. Antibiotiques ciblant le ribosome

1. Les principaux antibiotiques ciblant le ribosome

Le ribosome est la machine moléculaire principale de la synthèse protéique. C'est une macromolécule qui permet, à l'aide de différents facteurs, de traduire une séquence d'ARN messager (ARNm) en polypeptide composé d'acides aminés. Le ribosome est donc au cœur de la machinerie cellulaire car il permet de produire toutes les protéines nécessaires au fonctionnement de la cellule. Cette essentialité explique en partie pourquoi près de la moitié des antibiotiques utilisés en thérapie ciblent le ribosome. Ils inhibent cependant différentes étapes de la synthèse protéique (Wilson 2014) (***Figure 5***).

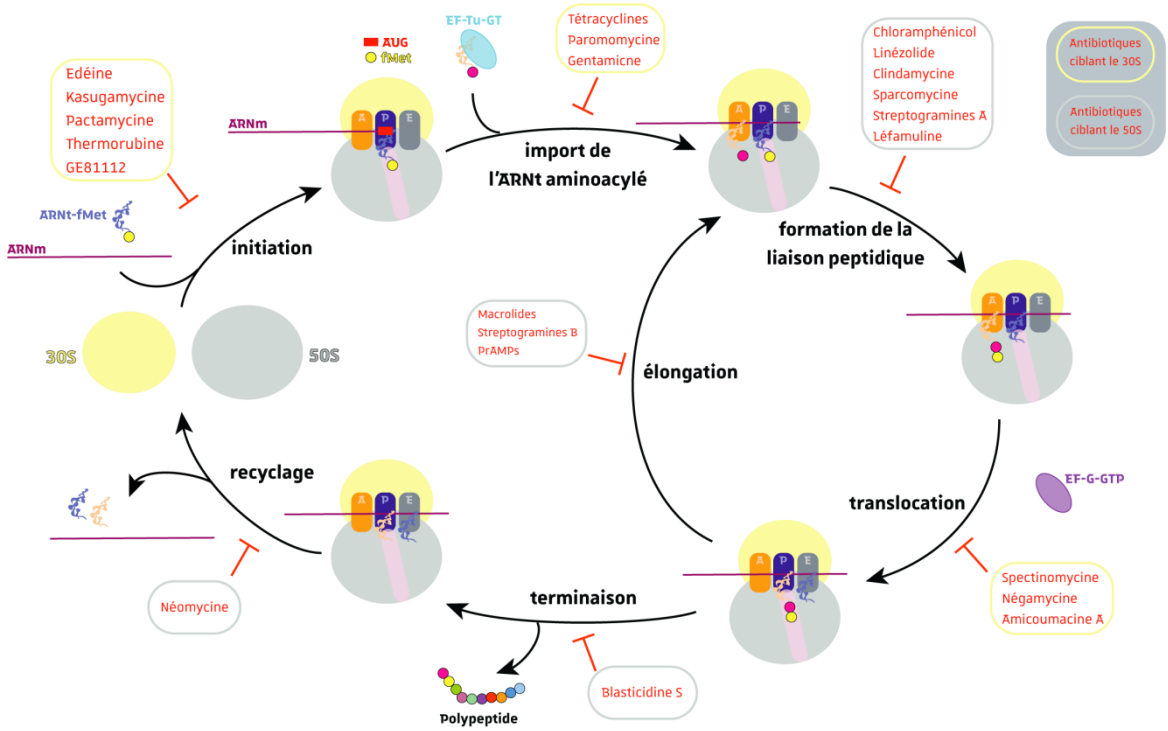


Figure 5 – Étapes de la traduction ciblées par les antibiotiques (adapté de Wilson et al. 2014). Les différentes étapes de la synthèse protéique procaryote et les antibiotiques les inhibant sont représentées. Les antibiotiques ciblant la petite sous-unité (30S) du ribosome sont encadrés en jaune, ceux ciblant la grande sous-unité (50S) sont encadrés en gris.

La synthèse protéique bactérienne se divise en quatre grandes étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage du ribosome. Le ribosome est composé de deux sous-unités, le 30 S et le 50 S, qui forment le ribosome 70 S. Celui-ci va se lier à l'ARN

messager. Chaque sous-unité contient des ARN ribosomiques (ARNr) et de nombreuses protéines. La sous-unité 30S comporte l'ARNr 16S et la sous-unité 50 S contient les ARNr 23 S et 5 S.

L'initiation est l'étape pendant laquelle le codon d'initiation, qui est généralement un codon AUG, de l'ARNm interagit avec l'ARN de transfert (ARNt) initiateur (fMet-ARNt^{fMet}) au niveau du site peptidyle(P)-ARNt, ou site P, de la sous unité 30 S du ribosome. Ainsi, se forme le complexe d'initiation 30 S ou 30 SIC, pour « 30 S Initiation Complex ». Cette étape est contrôlée par les facteurs d'initiation IF1, IF2 et IF3. À la suite du relargage des facteurs d'initiation, la sous-unité 50 S est recrutée au niveau du 30 SIC, formant le complexe d'initiation 70 S (70 SIC, « 70S Initiation Complex ») (Milón et Rodnina 2012).

L'étape d'élongation débute lors de la fixation du premier ARNt aminoacylé dans le site aminoacyle(A)-ARNt, ou site A. Les facteurs catalysant la réaction sont les facteurs d'élongation EF-Tu, EF-Ts et EF-G. L'élongation peut être divisée en trois étapes : le décodage, la transpeptidation et la translocation. Un complexe ternaire se forme entre l'ARNt aminoacylé et le facteur EF-Tu lié au GTP au niveau du site A. L'interaction du codon de l'ARNm avec l'anticodon de l'ARNt induit un changement de conformation de ce complexe ternaire, entrainant l'hydrolyse du GTP et la dissociation de EF-Tu. Le bras accepteur de l'ARNt est accommodé dans le site catalytique peptidyle-transférase du 50S, le site P, où a lieu la formation de la liaison peptidique. Ensuite, l'ARNt déacylé est transloqué du site P vers le site E (« Exit », sortie) et le peptidyle-ARNt est transloqué du site A vers le site P. Cette translocation est catalysée par le facteur EF-G lié au GTP. Le facteur EF-Ts participe au recyclage des complexes EF-Tu-GDP. Le peptide néo-synthétisé qui s'allonge au cours de la traduction se positionne dans le tunnel de sortie du ribosome ou NPET pour « Native Peptide Exit Tunnel » (Rodnina 2018).

La terminaison de la traduction est initiée lorsqu'un facteur RF (« Release Factor »), RF1 ou RF2, rencontre un codon STOP sur l'ARN messager. Le facteur RF se positionne dans le site A et induit l'hydrolyse de la liaison ester entre l'ARNt dans le site P et la chaine peptidique néo-synthétisée. La fixation d'un troisième facteur de terminaison est nécessaire pour dissocier les facteurs de terminaison du ribosome, par hydrolyse du GTP.

Pour recycler le ribosome, le facteur EF-G lié au GTP se fixe à ce dernier et induit la réorientation du facteur RRF (« Ribosome Recycling Factor ») générant la rupture du pont d'interaction B2a essentiel à l'association des deux sous-unités (Cate et al. 1999). L'hydrolyse du GTP permet le changement de conformation d'EF-G induisant la dissociation du 70 S.

Au sein du ribosome, seules les parties conservées et essentielles au fonctionnement de la synthèse protéique sont ciblées par des antibiotiques (Arenz et Wilson 2016, Lin et al. 2018) (***Figure 5***).

1.1. Antibiotiques ciblant la petite sous-unité du ribosome (30S)

Les antibiotiques qui ciblent la sous-unité 30 S se lie dans le centre de décodage (site A) ou au niveau des sites peptidyle-ARNt et de sortie de l'ARNt déacylé (sites P et E) (Lin et al. 2018) (***Figure 6A***). Ceux se liant au niveau du centre de décodage interfèrent avec l'import des ARNt aminoacylés et la reconnaissance codon-anticodon. Ceux qui se lient au niveau des sites P et E interfèrent avec l'initiation de la traduction mais aussi avec la translocation des ARN messager et de transfert.

1.1.1. Inhibiteurs se fixant au centre de décodage du 30S

Le centre de décodage, situé au niveau des régions de la tête et de l'épaule du 30 S et comportant le haut de l'hélice 44 (h44) de l'ARN ribosomal 16 S, est le lieu de reconnaissance entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt aminoacylé (**Figure *6B***). L'appariement de bases entre le codon et l'anticodon est permis par le retournement des nucléotides A1492 et A1493 de h44 qui forment des interactions de type « A-minor » (Lescoute et Westhof 2006). Cette interaction agit sur la géométrie des deux premières paires de bases formées entre le codon et l'anticodon. Ne sont permises que des paires de bases de type Watson-Crick, assurant ainsi l'incorporation de l'ARNt apparenté (Ogle 2001, Demeshkina et al. 2012).

Les tétracyclines et les aminoglycosides sont les principales familles d'antibiotiques ciblant les étapes d'import des ARNt et de reconnaissance entre codons et anticodons. Les tétracyclines empêchent la fixation d'un ARNt aminoacylé dans le site A car elles se lient au niveau du site de reconnaissance du codon par l'ARNt (Jenner et al. 2013). Les **tétracyclines** interagissent avec les groupements phosphates de l'ARNr 16 S au niveau de l'hélice, sans spécificité de séquence, ce qui leur confère une activité à large spectre. La plupart des aminoglycosides, comme la **paromomycine** ou la **gentamicine**, se lient au niveau de l'hélice 44 et favorisent la position retournée des nucléotides A1492 et A1493, ce qui induit l'incorporation d'ARNt non apparentés au niveau du site A. D'autres, comme la **spectinomycine**, améliorent l'affinité de l'ARNt pour le site A, empêchant sa translocation vers le site P (Carter et al. 2000). C'est le cas

également de la **négamycine**, un antibiotique peptidique, qui se lie dans l'hélice 34 de l'ARNr 16S en établissant également des liaisons avec l'anticodon de l'ARNt dans le site A. Ainsi, la négamycine inhibe la translocation de l'ARNt et favorise le mésappariement (Polikanov et al. 2014).

La **néomycine**, un aminoglycoside qui se lie à h44, possèderait un deuxième site d'interaction au niveau de l'hélice 69 (H69) de l'ARNr 23 S de la grande sous-unité. Cette hélice interagit avec h44 formant le pont B2a à l'interface entre les deux sous-unités ribosomiques. En se liant à H69, la néomycine rendrait les changements de conformation au niveau du pont B2a défavorables, ce qui déstabiliserait la translocation des ARNt et le recyclage du ribosome (Borovinskaya et al. 2007). D'autres antibiotiques se fixent au niveau de l'interface entre le 30 S et le 50 S. C'est le cas de la **thermorubine** (Bulkley, Johnson, et Steitz 2012) qui est structurellement semblable à la tétracycline mais se lie au niveau du pont B2a. En provoquant le réarrangement structural de certains nucléotides de H69, la thermorubine inhibe la fixation d'un ARNt au niveau de l'hélice 44 dans le site A.

1.1.2. Inhibiteurs se fixant aux sites P et E du 30 S

Le site peptidyle (P) est le site d'occupation du peptidyle-ARNt, c'est-à-dire l'ARNt qui est lié à la chaine polypeptidique en cours de traduction. Le site E est le site où est transloqué l'ARNt déacylé avant d'être dissocié du ribosome. Les aminoglycosides **kasugamycine** et **pactamycine** se lient au sein du canal de l'ARN messager dans la sous-unité 30 S, au niveau de bases qui interagissent normalement avec l'ARNt dans les sites P et E (Woodcock et al. 1991) (**Figure *6C***). La kasugamycine inhibe la fixation de l'ARNt initiateur (fMet-ARNt^{fMet}) dans le site P (Poldermans, Goosen, et Van Knippenberg 1979) et la translocation d'ARN messagers avec des séquences leaders (Chin et al. 1993, Schuwirth et al. 2006).

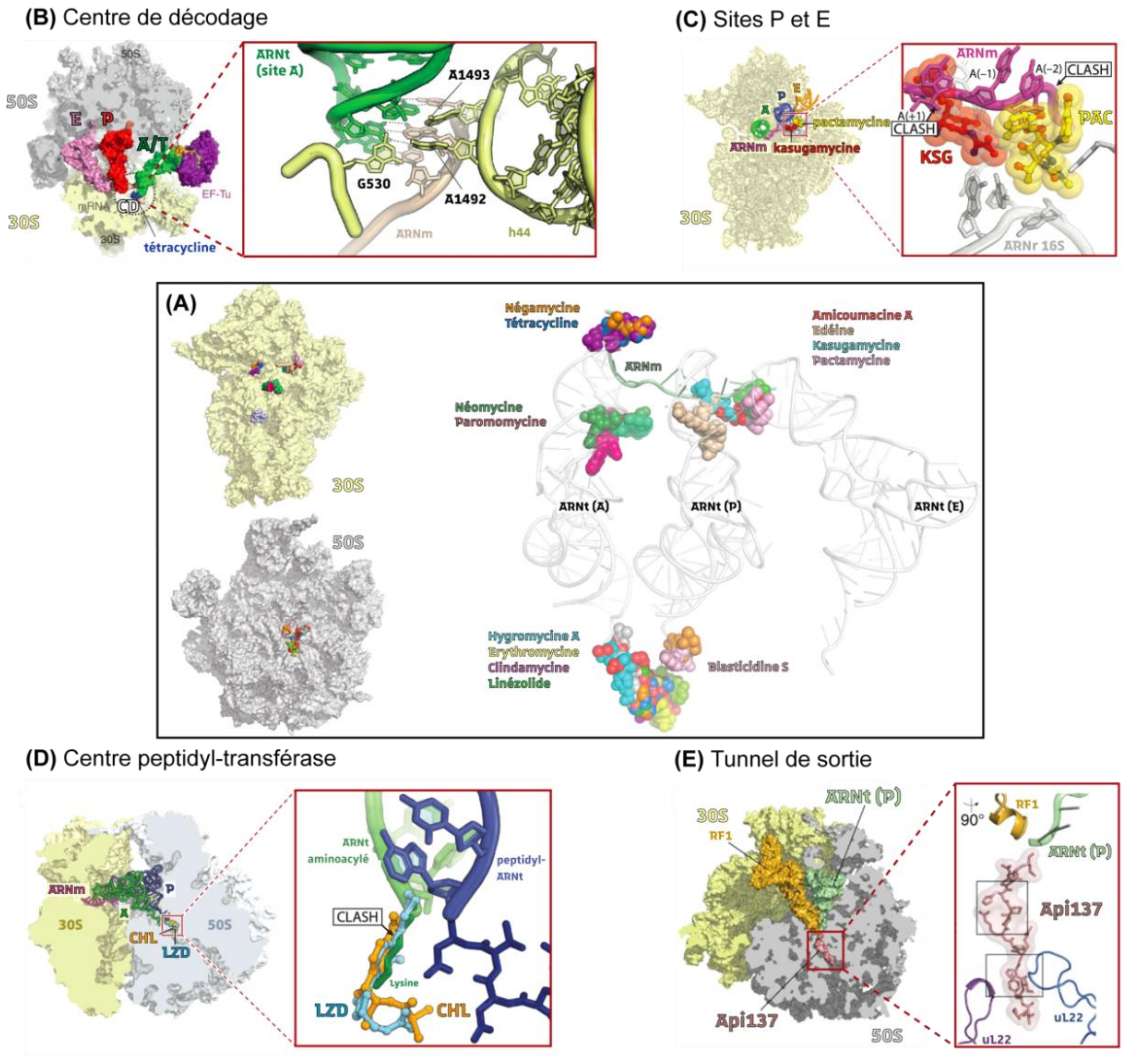


Figure 6 - Sites d'interaction d'antibiotiques ciblant le ribosome. (A) Sites d'interaction de différents antibiotiques au niveau des sites A, P et E du ribosome (adapté de Arenz et Wilson 2016a). (B) Site d'interaction au niveau du centre décodage (CD) des tétracyclines. Zoom sur les résidus impliqués dans l'interaction des antibiotiques ciblant le CD (adapté d'Arenz et Wilson 2016b). (C) Sites d'interaction de la kasugamycine (KSG) et de la pactamycine (PAC) au niveau des sites P/E (adapté de Vázquez-Laslop et Mankin 2018). (D) Interaction du linézolide (LZD) et du chloramphénicol (CHL) au niveau du centre peptidyle-transférase (adapté de Vázquez-Laslop et Mankin 2018). (E) Site d'interaction d'un PrAMP (Api137) dans le tunnel de sortie des peptides néosynthétisés (de Florin et al. 2017).

La pactamycine induit le déplacement de la position de l'ARNm dans le canal, provoquant une impossibilité d'interaction avec un ARNt présent dans le site E et par conséquent une inhibition de la translocation de l'ARNm et de l'initiation de la traduction (Schuwirth et al. 2006). L'**édéine**, un peptide cationique, induit la formation de paires de bases entre les nucléotides C795 et G693 de l'ARNr 16 S au niveau du site P, empêchant ainsi la liaison de l'ARNt initiateur (Pioletti et al. 2001). Au contraire, le tétrapeptide **GE81112**, qui se lie également au niveau du site P, stabilise l'interaction avec

l'ARNt initiateur dans une conformation inhibant l'initiation de la traduction (López-Alonso et al. 2017). L'**amicoumacine A** interagit avec des nucléotides de l'ARNr 16S au niveau du site E et du canal de l'ARNm. En interagissant à la fois avec l'ARNr 16 S et l'ARNm, l'amicoumacine inhibe la translocation de l'ARNm le long du canal (Polikanov et al. 2014).

1.2. Antibiotiques ciblant la grande sous-unité du ribosome (50S)

Les antibiotiques qui ciblent la sous-unité 50S se lie dans le centre peptidyle-transférase (site A ou P) ou au niveau du tunnel de sortie des peptides naissants (NPET) (Lin et al. 2018). Ceux se liant au niveau du centre peptidyle-transférase interfèrent avec la formation de la liaison peptidique. Ceux qui se lient au niveau du tunnel de sortie interfèrent avec l'élongation de la chaine polypeptidique naissante.

1.2.1. Inhibiteurs se fixant au centre peptidyle-transférase du 50S

Le centre peptidyle-transférase est le lieu de formation de la liaison peptidique. En effet, l'activité catalytique du ribosome est portée par l'ARNr 23S qui catalyse la réaction de transfert de la chaine polypeptidique depuis l'ARNt présent dans le site P vers l'ARNt aminoacylé présent dans le site A (Nissen et al. 2000). Cette fonction étant essentielle à la synthèse protéique, une majorité des classes d'antibiotiques cible ce centre et de nombreux composés ont des mécanismes d'inhibition similaires (Lin et al. 2018).

Le **chloramphénicol** se lie au niveau du site A dans le 50 S et empêche la fixation de l'acide aminé de l'ARNt aminoacylé dans la crevasse du site A. Cette crevasse est une fissure entourée par les bases des nucléotides U2504, A2451 et C2452 (numérotation *E. coli*) de l'ARNr 23 S. Le site liaison du chloramphénicol chevauche celui de la chaine latérale de l'acide aminé. Cependant cette inhibition semble spécifique à certains acides aminés et donc dépendante de la séquence de l'ARN messager en cours de traduction (Marks et al. 2016). Le **linézolide**, de la famille des oxazolidinones, se lie également au niveau de la crevasse du site A, en formant des empilements avec les bases des nucléotides U2504 et C2452. Cette position induirait une collision avec l'extrémité CCA de l'ARNt aminoacylé (Ippolito et al. 2008) (**Figure *6D***). La **clindamycine**, un dérivé semi-synthétique de la famille des lincosamides, obstrue la liaison de l'ARNt aminoacylé dans

le site A (Dunkle et al. 2010), tout comme l'aminoglycoside **sparcomycine**, qui établit des interactions hydrophobes avec la crevasse du site A (Hansen, Moore, et Steitz 2003).

La **sparcomycine** établit également des interactions d'empilement avec l'extrémité CCA de l'ARNt dans le site P et la base A2062, ce qui induit la stabilisation de l'ARNt dans le site P et favorise la translocation de l'ARNt situé dans le site A (Southworth et Green 2003). C'est également le rôle supposé de la **blasticidine S**, un analogue de nucléoside, qui occupe le site P de la grande sous-unité (Hansen, Moore, et Steitz 2003). La structure cristalline de la blasticidine S en complexe avec le ribosome de *Thermus thermophilus* montre que le composé forme une interaction de type Watson-Crick avec le nucléotide G2251 de l'ARNr 23 S et induit la distorsion de l'ARNt dans le site P (Svidritskiy et al. 2013). En bloquant l'ARNt dans cette position, la blasticidine S inhibe l'hydrolyse de l'ARNt par les facteurs de dissociation.

Les streptogramines de type A sont des antibiotiques qui interfèrent également dans la fixation des ARNt, au niveau à la fois du site P mais aussi du site A. En fonction du composé, les **streptogramines A** peuvent permettre la fixation de l'ARNt dans le site A ou P mais empêcher le positionnement correct de l'extrémité CCA inhibant la formation de la liaison peptidique, c'est le cas pour la **madumycine II** (Osterman et al. 2017). Quant à la **virginiamycine M**, qui établit des interactions hydrophobes au niveau de la crevasse du site A, sa fixation induit une inhibition de l'interaction des ARNt dans les sites A et P (Chinali, Moureau, et Cocito 1984, Hansen, Moore, et Steitz 2003). La **léfamuline**, antibiotique récemment accepté sur le marché thérapeutique, se lie également au centre peptidyle-transférase, comme les autres membres de la famille des pleuromutilines. La léfamuline entrave le positionnement de l'ARNt sur les sites P et A (Eyal et al. 2016, Lin et al. 2018).

1.2.2. Inhibiteurs se fixant au tunnel de sortie des peptides du 50S

Au cours de l'élongation, la chaine polypeptidique naissante accrochée à un ARNt se positionne dans un tunnel au sein de la sous-unité 50 S du ribosome (Nissen et al. 2000). Ce tunnel est non seulement un passage pour le polypeptide mais également un lieu où l'interaction des résidus formant le tunnel avec le polypeptide naissant peut moduler la traduction et réguler l'expression de gènes (Wilson, Arenz, et Beckmann 2016).

Parmi les antibiotiques ciblant le tunnel de sortie des peptides naissants, se trouve les macrolides. Le mécanisme d'inhibition de l'**érythromycine**, macrolide naturel, avait

été décrit comme étant dû à une simple obstruction du tunnel, qui entraine le départ du peptidyle-ARNt. Mais d'autres expériences ont nuancé cette hypothèse. Les macrolides ont un effet d'inhibition dépendant de la séquence en cours de traduction et agissent plus comme des modérateurs que de simples inhibiteurs. Certaines séquences protéiques induisent l'arrêt de la traduction et d'autres peuvent être traduites complètement, même en présence de l'antibiotique (Davis, Gohara, et Yap 2014, Kannan et al. 2014).

Les streptogramines de type B sont le deuxième type de molécules composant les streptogramines. Les streptogramines de type A et B fonctionnent en synergie, elles ont donc des sites de liaisons différents (Vannuffel et Cocito 1996). Les **streptogramines B** ont un site d'interaction chevauchant celui des macrolides et interfèreraient avec le passage de la chaine polypeptidique dans le tunnel. L'effet synergique des streptogramines est prouvé par le cas de la quinupristine, de type B et de la dalfopristine, de type A et qui se lie au centre peptidyle-transférase. En interagissant de manière commune au nucléotide A2062 de l'ARNr 23S, les composés induisent un changement de conformation inhibant la synthèse protéique (Harms et al. 2004).

Les peptides antimicrobiens riches en proline (PrAMP, « Proline-rich AntiMicrobial Peptides ») sont des antibiotiques produits par les insectes et les mammifères. Ils bloquent le tunnel de sortie peptidique du ribosome en se liant dans le sens inverse de la chaine polypeptidique naissante. La plupart des PrAMPs comme la **pyrrhocoricine**, la **métalnikovine** et **Bac7** ont un site d'interaction qui chevauche celui de l'ARNt aminoacylé dans le site A et inhibent la synthèse protéique dès l'initiation (Gagnon et al. 2016). Un exemple différent est celui d'un dérivé de l'**apidaécine**, Api137, qui se lie au ribosome pendant la terminaison et piège les facteurs de terminaison 1 ou 2 (RF1 et RF2) après la libération de la chaîne polypeptidique naissante (Florin et al. 2017) (**Figure *6E***).

Après avoir introduit de manière globale, la plupart des antibiotiques ciblant le ribosome. Nous allons maintenant prêter une attention plus particulière à deux grandes familles, les macrolides et les aminoglycosides. Ils ciblent respectivement le 50 S et le 30 S et sont les deux classes d'antibiotiques au cœur de mon projet de thèse.

2. Macrolides

2.1. Structure et classification

Les macrolides sont la troisième famille d'antimicrobiens la plus importante après les bêta-lactamines et les aminoglycosides. Ils sont produits par les polycétides synthase de différentes espèces de *Streptomyces* (Hopwood 1997). La structure des macrolides est définie par la présence d'un macrocycle lactone de 12 à 18 atomes auquel sont liés un ou plusieurs hexoses en positions C3 et C5. La plupart des macrolides utilisés en thérapie ont des cycles à 14 ou 15 atomes (***Figure 7***). Par exemple, l'érythromycine comporte un cycle lactone à 14 atomes avec en position C3 un cladinose et en position C5 un désosamine. Les macrolides peuvent donc être classés en fonction du nombre d'atomes dans le macrocycle mais aussi de leur génération.

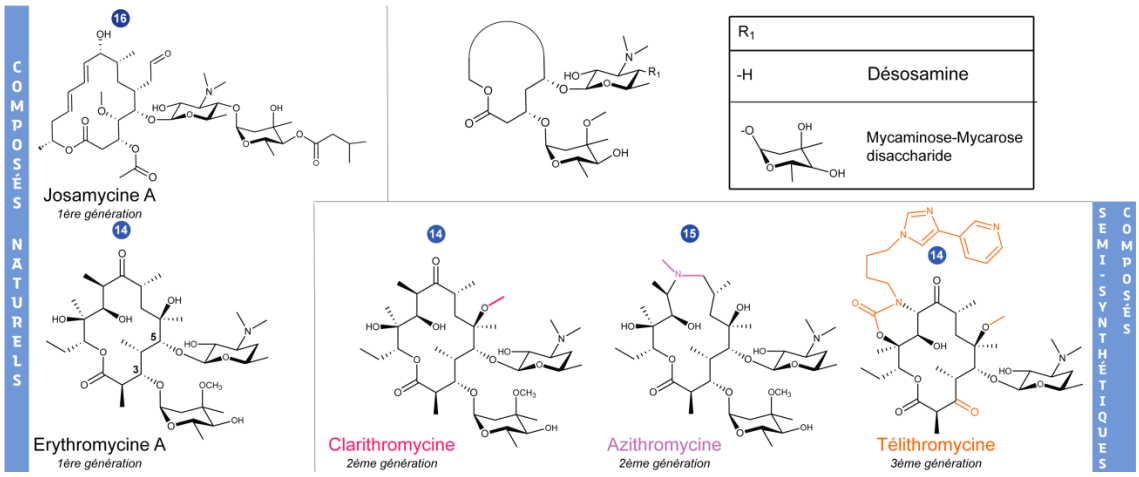


Figure 7 - Structures de macrolides de différentes générations (adapté de Golkar, Zieliński, et Berghuis 2018, créé avec ChemDraw®). La structure commune à tous les macrolides est représentée en haut à droite de la figure. Le nombre d'atomes du macrocycle lactone est indiqué par un cercle bleu. Les modifications apportées à l'érythromycine naturelle pour les composés semi-synthétiques sont colorées en rose, violet ou orange. La troisième génération correspond aux kétolides.

Afin d'améliorer les propriétés pharmacologiques des macrolides naturels, des composés semi-synthétiques basés sur le squelette de l'érythromycine ont été créés. La clarithromycine, macrolide de deuxième génération, a une structure semblable à celle de l'érythromycine avec une méthylation en position C6 du groupement hydroxyle. Cette

modification améliore la stabilité en milieu acide du composé, favorisant l'absorption de l'antibiotique par voie orale.

Puis, la pression induite par l'émergence de résistances a poussé à la création d'une troisième génération de macrolides, les kétolides. Un changement plus radical dans la structure de l'érythromycine a été effectué, le cladinose en position C3 est remplacé par un groupement cétone. De plus, la plupart des kétolides possèdent une chaine alkyle-aryle dont la position peut varier sur le cycle lactone (Dinos 2017, Golkar, Zieliński, et Berghuis 2018). Beaucoup d'efforts ont été déployés pour améliorer l'activité des kétolides, mais seules la télithromycine (en 2004) et la solithromycine (en 2016) furent acceptées par la Food and Drug Administration (FDA, « Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux »).

2.2. Mécanisme d'action

Les macrolides interfèrent dans la synthèse protéique en se fixant à la grande sous-unité du ribosome bactérien. Ils interagissent au niveau du tunnel de sortie du peptide naissant (« Native Peptide Exit Tunnel », NPET) à proximité du centre peptidyle-transférase (« Peptidyl-transferase Center », PTC) (***Figure 8***). Les différentes générations de macrolides ont des similarités d'interaction. Le macrocycle lactone des macrolides des différentes générations est orienté de la même manière dans le tunnel de sortie (Dunkle et al. 2010, Bulkley et al. 2010), la partie hydrophobe du cycle lactone est stabilisée contre les nucléotides 2611 et 2057 (numérotation *E. coli*) de l'ARNr 23 S. Le fragment désosamine/mycaminose en position C5 forme des liaisons hydrogènes avec les adénines 2058 et 2059 (numérotation *E. coli*) (Garza-Ramos et al. 2001, Hansen et al. 2002) (***Figure 8C***).

L'inhibition de la traduction par les macrolides fut longtemps considérée comme due uniquement à l'obstruction du tunnel empêchant le transfert la progression des peptides néo-synthétisés (Menninger et Otto 1982). En effet, pour la majorité des protéines, la fixation du macrolide induit l'arrêt de la synthèse protéique et la dissociation du peptidyle-ARNt. La taille du peptide synthétisé en présence de l'antibiotique varie entre 5 et 11 acides aminés en fonction de la taille de la ramification en position C5 du cycle lactone, cette branche pointant vers le centre peptidyle-transférase (Hansen et al. 2002, Tenson et al. 2003).

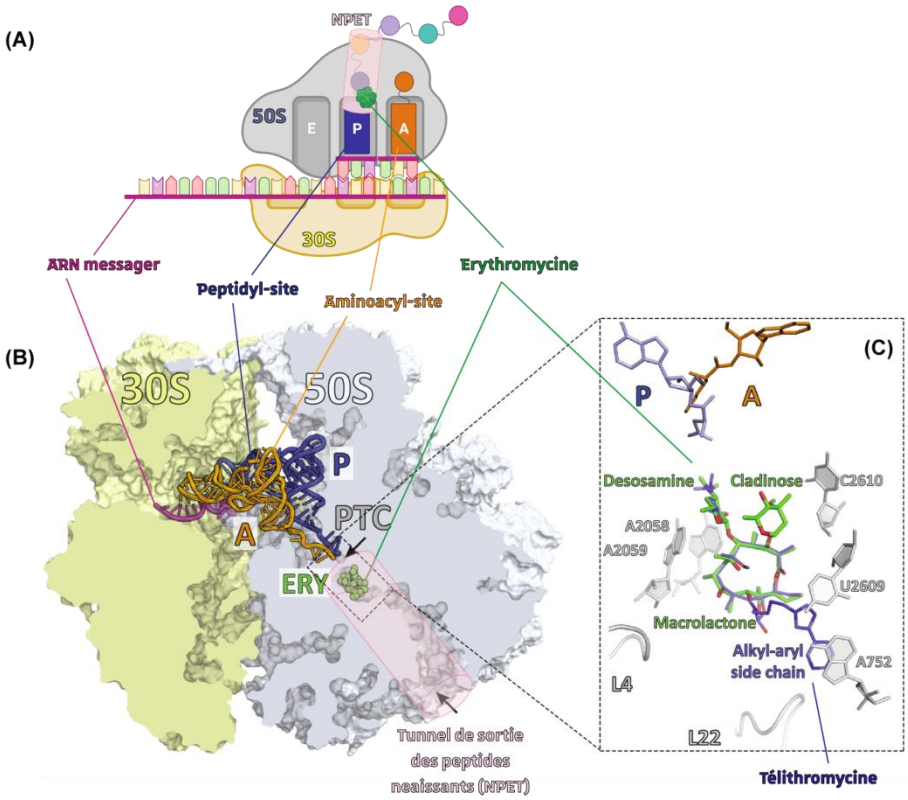


Figure 8 – Site d'interaction des macrolides au cœur du tunnel de sortie des peptides naissants. (A) Représentation schématique du ribosome en cours de traduction avec un macrolide lié dans le tunnel de sortie des peptides naissants (créé avec BioRender.com). (B) Coupe du ribosome en cours de traduction (adapté de Vázquez-Laslop et Mankin 2018) dans laquelle est représentée l'érythromycine (en vert), les ARNt dans les sites A (en orange) et P (en violet), et l'ARN messager (en bordeaux). (C) Zoom sur le site d'interaction des macrolides au sein du tunnel de sortie des peptides naissants (NPET) (adapté de Vázquez-Laslop et Mankin 2018). Les antibiotiques érythromycine (en vert) et télithromycine (en violet) ont été superposés. Leur cycle lactone interagit de manière similaire, par interactions hydrophobes, avec le tunnel. Le désosamine en C5 interagit par liaisons hydrogènes avec les résidus A2058 and A2059 de l'ARNr 23 S.

Cependant, les macrolides ne sont pas de simples inhibiteurs de la synthèse protéique mais des modulateurs de la traduction (Mankin, 2008). Le tunnel de sortie pourrait être assez large pour fixer en même temps un macrolide et le peptide néo-synthétisé (***Figure 9A***). Certaines séquences auraient la capacité de contourner l'antibiotique dans le tunnel, conduisant à la synthèse de peptides longs ou à l'arrêt de la traduction au niveau d'une séquence ultérieure (Kannan et al. 2012). En effet, il a été prouvé, notamment par des expériences de ribosome-profiling, que les macrolides induisent l'arrêt du ribosome au niveau de suites de codons de l'ARNm correspondant à des combinaisons spécifiques d'acides aminés (Kannan et al. 2014, Vázquez-Laslop et Mankin 2018). Le ribosome-profiling ou Ribo-seq est une technique de séquençage à haut débit permettant l'identification de fragments d'ARN en cours de traduction car ceux-ci,

étant liés au ribosome, sont résistants à la digestion par une RNase (Ingolia et al. 2009). Ces codons ont été appelés MAMs pour Macrolide Arrest Motifs et sont des combinaisons de codons accepteur et donneur. Ils rendent difficile la formation de la liaison peptidique, à cause de la charge et de la taille des acides aminés. Ce phénomène serait accentué par la présence d'un macrolide lié au ribosome (Sothiselvam et al. 2016). Différents motifs d'acides aminés sont favorables à l'arrêt de la traduction induit par les macrolides, le plus important étant le motif de séquence tripeptidique R/K-X-R/K, où R et K désignent les acides aminés arginine et lysine, respectivement, et X représente n'importe quel acide aminé.

Ce mécanisme d'arrêt de la traduction programmée par des séquences spécifiques en présence de macrolides est exploité pour l'expression de gènes de résistance aux macrolides. Par exemple, la traduction du peptide ErmD codant une enzyme de méthylation des macrolides est induite par le blocage du ribosome au niveau d'un peptide leader (**Figure *9C***). La fixation du macrolide dans le tunnel de sortie du ribosome et son interaction avec certains résidus du peptide néo-synthétisés induisent le changement de conformation de nucléotides de l'ARN 23 S. Ces changements de conformation empêchent l'accommodation de l'ARNt dans le site A et la formation de la liaison peptidique (Vazquez-Laslop et al. 2008, Ramu et al. 2011, Arenz et al. 2014).

Globalement, plusieurs cas de figure existent concernant la traduction de protéines lorsqu'un macrolide est fixé sur le ribosome, ces cas étant dépendant de la structure du macrolide et de la séquence de la protéine (Vázquez-Laslop et Mankin 2018). Premièrement, la protéine peut contenir un motif MAM qui inhibe la formation de la liaison peptidique et peut induire la dissociation du peptidyle-ARNt du ribosome (phénomène de « drop-off ») si la partie du peptide déjà traduite est inférieure à 10 acides aminés (Otaka et Kaji 1975, Menninger 1985). Deuxièmement, la traduction de la protéine peut se dérouler complètement si la séquence ne contient pas de motif MAM (phénomène de « bypass »). Troisièmement, certains peptides seraient capables de déplacer le macrolide et d'induire sa dissociation du ribosome. Cependant, cette hypothèse n'a été démontrée qu'en présence de peptides synthétiques courts (Vimberg et al. 2004, Lovmar et al. 2006) (***Figure 9B***).

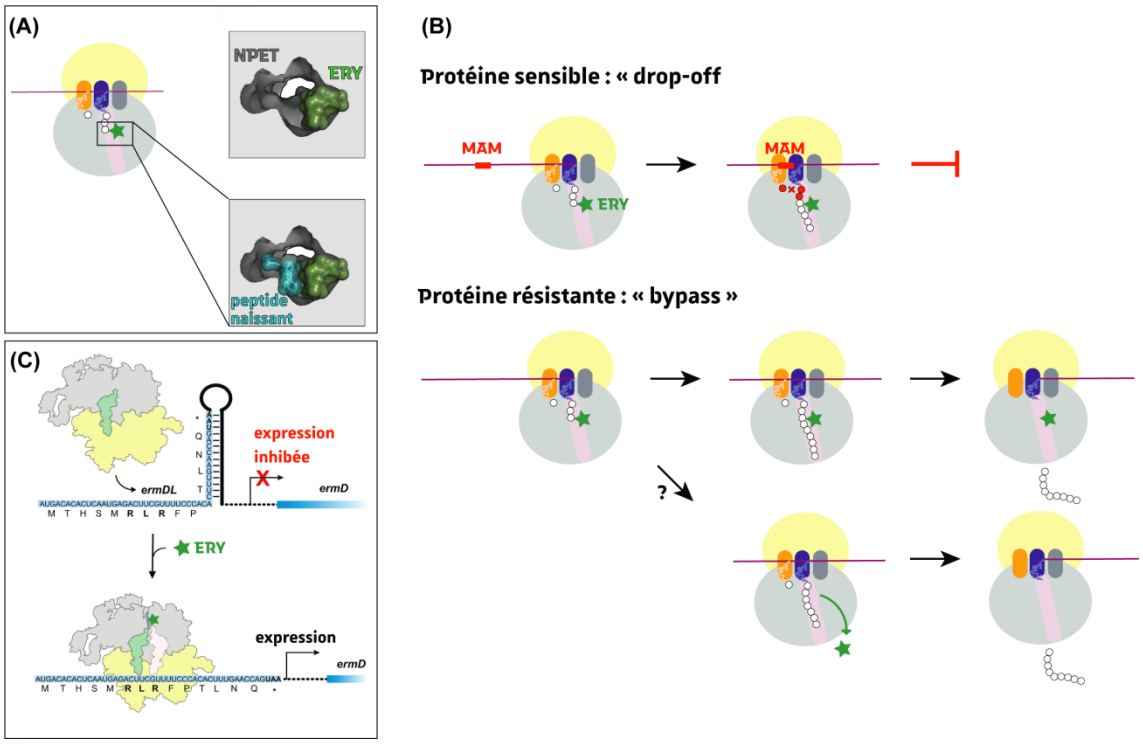


Figure 9 – Mécanisme d'action des macrolides, arrêt programmé de la traduction. (A) Vue de l'érythromycine au sein du tunnel de sortie. Le tunnel est assez large pour laisser passer un peptide (adapté de Vázquez-Laslop et Mankin 2018), NPET = « Native Peptide Exit Tunnel », tunnel de sortie des peptides naissants. (B) Mécanismes possibles de traduction lorsque le ribosome est lié à un macrolide. (C) Exemple de traduction de l'opéron ErmDL en présence d'un macrolide. L'expression du gène *ermD* est dépendent de la présence de l'érythromycine qui bloque la traduction du peptide leader qui comporte un motif MAM (de Beckert et al. 2021).

De plus, en fonction des macrolides, la constante de dissociation de l'inhibiteur varie, ce qui explique pourquoi certains ont un effet bactériostatique et d'autres bactéricide. La structure du macrolide explique cette différence, les composés comportant une chaine supplémentaire au niveau du macrocycle (chaine alkyle-aryle des kétolides) ont une dissociation ralentie induisant une perturbation de la traduction plus longue et donc un effet bactéricide (Krokidis et al. 2016, Svetlov, Vázquez-Laslop, et Mankin 2017).

2.3. Usage

Classiquement les macrolides sont utilisés contre les infections respiratoires, ou des tissus mous, liées à des bactéries à Gram positif (Zuckerman 2004). Ces antibiotiques n'ont pas une bonne activité contre les bactéries à Gram négatif non fermentaires mais l'azithromycine a une activité contre la formation de biofilm chez

Pseudomonas aeruginosa (Gomes et al. 2017). Introduite dans la thérapie clinique dans les années 1950, l'érythromycine A (McGuire et al. 1952) avait l'avantage de traiter les patients ayant des intolérances aux bêta-lactamines et d'avoir une activité contre les pathogènes résistants à la pénicilline. Cependant, les inconvénients majeurs étaient pharmaco-toxicologiques, avec des instabilités et intolérances gastriques, une demi-vie courte nécessitant de nombreuses administrations et des interactions potentiellement dangereuses avec d'autres médicaments (Bambeke, Verhaegen, et Tulkens 2001). De plus, pour tous les macrolides, l'émergence de résistances ont rapidement incité à un usage limité et raisonné de ces médicaments (Jones, Nichols, et Finland 1956).

Les macrolides font partis des antibiotiques les plus utilisés à travers le monde (Hicks, Taylor, et Hunkler 2013, Versporten et al. 2014) et plus particulièrement l'azithromycine qui présente une activité à large spectre, notamment contre les infections dues à des Entérobactéries (Gordillo, Singh, et Murray 1993), et des effets longs post-administration. L'usage vétérinaire représente une grande proportion de l'utilisation des macrolides. Ils sont utilisés pour le soin des animaux mais également en tant que promoteurs de croissance, bien que cette pratique ait été interdite dans l'Union Européenne depuis 1998 (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) 2011). De plus, l'OMS a inscrit certains macrolides (érythromycine, azithromycine et clarithromycine), ainsi que d'autres agents antimicrobiens, sur la liste des médicaments essentiels, pour lesquels il est urgent d'engager des actions de lutte pour limiter l'émergence de résistances et préserver leur utilité clinique (World Health Organization (WHO) 2019).

2.4. Mécanismes de résistance

Les premières résistances à l'érythromycine ont été identifiées chez un *Staphylococci* en 1956 et chez un *Streptococci* en 1959. Les macrolides ne sont pas les seuls composés à fixer le tunnel de sortie du ribosome, ce qui provoque des résistances croisées avec celles induites par les streptogramines de classe B et les lincosamides (Tu et al. 2005, Golkar, Zieliński, et Berghuis 2018). Ces familles d'antibiotiques sont donc souvent rassemblées sous l'acronyme MLS_B pour Macrolides, Lincosamides et Streptogramines B ou MLS_BK par l'ajout plus récent des Kétolides.

Certaines souches sont naturellement résistantes aux macrolides, notamment les bactéries à Gram négatif, qui du fait de la composition de leur paroi, ne laissent pas entrer les macrolides qui sont des molécules majoritairement hydrophobes (Vaara 1993). Le mécanisme de résistance aux macrolides le plus important est la méthylation de la

position A2058 de l'ARN ribosomal 23 S (numérotation *E. coli*) par les Erms (Erythromycin-resistant methyltransferases). D'autres mécanismes, plus rares, peuvent participer à la résistance aux macrolides.

2.4.1. Diminution de la concentration cellulaire en macrolides

Les pompes à efflux encodées sur des éléments transférables comme les plasmides sont généralement des pompes plus spécifiques à certains antibiotiques. Parmi elles, les sous-familles Mef et Msr sont particulièrement impliquées dans l'export des macrolides. Elles appartiennent aux familles des transporteurs MFS et ABC, respectivement (Roberts 2005). Le gène mef(A) est un des gènes de pompes à efflux les plus fréquemment détectés dans des entérobactéries (Ojo et al. 2004) mais également des micro-organismes à Gram positif (Bley et al. 2011). MefA, étant de la famille des transporteurs MFS ne nécessite pas d'ATP pour fonctionner et est capable d'extruder différents macrolides de 14 et 15C mais pas ceux avec 16C dans le macrocycle lactone (Poole, 2005, Gomes et al. 2017).

2.4.2. Modification de la cible, le ribosome

La cause de résistance aux macrolides la plus répandue est la mono- ou di-méthylation en position N6 du nucléotide A2058 de l'ARNr 23 S du ribosome par les Erms pour « Erythromycin-resistant methyltransferases ». Ces enzymes ont été identifiée dans des souches résistantes à l'érythromycine ayant également une résistance aux MLS_BK (Skinner, Cundliffe, et Schmidt 1983, Douthwaite et al. 1995).

La méthylation empêche la formation de la liaison hydrogène entre le saccharide en position C5 du cycle du macrolide et le nucléotide A2508. La mono-méthylation confère une résistance élevée aux lincosamides mais plus réduite aux macrolides et streptogramines B. La di-méthylation crée une résistance accrue, notamment aux kétolides (Liu et Douthwaite 2002) et est le type de résistance le plus commun. Comme expliqué précédemment, l'induction des gènes des méthylases peut être dépendante de la présence d'un macrolide. C'est le cas de l'expression du gène ermD qui nécessite le blocage du ribosome au niveau du peptide leader ermDL. Ce blocage est permis par l'interaction du ribosome avec un macrolide et la reconnaissance d'un motif MAM spécifique dans la séquence du peptide leader (**Figure *9C***) (Ramu, Mankin, et Vázquez-Laslop 2009).

Cette position peut également être mutée, tout comme le nucléotide A2059 ou d'autres parties des domaines II et V de l'ARNr 23 S (Vester et Douthwaite 2001). La résistance aux molécules ciblant le tunnel de sortie des peptides peut également être induite par la mutation de certaines protéines ribosomales. Notamment la mutation des protéines L4 et L22 qui induit un changement de conformation du tunnel de sortie. Ce changement de conformation n'impacte pas nécessairement l'affinité du macrolide pour le ribosome. Par exemple, la mutation de la protéine L22 induit un élargissement du tunnel permettant le passage du peptide en cours de synthèse malgré la présence de l'érythromycine (Tu et al. 2005, Poehlsgaard et Douthwaite 2005).

2.4.3. Protection de la cible

Un mécanisme de résistance aux macrolides dû à une protection du ribosome a été découvert plus récemment. La reconnaissance par la protéine MsrE d'un ribosome bloqué avec un ARNt dans le site P et un antibiotique dans le tunnel de sortie a été mis en évidence par cryo-microscopie électronique (Su et al. 2018). Une MsrE, protéine de la famille ABC, liée à l'ATP, peut induire l'export allostérique du macrolide du ribosome dû à l'accommodation de la boucle étendue de MsrE dans le tunnel de sortie. Il a été prouvé par des expériences de traduction *in vitro* que ces protéines sont bien capables d'induire la traduction en présence de macrolides, confirmant l'hypothèse d'une protection du ribosome et pas d'une résistance dû à un efflux de l'antibiotique (Sharkey, Edwards, et O'Neill, 2016).

2.4.4. Modification du macrolide

L'inactivation de l'action des macrolides peut également être causée par la modification enzymatique des antibiotiques (***Figure 10***).

Les Macrolide Phosphotransférases (MPHs) ont été découvertes dans les années 80 à partir d'une souche résistante d'*E. coli* (O'Hara et al. 1989). Il existe une quinzaine de gènes correspondant à des sous-types de MPHs (de mph A à mph O). Il a été confirmé pour cinq d'entre elles que leur rôle est de catalyser la phosphorylation de la partie mycaminose ou de la position 2' du désosamine en position C5 du macrocycle (**Figure *10***). Elles peuvent donc phosphoryler tous les macrolides et kétolides et inhibent l'interaction de ces derniers avec le nucléotide A2058. Ces gènes peuvent être codés dans le génome de la bactérie ou présent sur des éléments mobiles. Ils sont retrouvés dans des souches pathogènes ou environnementales (Fyfe et al. 2016) et leur expression peut être constitutive ou dépendant de la présence d'un macrolide (Dinos 2017). Il y a peu de

similarité de séquence entre les différents types de MPHs et la séquence ne semble pas liée à une spécificité de substrat (Golkar, Zieliński, et Berghuis 2018).

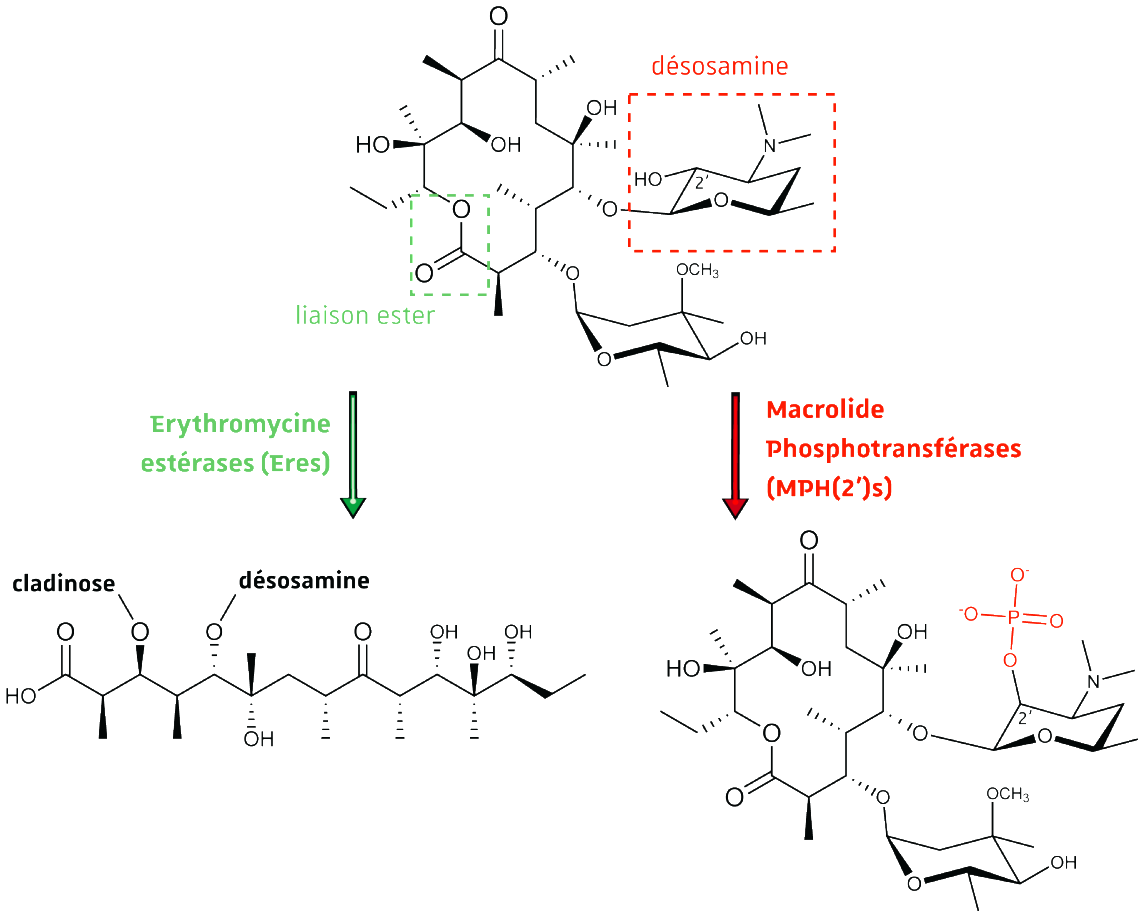


Figure 10 - Mode d'action des enzymes modificatrices de macrolides (adapté de Golkar et al. 2018, créé avec ChemDraw®). Modification de l'érythromycine A par une Macrolide Phosphotransférases (MPH (2')) qui phosphoryle la position 2' du désosamine et une Érythromycine estérases (Ere) qui linéarise le macrolactone.

Les Macrolide Estérases (Ere) ont également été découvertes au milieu des années 80. Un plasmide conférant une haute résistance aux macrolides a été mis en évidence dans une souche clinique d'*E. coli* (Wright 2005). Cependant, ce plasmide ne conférait pas de résistance aux streptogramines B ou aux lincosamides. Il ne s'agissait donc pas d'une résistance due à une Erm méthyltransférase qui aurait induit une résistance croisée pour ces trois familles d'antibiotiques (Andremont, Gerbaud, et Courvalin 1986, Golkar, Zieliński, et Berghuis 2018). Lors de la synthèse des macrolides par les polycétides synthases, le macrolide aglycone est circularisé par formation d'une

liaison ester pour former le macrocycle lactone (Donadio et al. 1991). Les Eres hydrolysent cette liaison ester et induisent donc la linéarisation du cycle des macrolides. La plupart des Eres sont codées sur des éléments génétiques mobiles et sont présentes dans de nombreuses souches cliniques et environnementales. Peu de données existent concernant la spécificité de substrat des Eres. Une étude montre cependant que seuls les macrolides avec des macrolactones à 14 et 15C seraient substrats de ces enzymes (Morar et al. 2012), mais elle ne concerne que les estérases EreA et EreB, testées sur cinq macrolides différents.

Il existe également des Macrolide Glycosyltransférases, mais elles ne sont présentes que dans les souches qui produisent des macrolides. Elles font partie de l'immunité de la cellule hôte. Ce mécanisme d'auto-résistance aux macrolides consiste en la glycosylation intracellulaire inactivant l'antibiotique. Ce dernier sera réactivé après sécrétion par une glycosidase extracellulaire (Vilches et al. 1992).

3. Aminoglycosides

3.1. Structure et classification

Les aminoglycosides peuvent être classés en quatre groupes structurels. Trois d'entre eux possèdent un aminocyclitol qui est un cycle 2-désoxystreptamine (2-DOS). Ces trois groupes diffèrent par les ramifications présentes sur le cycle 2-DOS. Différentes osamines sont liées à l'aminocyclitol par des liaisons pseudoglycosidiques. Les aminoglycosides avec un cycle 2-DOS peuvent être monosubstitués en position 4, comme la néamine, ou disubstitués aux positions 4,5 ou 4,6 du cycle. Le quatrième groupe regroupe les molécules ne comportant pas de cycle 2-DOS mais un cycle streptidine, comme la spectinomycine (Serio et al. 2018). A titre d'exemples, la néomycine B, la paromomycine, et la ribostamycine sont des aminoglycosides à cycle 2-DOS disubstitués en position 4 et 5. La gentamicine, la kanamycine A et la tobramycine sont des molécules à cycle 2-DOS disubstitués en position 4 et 6.

La nomenclature définit habituellement le cycle I comme étant l'aminoside en position 4 du cycle 2-DOS. Le deuxième cycle correspond à l'aminocyclitol central. Le cycle III correspond à la deuxième substitution en position 5 ou 6 du cycle 2-DOS des composés disubstitués. Un quatrième cycle, appelé cycle IV, peut être présent, lié au cycle III (Magnet et Blanchard 2005).

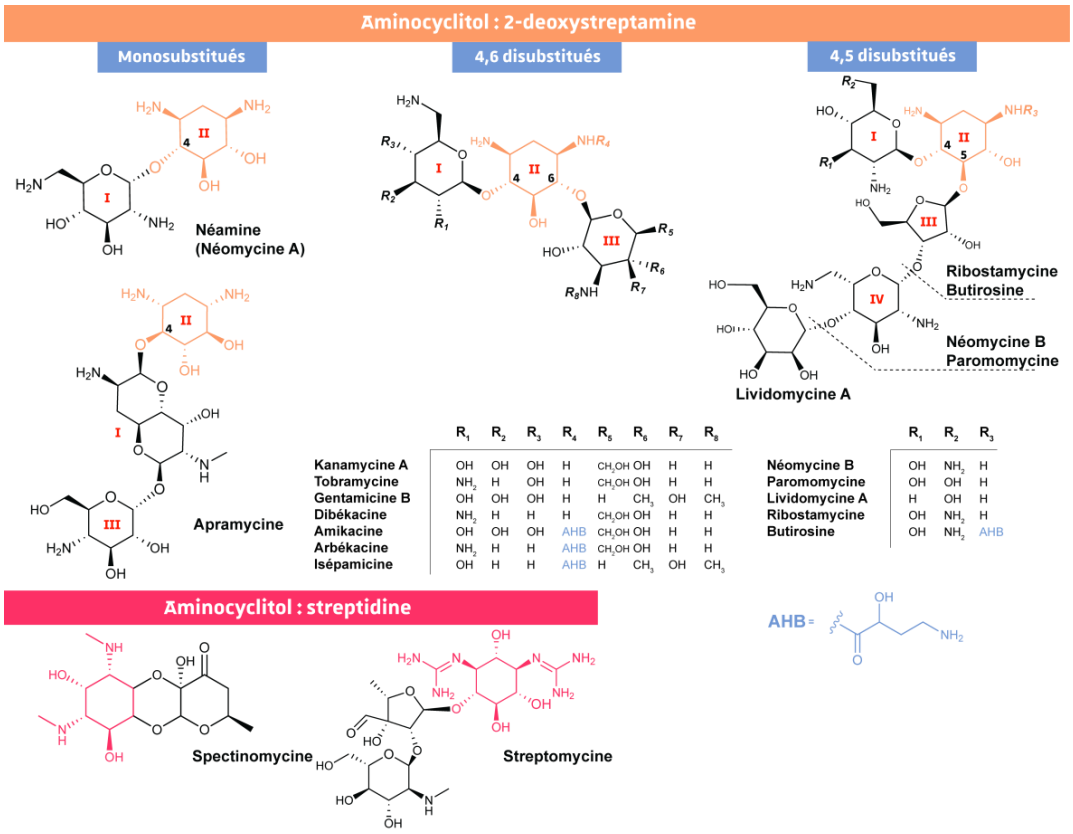


Figure 11 - Structures secondaires des principaux aminoglycosides (adapté de Shi et al. 2013, créé avec ChemDraw®). Le cycle 2-désoxystreptamine des aminoglycosides mono- et disubstitués est coloré en orange, le cycle streptidine est coloré en rose. Le numéro des cycles est indiqué en rouge.

Cette nomenclature exclut les aminoglycosides avec des structures atypiques comme la streptomycine et son cycle streptidine, la spectinomycine, qui est formé de trois cycles fusionnés ou encore l'apramycine qui est monosubstitué en position quatre du cycle 2-DOS mais possède un troisième cycle (***Figure 11***).

3.2. Mécanisme d'action

Les aminoglycosides ciblent la sous-unité 30 S du ribosome au niveau du site A, à différents sites spécifiques, et génèrent des changements de conformation du ribosome (Serio et al. 2018). La plupart des aminoglycosides, et notamment ceux possédant un aminocyclitol 2-DOS, ciblent plus précisément le site A au niveau de l'hélice 44 de l'ARNr 16 S (***Figure 12***).

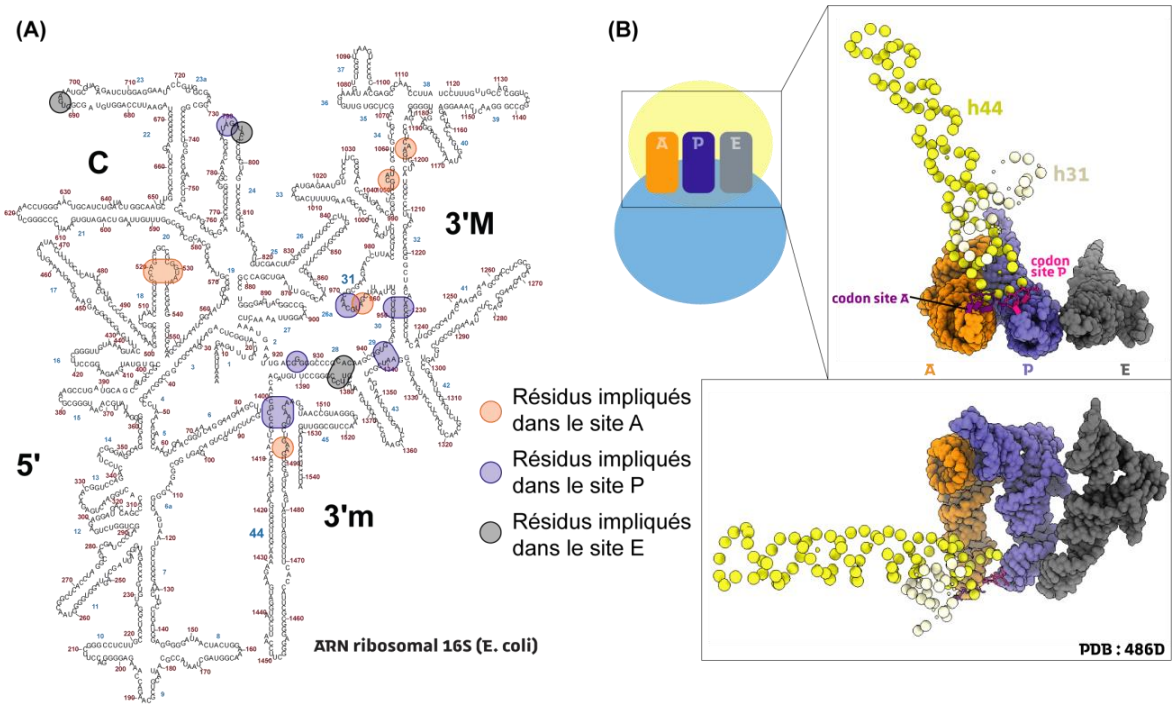


Figure 12 - Structure secondaire de l'ARN ribosomal 16S et position des sites A, P et E du ribosome. (A) Structure secondaire de l'ARNr 16 S (CC BY-SA, ©2013-2015 Georgia Institute of Technology). Les différents domaines de la structure sont indiqués (5', C, 3'M, 3'm), le numéro des hélices est indiqué en bleu, la numérotation des nucléotides est en bordeaux. Les nucléotides impliqués dans la liaison des ARNt dans les sites A, P et E sont cerclés en orange, bleu et gris, respectivement. (B) Représentation en 3D des ARNt positionnés dans les sites A (orange), P (bleu) et E (gris). PDB : 486D (Cate et al. 1999).

Des structures de la paromomycine en complexe avec un oligonucléotide ARN correspondant à la partie de l'hélice (h44) ciblée par les aminoglycosides, montrent qu'ils interagissent au niveau d'une poche créée par deux paires de bases non canoniques (A1408-A1493 et U1406-U1495, numérotation *E. coli*) et une adénine non appariée (A1492) (Fourmy et al. 1996). L'interaction des aminoglycosides au niveau de cette boucle interne induit le déplacement des résidus A1492 et A1493 vers le petit sillon de l'hélice de l'ARNr 16 S (Fourmy, Yoshizawa, et Puglisi 1998) (***Figure 13***).

L'étude de l'effet des aminoglycosides sur la synthèse protéique a fortement contribué à la compréhension des mécanismes de décodage et de l'implication du ribosome dans la stabilisation d'un ARNt apparié à l'ARNm (Ogle et Ramakrishnan 2005, Davies, 2006). L'interaction du ribosome avec ces composés induit une perturbation de la traduction en induisant soit une inhibition des étapes d'initiation ou d'élongation, soit une incorporation d'un ARNt aminoacylé non complémentaire à l'anticodon de l'ARN messager.

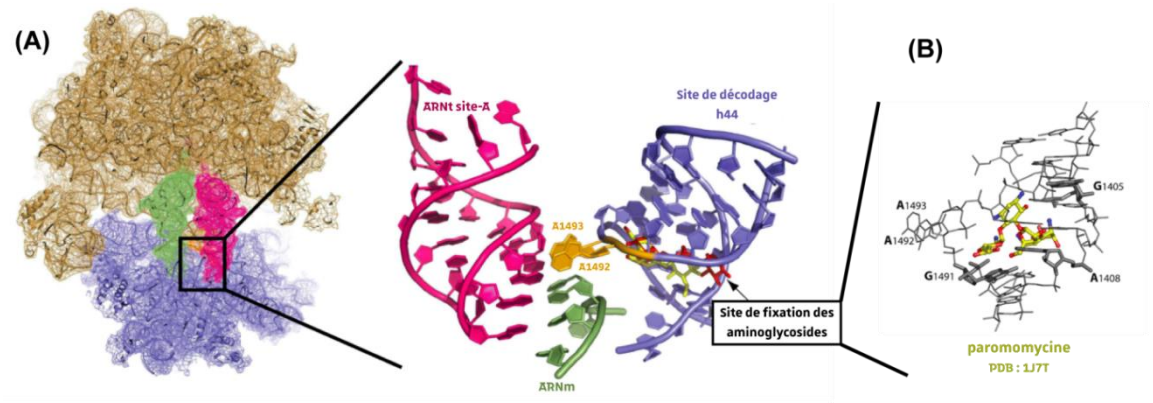


Figure 13 - Site d'interaction des aminoglycosides au niveau du site A (adapté de Feldman et al. 2010 et de Hobbie et al. 2006). (A) Les aminoglycosides fixent l'hélice 44 de l'ARNr 16 S de la petite sous-unité du ribosome et induisent la position ouverte des résidus A1492 et A1493. (B) Structure cristallographique de la paromomycine liée à un oligonucléotide correspondant au site de fixation dans l'hélice 44 (Vicens et Westhof 2001, PDB 1J7T).

L'impact sur la traduction additionné à la production de protéines aberrantes favorisent la mort cellulaire, en induisant notamment des dommages au niveau de la membrane cellulaire (Anand et Davis 1960, Davis 1987). Les protéines traduites avec des erreurs d'appariement d'ARNt créent des tunnels dans la membrane, augmentant l'import de l'antibiotique, ce qui augmente à nouveau le taux d'erreur de traduction, cercle vicieux conduisant à la mort cellulaire (Davis, Chen, et Tai 1986).

Des structures de la sous-unité 30 S fixée à différents antibiotiques confirment ces hypothèses (Carter et al. 2000). Les structures cristallines montrent que la paromomycine déplace les résidus A1492 et A1493 en dehors de la boucle interne de l'hélice 44. Positionnés ainsi, ces deux nucléotides peuvent entrer en contact avec le petit sillon de l'hélice codon-anticodon (Ogle 2001). Normalement, lorsqu'un ARNt apparenté arrive au niveau du site A, le site A change de conformation, passant d'un état « off » à un état « on ». L'état « off » correspond à la conformation dans laquelle les résidus A1492 et A1493 n'interagissent pas avec la mini-hélice codon-anticodon. Au contraire, à l'état « on », ces deux résidus rejoignent le résidu G530 et reconnaissent les deux premières paires de bases Watson-Crick formées entre le codon et l'anticodon (Kondo et al. 2006).

A une échelle plus globale, la fixation de la paromomycine seule induit également un mouvement de fermeture partielle de l'ensemble de l'épaule du 30 S, en particulier de la protéine S12 vers l'hélice 44 de l'ARNr 16 S (Ogle, Carter, et Ramakrishnan 2003). Ainsi, la paromomycine diminue le coût énergétique nécessaire au changement de conformation observé lors de la liaison de l'ARNt au site A et favorise la sélection d'ARNt non apparentés (Rodnina et al. 2002, Ogle et Ramakrishnan 2005). Il a été montré par des

expériences de FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») que la fixation de la kanamycine inhibe les changements de conformation induisant la rotation de la petite sous-unité par rapport à la grande sous-unité. Cette rotation est nécessaire pour la translocation de l'ARNm ou des ARNt et pour le recyclage du ribosome (Dunkle et al. 2011, Wang et al. 2012).

D'autres membres de la famille des aminoglycosides ciblent des sites différents au niveau du ribosome mais induisent également des changements de conformation perturbant la traduction et la fidélité du ribosome (Feldman et al. 2010). Par exemple, la néomycine qui lie l'hélice 44 comme décrit précédemment, se fixerait également au niveau de l'hélice 69 de l'ARNr 23S au sein du pont B2 entre les deux sous-unités du ribosome (***Figure 14A***). Liée à ce site, la néomycine empêcherait l'accommodation du pont B2, induirait l'inhibition de la rotation de la tête du ribosome et stabiliserait ce dernier dans une conformation partiellement tournée défavorable à la fixation de différents facteurs de traduction (Borovinskaya et al. 2007, Wang et al. 2012).

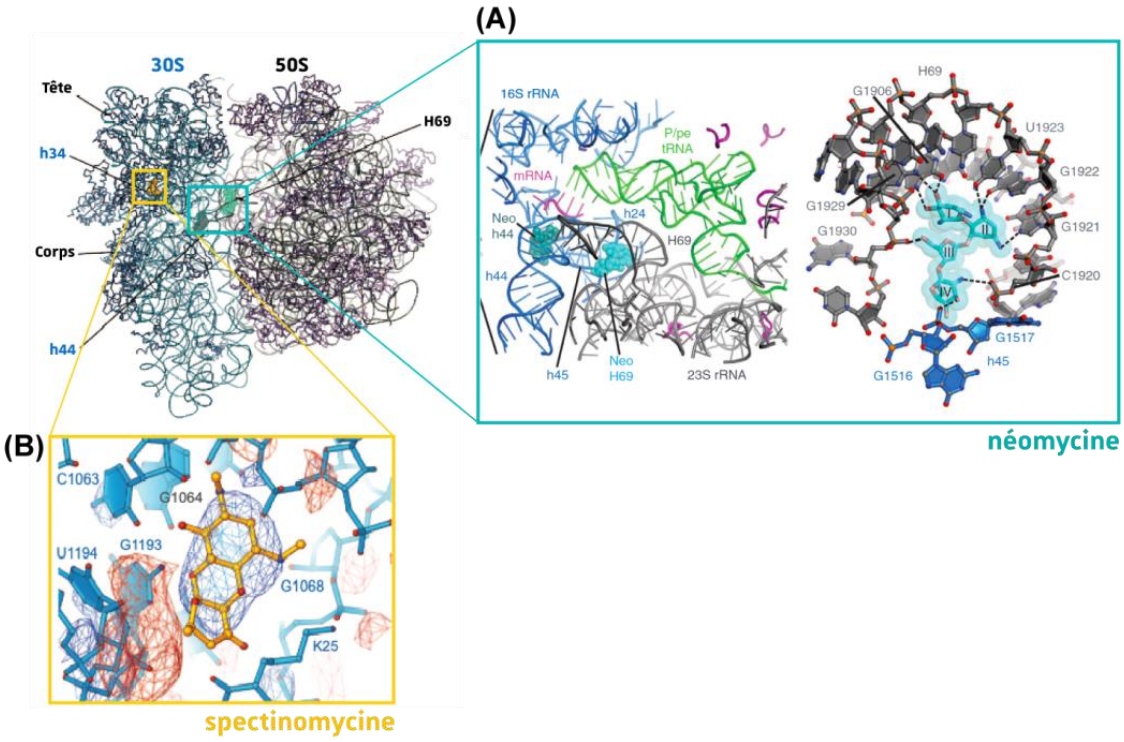


Figure 14 - Sites d'interaction de la néomycine et de la spectinomycine (A) Site d'interaction de la néomycine au niveau de l'hélice 69 de l'ARNr 23S du ribosome (adapté de Wang et al. 2012). (B) Site d'interaction de la spectinomycine au niveau de l'hélice 34 de l'ARNr 16S du ribosome (adapté de Borovinskaya et al. 2007).

La spectinomycine et la streptomycine ont également des sites de fixation différents. La spectinomycine inhibe la translocation du peptidyle-ARNt du site A vers le site P (Bilgin et al. 1990). La molécule interagit avec l'hélice 34 de l'ARNr 16 S (***Figure 14B***) en formant des liaisons hydrogènes avec différentes bases et, à cause de sa structure rigide, bloque le mouvement de la tête du ribosome nécessaire à la translocation de l'ARNt d'un site à l'autre (Carter et al. 2000). La streptomycine agit sur l'étape de décodage en augmentant le taux d'erreur due à l'incorporation d'un ARNt dont l'anticodon ne correspond pas au codon de l'ARNm (Karimi et Ehrenberg 1996). Elle interagit avec le squelette phosphate de l'ARNr 16 S au niveau des nucléotides 13, 526, 915 et 1490 (numérotation *E. coli*) et induit la stabilisation d'un état du ribosome appelé *ram* (pour « ribosomal ambiguity », Lodmell 1997) ayant une affinité accrue pour les ARNt. En effet, certains antibiotiques et certaines mutations, notamment au niveau de protéines ribosomales (mutations *ram*, Ogle et Ramakrishnan 2005), stabilisent une conformation intermédiaire du ribosome par rapport aux conformations que ce dernier adopte habituellement (***Figure 15***). L'arrivée d'un ARNt dans le site A module un changement de conformation du ribosome générant une fermeture de ce dernier (**Figure *15A,B***). Cette fermeture implique un basculement de la tête 30 S vers la protubérance centrale de la sous-unité 50 S. En absence d'aminoglycoside, cette conformation est stabilisée seulement si l'ARNt est apparenté (Berk et al. 2006). Ainsi, en perturbant la balance entre les états du site A restrictif et *ram*, plus affin pour les ARNt, la streptomycine favorise l'incorporation de molécules non apparentées (***Figure 15C***) (Carter et al. 2000, Gromadski et Rodnina 2004).

3.3. Usage

Le premier membre de la classe des aminoglycosides introduit en usage clinique fut la streptomycine en 1944. Au cours des années suivantes, d'autres membres de la classe ont été introduits sur le marché, notamment la néomycine en 1949, la kanamycine en 1957, la gentamicine en 1963, la tobramycine en 1967 et l'amikacine en 1972. C'est dans les années 80, avec l'arrivée des céphalosporines de troisième génération, des carbapénèmes et des fluoroquinolones, que l'utilisation des aminoglycosides a largement diminué. Ces classes avaient l'avantage d'être moins toxiques et de présenter un spectre d'action plus étendu. L'augmentation des résistances à ces classes de médicaments, combinée à un accroissement de la connaissance des mécanismes de résistance aux aminoglycosides, a conduit au développement de nouveaux aminoglycosides capables de surmonter ces résistances tels que l'arbékacine et la plazomicine (Krause et al. 2016).

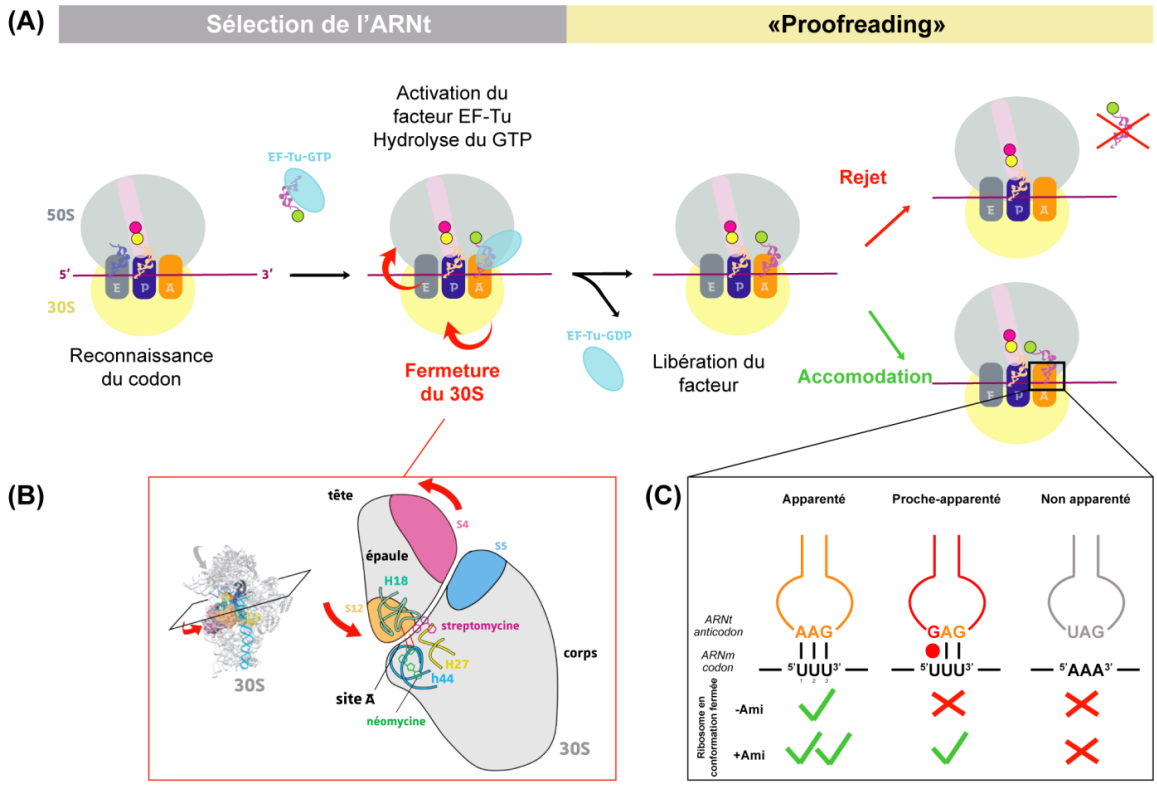


Figure 15 - Baisse de la fidélité du ribosome induite par les aminoglycosides (adapté de Ogle, Carter, et Ramakrishnan 2003). (A) Représentation schématique des étapes de décodage comprenant la sélection de l'ARNt aminoacylé et l'accommodation ou le rejet de celui-ci en fonction de l'anticodon. (B) Schéma de coupe de la sous-unité 30s. Sont représentés les éléments importants pour le décodage et la stabilisation d'une conformation fermée du ribosome permettant l'accommodation de l'ARNt apparenté (mouvement de la tête du 30S indiqué par des flèches rouges). (C) Interaction codon/anticodon et influence des aminoglycosides sur l'accommodation d'ARNt proche-apparentés. Un appariement non-canonique G-U est accepté pour la troisième position du codon de l'ARNm (paire de base « Wobble »), mais pas pour les deux premières positions du codon.

De plus, afin de diminuer les effets secondaires liés aux aminoglycosides, des protocoles de dosage basé sur une injection plus concentrée, mais une seule fois par jour, sont mis en place. Ces dosages quotidiens diminueraient les effets secondaires en conservant l'efficacité des médicaments (Drusano et al. 2007). Les aminoglycosides sont utilisés en monothérapie ou en association avec d'autres antibiotiques, les trois membres de la classe qui restent les plus fréquemment utilisés aujourd'hui sont la tobramycine, la gentamicine et l'amikacine (Avent et al. 2011). Leur utilisation est principalement dédiée au traitement d'infections persistantes à des bactéries à Gram négatif, de la tuberculose ou des patients atteints de mucoviscidose.

Le ***Tableau 1*** récapitule les aminoglycosides existants, leurs origines et leurs principales utilisations.

Antibiotique	Date de découverte	Noyau structurel (aminocyclitol	Substitution	Origine				Utilisation clinique	Usage
				Naturelle		Synthétique			
				Oui	Souche	Oui	Squelette		
Streptomycine	**1943**	streptidine		X	*Streptomyces griseus*			Peu utilisé aujourd'hui	Généralement utilisé pour le traitement de la tuberculose active, toujours en association avec d'autres agents antituberculeux. Également utilisé pour traiter les infections à *Mycobacterium tuberculosis* (en deuxième ligne)
Néomycine = mélange de néomycine B et C	**1949**	2-deoxystreptamine (DOS)	4,5-disubstitué	X	*Streptomyces fradiae*			Médical	Infections cutanées. Excellente activité contre les bactéries à Gram négatif, et est partiellement efficace contre les bactéries à Gram-positif. Actif contre les bactéries résistantes à la streptomycine
Néamine (néomycine A)		2-DOS	mono-substitué	X	Composant mineur de la néomycine				
Hygromycine B	**1950s**	2-DOS	mono-substitué	X	*Streptomyces hygroscopicus*			Médical, vétérinaire	Contre vers parasites
Kanamycine	**1957**	2-DOS	4,6-disubstitué	X	*Streptomyces kanamyceticus*			Peu utilisé aujourd'hui	Utilisé pour traiter les infections à *Mycobacterium tuberculosis* (en deuxième ligne)
Dibékacine		2-DOS	4,6-disubstitué			X	Kanamycine B	Médical	Propriétés antituberculeuses et antimicrobiennes à large spectre. Actif contre les souches bactériennes résistantes à la kanamycine
Paromomycine	**1959**	2-DOS	4,5-disubstitué	X	*Streptomyces* spp.			Médical	Activité amibicide, antiparasitaire et antibactérienne. Traitement de l'amibiase intestinale
Lividomycine		2-DOS	4,5-disubstitué			X	Paromomycine & lividomycine B		
Spectinomycine	**1961**	streptidine		X	*Streptomyces spectabilis*			Médical, vétérinaire	Actif contre les bactéries à Gram négatif et utilisé pour le traitement de la gonorrhée
Gentamicine	**1963**	2-DOS	4,6-disubstitué	X	*Micromonospora purpurea*			Médical, utilisé fréquemment	Contre de nombreuses souches à Gram négatif (*P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*) et seulement Staphylococcus parmi les bactéries à Gram positif
Isépamicine		2-DOS	4,6-disubstitué			X	Gentamicine B		Activité similaire à l'amikacine mais avec une meilleure activité contre les souches bactériennes résistantes
Tobramycine	**1967**	2-DOS	4,6-disubstitué	X	*Streptomyces tenebrarius*			Médical, utilisé fréquemment	Contre de nombreuses souches à Gram négatif (*P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*) et seulement Staphylococcus parmi les bactéries à Gram positif
Sisomicine	**1970**	2-DOS	4,6-disubstitué	X	*Micromonospora inyoensis*			Médical	Plus grande activité contre les bactéries à Gram positif
Netilmicine	**1970s**	2-DOS	4,6-disubstitué			X	Sisomicine	Médical, peu utilisé aujourd'hui	
Ribostamycine	**1970s**	2-DOS	4,5-disubstitué	X	*Streptomyces ribosifidicus*				Antibiotique à large spectre
Amikacine	**1972**	2-DOS	4,6-disubstitué			X	Kanamycine A	Médical, utilisé fréquemment	Traitement à court terme des infections bactériennes à Gram négatif (*P.aeruginosa, E.coli*, Klebsiella-Enterobacter-Serratiaspecies…). Également être utilisé pour traiter les infections à Mycobacterium tuberculosis (deuxième ligne)
Arbekacine	**1973**	2-DOS	4,6-disubstitué			X	Dibékacine	Traitement à court terme des infections bactériennes multi-résistantes, telles que *S.aureus* résistant à la méthicilline (SARM)	Bactéries à Gram négatif et à Gram positif
Plazomicine	**2012**	2-DOS	4,6-disubstitué			X	Sisomicine		A été conçu pour échapper à toutes les enzymes modifiant les aminosides cliniquement pertinentes. Approuvé par la FDA pour le traitement des infections compliquées des voies urinaires (cUTI), y compris la pyélonéphrite (2018).
Apramycine		2-DOS	mono-substitué	X	*Streptomyces tenebrarius*			Non accepté pour l'usage sur les humains, vétérinaire	Action bactéricide contre de nombreuses bactéries à Gram négatif
Kasugamycine		2-DOS	mono-substitué	X	*Streptomyces kasugaensis*				
Bekanamycine		2-DOS	4,6-disubstitué	X	*Streptomyces k anamyceticus*				
Généticine		2-DOS	4,6-disubstitué	X	*Micromonospora rhodorangea*			Médical, vétérinaire	Couramment utilisé en laboratoire pour sélectionner des cellules génétiquement modifiées
Butirosine		2-DOS	1,4,5-trisubstitué	X	*Bacillus circulans*				Actif contre de nombreuses bactéries à Gram positif et certaines bactéries à Gram négatif (groupes Klebsiella-Enterobacter-Serratia ainsi que Proteus sp. et Pseudomonas sp.)

Tableau 1 - Membres de la classe des aminoglycosides : origines et usages

3.4. Mécanismes de résistance

3.4.1. Modification des aminoglycosides

Les modes de résistance les plus communs dans les isolats cliniques sont dus à des enzymes qui modifient les aminoglycosides, appelées « Aminoglycosides-Modifying Enzymes » (AMEs). Il existe différents types d'AMEs responsables de différentes modifications, les acétyltransférases, les phosphotransférases et les adényltransférases (Serio et al. 2018) (***Figure 16***).

Les acétyltransférases, « Aminoglycoside Acétyltransférases » (AACs), ajoutent un groupement acétyle (-CO-CH_3), à partir de l'acétyl-CoA, aux groupements amine (-NH_2) des aminoglycosides. Il existe 4 sous-types de ces enzymes, dont AAC (1), AAC (2') et les plus répandus AAC (3) et AAC (6'). Elles sont classées en fonction de la position de l'aminoglycoside ciblée par le transfert d'un acétyle. Les gènes codant ces enzymes sont généralement retrouvés sur des éléments génétiques mobiles, qui codent également pour des gènes de résistances à d'autres classes d'antibiotiques comme les bêta-lactamines ou les carbapénèmes, à la fois chez des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Par exemple, plusieurs AACs ont été détectées dans de nombreuses souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (Almaghrabi et al. 2014, Castanheira et al. 2017). Les résidus catalytiques du site actif ne sont pas conservés parmi toutes les AACs mais la surface du site actif est fortement chargée négativement afin de lier ces antibiotiques majoritairement basiques (Vetting et al. 2005).

Les phosphotransférases, « Aminoglycoside Phosphotransferases » (APHs), transfèrent un groupement phosphate à partir de l'ATP sur les groupements hydroxyle (-OH) des aminoglycosides. La phosphorylation diminue drastiquement la capacité des aminoglycosides à se fixer au niveau du site A. Il existe 7 sous-classes de ces enzymes classées en fonction de leur spécificité mais dont la plupart induisent une résistance à un seul type d'aminoglycoside. Seules les enzymes de la sous-classe APH (3') sont retrouvées dans des isolats cliniques de bactéries à Gram négatif et positif et confèrent une résistance à différents aminoglycosides (amikacine, kanamycine, néomycine) (Ramirez et Tolmasky 2010). La plus étudiée est l'APH (3')-IIIa. Elle possède une double spécificité et peut transférer un groupement phosphoryle aux positions 3' et 5''. Elle est principalement retrouvée dans les bactéries à Gram positif et confère une résistance à de nombreux aminoglycosides excepté la gentamicine et la tobramycine, qui ne possèdent pas le groupe accepteur spécifique à cette enzyme (McKay et al. 1996). Cette kinase nécessite la formation d'un complexe ternaire avec l'ATP et l'antibiotique et son activité requiert des cations divalents.

Enfin, les adényltransférases, « Aminoglycoside Nucleotidyltransferases (ANTs) », qui font partie de la plus petite classe d'enzymes modifiant les aminoglycosides, transfèrent une adénosine monophosphate (AMP) à partir de l'ATP sur les groupements hydroxyle (-OH). Il existe 5 sous-types de ces enzymes, ANT (2''), ANT (3''), ANT (4'), ANT (6) et ANT (9). Les sous-classes ANT (3''), ANT (4'), ANT (6) et ANT (9) sont principalement retrouvées chez des bactéries à Gram positif. L'enzyme fonctionne comme un dimère, avec le site actif composé de résidus à l'interface des deux monomères (Pedersen, Benning, et Holden 1995).

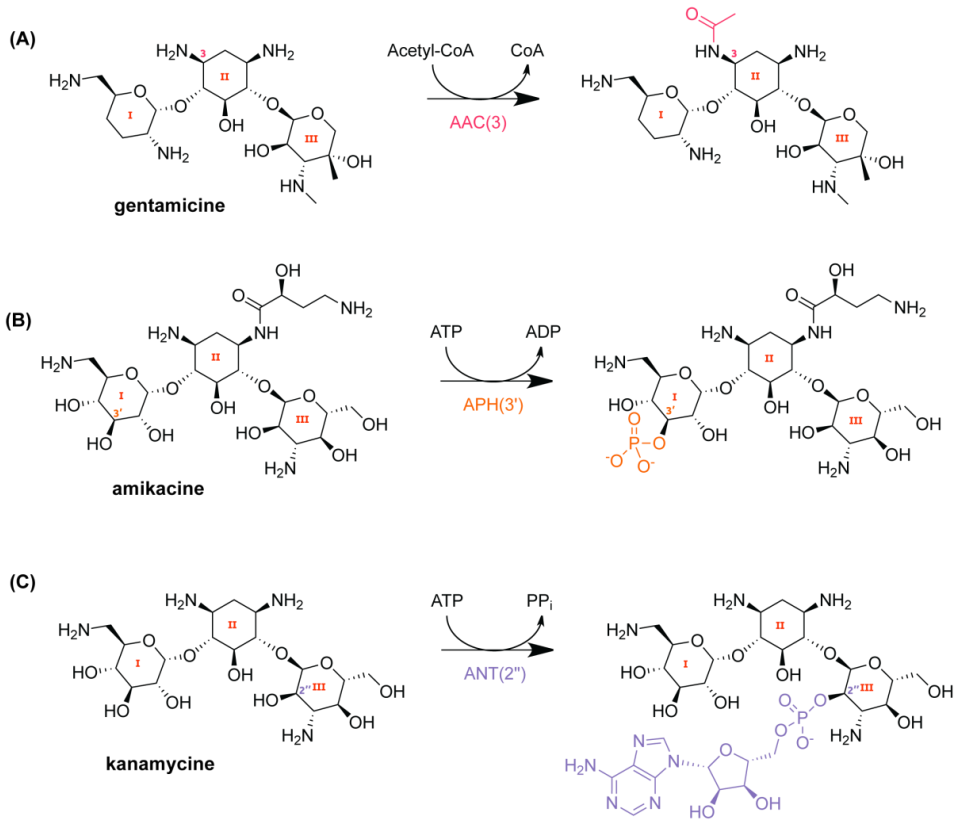


Figure 16 – Enzymes modificatrices d'aminoglycosides (adapté de Krause et al. 2016, créé avec ChemDraw®). (A) Exemple d'une acétyltransférase de sous-type AAC (3) modifiant la position 3 de l'aminocyclitol de la gentamicine. (B) Exemple d'une phosphotransférase de sous-type APH (3') modifiant la position 3' de l'aminoside (cycle I) de l'amikacine. (C) Exemple d'une adényltransférase de sous-type ANT (2'') modifiant la position 2'' du cycle III de la kanamycine.

3.4.2. Modification de la cible

La cible des aminoglycosides étant principalement l'ARNr 16 S, ce dernier peut être modifié ou muté afin de conférer une résistance. Les modifications de l'ARNr 16 S

sont induites par des méthyltransférases. Les mutations du site d'interaction se retrouvent principalement chez les mycobactéries. Ces espèces ne possèdent qu'une copie de l'opéron *rrn* codant pour les ARN ribosomiques. Par exemple la résistance aux aminoglycosides chez *Mycobacterium tuberculosis* est souvent liée à la mutation du gène *rps*L codant pour la protéine ribosomale S12 ou une mutation du gène *rrs* codant pour l'ARNr 16 S (Shi et al. 2013).

La méthylation ribosomique est un mécanisme de résistance plus important car il est plus largement diffusé à travers le monde (Doi, Wachino, et Arakawa 2016). Les méthyltransférases étaient initialement présentes uniquement chez les bactéries productrices d'aminoglycosides, les actinomycètes, mais ont été détectées chez *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Galimand, Courvalin, et Lambert 2003, Yokoyama et al. 2003). Ces 16S-RMTases sont classées en deux groupes basés sur le site de modification. Les N7-G1405 16S-RMTases et les N1-A1408 16S-RMTases. Les N7-G1405 16S-RMTases constituent le plus grand groupe, avec neuf membres ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG et RmtH (Doi, Wachino, et Arakawa 2016). La méthylation du G1405 dans le centre de décodage confère une résistance aux aminoglycosides 2-DOS 4,6-disubstitués. En revanche, une seule enzyme de type N1-A140816S-RMTase a été découverte, la NpmA (Wachino et al. 2007). Cette enzyme méthyle la position A1408 empêchant la liaison de tous les aminoglycosides avec un aminocyclitol 2-DOS (Wachino et Arakawa 2012).

3.4.3. Assimilation et efflux

L'import des aminoglycosides dans les cellules, caractérisé surtout pour la streptomycine et la gentamicine, se déroule en trois étapes (Becker et Cooper 2013, Shi et al. 2013). La première est une simple interaction électrostatique entre l'aminoglycoside et les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries. Les deux autres étapes nécessitent l'apport d'énergie et dépendent donc du potentiel membranaire (Bryan et Van Den Elzen 1977). Globalement, peu de systèmes d'export participant à la résistance aux aminoglycosides ont été identifiés à cause de leur nature polycationique. La plupart sont des systèmes d'efflux de la famille des RND (« Resistance Nodulation Division ») qui fonctionnent comme un système en trois parties comportant une protéine de fusion membranaire périplasmique et une protéine de la membrane externe (Poole 2005). Par exemple, l'une des causes principales de la résistance aux aminoglycosides chez *Pseudomonas aeruginosa,* longtemps attribuée à une perméabilité réduite, est due au système d'export MexXY-OprM (Poole 2011, Morita, Tomida, et Kawamura 2012). C'est le

mécanisme le plus retrouvé dans des isolats pulmonaires d'infection due à *P. aeruginosa* provenant de patients atteints de mucoviscidose (Poole 2011, Shi et al. 2013).

3.4.4. Perméabilité

Bien que non considéré comme un système de résistance à part entière, l'activité des protéases responsables de la lyse des protéines aberrantes ou mal repliées, participant ainsi au contrôle qualité de la synthèse protéique, peut jouer un rôle dans la résistance aux aminoglycosides (Becker et Cooper 2013). Ces protéases font partie des systèmes d'entretien de la paroi cellulaire, de régulation des protéines membranaires et de réponse au stress. Leur activité peut donc participer à la résistance aux aminoglycosides qui induisent une augmentation de la production de protéines aberrantes. L'effet des aminoglycosides étant efficace seulement si le taux de protéines mal traduites dépasse le potentiel d'activité de ces protéases. Par exemple, la suppression des gènes *hflK* et *hflC*, régulateurs de la protéase FtsH, chez *E. coli* provoque une augmentation de la mort cellulaire, liée à l'accumulation de protéines mal formées lorsque la bactérie est traitée avec la gentamicine ou la tobramycine (Kohanski et al. 2008, Hinz et al. 2011).

3.5. Sélectivité et effets secondaires

3.5.1. Sélectivité des aminoglycosides pour le site A bactérien

Les aminoglycosides possèdent une sélectivité pour le ribosome bactérien, son interaction avec le site A humain cytoplasmique ou mitochondrial étant moins efficace. Cependant, il a été montré que le site A humain mitochondrial a une affinité accrue pour les aminoglycosides lorsqu'il possède une mutation au niveau de la position A1555 (numérotation *Homo sapiens*). L'adénine est alors remplacée par une guanine.

La comparaison de la structure cristalline de l'apramycine avec un oligonucléotide correspondant au site A humain cytoplasmique et au site A bactérien montre que les modes d'interaction sont différents à cause des changements de séquences entre ces deux sites. Dans le cas de la structure d'interaction de l'apramycine avec le site A bactérien, le cycle I de l'aminoglycoside s'insère au niveau de l'hélice 44, s'empile sur le résidu G1491 (numérotation *E. coli*) et les atomes O5' et O6' forment deux liaisons hydrogènes avec le résidu A1408, conservé universellement au sein des bactéries.

Les atomes N1 et N3 du cycle central II forme quatre liaisons hydrogènes avec les résidus U1495, G1494 et A1493. Ces six liaisons hydrogènes maintiennent les résidus A1492 et A1493 dans une position ouverte à l'opposé de l'intérieur de l'hélice du site A bactérien. Cette position permet à ces deux résidus de placer leur pentose dans le sillon mineur de l'hélice formée par les paires de bases entre le codon et l'anticodon (motif « A-minor ») (Kondo et al. 2006). La position ouverte de ces deux adénines est corrélée à l'état « on » du site A bactérien qui est l'état correspondant à un décodage actif (**Figure *17A***). Ainsi, l'apramycine favorise la position active du site A, influant ainsi sur le décodage en diminuant sa fidélité (Kondo et al. 2006).

Au contraire, dans le cas du site A humain cytoplasmique, les deux atomes du cycle I de l'aminoglycoside sont liés à des molécules d'eau. De plus, la base du résidu 1408 de l'ARNr 16 S n'est pas une adénine mais une guanine et ce résidu G1408 (**Figure *18***), conservé au sein des sites A cytoplasmiques eucaryotes, n'établit pas de paires de bases mais deux contacts avec les oxygènes anioniques du groupement phosphate du résidu A1493. L'aminoglycoside apramycine se lie spécifiquement au site A cytoplasmique humain et stabilise l'état « off » (**Figure *17B***). Cet état ne permet pas de décoder les ARNt, l'apramycine inhibe ainsi probablement la translocation du ribosome eucaryote plutôt que de diminuer la fidélité du décodage (Kondo et al. 2007).

Le résidu 1491 (G1491, numérotation *E. coli*) est également muté dans les ribosomes humains, c'est une cytosine pour le site A mitochondrial et une adénine pour le site A cytoplasmique (**Figure *18***). La structure du site A mitochondrial montre que le changement de conformation induit par la fixation d'un ARNt faisant passer le site A d'un état « off » à un état « on » est plus coûteux énergétiquement pour le site A mitochondrial (Kondo et Westhof 2008). Ce coût supplémentaire est probablement lié au fait qu'il n'existe que 22 ARNt mitochondriaux et que la mitochondrie augmenterait sa précision de sélection des ARNt en diminuant sa vitesse de traduction.

La sélectivité reposerait donc sur deux résidus du site d'interaction, les résidus 1408 et 1491. La mutation A1408G affecte la fixation des composés 2-DOS avec un groupement amine en position 6' (6'NH_2), car ils ne peuvent pas former de liaisons hydrogènes avec la guanine, sa charge positive repoussant les groupements amines N1 et N2. Au contraire, les composés 2-DOS avec un groupement hydroxyle (6'OH) sont moins affectés par cette mutation car ils peuvent établir une liaison hydrogène avec le site Watson-Crick de la guanine.

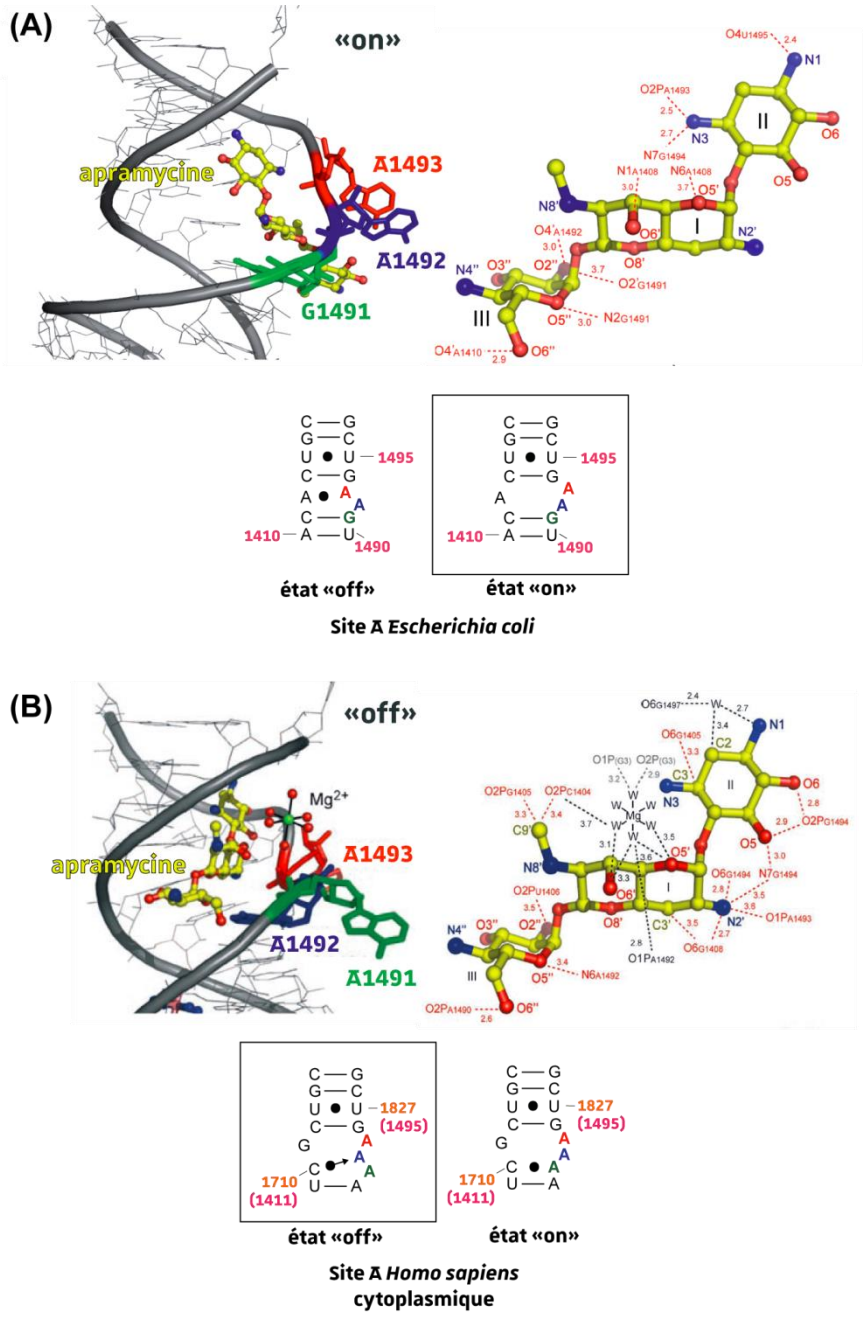


Figure 17 – Interaction de l'apramycine avec les sites A bactérien et humain cytoplasmique. (A) A gauche : Vue de la structure cristalline du complexe apramycine-site A bactérien (PDB : 1YRJ) (adapté de Kondo et al. 2006, SI). A droite : Contacts directs entre l'apramycine et les atomes du site A bactérien (numérotation *E. coli*) représentés par des lignes pointillées rouges (adapté de Kondo et al. 2006, SI). En bas : représentation schématique des différents états du site A bactérien. L'état stabilisé en présence d'apramycine est encadré en noir. (B) A gauche : Vue de la structure cristalline du complexe apramycine-site A humain cytoplasmique (PDB : 2G5K) (adapté de Kondo et al. 2006). A droite : Contacts directs et indirects (via des molécules d'eau) entre l'apramycine et les atomes du site A humain cytoplasmique (numérotation *E. coli*) représentés par des lignes pointillées rouges et noires, respectivement (adapté de Kondo et al. 2006). En bas : représentation schématique des différents états du site A humain cytoplasmique. L'état stabilisé en présence d'apramycine est encadré en noir.

Les changements de séquences entre les ARNr 16 S bactérien et humains perturbent la paire de base C1409-G1491 (numérotation *E. coli*). La présence des nucléotides C1409-C1491 opposés l'un à l'autre affecte beaucoup plus la fixation des aminoglycosides 2-DOS avec un 6'OH que les composés avec un 6'NH2 (Perez-Fernandez et al. 2014).

La spécificité d'action des aminoglycosides sur le site A procaryote est essentielle pour l'usage thérapeutique des aminoglycosides. Comme décrit précédemment, les aminoglycosides peuvent interagir avec les différents sites A. Leur interaction ne serait donc pas entièrement sélective bien que les modes d'interaction diffèrent induisant des modes d'inhibition de la traduction variés (Böttger et al. 2001, Wilhelm, Jessop, et Pettitt 2002, Kondo et al. 2007). Cependant, il a été démontré, premièrement, que l'affinité pour le site A bactérien était plus élevée que l'affinité pour le site A humain (Kaul, Barbieri, et Pilch 2005). Deuxièmement, la sélectivité accrue de certains aminoglycosides (comme la paromomycine) pour le site A bactérien est due, non pas à une affinité accrue, mais au désempilement des résidus A1492 et A1493 (numérotation *E. coli*) (Kaul, Barbieri, et Pilch 2005) (**Figure *18***). En effet, le changement de conformation de l'ARN ribosomal 16 S après fixation de la paromomycine, n'a pas lieu avec un oligonucléotide mimant le site A humain pour lequel le résidu 1408 est une guanine. Au contraire, la présence d'un G en position 1408 stabiliserait l'empilement des résidus A1492 et A1493 en présence de la paromomycine (Kaul, Barbieri, et Pilch 2004). Cette différence au niveau du résidu 1408 est donc importante pour la sélectivité de certains aminoglycosides pour le site A bactérien. Cependant, certains composés ont une affinité du même ordre de grandeur pour le site A bactérien que la paromomycine pour le site A humain, signifiant que l'affinité seule ne peut pas décrire les spécificités de chaque aminoglycoside (Kaul, Barbieri, et Pilch 2004).

Cette faible sélectivité apparente de certains aminoglycosides a mené à la suggestion d'utilisation d'aminoglycosides en tant que traitement de maladies génétiques dues à des mutations non-sens et notamment la mucoviscidose (Kerem 2004). Les aminoglycosides permettent de rétablir l'expression de protéines fonctionnelles grâce à la diminution de la fidélité de traduction (Keeling et Bedwell 2005). Cela rend l'utilisation de ces antibiotiques encore plus complexe, par exemple, le G-418 (généticine), un composé hautement toxique qui a été interdit à l'usage clinique, lie les ribosomes bactériens et eucaryotes avec une affinité élevée (Garreau de Loubresse et al. 2014, Prokhorova et al. 2017, Jospe-Kaufman, Siomin, et Fridman 2020).

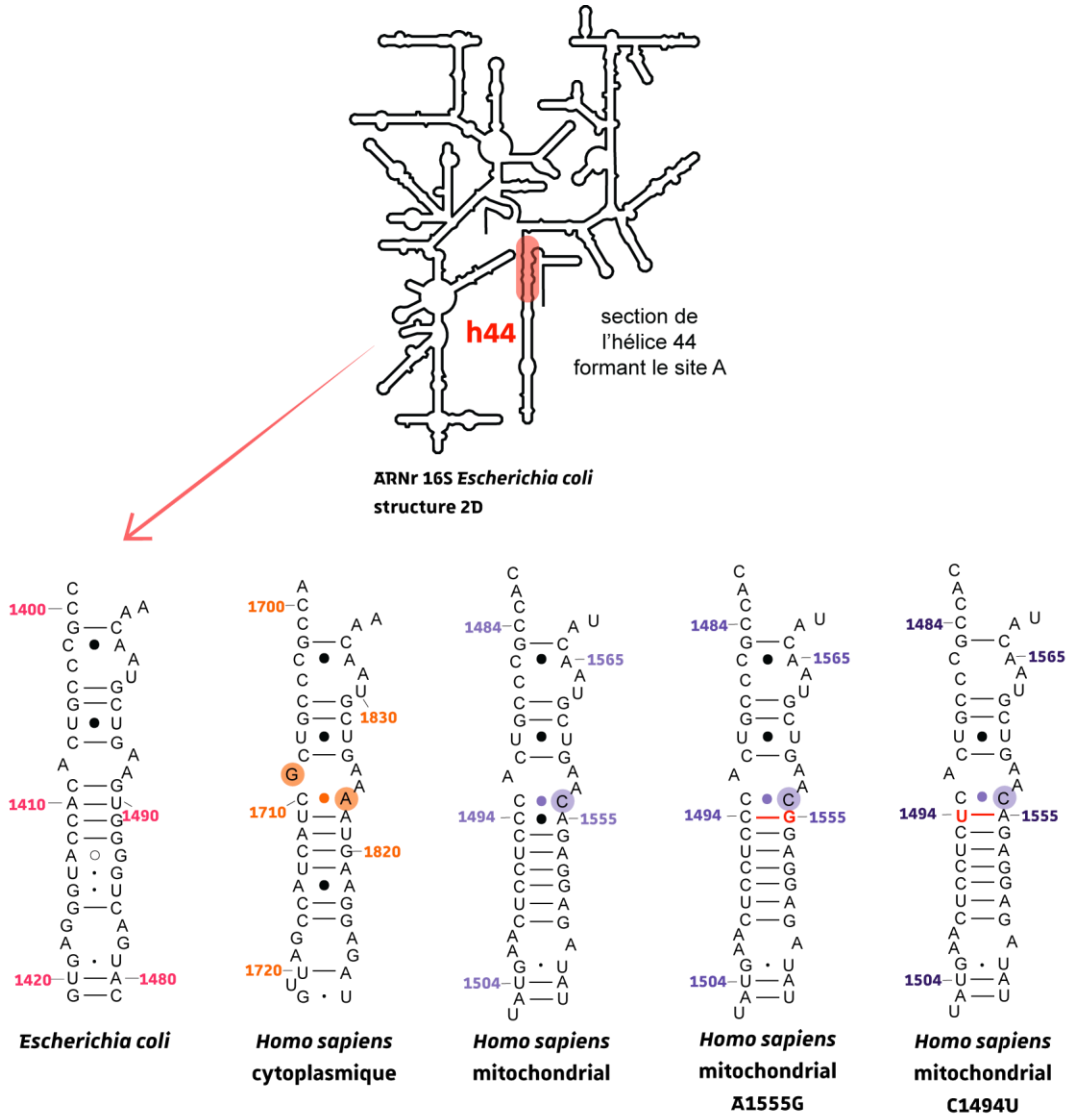


Figure 18 – Structures secondaires du site d'interaction des aminoglycosides sur l'ARNr 16 S au niveau de h44. Les nucléotides différant entre le site A bactérien et les sites A humains cytoplasmique et mitochondrial (WT ou mutant) sont mis en évidence par un cercle. Les mutations du site A mitochondrial conférant une hypersensibilité aux effets secondaires des aminoglycosides sont indiquées en rouge.

3.5.2. Effets secondaires

Un inconvénient majeur lié à la sélectivité relative des aminoglycosides est le fait qu'ils induisent des effets secondaires importants qui, en plus de l'émergence des résistances, oblige à limiter l'utilisation de ces antibiotiques en dernier recours. Ces effets secondaires sont liés au fait que ces composés peuvent s'accumuler à l'intérieur des cellules épithéliales des reins et de l'oreille notamment. Il a été démontré que cette accumulation est permise par endocytose via le récepteur mégaline. En effet, les

aminoglycosides ne s'accumulent pas dans les reins de souris pour lesquelles l'expression de la mégaline a été inhibée (Schmitz et al. 2002). La mégaline est un récepteur multi-ligands qui fixe de nombreuses protéines de bas poids moléculaire, comme l'albumine ou la protéine de liaison à la vitamine D, avec lesquelles les aminoglycosides entrent en compétition (Nagai et al. 2001). Elle est fortement exprimée par les cellules épithéliales des tubules proximaux, expliquant la spécificité cellulaire et tissulaire de cette toxicité (McWilliam et al. 2017). Les effets secondaires principaux sont l'ototoxicité, la néphrotoxicité et le blocage neuromusculaire (Forge et Schacht, 2000). Au contraire de la perte auditive qui est permanent, la néphrotoxicité est réversible (O'Sullivan et al. 2017).

L'effet appelé « curarisant » des aminoglycosides (Brazil et Corrado 1957) serait lié au fait qu'ils entrent en compétition avec le calcium et bloquent ainsi les tunnels de transport du calcium dans les cellules et donc la neurotransmission (Parsons, Obaid, et Salzberg 1992).

L'ototoxicité, c'est-à-dire la capacité des composés à provoquer une perte auditive irréversible, est due à la destruction des cellules ciliées sensorielles de l'oreille interne. L'effet ototoxique des aminoglycosides se produit de manière sporadique et dose-dépendante. Les aminoglycosides peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules ciliées cochléaires car ils utilisent les tunnels d'import d'ions chargés positivement qui ne sont pas sélectifs, ce qui induit une augmentation de la perméabilisation des cellules (Jospe-Kaufman, Siomin, et Fridman 2020).

La néphrotoxicité est un effet secondaire provoqué particulièrement par la gentamicine qui induit des effets tubulaires, mais aussi glomérulaires et vasculaires (Lopez-Novoa et al. 2011). Les aminoglycosides ne sont pas affectés par le métabolisme avant d'arriver au niveau des reins et y rentrent donc inaltérés et à des concentrations élevées. Ils induisent notamment la nécrose des cellules proximales tubulaires du rein en perturbant les mécanismes intracellulaires menant à la mort des cellules épithéliales (Jospe-Kaufman, Siomin, et Fridman 2020). La réversibilité de cette toxicité est possible grâce à la régénération des cellules tubulaires.

Un lien peut être établit entre la structure des aminoglycosides et leur toxicité ce qui donne l'espoir de pouvoir diminuer la toxicité de ces composés en modifiant chimiquement leur structure (Jospe-Kaufman, Siomin, et Fridman 2020). Par exemple, la gentamicine C1a et l'apramycine sont moins ototoxiques que d'autres composés comme la néomycine ou la paromomycine (Ishikawa et al. 2019). En effet les différences de substitutions des aminoglycosides peuvent induire des différences de sélectivité sans diminuer l'activité antibactérienne. C'est le cas lorsque la position N6' de la néomycine

B est substitué par un groupe hydroxy-éthyle, la sélectivité est accrue pour le site A bactérien par rapport au site A mitochondrial (Sati et al. 2017).

D'autres stratégies peuvent être utilisées pour diminuer la toxicité des aminoglycosides. Par exemple, la baisse de la néphrotoxicité de l'amikacine est induite par l'association avec la taurine (Madbouly et al. 2021).

3.5.3. Mutation du site A mitochondrial et sensibilité accrue aux aminoglycosides

Certains patients sont plus sensibles aux effets ototoxiques induits par les aminoglycosides et, dans la plupart des cas chez l'humain, cette sensibilité est génétiquement héritée de la mère (Guan 2011). En effet, des formes héréditaires d'hypersensibilité à l'ototoxicité des aminoglycosides sont liées à des mutations ponctuelles de l'ARNr mitochondrial, comme A1555G et C1494U (numérotation *Homo sapiens*, ARNr 16 S mitochondrial). Des preuves expérimentales montrent le dysfonctionnement du ribosome mitochondrial induit par les aminoglycosides et l'hypersensibilité mitochondriale liée aux mutations A1555G/C1494U, prouvant que la toxicité de ces composés est directement liée à leur action sur le ribosome eucaryote (Hobbie et al. 2008, Perez-Fernandez et al. 2014). Le mutant A1555G du site A humain mitochondrial est retrouvé dans plus de 120 familles à travers le monde et est l'une des causes génétiques de perte auditive les plus courantes (Prezant et al. 1993, Hutchin et Cortopassi 2000). Le résidu G1555 forme une paire de bases Watson-Crick avec le résidu C1494 sur le brin opposé rendant sa structure plus proche de celle du site A bactérien (Kondo et Westhof 2008).

Comme dit précédemment, le site A mitochondrial sauvage nécessite un coût énergétique plus élevé pour passer d'un état inactif (« off ») à un état actif pour le décodage (« on »). Ce coût plus élevé est lié au mécanisme de traduction différent au sein de la bactérie et de la mitochondrie. Or la mutation A1555G du site A mitochondrial lui confère deux sous-états « off », l'un étant plus proche structuralement de l'état « off » du site A bactérien (**Figure *19***) (Kondo et Westhof 2008). La mutation confère ainsi à l'ARN ribosomal mitochondrial un coût énergétique plus faible pour passer de l'état « off » à l'état « on ». Une augmentation des erreurs de traduction des protéines mitochondriales induirait une perturbation de la production d'énergie dans la cellule, les protéines mal formées induisant une production trop élevée de superoxides conduisant à la mort cellulaire. Les aminoglycosides se lient avec une meilleure affinité au site A mitochondrial mutant et induisent des changements de conformation différents du site A mitochondrial sauvage (Qian et Guan 2009).

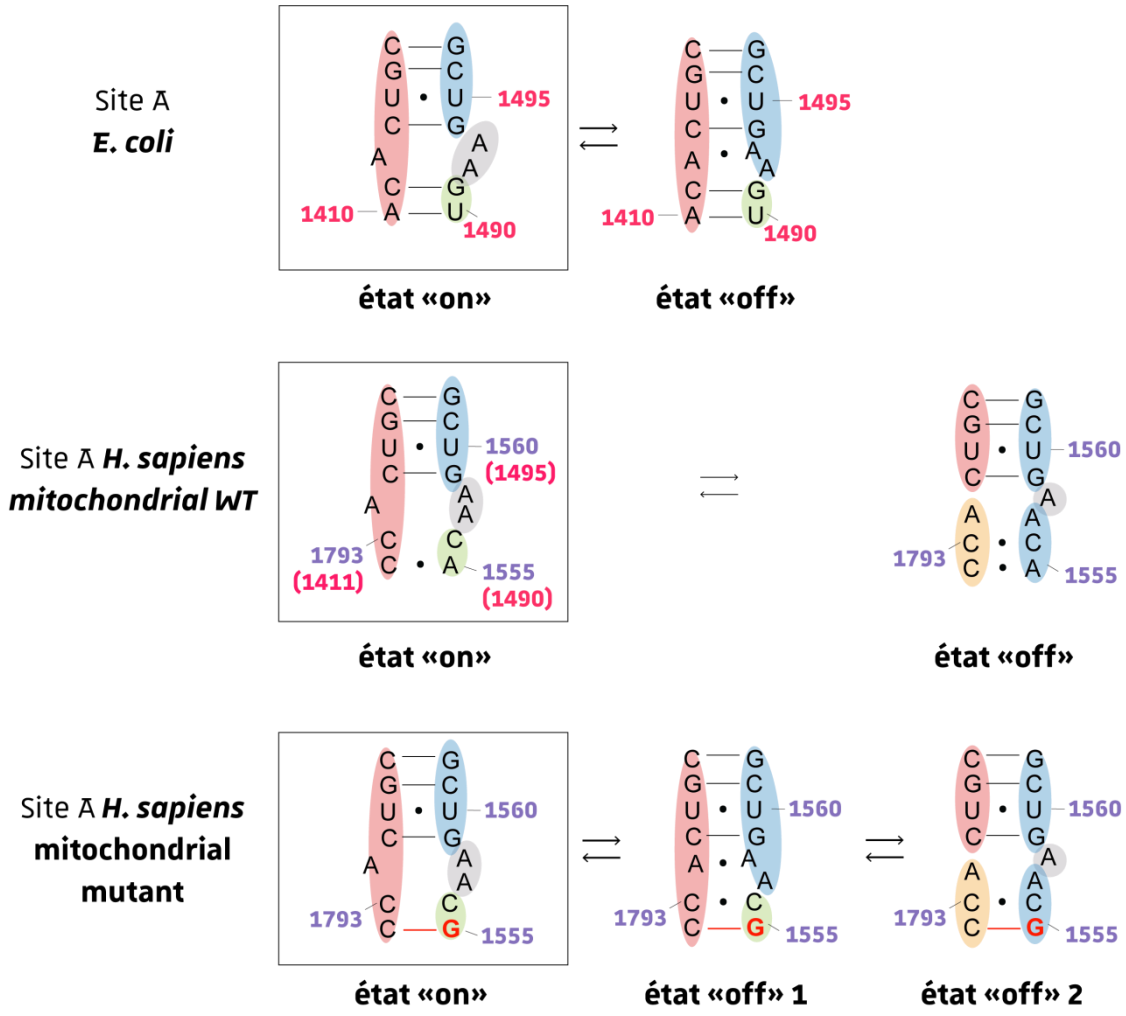


Figure 19 – Etats actifs et inactifs des sites A bactérien et humains mitochondriaux sauvage et mutant A1555G (adapté de Kondo et Westhof 2008). Les bases empilées dans la structure sont entourées en rouge, bleu, orange ou vert. Les adénines qui sont orientées à l'extérieur de l'hélice sont entourées en gris.

3.6. Développement d'aminoglycosides semi-synthétiques

Avec l'augmentation des résistances dues notamment aux enzymes modificatrices d'aminoglycosides (AMEs), le mécanisme de résistance aux aminosides le plus courant chez les entérobactéries, le design de molécules semi-synthétiques capables d'échapper à ces résistances a augmenté.

3.6.1. Dérivés résistants aux AMEs

Afin de surmonter les résistances aux AMEs, deux stratégies majeures sont employées : la modification précise d'un composé pour surmonter la résistance à une enzyme précise ou des modifications plus générales permettant d'échapper à la résistance provoquée par plusieurs enzymes (Mingeot-Leclercq, Glupczynski, et Tulkens 1999, Thamban Chandrika et Garneau-Tsodikova 2018). Un des premiers aminoglycosides semi-synthétiques à être élaboré est la dibékacine, à partir de la structure de la kanamycine, qui en diffère par l'absence de groupement hydroxyle en position 3' et 4'. Ces modifications au niveau de ces sites confèrent à la dibékacine une résistance à la phosphorylation ou à l'adénylation et une résistance à l'acétylation en position 3 de l'aminocyclitol 2-DOS (Hill, Counts, et Turck 1981).

La plazomicine est également un dérivé semi-synthétique de la sisomicine qui a été conçu pour surmonter les résistances dues aux AMEs. Cet aminoglycoside, autorisé en juin 2018, est le premier à être approuvé par la FDA depuis l'approbation de l'amikacine en 1981 (Serio et al. 2018). La plazomicine n'est pas désactivée par la plupart des AMEs connues, ne présente pas d'effets secondaires majeurs dans des modèles animaux et induit des effets néphrotoxiques chez l'homme mais n'a pas montré d'effets ototoxiques dans les essais cliniques (Jospe-Kaufman, Siomin, et Fridman 2020). L'arrivée de cet antibiotique et la création d'une société pour le commercialiser (Achaogen) démontre un regain d'intérêt pour la recherche sur les aminoglycosides (Thamban Chandrika et Garneau-Tsodikova 2018).

3.6.2. Augmentation de la sélectivité pour le ribosome bactérien

L'exemple de la plazomicine montre que les modifications chimiques des aminoglycosides pourraient à la fois améliorer la sélectivité, sans perdre en efficacité antibactérienne ni augmenter les effets secondaires car idéalement les antibiotiques devraient être résistants à la modification enzymatique et pas ou peu toxiques pour les cellules humaines et plus généralement de mammifères (Jospe-Kaufman, Siomin, et Fridman 2020).

La position 4' des aminoglycosides a été désignée comme un site intéressant de modifications améliorant la sélectivité (Perez-Fernandez et al. 2014). Par exemple, le remplacement d'un groupe hydroxyle en position 4' de la paromomycine 4,5-disubstituée, formant la propylamycine, augmente la sélectivité ribosomique bactérienne (Matsushita et al. 2019). La modification de la position 2'-NH_2 de la

paromomycine et de la néomycine, entraîne également un gain de sélectivité pour la bactérie par rapport aux ribosomes eucaryotes, bien que l'effet soit probablement indirect car cette position n'interagit pas avec le site de liaison au niveau du site A (Sati et al. 2019). Dans cette idée, le cas d'un dérivé de l'arbékacine est également intéressant. En ajoutant un groupe hydroxyle en position 2 de l'arbékacine, le dérivé conserve une activité semblable à celle de son parent mais montre une néphrotoxicité décrue. Cette modification a été inspirée par la présence d'un groupe hydroxyle en position 2 de la streptomycine, qui possède naturellement une néphrotoxicité faible comparée aux autres membres de la classe (Takahashi et al. 2018, Serio et al. 2018). L'apramycine, réservée à l'usage vétérinaire (***Tableau 1***), montre peu d'activité contre les ribosomes eucaryotes. Ce composé montre également une sélectivité plus faible pour des ribosomes hybrides, c'est-à-dire des ribosomes bactériens génétiquement modifiés pour porter la mutation A1555G du ribosome mitochondrial induisant une susceptibilité accrue aux aminoglycosides (Matt et al. 2012).

3.6.3. Résistance aux 16S-RMTases

La plupart des aminoglycosides 4,6-disubstitués sont inefficaces dans des souches possédant une résistance due à la méthylation de l'ARNr 16 S par des méthyltransférases (16 S-RMTases). Comme cité précédemment la substitution de la position N6' de la néomycine B augmente la sélectivité pour le site A bactérien par rapport au site A mitochondrial (Sati et al. 2017). Le fait de modifier la néomycine a un intérêt majeur qui est que cette dernière n'est majoritairement pas ciblée par les 16 S-RMTases car elle possède un aminocyclitol 4,5-disubstitué (Serio et al. 2018). Des modifications, dans le but de diminuer les effets toxiques, ont également été réalisée sur la paromomycine, un autre aminoglycoside 4,5-disubstitué (Duscha et al. 2014). Dans les deux cas, les modifications permettent d'augmenter la sélectivité des composés pour le ribosome bactérien, tout en conservant l'activité bactérienne et sur des composés naturellement résistants aux 16 S-RMTases.

II. APPROCHE INTÉGRATIVE

A. Objectifs de la thèse

Le but du projet de thèse est d'obtenir une meilleure compréhension du mécanisme d'action d'antibiotiques utilisés contre des bactéries responsables de maladies nosocomiales et généralement associées à la multi-résistance (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacter spp). Comme décrit dans cette introduction générale, le ribosome bactérien est une des cibles majeures des principaux antibiotiques. Effectivement, près de la moitié des antibiotiques actuellement utilisés, comme les macrolides ou les aminoglycosides ciblent différentes étapes du mécanisme de traduction.

Cependant, le mécanisme exact d'inhibition n'est pas encore parfaitement compris. Il est devenu urgent de rendre disponible de nouveaux médicaments, possiblement avec un nouveau mécanisme d'action, pour surpasser cette augmentation de cas de résistance et surtout de multi-résistance. D'une part, le projet porte sur l'étude de l'interaction des macrolides avec le tunnel de sortie des peptides néosynthétisés (PET pour « Peptide Exit Tunnel »). D'autre part, l'interaction de dérivés d'aminoglycoside avec leur cible au sein de l'ARNr 16 S, le site A accepteur du ribosome, sera étudiée.

Pour réaliser ce projet, j'utilise une approche intégrative utilisant divers outils biophysiques dans l'objectif de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de ces antibiotiques. Les aspects thermodynamiques et cinétiques de l'interaction sont abordés en utilisant la technique de microcalorimétrie ITC (« *Isothermal Titration Calorimetry* »). Les sites d'interaction ont été observés plus précisément grâce à la biologie structurale, plus particulièrement la cristallographie et la cryo-microscopie électronique. L'objectif de ce projet est de contribuer de manière significative au développement de nouveaux médicaments en améliorant la compréhension du mode d'action des antibiotiques ciblant le ribosome bactérien.

B. Techniques pour étudier l'interaction entre un antibiotique et sa cible

1. Intérêt d'une étude intégrative

L'étude d'une interaction entre un antibiotique et sa cible moléculaire peut être envisagée à différentes échelles. Tout d'abord, la cible à grande échelle d'un antibiotique est la bactérie. La première chose à tester dans le cas de développement de nouveaux antibiotiques serait donc son pouvoir bactériostatique ou bactéricide en le mettant en contact avec des souches bactériennes.

Des techniques de biochimie, *in vitro*, peuvent également être envisagées pour mettre en évidence la cible moléculaire directe de l'antibiotique au sein de la bactérie. Dans le cas des antibiotiques ciblant le ribosome et le mécanisme de traduction, il sera alors question d'étudier l'inhibition de la traduction par les composés testés.

La biologie structurale est également une approche clé de la compréhension d'un mécanisme d'action d'un antibiotique. En effet, elle permet d'observer les interactions de la molécule avec sa cible au niveau atomique, de comprendre les changements de conformation induits par la fixation de l'antibiotique au niveau du ribosome par exemple. Dans ce projet de thèse, j'utilise les techniques de cristallographie et cryo-microscopie électronique (cryo-EM). Ces deux techniques sont complémentaires à bien des égards. En effet, la cristallographie permet d'obtenir des structures à très haute résolution. La cryo-EM permet d'étudier plus facilement de gros complexes tels que le ribosome afin d'identifier les interactions et changements de conformation de la cible au niveau global.

Cependant, un aspect qui manque aux techniques ci-dessus est celui de la dynamique moléculaire du mécanisme d'action. En effet, la microbiologie et la biochimie apportent une réponse binaire d'action ou d'inaction du composé. La biologie structurale apporte une vision moléculaire de l'interaction, mais qui est figée à un moment précis. C'est pourquoi j'utilise également une technique de thermodynamique pour caractériser les forces qui entrent en jeu dans le mécanisme d'interaction. J'apporte dans la section suivant une introduction de la microcalorimétrie et de son application à l'étude des interactions biologiques.

2. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

2.1. Principes thermodynamiques

Un système fermé est un système dans lequel il n'y a pas d'échanges de matière avec l'extérieur. Le passage d'un état initial à un état final nécessite une transformation. Les variables d'état sont la masse (M), le volume (V), la température, la pression et une fonction d'état est par exemple la masse volumique.

Le premier principe thermodynamique est : à tout système fermé est associée une fonction d'état, l'énergie interne U (Joule). S'il y a une transformation alors $\Delta U + \Delta K = W + Q$ où ΔU est la variation d'énergie interne, ΔK la variation d'énergie cinétique, W le travail échangé avec le milieu extérieur et Q la chaleur. Dans ce cas, l'énergie totale est conservée. Lors d'une transformation isobare, c'est-à-dire à pression constante, seul le travail des forces de pression intervient.

Alors,	$W = -P\Delta V$	où ΔV est la variation de volumes,
Donc	$\Delta U = Qp - P\Delta V$,	
En posant	$H = U + PV$,	
On a	$\Delta H = \Delta U + P\Delta V$,	
Donc	$\Delta H = Qp$	

H est la fonction d'état enthalpie qui correspond à l'énergie totale du système en Joule et ΔH est la quantité de chaleur émise ou absorbée pendant la transformation.

Le deuxième principe thermodynamique est : à tout système fermé est associée une fonction d'état extensive, c'est-à-dire une quantité qui ne peut qu'augmenter au cours de toute transformation, l'entropie S (Joule/K). L'entropie instaure une différence fondamentale entre deux formes d'énergie, la chaleur et le travail. La chaleur est désordonnée et le travail est dans un sens précis. L'équation associée est $\Delta S = \Delta eS + \Delta iS$ où ΔeS est l'entropie d'échange de chaleur avec l'extérieur et ΔiS est l'entropie de création (≥0). $\Delta eS = \frac{\Delta Q}{T}$, où T est la température en Kelvin, qui est nulle si la transformation est adiabatique. Un processus adiabatique est décrit par le fait qu'aucun transfert thermique n'a lieu entre le système étudié et le milieu extérieur mais cela ne veut pas dire que la température du système reste constante, à ne pas confondre avec un processus isotherme. Lors d'une transformation, l'augmentation d'entropie représente le degré de dispersion de l'énergie.

La fonction d'état d'enthalpie libre G (Joule) correspond à la fonction d'énergie de Gibbs qui représente la mesure de la variation d'énergie d'un système utile pour réaliser un travail précis :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Au cours d'une interaction, G doit diminuer pour que l'énergie globale du système fermé diminue. Les quantités de matière des réactifs et produits dépendent de l'avancement de la réaction ζ (mol) : $\Delta rX = \Delta X/\Delta\zeta$ où X est la fonction d'état et ΔrX la grandeur de réaction.

ΔrH = Enthalpie de la réaction en J.mol^{-1}
ΔrS = Entropie de la réaction en J.K^{-1}.mol^{-1}
ΔrG = Enthalpie libre de la réaction en J.mol^{-1}

ΔrH correspond aux échanges thermiques associés à l'interaction, si $\Delta rH < 0$, la réaction est exothermique, si $\Delta rH > 0$, la réaction est endothermique.

ΔrS correspond à l'évolution du système pendant l'interaction, si $\Delta rS < 0$, l'interaction organise le système, si $\Delta rS > 0$, l'interaction désorganise le système.

ΔrG correspond à la spontanéité de l'interaction, si $\Delta rG < 0$, l'interaction est spontanée donc exergonique, si $\Delta rG > 0$, l'interaction nécessite un apport d'énergie, elle est donc endergonique.

2.2. Microcalorimétrie par titration isotherme

La microcalorimétrie par titration isotherme ou ITC (pour « *Isothermal Titration Calorimetry* ») est une technique qui permet la mesure des paramètres thermodynamiques d'une interaction donc ΔH, ΔG et -TΔHS, mais aussi la mesure du K_D et de la stœchiométrie. L'appareil utilisé est un calorimètre à compensation. Il maintient une différence de température faible et précise entre une cellule de référence et une cellule à échantillon. A cette différence de température est associée la puissance calorifique ou thermique de base (en µcal.s^{-1}) qui est généralement fixée à 5 µcal.s^{-1}. Lors d'une réaction de fixation d'un antibiotique sur sa cible, l'appareil compense alors la différence de chaleur et permet de déterminer si la réaction est exo- ou endothermique. Par exemple, si la réaction est exothermique, la puissance générée

par l'appareil diminue. Le principe physique expliquant comment une machine maintient constante une différence de chaleur est appelé effet Peltier.

La mesure de la variation de puissance générée par l'appareil lors d'une réaction au cours du temps permet d'obtenir un thermogramme. L'intégration des valeurs de puissance mesurées génère une courbe appelée isotherme d'interaction. Cet isotherme d'interaction représente en abscisse le rapport molaire de la concentration de ligand par rapport à la concentration de macromolécule et en ordonnées l'intégration des pics en kcal.mol^{-1} (***Figure 20***). Pendant les injections au cours du temps, la température étant maintenue constante, le processus est proche d'un processus isotherme. L'ITC permet une mesure « directe », en une seule expérience, de l'ensemble des paramètres thermodynamiques d'une interaction entre deux molécules. L'aspect direct de la mesure est à nuancer car la mesure brute correspond à la puissance générée par l'appareil pour compenser l'interaction et pas directement la quantité de chaleur générée ou absorbée par la réaction.

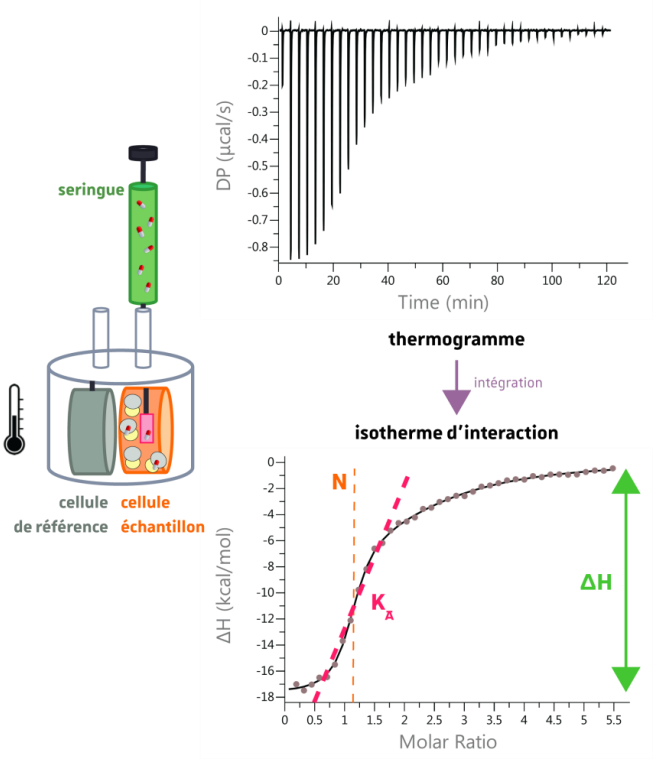


Figure 20 - Exemple de thermogramme obtenu lors d'une expérience d'ITC

La chaleur mise en jeu dans la réaction est mesurée via la puissance instantanée intégrée au cours du temps.

$$Q = \int P(t)dt$$

Les valeurs directement lisibles sur l'isotherme d'interaction sont le ΔH qui correspond à l'amplitude totale de la sigmoïde, le K_A, la constante d'affinité correspondant à la pente maximale de la sigmoïde et la stœchiométrie mesurable au point d'inflexion de la courbe sur l'axe du ratio molaire. La déduction des valeurs de ΔG et de ΔS (en cal ou $J.K^{-1}.mol^{-1}$) à partir des résultats expérimentaux est possible à partir des relations fondamentales :

$$\Delta G = -RTLn(K_a) = \Delta H - T\Delta S$$

R est la constante des gaz parfaits (8.314 $J.mol^{-1}.K^{-1}$)
T est la température absolue en K
ΔG est exprimée en $kJ.mol^{-1}$

En variant la température d'expérience, il est possible de déterminer le ΔCp qui correspond au « heat capacity change » ou le changement de capacité calorifique, c'est-à-dire la dépendance de la valeur de ΔH à la température :

$$Cp = \partial H/\partial T$$

La dérivation (∂) par rapport à la température s'effectue en maintenant constantes toutes les autres variables indépendantes de T (P, pH).

$$Cp = \partial \Delta H/\partial T$$

Les avantages sont que cette technique ne nécessite pas de marquage des protéines ou acides nucléiques étudiés, ni de fixation sur un support solide, il n'y a pas de restriction de taille des molécules et elle s'accommode de la plupart des tampons. Le paramètre essentiel pour obtenir des mesures correctes est la dialyse pour que les deux partenaires d'interaction soient exactement dans le même tampon. Une différence dans la composition des tampons induit la formation de pics parasites dus à la « chaleur de dilution », c'est-à-dire la chaleur générée par les interactions entre les ions et les composants du tampon ou une dilution du ligand qui se serait multimérisé

dans la seringue. L'inconvénient majeur est l'importante consommation de matériel biologique. Des concentrations élevées de matériel sont nécessaires pour obtenir un signal interprétable.

Lors d'une expérience d'ITC, la première injection génère beaucoup d'interactions car beaucoup de sites de fixation sont libres, le signal mesuré sera alors à son maximum. Lors des dernières injections, il y a peu ou plus d'interactions car plus de sites de fixation libres, le signal est faible et on n'observe seulement le signal lié à la chaleur de dilution (Audfray, Malvern 2015).

2.3. Utilisation de l'ITC pour étudier des interactions biologiques

Les interactions biomoléculaires peuvent être définies de manière plus complète en combinant des données structurales à des données thermodynamiques, communiquant des informations sur les propriétés énergétiques de l'interaction (Ladbury et Chowdhry 1996). Les interactions biologiques dépendent d'un certain nombre de variables, telles que la concentration de molécules présentes, l'environnement physique (température, pression, solvant), la cinétique et les conséquences thermodynamiques de l'interaction. Le développement d'instruments de calorimétrie isotherme par titration (ITC) a permis d'améliorer la capacité à mesurer ces valeurs directement et précisément (Ladbury et Chowdhry 1996).

Dans le cas d'une interaction biologique, l'enthalpie d'une réaction exothermique, donc un dégagement de chaleur, peut être associé à la formation de liaisons polaires, telles que les liaisons hydrogène ou les interactions de van der Waals. Tandis que la variation d'entropie, donc de l'organisation du système, peut prendre origine dans la formation de liaisons ou d'interactions hydrophobes (empilement, interaction entre deux dipôles induits) qui induisent un mouvement des molécules d'eau en dehors du site d'interaction (Velazquez-Campoy, Luque, et Freire 2001). Les contributions entropiques dues à la sortie des molécules d'eau du site d'interaction sont souvent favorables à l'interaction, alors que les contributions entropiques dues à des changements conformationnels ou la réduction du degré de liberté des atomes sont défavorables pour l'énergie de la réaction (**Figure *21***). Le ΔS total peut être divisé en trois sous-termes entropiques (Sakamoto, Ennifar, et Nakamura 2018) :

$$\Delta S = \Delta_{\text{eau}} + \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{\text{r/t}}$$

ΔS_{eau} est l'entropie associée à la libération d'ions et de molécules d'eau

ΔS_{conf} est l'entropie liée aux changements de conformations

$\Delta S_{r/t}$ est l'entropie liée à la perte de degrés de liberté de mouvements rotationnels et de translation

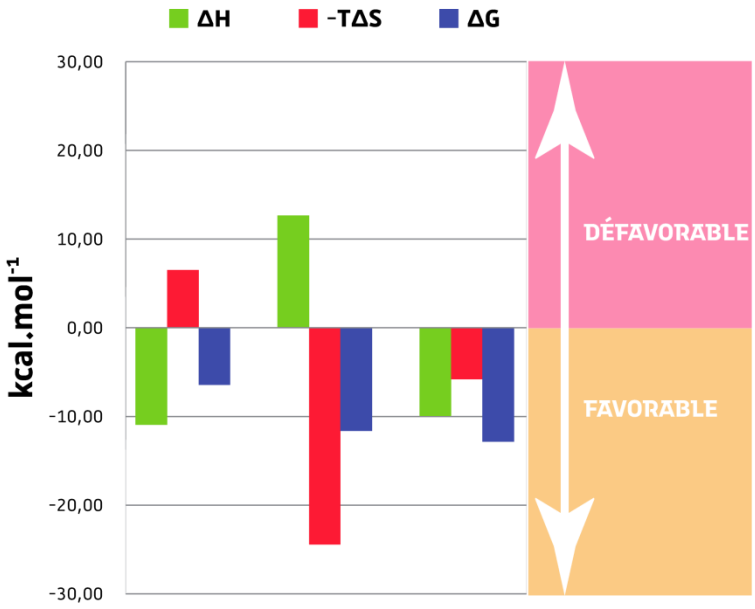


Figure 21 – Exemples de profils thermodynamiques. De gauche à droite : profil typique d'une interaction favorisée par la formation de liaisons et défavorisée par des changements conformationnels, profil typique d'une interaction dominée par des interactions hydrophobes, profil typique d'une interaction favorisée par la formation de liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes.

Comme $\Delta G=\Delta H-T\Delta S$, la valeur d'entropie ($\Delta S$) influe différemment sur l'énergie libre globale (ΔG) en fonction de son signe. Si la valeur d'entropie est positive, l'énergie libre diminue, l'entropie a donc un effet favorable sur l'interaction. Au contraire, si la valeur d'entropie est négative, l'influence sera défavorable car l'énergie libre nécessaire à la réaction augmente (Sakamoto, Ennifar, et Nakamura 2018).

La valeur de ΔH total est également la somme de plusieurs signaux, notamment les échanges de chaleurs générés par le transfert de protons :

$$\Delta H_{obs} = \Delta H_{interaction} + (n_H + \Delta H_{ion})$$

$n_H+\Delta H_{ion}$ correspondant au transfert de protons entre le complexe molécule/ligand et le tampon environnant. Ce transfert peut être expliqué par le changement de pKa des groupements ionisables de la molécule ou du ligand durant la formation du complexe générant un changement d'environnement des groupes fonctionnels (Krimmer et Klebe 2015).

Par exemple, la synthèse protéique par le ribosome induit une augmentation forte de l'ordre donc une baisse de la valeur d'entropie. L'hydrolyse des nucléotides triphosphates consomme de l'énergie libre, la réaction est endergonique. De manière générale, la formation de liaisons génère un dégagement de chaleur et à l'inverse, la rupture de liaisons absorbe de la chaleur.

2.4. Caractérisation thermodynamique et design de médicaments

Lors du développement de nouveaux médicaments, les paramètres thermodynamiques sont pris en compte. Pour obtenir le meilleur composé, le mieux serait d'améliorer simultanément l'entropie et l'enthalpie mais cela est compliqué à cause de la compensation enthalpie/entropie (Su et Xu 2018). En effet, une interaction est le résultat de la contribution de forces favorables et défavorables. C'est pourquoi il est essentiel de combiner les données thermodynamiques à des données structurales qui permettent de comprendre concrètement à quoi sont dues les variations d'enthalpie et d'entropie observées. Par exemple, dans le cas d'une interaction d'un ligand avec une protéine, la formation d'une liaison hydrogène, générant un gain d'enthalpie, peut compenser une perte d'enthalpie due à la perturbation d'autres liaisons auparavant établies entre des molécules d'eau et le ligand ou la protéine. En effet, lors de la mesure des paramètres thermodynamiques par ITC, l'évènement est mesuré dans sa globalité. Les différentes étapes de l'interaction au niveau moléculaire peuvent se compenser entre elles résultant à des changements thermodynamiques globaux nuls (Krimmer et Klebe 2015).

Pour optimiser des médicaments candidats les forces qui peuvent être optimisées sont les interactions de van der Waals, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et des contraintes conformationnelles pour minimiser la perte entropique. Les optimisations sont plus facilement envisageables si les forces à améliorer sont connues, c'est pourquoi l'ITC a une importance dans la conception de nouveaux médicaments (Lafont et al. 2007).

2.5. ITC et ARN

L'ITC est aujourd'hui une technique particulièrement intéressante pour l'étude d'interactions de ligands avec de l'ARN (Salim et Feig 2009). Les études par ITC réalisées sur les interactions entre petites molécules et ARN sont assez répandues dans la littérature car la mise en place de l'expérience est relativement simple. Différentes études ont alors été réalisées comme la mesure de la spécificité de riboswitches (Gilbert et al. 2006, Müller et al. 2006), la fixation d'aminoglycosides à des introns de groupe I (von Ahsen, Davies, et Schroeder 1991), au ribozyme Hammerhead (Hermann et Westhof 1998) ou un oligonucléotide mimant le site A (Pilch et al. 2003). Outre l'interaction avec les petites molécules, les interactions d'ARN avec des protéines est également un sujet d'étude propice aux mesures calorimétriques. Par exemple l'interaction entre ARN et protéines, comme les kinases dépendantes de l'ARN (Kim, Liu, et Puglisi 2006), la protéine Hfq de *E. coli* (Mikulecky et al. 2004) ou l'assemblage des sous-unités du ribosome (Recht et Williamson 2004) ont été étudiés par ITC. En utilisant l'ITC, il est donc possible de mettre en évidence les attributs de structures de l'ARN nécessaires au mécanisme d'interaction, la stœchiométrie ou encore le mécanisme d'assemblage de complexe tels que le ribosome.

Les avantages de l'utilisation de l'ITC pour étudier les interactions avec l'ARN par rapport à l'utilisation d'autres techniques comme la fusion UV (« *UV-melting* ») sont notamment que les mesures sont directes et à une température précise. Lors de l'étude d'interaction avec l'ARN, des études préliminaires sont essentielles. Parmi elles, l'étude de conformations alternatives sur gel natif, de l'équilibre entre monomères et dimères car la concentration utilisée en ITC est dans l'ordre du µM et de l'homogénéité de l'échantillon (Salim et Feig 2009).

2.6. ITC par compétition

Le coefficient de Wiseman c définit deux critères : la courbe doit comporter deux plateaux pour avoir un ΔH précis et c doit être compris entre 20 et 500 pour une détermination optimale du ΔH :

$$c = K_a \times M_{tot} \times N$$

K_a est la constante d'association (M^{-1})

M_{tot} est la concentration de la macromolécule (M)
N est la stœchiométrie

En effet, si *c* est élevé, à cause d'une faible concentration de la molécule étudiée ou de l'affinité trop élevée du ligand, la détermination du Ka sera compliquée car la pente sera trop ardue. En revanche, le ΔH sera facilement déterminable car les deux plateaux seront bien définis. Si la valeur *c* est faible, cela correspond à un ligand avec une faible affinité qui ne conduira jamais à une saturation de la molécule cible, le ligand doit donc être utilisé en excès. La détermination de la stœchiométrie et du ΔH sont alors difficiles. Dans ce cas, la solution est d'utiliser une titration par déplacement ou compétition afin d'obtenir un thermogramme avec une valeur *c* optimale. L'ITC de compétition est une stratégie utilisant la capacité d'un ligand de forte affinité (par exemple, un macrolide) à déplacer un ligand de plus faible affinité (compétiteur) pour obtenir les paramètres thermodynamiques du ligand de forte affinité. Dans le cas de l'étude des paramètres thermodynamiques de fixation d'un macrolide, les peptides antimicrobiens sont des compétiteurs de choix car ils se fixent au niveau du tunnel de sortie du ribosome, le site de liaison des macrolides.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Étude de l'interaction de ribosomes bactériens avec différents antibiotiques

1. Purification du ribosome bactérien

Le ribosome (70 S) est produit à partir de différentes souches : *Escherichia coli* MRE600 (Code d'accession GenBank : CP014197.1), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* 1901m250054-02 (isolée d'une aspiration trachéale protégée prélevée le : 25/01/2019), *Enterobacter cloacae* 1904M300549-01 (reçu du PTM le 03/05/2019). A partir d'une préculture sur la nuit (12 à 16 h), 10 litres de milieu LB sont ensemencés pour obtenir une densité optique à 600 nm de 0,05 et incubés à 37 °C avec agitation. Quand la densité optique atteint une valeur proche de 1, les cellules bactériennes sont centrifugées pendant 20 min à 4 000 rpm et 4 °C. Les culots comportent environ 2 g de bactéries par litre de culture. Les cellules du culot sont lavées dans le tampon AE (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 200 mM NH_4Cl, 0,1 mM EDTA, 6 mM β-mercaptoéthanol). Les bactéries sont conservées à 4 °C.

Les suspensions de bactéries sont supplémentées avec un cocktail d'inhibiteur de protéases (1 X), 10 unités de DNase I et 1 mM de $CaCl_2$. Les bactéries sont lysées mécaniquement avec un désintégrateur de cellules de type French Press à une pression de 1,6 bar. Les lysats sont centrifugés 30 minutes à 18 200 rpm et 4 °C avec un rotor 50.2 Ti pour culotter les débris cellulaires. Les ribosomes sont alors dans le surnageant et culottés par une centrifugation de 4 h à 41 700 rpm à 4 °C. Les culots sont débarrassés de la fine couche brune qui les recouvre par aspiration/reflux et resuspendus dans le tampon AE (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 200 mM NH_4Cl, 0,1 mM EDTA, 6 mM β-mercaptoéthanol).

Afin d'isoler les ribosomes d'autres contaminants, tels que des facteurs d'initiation, les suspensions sont déposées sur un coussin de sucrose (30 % sucrose) et centrifugées pendant 19 h à 31500 rpm et 4 °C. Les culots sont à nouveau débarrassés d'une fine couche brunâtre par aspiration/reflux. Les culots devenus translucides sont resuspendus dans un tampon de conservation (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl, 0,1 mM EDTA, 6 mM β-mercaptoéthanol). Une dernière centrifugation de 1 h à 18 200 rpm et 4 °C est réalisée pour clarifier les suspensions de ribosomes. Ces

derniers sont concentrés à l'aide d'un filtre à centrifuger avec un seuil de 100 000 Da (100 K, Centricon, Merck Millipore) puis congelés rapidement dans l'azote liquide et conservés à -80 °C. La concentration en 70 S est mesurée avec un NanoDrop™ (Thermo Scientific), une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à 24 nM de 70 S (ou 0,06 mg/ml).

2. Dissociation des deux sous-unités du ribosome bactérien

Les deux sous-unités du ribosome bactérien sont dissociées par dialyse dans un tampon à concentration faible en $MgCl_2$ qui stabilise l'association des deux sous-unités. Environ 50 mg de ribosome sont déposés dans une cassette de dialyse avec un seuil de 3 kDas et. La cassette est placée sous agitation dans un tampon de dissociation (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 300 mM NH_4Cl, 0,1 mM EDTA, 1,5 mM DTT) pendant 4 heures à 4 °C. L'échantillon de ribosome dissocié est déposé sur un gradient de sucrose allant de 10 à 30 % et centrifugé pendant 15 heures à 30 000 rpm et 4 °C (rotor SW 32.Ti).

Les sous-unités dissociées sont collectées et visualisées avec un Piston Gradient Fractionator™ (BioComp). Les fractions correspondant aux sous-unités 30 S et 50 S sont récupérées séparément et l'efficacité de la dissociation est vérifiée à l'aide d'un gel d'agarose 1 %. Les sous-unités sont concentrées séparément et lavées dans un tampon de conservation (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT) sur un filtre à centrifuger avec un seuil de 100 000 Da (100 K, Centricon, Merck Millipore). Les aliquotes sont congelées rapidement dans l'azote et conservés à -80 °C. La concentration en sous-unités 50 S ou 30 S est mesurée avec un NanoDrop™ (Thermo Scientific), une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à 36 nM de 50 S ou 72 nM de 30 S.

3. Expérience ITC ribosome 70S - dérivés de Néomycine

L'appareil utilisé pour les expériences d'ITC est le PEAQ ITC de Malvern. Les échantillons de ribosome sont décongelés puis concentrés à l'aide d'un filtre à centrifuger avec un seuil de 100 000 Da (100 K, Centricon, Merck Millipore). Le tampon de conservation est échangé avec le tampon ITC 1 X. Préalablement au dépôt dans l'appareil d'ITC, les échantillons de ribosome et de dérivés de néomycine sont incubés

à la température d'expérience. Cela permet de dégazer les échantillons et d'éviter la formation de bulles pendant les injections. Une fois la cellule d'échantillon rincée avec du tampon ITC 1 X (50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM $MgCl_2$, 3 M NH_4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycérol, 30 mM KCl), 285 µl de ribosome à 20 µM sont ajoutés. La seringue est remplie avec 70 µl de dérivé de néomycine à 500 µM. L'expérience ITC se déroule à 25 °C et est composée de 40 injections de 1 µl espacées de 180 secondes.

4. Expérience ITC ribosome 70S compétition peptide antimicrobien – macrolide

L'appareil utilisé pour les expériences d'ITC est le PEAQ ITC de Malvern. Les échantillons de ribosome sont décongelés puis concentrés à l'aide d'un filtre à centrifuger avec un seuil de 100 000 Da (100 K, Centricon, Merck Millipore). Le tampon de conservation est échangé avec le tampon ITC 1 X. Préalablement au dépôt dans l'appareil d'ITC, les échantillons de ribosome et de peptide antimicrobien ou de macrolide sont incubés à la température d'expérience. Cela permet de dégazer les échantillons et d'éviter la formation de bulles pendant les injections. Une fois la cellule d'échantillon rincée avec du tampon ITC 1 X (50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM $MgCl_2$, 3 M NH_4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycérol, 30 mM KCl), 285 µl de ribosome à 20 µM sont ajoutés. La seringue est remplie avec 70 µl de peptide antimicrobien à 200 µM. La première partie de l'expérience ITC se déroule à 30 °C et est composée de 40 injections de 1 µl espacées de 180 secondes. La seringue est ensuite remplie avec 70 µl de macrolide à 300 µM. La deuxième partie de la compétition se déroule à 30 °C et est composée de 20 injections de 2 µl espacées de 480 secondes.

5. Hybridation d'oligonucléotides aux ARNr pour l'étude des modifications

Le ribosome purifié de *Pseudomonas aeruginosa* sous forme 70 S ou dissocié (30 S et 50 S) est traité à la protéinase K (VWR). La mélange de dégradation des protéines ribosomales contient : ribosome 3,5 µg/µl, protéinase K 2 mg/ml, 0,5 % SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl. La réaction est incubée sur la nuit à température ambiante.

Le mélange d'hybridation contient : 50 pmol d'ARNr ou d'ARNr 16 S ou 23 S seuls, 30 pmol d'oligonucléotide (fluorescent ou biotinylé) et du tampon 1 X (200 mM

NaCaco, 50 mM KCl, 100 mM NaCl). Le protocole d'hybridation consiste en une incubation 3 min à 95 °C, suivies de 5 min sur glace, puis les échantillons sont centrifugés et incubés 15 min à 60 °C. Les échantillons concernés sont ensuite traités à la RNase T1 (0,1 U/µl ou 0,01 U/µl) pendant 3 h à 37 °C.

100 µl de billes magnétique streptavidine (MagnaBind™ Streptavidin Beads PIERCE) sont lavées avec 100 µl de tampon de lavage (5 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl). Puis 50 µl de chaque condition et 50 µl sont ajoutés et incubés pendant 15 min à 20 °C sous agitation. Les billes sont lavées trois fois avec du tampon de lavage. Enfin, 100 µl de tampon d'élution (0,2 M NaOH) sont ajoutés et les billes sont incubées pendant 5 min à 95 °C.

B. Étude ITC de l'interaction des dérivés de Néomycine avec leur cible

1. Transcription *in vitro* à grande échelle des oligonucléotides imitant les sites A

Le mélange de transcription *in vitro* contient : 10 % PEG8000, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1,5 mM spermidine, 50 mM DTT, 4 mM ATP, 4 mM GTP, 4 mM CTP, 4 mM UTP, 0,01 % Triton, 16 mM $MgCl_2$, 0,3 mM oligonucléotide ADN promoteur T7, 0,3 mM oligonucléotide ADN site A, 0,1 mg/ml T7 ARN Polymérase. Un volume de 5 ml de mélange est préparé afin d'avoir suffisamment de transcrit pour les expériences d'ITC qui consomment beaucoup de matériel. Le mélange est séparé en 5 tubes et incubé à 37 °C pendant 4 h.

A la fin de l'incubation, 100 µl d'EDTA à 0,5 M sont ajoutés dans chaque tube. Tous les échantillons sont rassemblés dans un tube de 50ml et ½ volume de phénol est ajouté (ROTI®Aqua-P/C/I, Roth). Le mélange est vortexé et centrifugé pendant 10 minutes à 9000 rpm et 20 °C. La phase supérieure est concentrée à l'aide d'un filtre à centrifuger avec un seuil de 3 000 Da (3 K, Centricon, Merck Millipore). Les traces de phénol restantes sont supprimées par plusieurs lavages avec de l'eau, les densités optiques à 260 et 270 nm sont mesurées tout au long des lavages. Les centrifugations sont arrêtées quand le pic d'absorption à 270 nM, correspondant au phénol, a disparu.

Le transcrit est déposé sur un gel d'acrylamide 12 %, urée 7 M et migré pendant 30 min à 180 V. Un ARN de taille connue est utilisé comme marqueur de taille, la taille du transcrit étant de 27 bases. Les séquences des oligonucléotides correspondant aux différents sites-A en aval d'un promoteur T7 sont les suivantes :

- Site-A bactérien :
  5'-GGCGACTTCACCCGAAGGTGTGACGCCTATAGTGAGTCGTATTA -3'
- Site-A humain cytoplasmique :
  5'-GGCGACTTTTACTCGAAAGTAGCGACGCCTATAGTGAGTCGTATTA -3'
- Site-A humain mitochondrial :
  5'-GGCGACTTGTCTCGAAAGGGTGACGCCTATAGTGAGTCGTATTA -3'
- Site-A humain mitochondrial mutant A1555G :
  5'-GGCGACTTGCCTCGAAAGGGTGACGCCTATAGTGAGTCGTATTA -3'

2. Purification des sites A transcrits

Afin de supprimer les nucléotides et les transcrits abortifs, les transcrits sont purifiés sur une colonne HiTrap™ Q XL 5 ml (Dominique Dutscher) avec un appareil FPLC ÄKTA (GE HEALTHCARE). L'échantillon de transcrit est déposé sur la colonne préalablement équilibrée avec du tampon A (20 mM Mes pH 6.5, 10 mM NaCl). Le transcrit est ensuite élué à l'aide d'un gradient de NaCl allant de 10 mM à 1,5 M (tampon B : 20 mM Mes pH 6.5, 1,5 M NaCl).

Les fractions correspondant aux pics sont déposées sur un gel d'acrylamide 12 %, urée 7 M et migré pendant 30 min à 180 V. Les fractions contenant le transcrit sont concentrées à l'aide d'un filtre à centrifuger avec un seuil de 3 000 Da (3K, Centricon, Merck Millipore).

3. Préparation des sites A transcrits pour une expérience d'ITC

L'absorbance à 260 nm des ARNs transcrits (sites-A bactérien, humain, humain mitochondrial, humain mitochondrial mutant A1555G) est mesurée. La concentration en micro-molaires est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire de chaque ARN.

L'ARN est restructuré *in vitro* via le protocole suivant. Le volume nécessaire pour une concentration de 20 µM dans 1ml est prélevé et divisé en 6 tubes. Le volume

de chaque tube est ajusté à 1 ml. Cette dilution permet de favoriser la formation de la structure en tête d'épingle au détriment de la formation de dimères d'ARN. Les solutions d'ARN diluées sont incubées 5 minutes à 90 °C puis directement incubées 5 minutes supplémentaires dans de la glace à 0 °C (mélangée à de l'eau). Ensuite, 111,1 µl de tampon ITC ARN 10 X (20 mM $MgCl_2$, 250 mM NaCacodylate pH 7, 1 M KCl). Les solutions sont concentrées à l'aide d'un filtre à centrifuger avec un seuil de 10 000 Da (10 K, Centricon, Merck Millipore) et lavées avec du tampon ITC ARN 1 X (2 mM $MgCl_2$, 25 mM NaCacodylate pH 7, 0,1 M KCl). Lorsque le volume atteint 1 ml total, l'absorbance à 260 nm est mesurée pour vérifier que la concentration finale est égale à 20 µM.

4. Expérience d'ITC site A - dérivés de Néomycine

L'appareil utilisé pour les expériences d'ITC est le PEAQ ITC de Malvern. Préalablement au dépôt dans l'appareil d'ITC, les échantillons d'ARN site A et de dérivés de néomycine sont incubés à la température d'expérience. Cela permet de dégazer les échantillons et d'éviter la formation de bulles pendant les injections. Une fois la cellule d'échantillon rincée avec du tampon ITC ARN 1 X (20 mM $MgCl_2$, 250 mM NaCacodylate pH 7, 1 M KCl), 285 µl d'ARN site A à 20 µM sont ajoutés. La seringue est remplie avec 70 µl de dérivé de néomycine à 500 µM. L'expérience ITC se déroule à 25 °C et est composée de 40 injections de 1 µl espacées de 180 secondes.

C. Test *in vitro* d'inhibition de la traduction

1. Amplification du plasmide reporter luciférase pBESTluc

Le plasmide pBESTluc™ (Promega, **Annexe 1**) est amplifié par PCR, le mélange contient : tampon Taq polymérase 10 X, mélange dNTPs à 2,5 mM chacun, 10 µM oligonucléotide sens T7 (5'- TAATACGACTCACTATAGG), 10 µM oligonucléotide antisens (5'-GGTGATGTCGGCGATATAGG-3') (Jiang et al. 2012), 500 ng pBESTluc™ (Promega), 20 U Taq Polymérase.

Un programme de PCR avec gradient de températures est réalisé : 3 minutes de dénaturation initiale à 95 °C suivi de 34 cycles avec 30 secondes de dénaturation à

95 °C, 30 secondes d'appariement à 55, 55.7, 56.9, 58.8, 61.1, 63, 64.3 ou 65 °C et 45 secondes d'élongation à 72 °C puis une élongation finale de 5 minutes à 72 °C. Les produits PCR sont analysés sur gel et les produits de réaction les plus concentrés sont rassemblés et purifiés par ajout d'un volume de phénol (ROTI®Aqua-P/C/I, Roth). Le mélange est mélangé avec un vortex et centrifugé pendant 5 minutes à 13 400 rpm et 20 °C. Une précipitation à l'éthanol est réalisée avec l'ADN contenu dans la phase supérieure (2,5 volumes d'éthanol 100 %, 0,1 volume NH_4OAc 0,3 M). Après précipitation à -20 °C, l'échantillon est centrifugé 30 minutes à 13 400 rpm et 4 °C. Le culot est conservé et 150 µl d'éthanol 70 % sont ajoutés. L'échantillon est centrifugé 5 minutes à 13 400 rpm et 4 °C, puis le culot est séché et resuspendu dans de l'eau Milli-Q®.

2. Production d'extraits bactériens à partir de la souche SL119

La souche SL119 (Lesley, Brow, et Burgess 1991) a été gracieusement envoyée par Dr. Hans-Georg Koch (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Albert-Ludwigs, Universität Freiburg). Cette souche est utilisée pour la production d'extraits bactériens car elle est déficiente en endoprotéinase OmpT, en protéase Lon et en exonucléase V (recBCD). L'absence d'activité protéase permet une plus grande stabilité des protéines produites et, dans ce cas, d'une plus grande stabilité des facteurs de traduction lors des expériences de traduction *in vitro*.

Une préculture de 10 ml à partir d'une colonie sur boite de Petri est incubée à 37 °C sur la nuit. Le lendemain, 500 ml de TB sont ensemencés avec la totalité du volume de préculture. Quand la densité optique atteint une valeur proche de 2, les cellules bactériennes sont centrifugées pendant 30 min à 4 000 rpm et 4 °C. Les cellules du culot sont lavées dans 500 ml de tampon S30 (10 mM Tris-Acétate pH 7.4, 14 mM Mg-Acétate, 60 mM K-Acétate, 1 mM DTT, 0,1 ml/L β-mercaptoéthanol) et centrifugées pendant 30 min à 4 000 rpm et 4 °C. Le culot est à nouveau resuspendu dans 15 ml de tampon S30.

Les bactéries sont lysées mécaniquement avec un désintégrateur de cellules de type French Press à une pression de 1,6 bar. Les lysats sont centrifugés 30 minutes à 18 200 rpm et 4 °C avec un rotor 50.2 Ti pour culotter les débris cellulaires.

Les extraits cellulaires contenant les ribosomes, appelés S30, sont congelés rapidement dans l'azote liquide et conservés à -80 °C.

3. Traduction *in vitro* de la protéine reporter Luciférase

Le mélange de traduction *in vitro* contient les éléments suivants : 30 % v/v S30 *E. coli* SL119, 1 µg pBESTluc circulaire, acides aminés à 50 µM, 30 % v/v S30 premix sans acides aminés (Promega), 20 U RNasine, avec ou sans différentes concentrations de dérivés de Néomycine. Le mélange de traduction est incubé 3 h à 37 °C sous agitation à 300 rpm. Les 25 µl de chaque réaction sont déposés dans une plaque 96 puits noire. L'activité de la luciférase est mesurée à l'aide de l'appareil GloMax 20/20 Luminometer (Promega, Madison, WI, USA) et du tampon de révélation du Luciférase Assay System (Promega).

D. Production de ribosomes hybrides (Recht et al. 1999)

1. Souche TA531

La souche TA531 (Asai et al. 1999) a été gracieusement envoyée par Dr. Dominique Fourmy et Dr. Satoko Yoshizawa (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CNRS, Structure et dynamique des ARN, Université Paris-Saclay). La souche TA531 est délétée des 7 opérons codant les ARN ribosomaux dans le génome (= Δ7). Elle contient le plasmide pHK-rrnC+ (résistance Kanamycine) codant pour l'opéron d'ARN ribosomaux WT rrnC et le plasmide pTRNA66 (résistance Spectinomycine) codant les opérons d'ARN de transfert pour pallier les délétions de certains gènes d'ARNt codés au sein d'opérons génomiques d'ARNr.

2. Préparation des bactéries TA531 compétentes

Une colonie de TA531 précédemment étalée sur une boite de Petri LB-Spc-Kan est ensemencée dans 2ml de LB-Spc-Kan et incubée sur la nuit à 37 °C sous agitation. Le lendemain, 200 ml de milieu LB-Spc-Amp sont inoculés avec 2 ml de préculture. La culture est incubée à 37 °C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} de 0,3 puis centrifugée 15 min à 4 000 rpm et 4 °C. Les culots sont récupérés et resuspendus

doucement dans 30 ml de $CaCl_2$ à 100 mM stérile. Les suspensions sont laissées une heure sur glace puis centrifugées 15 min à 4 000 rpm et 4 °C. Les culots sont récupérés et resuspendus doucement dans 2 ml de $CaCl_2$ à 100 mM ajoutés à 2 ml de glycérol à 50 %. Les suspensions de bactéries sont conservées à -80 °C.

3. Plasmide pKK3535

Le plasmide pKK3535 a été gracieusement envoyé par Dr. Dominique Fourmy et Dr. Satoko Yoshizawa (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CNRS, Structure et dynamique des ARN, Université Paris-Saclay). Le plasmide pKK3535 de 11 796 paires de bases code pour un opéron d'ARN ribosomaux rrnB (

Annexe 2) et un gène de résistance à l'Ampicilline. Ce plasmide est un dérivé de pBR322, il comporte donc une origine de réplication de type ColE1 à faible nombre de copies.

4. Maxi-préparation du plasmide pKK3535

75 ng de pKK3535 sont ajoutés à 50 µl de DH5α, le mélange est laissé sur glace pendant 20 minutes. Le choc thermique, déstabilisant les membranes et favorisant l'entrée du plasmide dans les cellules, est réalisé à 42 °C pendant 45 secondes. Puis, 450 µl de milieu LB sont ajoutés et l'échantillon est incubé pendant 45 minutes à 37 °C sous agitation. Les bactéries transformées sont étalées sur boite de Petri LB-Amp et placées à 37 °C sur la nuit.

Une colonie issue de la transformation est ensemencée dans 3 ml de LB-Amp et incubée sur la nuit à 37 °C avec agitation. Le lendemain, 200 ml de milieu LB sont ensemencés avec le volume de préculture nécessaire pour obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,02. La culture est placée sous agitation à 37 °C. Lorsque la DO_{600nm} atteint une valeur de 0,4, du chloramphénicol à une concentration finale de 10 µg/ml est ajouté. L'ajout de chloramphénicol permet d'inhiber la traduction protéique sans inhiber la réplication, permettant de réserver la machinerie cellulaire à l'amplification du plasmide. La culture en présence de chloramphénicol est incubée sur la nuit à 37 °C sous agitation.

Une maxi-préparation de pKK3535 est réalisée à l'aide du kit Maxiprep de filtres plasmidiques PureLink® HiPure (Invitrogen™) en suivant le protocole du fabriquant. La

concentration finale en plasmide est mesurée avec un NanoDrop™ (Thermo Scientific), une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à une concentration en ADN de 50 ng/µl.

5. Mutagénèse dirigée par PCR

Des oligonucléotides comportant une ou plusieurs mutations permettant de modifier la séquence du site A bactérien au sein de l'ARN ribosomal 16S sont générés. Le but est de muter les bases correspondantes aux substitutions présentes dans les sites A des ARN 16 S humain cytoplasmique, humain mitochondrial et humain mitochondrial mutant.

Séquence des oligonucléotides utilisés pour la mutagénèse :

Site A humain (séquence 1404-1412, numérotation *E. coli*) :

- HumA1408G upstream : 5'-GTACACACCGCCCGTC**G**CACCATGGGAGTGGG-3' (85,5 °C, 68,8 % GC)
- HumA1408G downstream : 5'-CCCACTCCCATGGTG**C**GACGGGCGGTGTGTAC-3' (85,5 °C, 68,8 % GC)
- HumA1410T upstream : 5'-GTACACACCGCCCGTCAC**T**CCATGGGAGTGGG-3' (84,2 °C, 65,6 % GC)
- HumA1410T downstream : 5'-CCCACTCCCATGG**A**GTGACGGGCGGTGTGTAC-3' (84,2 °C, 65,6 % GC)

Site A humain (séquence 1488-1498, numérotation *E. coli*) :

- HumT1490A-G1491A upstream : 5'-GTGATTCATGACTGGGG**AA**AAGTCGTAACAAGGTAACCG-3' (78 °C, 46,2 % GC)
- HumT1490A-G1491A downstream : 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT**TT**CCCCAGTCATGAATCAC-3' (78 °C, 46,2 % GC)

Oligonucléotide séquençage pour vérification des mutations :

- 5'-CGTGCTACAATGGCGCATAC-3' (55 °C, 55 % GC)

Le mix de PCR contient : 125 ng de chaque oligonucléotide, un mélange de dNTPs à 200 µM, 500 ng de plasmide pKK3535, 2,5 U de Polymérase Pfu dans son tampon 1X

(PfuTurbo DNA Polymerase, Agilent) et le volume est complété à 50 µl avec de l'eau Milli-Q®.

Le programme PCR est composé d'un cycle initial de dénaturation à 95 °C pendant 30 sec, puis de 16 cycles avec une étape de dénaturation à 95 °C pendant 30 sec, une étape d'hybridation à 55 °C pendant 1 minute et une étape d'élongation à 68 °C pendant 15 min (basé sur le protocole du kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis, Agilent).

Afin de s'affranchir des plasmides parentaux non mutés, un traitement avec l'enzyme de restriction DpnI est réalisé. En effet cette enzyme clive son site de restriction uniquement s'il est modifié par un groupement méthyle et seuls les plasmides parentaux produits *in vivo* sont méthylés. 40 U de DpnI (NEB) sont ajoutées aux produits PCR et l'échantillon est placé à 37 °C sous agitation pendant 2 h.

6. Mini-préparation du plasmide pKK3535 muté

Les produits PCR traités avec DpnI sont transformés dans DH5α. Pour cela, 10 µl de réaction PCR sont mis en présence de 50 µl de DH5α et laissés sur glace pendant 20 min. Le choc thermique, déstabilisant les membranes et favorisant l'entrée du plasmide dans les cellules, est réalisé à 42 °C pendant 45 secondes. Puis, 450 µl de milieu LB sont ajoutés et l'échantillon est incubé pendant 45 minutes à 37 °C sous agitation. Les bactéries transformées sont étalées sur boite de Petri LB-Amp et placées à 37 °C sur la nuit.

Plusieurs colonies issues de la transformation sont ensemencées dans 3 ml de LB-Amp et incubées sur la nuit à 37 °C avec agitation. Le lendemain, 10 ml de milieu LB sont ensemencés avec le volume de préculture nécessaire pour obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,02. La culture est placée sous agitation à 37 °C. Lorsque la DO_{600nm} atteint une valeur de 0,4, du chloramphénicol à une concentration finale de 10 µg/ml est ajouté. L'ajout de chloramphénicol permet d'inhiber la traduction protéique sans inhiber la réplication, permettant de réserver la machinerie cellulaire à l'amplification du plasmide. La culture en présence de chloramphénicol est incubée sur la nuit à 37 °C sous agitation.

Des mini-préparations de pKK3535 mutés sont réalisées à l'aide du kit d'extraction de plasmides NucleoSpin Plasmid (Mini kit for plasmid DNA, Macherey-Nagel™) en suivant le protocole du fabriquant. La concentration finale en plasmide est

mesurée avec un NanoDrop™ (Thermo Scientific), une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à une concentration en ADN de 50 ng/µl.

Les plasmides issus des différents clones sont envoyés à séquencer chez Microsynth (Microsynth Seqlab GmbH, Allemagne), par la méthode de séquençage Sanger, afin de vérifier si la mutation voulue est présente.

7. Transformation de la souche TA531 et perte de plasmide

1 µg de pKK3535-A1408G sont ajoutés à 50 µl de TA531, le mélange est laissé sur glace pendant 20 minutes. Le choc thermique, déstabilisant les membranes et favorisant l'entrée du plasmide dans les cellules, est réalisé à 42 °C pendant 45 secondes. Puis, 450 µl de milieu LB sont ajoutés et l'échantillon est incubé pendant 45 minutes à 37 °C sous agitation. Les bactéries transformées sont étalées sur boite de Petri LB-Amp-Spc-Kan et placées à 37 °C sur la nuit.

Une colonie issue de la transformation est ensemencée dans 20 ml de LB-Amp-Spc et incubée sur la nuit à 37 °C avec agitation. Le but est de cultiver la souche transformée par le plasmide pKK3535 mutant en absence de l'antibiotique dont le gène de résistance est codé par le plasmide pKK3535 parent, en l'occurrence la kanamycine, afin de favoriser la perte du plasmide parent.

Le lendemain, 100 µl des dilutions de la culture à 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} ou 10^{-8} sont étalés sur boite de Petri LB-Amp-Spc pour obtenir des clones isolés. Ces clones sont ensuite repiqués en parallèle sur une boite de Petri LB-Amp-Spc et LB Amp-Spc-Kan. L'objectif est de sélectionner un clone qui se développera en absence de kanamycine mais pas en présence de kanamycine, signifiant qu'il a perdu le plasmide pKK3535 parent et n'exprime donc que l'opéron d'ARN ribosomaux muté.

E. Cristallisation de l'ARN DIS du VIH en présence de dérivés de Néomycine

1. Co-cristallisation ARN DIS / dérivés de Néomycine (structure boucle-boucle du DIS)

Tampon cristallisation boucle-boucle 10X : 1,5 M KCl, 50 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCaco pH 7.0
Tampon réservoir : 40% MPD, 300 mM KCl, 50 mM NaCaco pH 7.0, 20 mM $MgCl_2$

La concentration finale d'ARN DIS de sous-type F (DISF) (**Annexe 3**) nécessaire pour réaliser des gouttes dans le but d'obtenir des cristaux est de 360 µM. Une étape préliminaire de dénaturation est nécessaire pour obtenir un mélange homogène au niveau de la structure de l'ARN. L'ARN DIS F est dilué à 60 µM, dénaturé à 90 °C pendant 5 minutes et directement déposé sur un mélange d'eau et de glace à 0 °C. La dilution de l'ARN permet de favoriser la formation de la structure en tige-boucle, au détriment de la formation de duplex entre deux molécules d'ARN DIS F. Le volume nécessaire de tampon de cristallisation boucle-boucle 10 X est ajouté pour obtenir une concentration finale de 1X. Ensuite, l'ARN DIS F est concentré à l'aide d'un filtre à centrifuger avec un seuil de 10 000 Da (10 K, Centricon, Merck Millipore), jusqu'à l'obtention de la concentration désirée (360 µM) (Ennifar et al. 1999).

La cristallisation est réalisée en gouttes suspendues ou assises à l'aide de cavaliers à fond convexe. Les gouttes de cristallisation comportent 7, 8 ou 9 µl d'ARN DIS F structuré dans le tampon de cristallisation et de 0,6 µl, 0,7 µl, 0,8 µl ou 0.9 µl de dérivés de Néomycine concentrés à 2,5 mM avec 10 % v/v de MPD. Les puits sont remplis avec 550 µl de tampon réservoir. La préparation des gouttes est réalisée à 20 °C et les boites sont placées à 37 °C pour favoriser la croissance des cristaux.

2. Co-cristallisation ARN DIS / dérivés de néomycine (structure en duplex du DIS)

Tampon cristallisation duplex 10 X : 6 ml de KCl à 3 M, 600 µl de $MgCl_2$ à 1 M, 6 ml de NaCaco pH 7.0 à 1 M
Tampon réservoir : 50% MPD, 300 mM KCl, 50 mM NaCaco pH 7.0, 20 mM $MgCl_2$

La concentration finale d'ARN DIS F en duplex étendu nécessaire pour réaliser des gouttes dans le but d'obtenir des cristaux est de 600 µM. Une étape préliminaire de dénaturation est nécessaire pour obtenir un mélange homogène au niveau de la structure de l'ARN. L'ARN DISF non dilué est dénaturé à 90 °C pendant 5 minutes et lentement refroidi à 25 °C pendant 30 minutes. La concentration et le refroidissement lent permet de favoriser la formation de la structure en duplex entre deux molécules d'ARN DIS F. Le volume nécessaire de tampon de cristallisation duplex 10X est ajouté pour obtenir une concentration finale de 1 X. Ensuite, l'ARN DIS F est concentré à l'aide

d'un filtre à centrifuger avec un seuil de 10 000 Da (10 K, Centricon, Merck Millipore), jusqu'à l'obtention de la concentration désirée (600 µM).

3. Acquisition et traitement des données de cristallographie

L'acquisition des données a été réalisée sur la ligne de lumière X06DA - PXIII du SLS (Swiss Light Source) de l'institut Paul Scherrer en Suisse (Villigen). Les données sont traitées avec XDS (Kabsch 2010). La structure de l'ARN DIS F en complexe avec un dérivé de Néomycine est résolue par remplacement moléculaire, en utilisant MOLREP (Vagin and Teplyakov 2010) et le PDB 1ZCI pour l'ARN DIS structuré dimère par interaction boucle-boucle ou le PDB 2QEK pour l'ARN DIS structuré en duplex étendu. Les structures sont affinées avec PHENIX (Afonine et al. 2012) et les modèles construits dans Coot (Emsley et al. 2010).

F. Cryo-microscopie électronique

1. Complexe E. cloacae-TG196

1.1. Préparation des grilles pour la cryo-microscopie électronique

Les grilles utilisées sont des R2/2 300 mesh Cu/Rh ionisées 30 secondes à 2 mA avec un appareil à « glow discharge » (Leica, EM ACE 600). La vitrification des échantillons sur les grilles est réalisée avec un Vitrobot™ Mark IV (Thermo Fisher Scientific) à une température de 4 °C. 1 µl du complexe ribosome d'*E. cloacae*/TG196 à 1.2 ou 1.9 µM d'échantillon sont incubés avec 9 µl de tampon de dilution pendant 4 minutes à 30 °C. 3 µl de l'échantillon concentré à 120 ou 190 nM sont déposés sur la grille. Après 30 secondes de contact, l'excès de volume réactionnel est absorbé pendant 2 secondes (blot force 5) à l'aide de disques de papier filtre positionnés de chaque côté de la grille. Celle-ci est ensuite plongée dans l'éthane liquide. Le refroidissement rapide dans l'éthane liquide permet d'éviter la formation de glace cristalline. La glace diffracte les rayons d'électrons lors de l'acquisition et bruite le signal.

1.2. Acquisition des images

L'acquisition des images a été réalisée sur un microscope Glacios™ (200kV) de la plateforme cryo-EM de NovAliX (Illkirch, Strasbourg, France), qui est équipé d'une caméra Falcon III à détection directe d'électrons. La taille du pixel au niveau de l'échantillon est de 1,55 Å. La gamme de défocalisation utilisée est de 0.8 µm à 3 .4 µm. Au total, environ 3000 images ont été collectées. Pour chaque image 39 vues sont enregistrées avec une dose totale d'électrons de 36.8 e/Å^2 dans un temps d'exposition d'une seconde.

1.3. Analyse des images

Une première analyse des images a été réalisée en parallèle par la Dr. Angelita Simonetti avec la suite logicielle Scipion et par moi-même avec RELION. Une nouvelle analyse des images a été réalisée avec l'aide du Dr. Emmanuel Giudice. Un prétraitement des données a été réalisé avec cryoSPARC™ (Punjani et al. 2017). Les images obtenues en "movie mode" ont été alignées en utilisant l'algorithme de « *Patch-based Motion Correlation* ». Ensuite, la fonction de transfert de contraste (CTF) a été déterminée en utilisant l'algorithme de « *Patch-based CTF Estimation* ». Puis, des particules ont été sélectionnées manuellement sur quelques micrographes et utilisées pour réaliser une première classification 2D avec 10 classes. Les classes ont été sélectionnées et utilisées en modèle pour la sélection des particules sur tous les micrographes. Le nombre et la qualité des particules sélectionnées peut être vérifiée et adapter avec l'outil « *Inspect Picks* » intégré dans cryoSPARC™. Les particules sélectionnées et extraites des micrographes sont à nouveau classées en 2D avec environ 200 classes. Plusieurs sélections et classifications 2D sont réalisées. Une reconstruction 3D est réalisée en utilisant l'algorithme de « *Ab-initio Reconstruction* » et affinée avec « *3D-Homogeneous Refinement* ».

La suite de l'analyse est réalisée avec RELION. Le prétraitement doit être fait également avec RELION pour éviter les incompatibilités de fichiers. Les images ont été alignées en utilisant l'algorithme de « *Motion Correlation* » intégré dans RELION (Zivanov, Nakane, et Scheres 2019). Ensuite, la CTF a été déterminée en utilisant l'algorithme Gctf (Zhang 2016). Les fichiers de coordonnées de particules sélectionnées avec cryoSPARC™ sont converties et importées dans RELION. Une classification en 3D des particules est réalisée, en utilisant le modèle 3D généré dans cryoSPARC™ et préalablement affiné dans RELION (Scheres 2012). Plusieurs classes, contenant

environ 200 000 particules sont sélectionnées. La taille du pixel est ajustée avec Chimera (UCSF CHIMERA). Toutes les classes ont été affinées à l'aide de l'auto-affinement 3D de RELION, puis post-traitées à l'aide de la procédure implémentée dans RELION (Scheres, 2012).

2. Complexe E. coli-Érythromycine-Pyrrhocoricine

2.1. Acquisition des images

Le complexe ribosome d'*E. coli*/érythromycine/pyrrhocoricine est issu d'une expérience d'ITC réalisée par Emma Schenckbecher. Les grilles ont été préparées par Angelita Simonetti comme décrit précédemment. Les images du complexe ont été collectées avec un microscope Titan Krios™ en collaboration avec Dr. Jérôme Basquin (Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried). Le microscope est équipé d'une caméra K3 (300 kV) à détection directe d'électrons. L'acquisition a été réalisée en "movie mode" avec un débit de dose de 1.12 e/Å^2.

2.2. Analyse des images

L'analyse des images a été réalisée avec l'aide du Dr. Emmanuel Giudice. Un prétraitement des données a été réalisé avec cryoSPARC™ (Punjani et al. 2017). Les images obtenues en "movie mode" ont été alignées en utilisant l'algorithme de « *Patch-based Motion Correlation* ». Ensuite, la fonction de transfert de contraste (CTF) a été déterminée en utilisant l'algorithme de « *Patch-based CTF Estimation* ». Puis, des particules ont été sélectionnées manuellement sur quelques micrographes et utilisées pour réaliser une première classification 2D avec 10 classes. Les classes ont été sélectionnées et utilisées en modèle pour la sélection des particules sur tous les micrographes. Le nombre et la qualité des particules sélectionnées peut être vérifiée et adapter avec l'outil « *Inspect Picks* » intégré dans cryoSPARC™. Les particules sélectionnées et extraites des micrographes sont à nouveau classées en 2D avec environ 200 classes. Plusieurs sélections et classifications 2D sont réalisées pour une sélection finale d'environ 373 000 particules. Une reconstruction 3D est réalisée en utilisant l'algorithme de « *Ab-initio Reconstruction* » et affinée avec « *3D-Homogeneous Refinement* ».

La suite de l'analyse est réalisée avec RELION. Le prétraitement doit être fait également avec RELION pour éviter les incompatibilités de fichiers. Les images ont été alignées en utilisant l'algorithme de « *Motion Correlation* » intégré dans RELION (Zivanov, Nakane, et Scheres 2019). Ensuite, la CTF a été déterminée en utilisant l'algorithme Gctf (Zhang 2016). Les fichiers de coordonnées de particules sélectionnées avec cryoSPARC™ sont converties et importées dans RELION. Une classification en 3D des particules est réalisée, en utilisant le modèle 3D généré dans cryoSPARC™ et préalablement affiné dans RELION (Scheres 2012). Plusieurs classes, contenant environ 222 000 particules correspondant au ribosome 70 S sont sélectionnées. La taille du pixel est ajustée avec Chimera (UCSF CHIMERA). Toutes les classes ont été affinées à l'aide de l'auto-affinement 3D de RELION, puis post-traitées à l'aide de la procédure implémentée dans RELION (Scheres, 2012). Un affinement de la CTF est également réalisé avec les algorithmes « *High-order aberrations* », « *Anisotropic magnification* » et « *Per-particle defocus values* » (Zivanov et al. 2018). La suite du post-traitement est réalisé à l'aide de masque afin de focaliser l'affinement au niveau du site d'interaction.

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. Études des paramètres d'interaction des macrolides avec des ribosomes ESKAPE

Une partie du projet porte sur l'étude du mécanisme d'interaction des macrolides avec différents ribosomes issus de souches de bactéries pathogènes. J'ai réalisé, dans le laboratoire de Dr. Gilles Prévost et sous la supervision de Daniel Keller (Université de Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA 7290), des cultures et purifications de ribosomes de souches commerciales ou issues de prélèvements réalisés à l'hôpital de Strasbourg : *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae, Acinetobacter lwoffii*. Ces souches rentrent dans la liste des bactéries particulièrement dangereuses en termes de multirésistances, regroupées sous l'acronyme ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et Enterobacter spp.) (De Oliveira et al. 2020). Le but est d'étudier le mécanisme d'action de macrolides en comparant l'interaction avec des ribosomes issus de différentes souches bactériennes.

Je vais me concentrer ici sur l'étude du mécanisme d'action au niveau thermodynamique. En utilisant l'ITC, technique qui permet d'étudier les paramètres thermodynamiques d'une interaction, il est possible de caractériser si le mécanisme d'interaction varie en fonction de la souche bactérienne étudiée. La purification des ribosomes à partir d'une souche nécessite environ cinq jours de travail, de la culture bactérienne à la concentration de l'échantillon de ribosomes. Comme décrit précédemment, le principal inconvénient de cette technique est lié au fait qu'elle nécessite l'utilisation d'une grande quantité de matériel biologique. En effet, pour étudier l'interaction avec des antibiotiques, la quantité en ribosome généralement utilisée est d'au moins 10 mg.

1. Expériences d'ITC par compétition

1.1. Un peu d'histoire

Le mécanisme d'interaction des macrolides avec le ribosome d'*E. coli* a été étudié par Dr. Emma Schenckbecher lors de sa thèse au sein du laboratoire. Pendant

ses travaux, elle s'est d'abord concentrée sur l'étude de la fixation directe d'un macrolide sur le ribosome par des expériences d'ITC. Cependant, les macrolides ont une très forte affinité pour le ribosome, de l'ordre du nanomolaire bas ou inférieur, ce qui ne permet pas l'obtention très précise de la constante d'affinité par l'approche ITC compte tenu des contraintes physicochimiques du système. De plus, le signal mesuré était de faible intensité dû à un faible échange de chaleur. Cela signifie que la valeur de ΔH mesurée était proche de zéro.

Proportionnellement, les macrolides sont de très petites molécules comparées au ribosome. Selon les données de la littérature, les macrolides présentent une affinité pour le ribosome inférieure à 10 nM (Svetlov, Vázquez-Laslop, et Mankin 2017), ce qui se rapproche de la limite de sensibilité de l'appareil d'ITC. Ainsi, en se référant à la valeur c ($c = K_a \times M_{tot} \times N$), il faudrait utiliser des concentrations très élevées de ribosome pour détecter un signal significatif. La concentration utilisée étant déjà très élevée, il est difficile d'adapter ce paramètre pour améliorer les résultats obtenus. En effet, une concentration plus élevée risquerait de provoquer l'agrégation des ribosomes et de biaiser d'avantage les données. C'est pourquoi il a été envisagé d'utiliser la stratégie de compétition pour pallier ces problèmes techniques de mesure des paramètres thermodynamiques (Velazquez-Campoy et Freire 2006, Krainer et Keller 2015, Schenckbecher, Meyer, et Ennifar 2019).

La stratégie de compétition consiste à titrer, dans un premier temps, le ribosome avec un ligand de plus faible affinité que les macrolides et d'en mesurer les paramètres thermodynamiques. Dans un deuxième temps, une titration avec le macrolide est réalisée en conservant le complexe composé du ribosome et du ligand de faible affinité dans la cellule d'échantillon. Ainsi, l'application d'un modèle de compétition aux paramètres d'interaction du macrolide sur le complexe ribosome-ligand, en prenant en compte les paramètres d'interaction du ligand seul permet d'obtenir les paramètres d'interaction du macrolide seul (**Figure *22***). Le ligand de faible affinité utilisé pour étudier l'interaction des macrolides est un peptide antimicrobien riche en prolines (PrAMP pour « Proline-rich AntiMicrobial Peptide ») dont le site d'interaction est très proche de celui des macrolides, dans le tunnel de sortie des peptides néosynthétisés.

La pyrrhocoricine, initialement isolé de la punaise d'Europe (*Pyrrhocoris apterus*), fait partie des peptides antimicrobiens les mieux caractérisés. Sa séquence de 20 acides aminés est :

5' – VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN – 3'

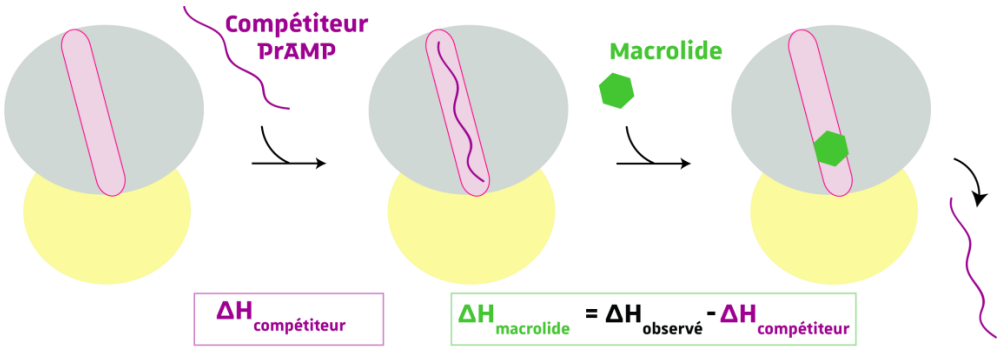


Figure 22 - Stratégie d'ITC par compétition

La pyrrhocoricine a été déterminée comme étant le meilleur compétiteur en se basant sur plusieurs critères (affinité, ΔH) et notamment le fait que, contrairement à certains peptides, sa concentration peut être correctement estimée car elle possède deux arginines. De plus, la pyrrhocoricine valide tous les critères faisant un bon compétiteur :

- Elle interagit avec le la même région du ribosome que les macrolides
- Son mode d'interaction est différent, il est fortement guidé par l'enthalpie et non l'entropie
- Son affinité pour le ribosome est significativement plus faible.

D'après les expériences réalisées par Emma Schenckbecher, la température référence d'expérience est fixée à 30 °C. C'est à cette température que le rapport meilleur rapport signal/bruit est observé.

1.2. Compétition pyrrhocoricine-macrolides pour des ribosomes ESKAPE

À la suite des travaux d'Emma Schenckbecher, j'ai donc réalisé des expériences de compétition par ITC avec la pyrrhocoricine et différents macrolides pour étudier l'interaction avec des ribosomes de *P. aeruginosa, K. pneumoniae* et *E. cloacae* (**Figure 23**).

Premièrement, nous analyserons les profils obtenus pour l'interaction de ces différents ribosomes avec la pyrrhocoricine seule. Le modèle utilisé pour ajuster la courbe d'interaction de la pyrrhocoricine seule est un modèle à un site. Cela signifie

qu'on n'observe pas plusieurs sites de fixation avec des affinités différentes. Les pics positifs observés à la fin de la titration sont dus à la dilution du ribosome lorsque seul du tampon est ajouté. La concentration élevée du ribosome génère ces pics de dilution (**Figure *23A***).

Pour les trois souches étudiées, le profil thermodynamique de l'interaction avec la pyrrhocoricine présente une valeur d'entropie (-TΔS) défavorable à la réaction (***Figure 23B***), car de signe positif, donc ne participant pas à la diminution de l'énergie libre (ΔG). Au contraire la valeur d'enthalpie (ΔH), qui est largement négative, participe favorablement à la diminution de l'énergie nécessaire au déroulement de l'interaction. Cela signifie que la formation de liaisons entre le peptide et le ribosome influence favorablement l'interaction, tandis que le désordre créé influe négativement. Les deux termes se compensent, permettant l'interaction.

Deuxièmement, nous analyserons les profils obtenus pour l'interaction des différents ribosomes liés à la pyrrhocoricine (PYR) seule avec un macrolide. Les profils thermodynamiques correspondant à l'érythromycine (ERY) ou l'azithromycine (AZI) représentés en ***Figure 23B*** sont obtenus après la deuxième titration de compétition. Les paramètres à l'interaction du ribosome avec ERY ou AZI sont calculés par soustraction des paramètres d'interaction de PYR seule aux paramètres d'interaction du macrolide avec le complexe ribosome-PYR. Le modèle utilisé pour ajuster la courbe correspondant à la fixation du macrolide sur le complexe ribosome-PYR est également un modèle à un site. Les paramètres propres à l'érythromycine ou l'azithromycine sont calculés automatiquement en utilisant l'option « Competitive Model » du logiciel d'analyses MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Panalytical).

Dans le cas de l'interaction avec ERY, on observe que la réaction est cette fois-ci favorisée par la valeur d'entropie (-TΔS) qui est en moyenne plus négative que la valeur d'enthalpie (ΔH). Au contraire, dans le cas de l'interaction avec AZI, on observe une plus grande variation entre les profils d'interaction de l'azithromycine avec les ribosomes de *Pseudomonas aeruginosa* (Pae) et *Klebsiella pneumoniae* (Kpn), l'entropie ne semble pas être le terme favorisant la réaction dans le cas de Kpn. Les expériences devraient être répétées pour obtenir des valeurs statistiquement représentatives (valeurs en ***Annexe 4***).

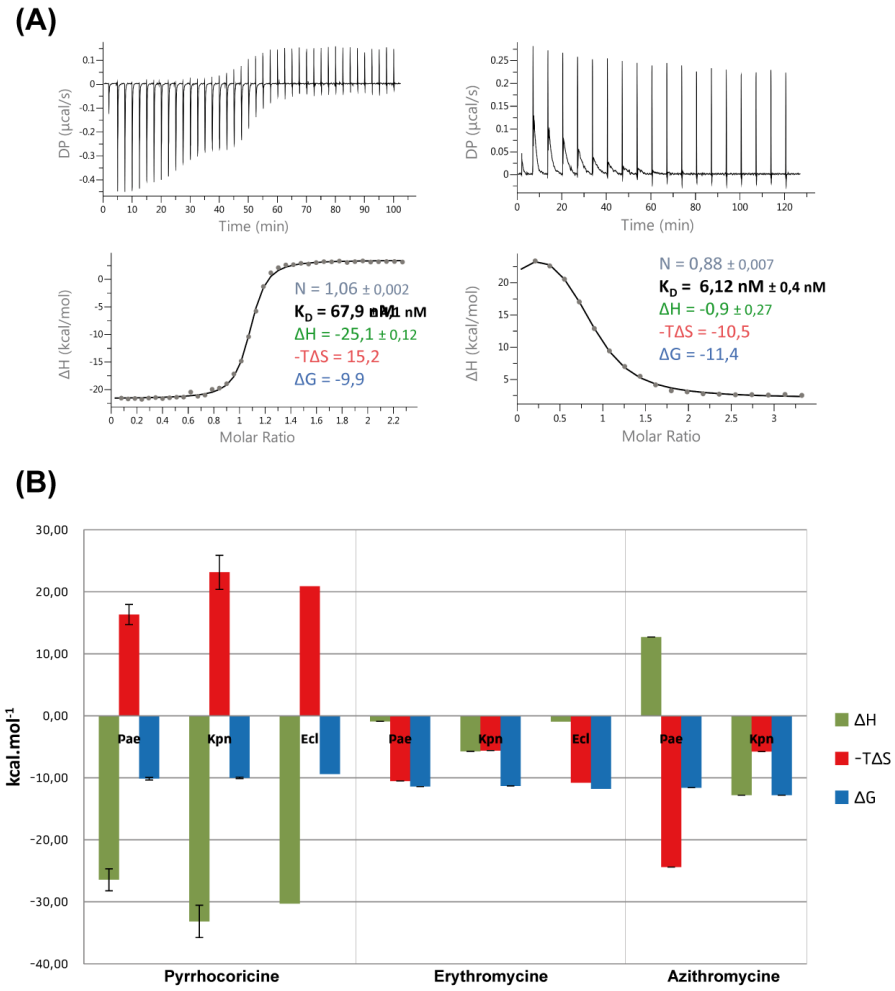


Figure 23 - ITC de compétition macrolides-ESKAPE. (A) Exemple d'isotherme d'interaction obtenu pour l'interaction du ribosome de *Pseudomonas aeruginosa* avec la pyrrhocoricine (à gauche) et du ribosome de Pae lié à la pyrrhocoricine (PYR) avec l'érythromycine (ERY) (à droite). Les paramètres indiqués correspondent à l'interaction de PYR seule ou du macrolide seul. (B) Signatures énergétiques des ITC de compétition macrolides-ESKAPE. Valeurs des paramètres thermodynamiques en kcal.mol^{-1} pour chaque souche testée : *Pseudomonas aeruginosa* (Pae), *Klebsiella pneumoniae* (Kpn) et *Enterobacter cloacae* (Ecl).

Nous nous concentrons désormais sur les affinités observées dans ces expériences d'interaction avec les ribosomes de *P. aeruginosa, K. pneumoniae, E. cloacae*. La comparaison des constantes de dissociation (K_D) permet de confirmer que les peptides antimicrobiens sont des ligands de plus faible affinité pour le ribosome par rapport aux macrolides et ce, quelle que soit la souche étudiée.

L'affinité de la pyrrhocoricine pour les ribosomes est dans l'ordre de plusieurs dizaines de nanomolaires, tandis que l'affinité des macrolides est de l'ordre du nanomolaire ou sub-nanomolaire (***Figure 24***). Les K_D de l'interaction de la pyrrhocoricine avec les ribosomes de Pae, Kpn et Ecl ont une valeur moyenne de 53,

59 et 164 nM, respectivement. Tandis que, les K_D de l'interaction de l'érythromycine avec les ribosomes de Pae, Kpn et Ecl ont une valeur moyenne de 6, 7 et 3 nM, respectivement. Les K_D de l'interaction de l'azithromycine avec les ribosomes de Pae et Kpn ont une valeur moyenne de 4 et 0,6 nM, respectivement (**Annexe *4***). Ces résultats confirment qu'il est possible d'exploiter la stratégie de compétition sur tout type de souche.

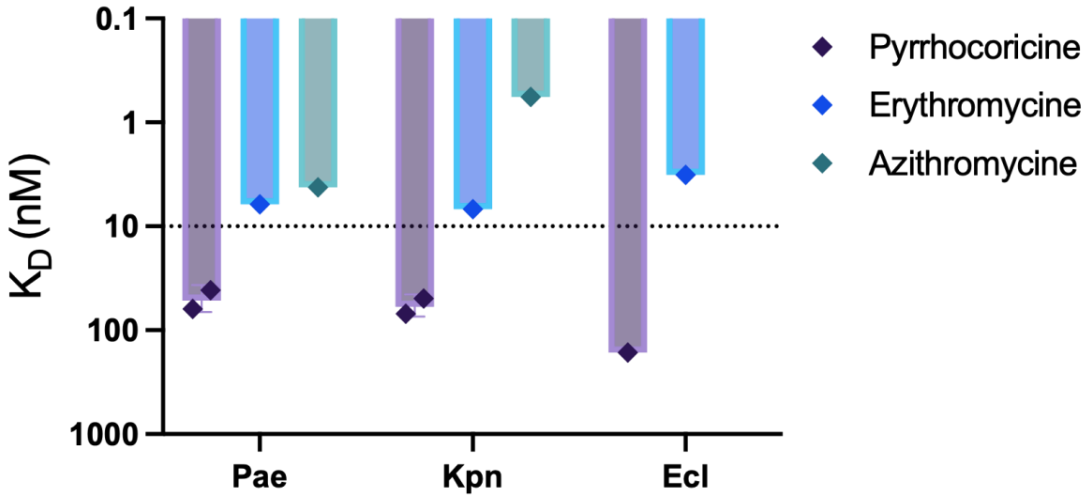


Figure 24 - Affinités des interactions de macrolides avec des ribosomes ESKAPE. Les valeurs des constantes de dissociation (K_D) en nM sont représentées pour chaque souche testée : *Pseudomonas aeruginosa* (Pae), *Klebsiella pneumoniae* (Kpn) et *Enterobacter cloacae* (Ecl).

De manière globale, les paramètres thermodynamiques obtenus avec les différents ribosomes sont dans le même ordre de grandeur que ceux obtenus précédemment lors d'expériences d'ITC avec des ribosomes d'*E. coli* (MRE600). Cette observation pouvait être attendue car les résidus formant le site d'interaction des macrolides sont conservés au sein de ces différentes souches. Ces souches sont toutes des bactéries à Gram négatif qui présentent une résistance naturelle aux macrolides du fait de la composition de leur membrane cellulaire externe. En effet, la couche de la membrane des bactéries à Gram négatif est composée de phospholipides organisés en bicouche et est donc imperméable aux macrolides qui sont des molécules assez hydrophobes. La perspective majeure de cette étude serait de pouvoir analyser par ITC l'interaction des macrolides avec une souche possédant une résistance connue aux macrolides. Afin de pouvoir observer l'impact d'une résistance sur les paramètres d'interaction des macrolides avec les ribosomes, cette dernière devrait être connue et

localisée sur le ribosome (***cf. I.B.2.4.2, page 29***). De cette manière, il serait possible d'observer des différences de profil thermodynamique et d'affinité entre une souche sauvage et mutée au niveau du ribosome.

1.3. Étude des modifications au site d'interaction des macrolides

Un autre aspect de mon projet de thèse consiste à étudier les modifications de l'ARN au niveau des sites d'interaction des antibiotiques testés. Le but était de mettre en évidence les modifications pour étudier si leur présence et différence peut influer sur l'interaction de l'antibiotique.

J'ai donc mis au point un protocole pour étudier les modifications au niveau du site d'interaction des macrolides sur l'ARNr 23 S. Le principe est de cibler des fragments spécifiques de la séquence des ARN ribosomaux en utilisant des oligonucléotides biotinylés complémentaires aux séquences d'intérêt. Dans ce cas, les séquences d'intérêts se situent sur le domaine V de l'ARNr 23 S dans la zone correspondant au centre peptidyle-transférase.

Les ARN ribosomaux sont isolés des protéines ribosomales par un traitement à la protéase K. Les oligonucléotides sont hybridés aux ARNr puis un traitement à la RNase T1 est effectué pour dégrader spécifiquement les fragments de l'ARNr non appariés. Ensuite, les hybrides oligonucléotide/ARN sont purifiés sur colonnes de streptavidine. La finalité est d'analyser les fragments d'ARNr sélectionnés par spectrométrie de masse (**Figure *25***).

Différentes conditions d'hybridation ont été testées avec quatre oligonucléotides d'environ 20 nucléotides complémentaires à des séquences de l'ARNr 23 S au niveau du PTC (Peptidyl-Transferase Center) (**Annexe *5***). Dans un premier temps, des tests ont été réalisés avec des oligonucléotides fluorescents pour déterminer si l'étape d'hybridation était réalisable au vu de la grande taille et la structure relativement complexe des ARN ribosomaux. De plus les conditions d'hybridation ont été optimisées. Des tests avec l'ajout de différentes concentrations en magnésium et urée afin de favoriser la dénaturation de la structure de l'ARNr ont été réalisés. De plus, les ribosomes de *P. aeruginosa* ont été dissociés pour diminuer la quantité d'ARNr présent dans l'échantillon lors de l'hybridation. J'ai ainsi pu déterminer les conditions permettant d'hybrider les oligonucléotides sur l'ARNr cible (**Annexe *6***).

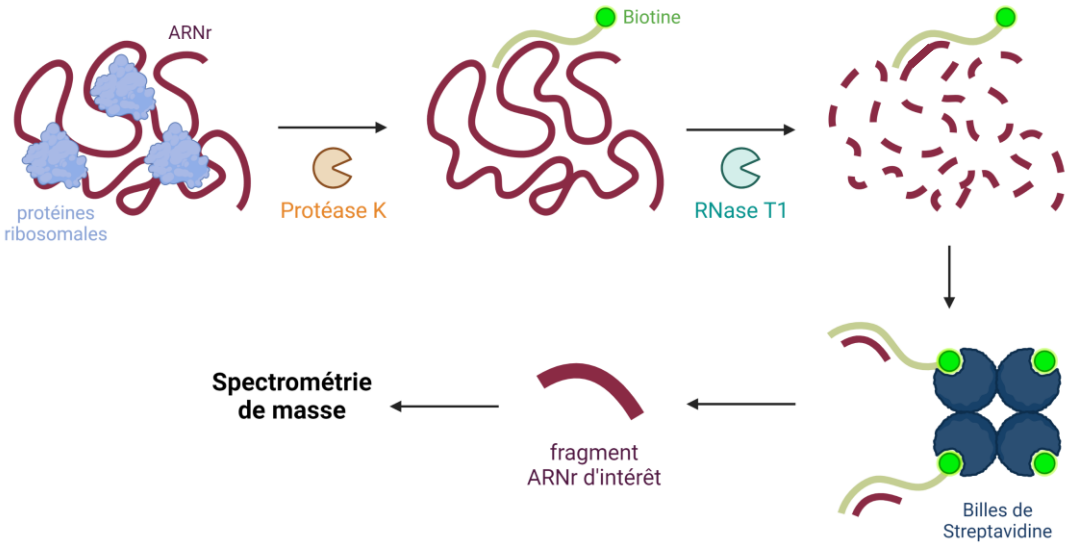


Figure 25 – Stratégie pour la mise en évidence de modifications sur l'ARNr.

Il a été établit que l'absence de magnésium favorise l'hybridation des oligonucléotides sur l'ARNr mais que la présence d'urée n'apporte aucun bénéfice à l'hybridation.

Ces tests ont permis de réaliser l'expérience avec des oligonucléotides biotinylés, permettant l'isolation des hybrides entre les oligonucléotides et les séquences d'ARN ribosomaux cibles. J'ai pu mettre en évidence l'isolation d'un fragment hybride après l'élution des fragments isolés sur des billes de streptavidine (***Figure 26***). La stratégie doit être optimisée pour obtenir de plus grands rendements, trop peu d'ARN pouvant être isolé à ce stade ce qui ne permet pas encore d'en étudier les modifications par spectrométrie de masse.

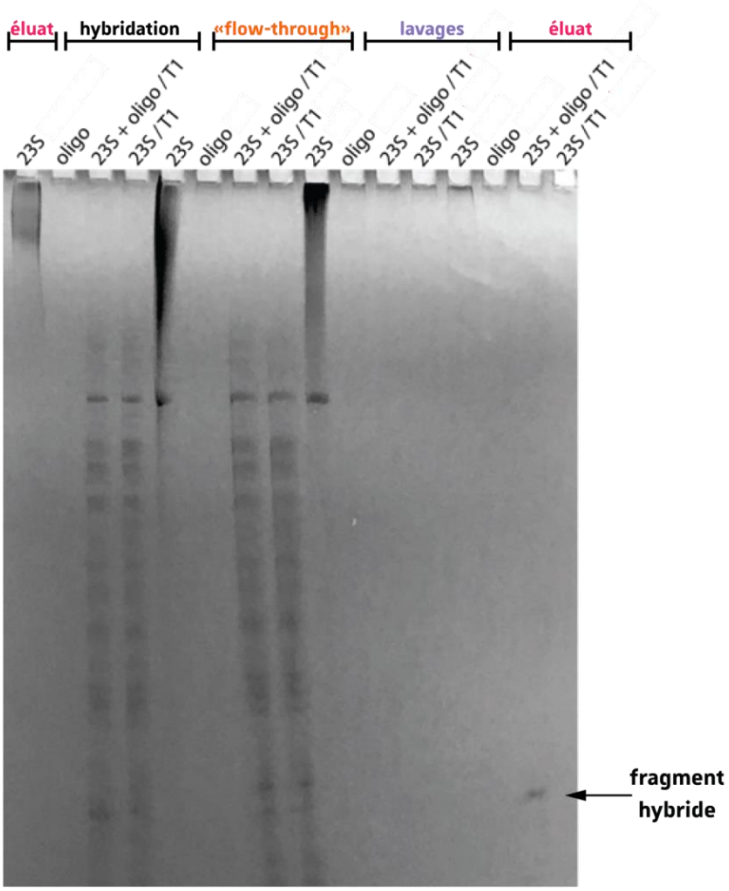


Figure 26 – Hybride entre un oligonucléotide biotinylés et un fragment d'ARNr. Gel acrylamide 12 %, 7 M urée. Tous les échantillons subissent le protocole d'hybridation puis élués avec des billes de streptavidine. 23 S = ARNr seul. Oligo = oligonucléotide Pae 1 seul. 23 S + oligo / T1 = hybride Pae 1 et ARNr 23 S traités à la RNase T1. 23 S / T1 = ARNr 23 S seul traité à la RNase T1.

2. Étude de la co-fixation de la pyrrhocoricine et d'un macrolide dans le ribosome par Cryo-microscopie électronique

2.1. Motivations

Les expériences d'ITC par compétition réalisées ci-dessus sont basées sur le fait que les macrolides sont capables de déplacer totalement la pyrrhocoricine du site d'interaction au niveau du tunnel de sortie.

Cependant, après analyse approfondie des expériences de compétition par ITC réalisées notamment par Emma Schenckbecher, il a été mis en évidence l'anomalie suivante : les paramètres thermodynamiques de l'interaction du macrolide avec le ribosome lié au PrAMP ne correspondent pas à ceux obtenus pour l'interaction du macrolide avec le ribosome seul. En effet, les valeurs d'enthalpie (ΔH) obtenues après soustraction des paramètres d'interaction du PrAMP sont différentes de celles obtenues lors d'expériences d'ITC avec un macrolide seul. Cette différence suggère que la pyrrhocoricine ne serait pas totalement déplacée par le macrolide.

Partant de cette observation, trois hypothèses se présentent :

- Une partie des molécules de pyrrhocoricine fixées aux ribosomes n'est pas déplacée par les macrolides
- Les macrolides sont capables de déplacer la pyrrhocoricine dans le tunnel de sortie, mais pas totalement, les deux molécules resteraient alors liées en même temps au sein d'un même ribosome
- Le macrolide se fixe sur un site différent en présence du peptide.

Afin d'étudier ces deux hypothèses, un complexe fut isolé à la suite d'une expérience de compétition par ITC entre la pyrrhocoricine et l'érythromycine avec le ribosome d'*E. coli* (MRE600) (**Annexe 7**). Le but étant d'observer si les deux composés peuvent cohabiter dans le tunnel de sortie du ribosome ou si le macrolide, ayant une affinité plus forte, permet la dissociation totale du peptide antimicrobien fixé en premier. Ce complexe isolé a été déposé sur grille de cryo-microscopie électronique (cryo-EM) et les images du complexe ont été collectées avec un microscope Titan Krios™ en collaboration avec le Dr. Jérôme Basquin (Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried). Par la suite, j'ai pu effectuer un échange au sein du laboratoire du Pr. Reynald Gillet à Rennes (IGDR - UMR 6290 - CNRS - Équipe : Ribosomes, Bactéries et Stress), sous la supervision du Dr. Emmanuel Giudice afin de traiter ces données.

2.2. Analyse des images obtenues par cryo-EM

L'analyse préliminaire des données a été réalisée avec le logiciel cryoSPARC™ et l'affinement de la reconstruction 3D a été fait avec RELION. L'utilisation de cryoSPARC™ permet de rapidement sélectionner les particules sur les images et de les classer en 2D. Après plusieurs cycles de classification et de sélection des classes de particules exploitables, un modèle en 3D « *ab initio* » est généré à une résolution de

3,27 Å. Cela permet donc d'obtenir rapidement une reconstruction 3D pour évaluer la qualité de l'acquisition. Il sera par la suite utilisé dans RELION en tant que modèle pour la classification 3D. Ce qui a pu être mis en évidence rapidement dès l'obtention de ce modèle est le fait que le ribosome ne comporte pas d'ARN de transfert ni d'ARN messager (***Figure 27***). Il est donc considéré comme « vide » car l'espace entre les deux sous-unités n'est pas encombré. Par conséquent, cela définit un contexte particulier influant l'interprétation des résultats suivants car les possibilités d'interaction des différentes molécules seraient différentes en présence d'un ribosome en cours de traduction par exemple.

Le modèle 3D obtenu à l'aide de cryoSPARC™ permet d'observer, en plus du ribosome, une densité localisée au niveau du site d'interaction des macrolides et une densité supplémentaire, plus allongée, proche de la première (***Figure 28***).

Dans RELION, les particules ont pu être classées en fonction de leur structure en 3D. La classification 3D a permis de s'affranchir des particules « poubelles » et d'une minorité de particules de 50 S seul afin de ne conserver que les particules de ribosomes 70 S. Le but étant d'améliorer la résolution de la reconstruction 3D du 70 S. Les particules de 70 S sélectionnées ont été soumises à un affinement multicorps afin d'affiner séparément le 50 S, la tête du 30 S et le corps du 30 S. Le but est de pouvoir affiner la résolution du complexe en se focalisant sur des parties distinctes du ribosome (**Figure *29***).

Une classification 3D focalisée sur la sous-unité 50 S des particules de ribosomes et avec un masque sphérique localisé sur la pyrrhocoricine a été réalisée. Sur quatre classes, deux en ressortent, une avec environ 30 000 particules et l'autre avec environ 180 000 particules, mais dans ces deux classes, aucune différence majeure au niveau du site d'interaction du macrolide/peptide n'est observée (**Figure *30***). Le fait de ne pas isoler de classes comportant, par exemple, uniquement la densité correspondant au macrolide signifie que les deux densités observées sont probablement retrouvées au sein d'un même ribosome et ne sont pas la moyenne de deux ou trois sous-populations de ribosomes distinctes :

- Une population comportant uniquement le macrolide
- Une population ne comportant que la pyrrhocoricine
- Une population comportant les deux composés.

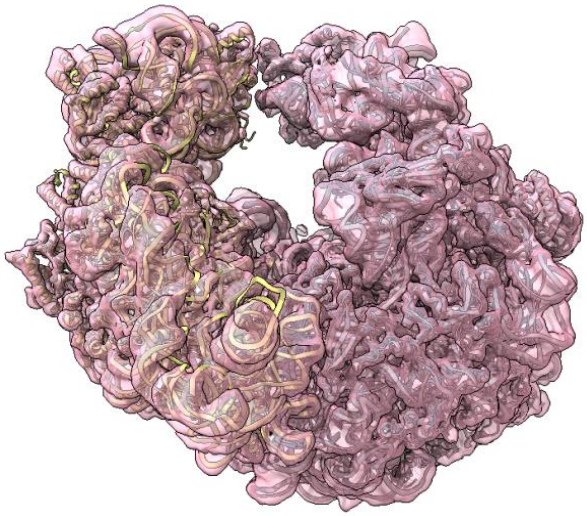


Figure 27 – Modèle « *ab initio* » du 70 S d'*E. coli* obtenu avec cryoSPARC™. Surface du modèle représentée en rose. Structure du ribosome bactérien (*E. coli*, PDB : 7K00, Watson et al. 2020) ajusté à la carte 3D. Le 30 S est représenté en jaune et le 50 S en gris.

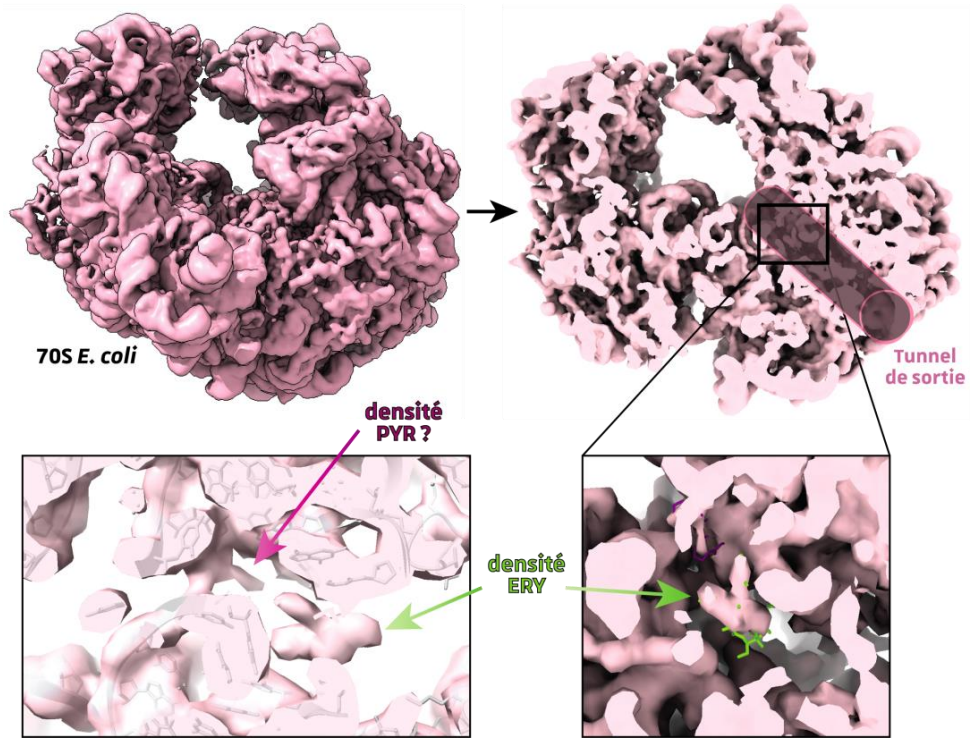


Figure 28 – Densités observées au site d'interaction dans le tunnel de sortie du ribosome. Le 70 S entier et en coupe sont représentés au-dessus. La position des densités est indiquée sur le 70 S. En dessous : zoom sur les densités observées au sein du site d'interaction des macrolides, la densité de droite correspondant très probablement à l'érythromycine, la densité à gauche de la première est moins résolue mais pourrait correspondre à la pyrrhocoricine.

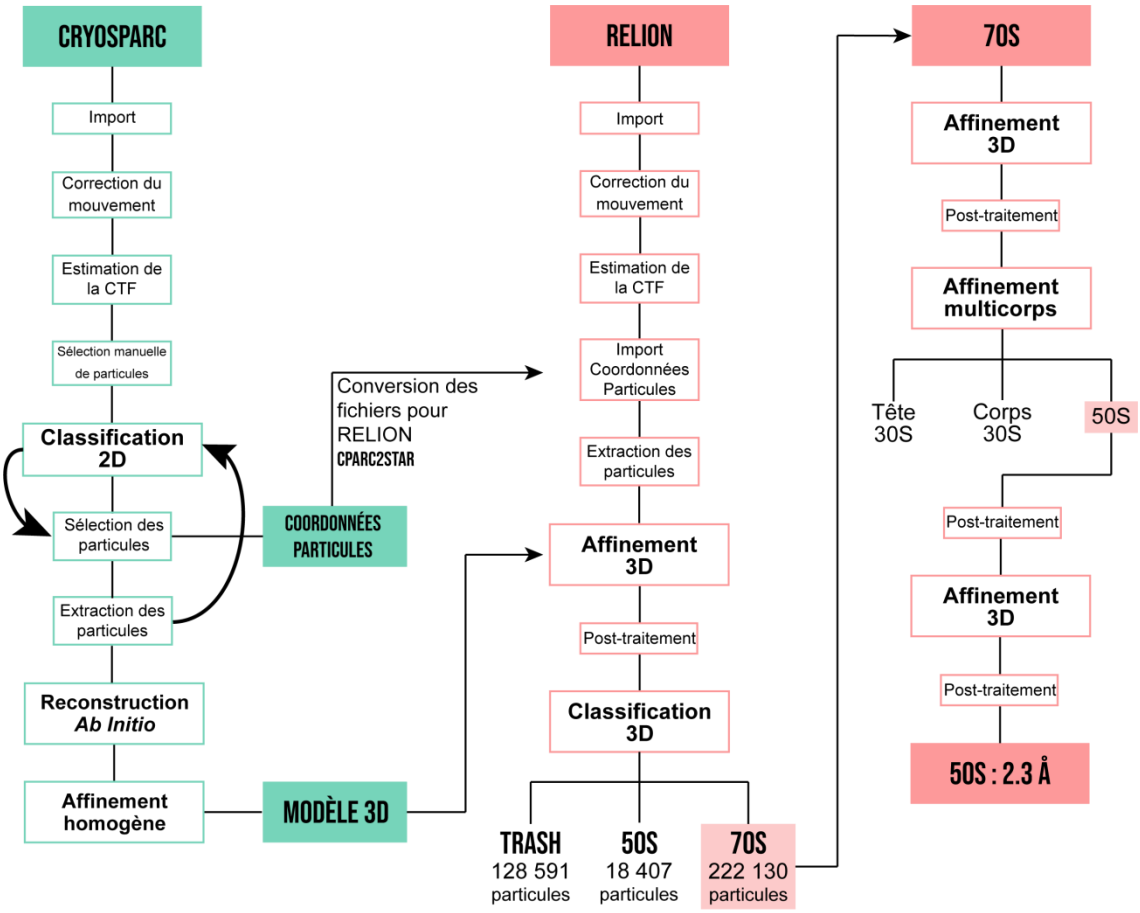


Figure 29 – Démarche d'analyses des images de cryo-EM du complexe entre le ribosome *E. coli* et les antibiotiques pyrrhocoricine et érythromycine. La reconstruction 3D obtenue avec cryoSPARC et affinée avec RELION est à une résolution de 3,27 Å.

Globalement, aucune différence notable au niveau des densités au site d'interaction dans le tunnel de sortie n'est identifiable entre la carte de densité obtenue pour le 50 S après l'affinement multicorps (50 S à 2,3 Å, **Figure *29***) et la carte obtenue après classification 3D avec un masque sphérique (70 S à 2,5 Å, **Figure *30***).

Un modèle de ribosome (PDB : 7k00), de l'érythromycine et d'une partie de la pyrrhocoricine ont été ajustés dans la carte de densité du 50 S. Les densités observées au niveau du site d'interaction dans le tunnel de sortie du 50 S correspondent parfaitement dans le cas du macrolide (**Figure *31***). Pour la pyrrhocoricine, plusieurs hypothèses s'opposent et sont discuter dans la partie suivante.

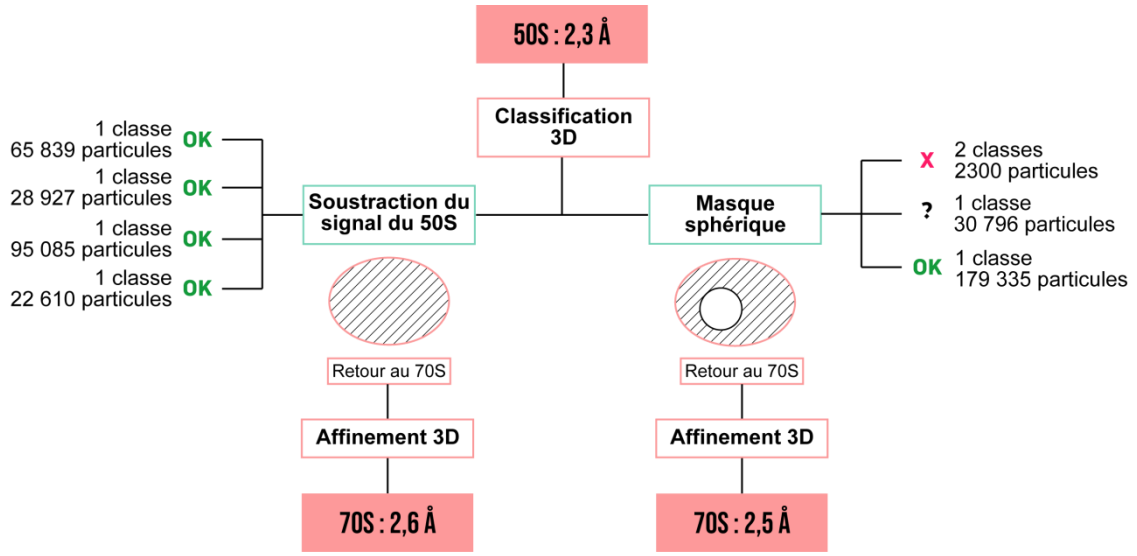


Figure 30 – Affinement à l'aide de masques focalisés sur la densité correspondant à l'érythromycine et une partie de la pyrrhocoricine.

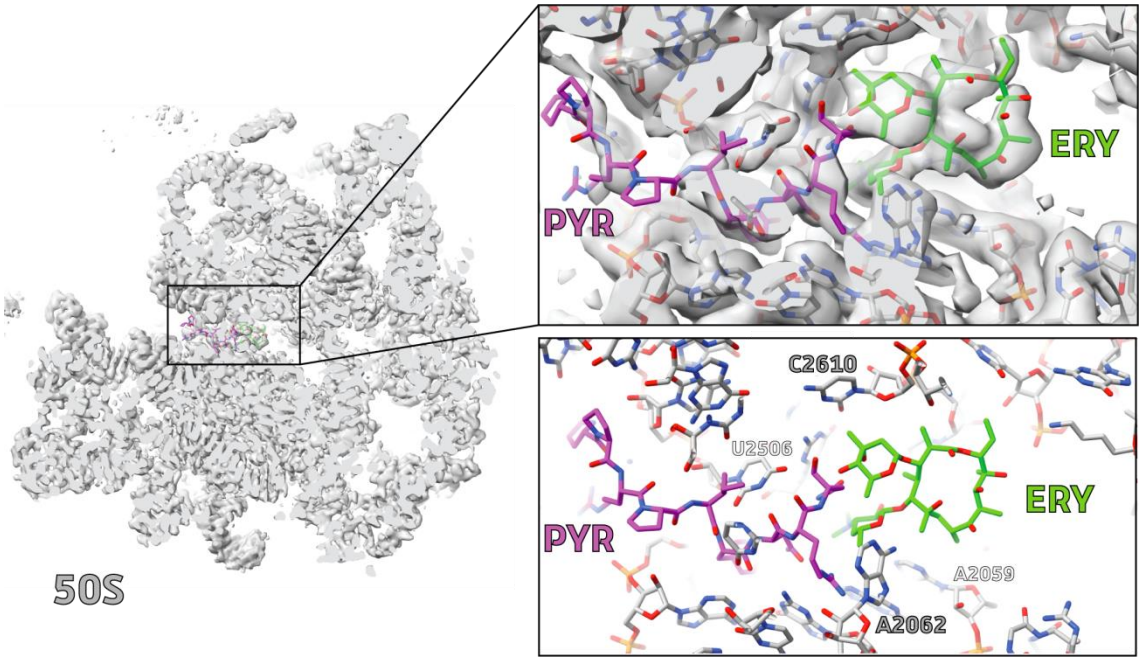


Figure 31 - Carte de densité et reconstruction du 50 S, l'érythromycine et une partie de la pyrrhocoricine

2.3. Interprétation des résultats et hypothèses

Les résultats observés indiquent une co-fixation probable des deux antimicrobiens puisqu'on observe une densité suffisamment résolue pour affirmer qu'elle correspond au macrolide ainsi qu'une densité résiduelle proche de la première qui correspond à une partie de la pyrrhocoricine. La taille et la forme de cette densité résiduelle permet d'accommoder environ dix résidus du peptide. La question majeure est de savoir si cette densité résiduelle correspond :

- Aux résidus 1 à 10 de la pyrrhocoricine (N-terminal), c'est-à-dire à la même position que dans la structure avec le peptide seul, ce qui sous-entend que le macrolide peut s'accommoder au niveau de son site d'interaction en poussant le peptide mais sans le déplacer
- Aux résidus 12 à 20 du pyrrhocoricine (C-terminal), donc dans une position décalée induite par le macrolide, ce qui signifie que le macrolide aurait provoqué le déplacement de la pyrrhocoricine dans le tunnel vers l'interface entre le 50 S et le 30 S (entrée du tunnel) (***Figure 32***)
- A l'une ou l'autre des parties de la pyrrhocoricine qui aurait été totalement éjectée du ribosome par le macrolide puis se serait fixé à nouveau dans l'espace restant.

Afin d'adhérer à l'une de ces hypothèses, nous allons comparer la position des acides aminés de la pyrrhocoricine avec les densités observées.

Premièrement, il est possible de positionner dans la densité les résidus 12 à 20 à la place des résidus 1 à 10 observés dans la structure avec la pyrrhocoricine seule (Gagnon et al. 2016, Seefeldt et al. 2016). Les deux parties de la pyrrhocoricine possèdent des acides aminés se ressemblant, il serait également possible de positionner les résidus dans la même position que lorsque la pyrrhocoricine seule est liée au ribosome.

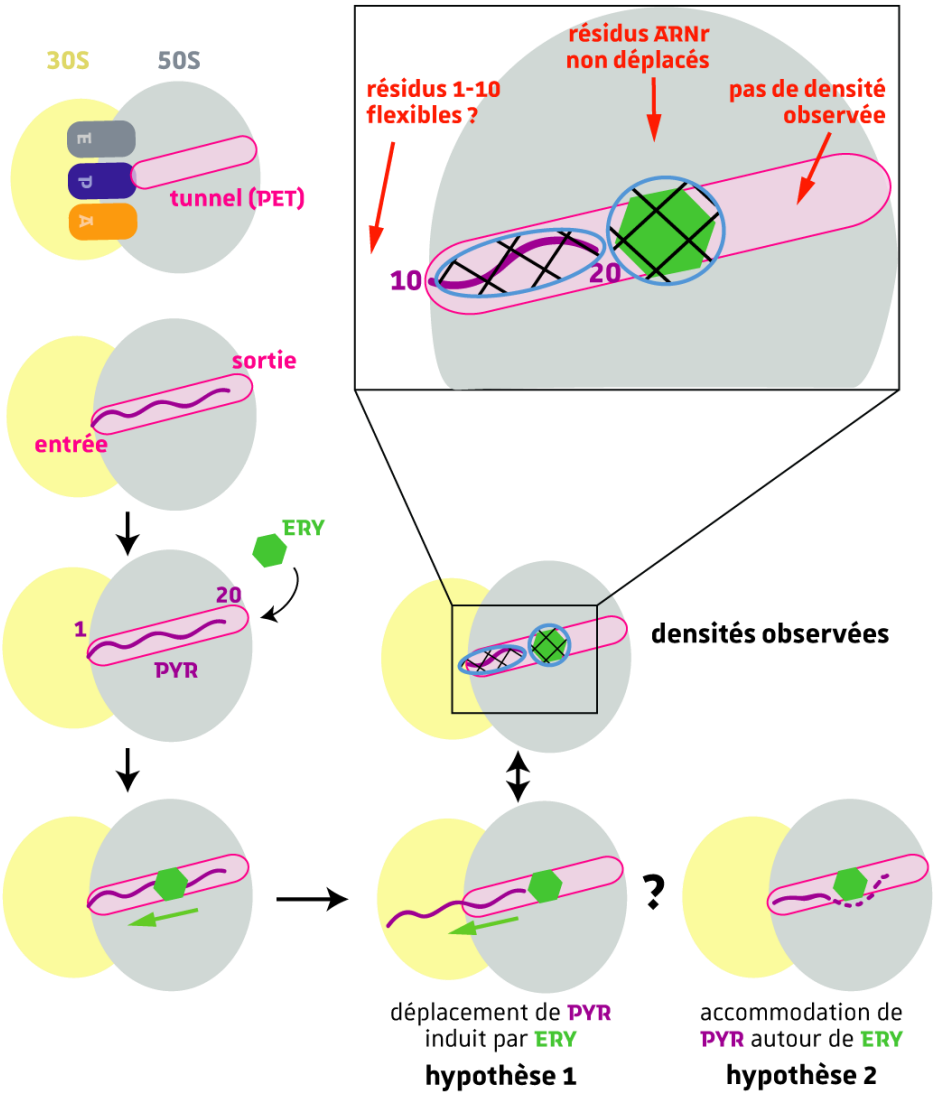


Figure 32 - Hypothèses de déplacement ou accommodation de la pyrrhocoricine en présence du macrolide.

Dans le cas où les résidus 12 à 20 sont reconstruits dans la densité et en comparaison avec le cas où les résidus 1 à 10 sont dans leur position habituelle (**Figure 33**), on observe que :

- La Tyr 6 est remplacée par la Tyr 17, et une densité correspondant à une tyrosine est observée à cette position
- La Lys 3 est remplacée par l'Arg 14, les deux résidus possédant une longue chaine latérale, il est difficile de trancher favorablement pour l'un plutôt que pour l'autre, d'autant que la densité observée au niveau de la chaine latérale est faible

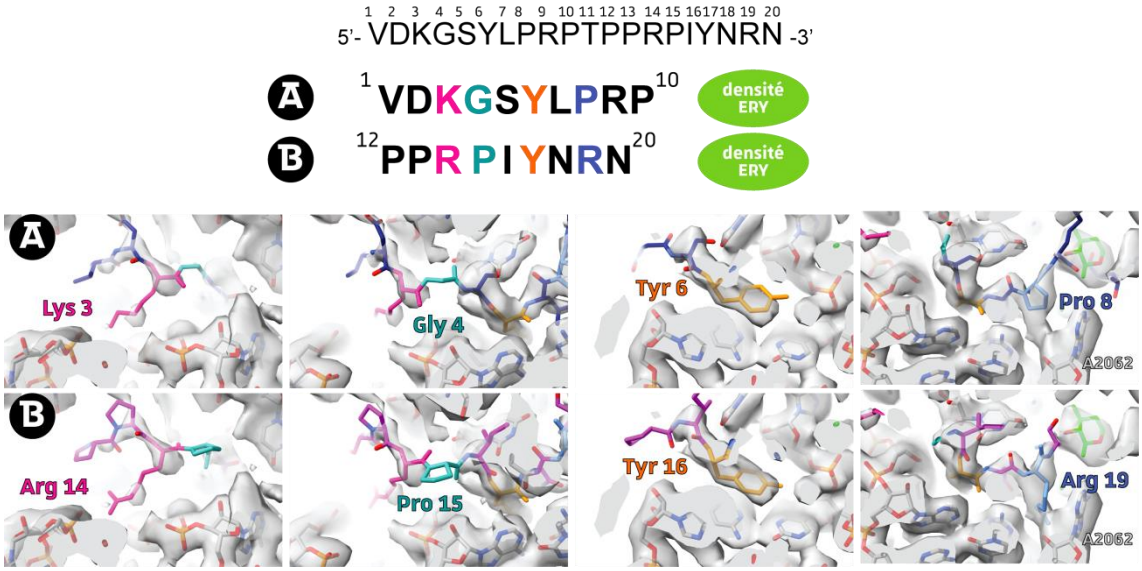


Figure 33 – Comparaison des résidus de la pyrrhocoricine dans les densités observées en fonction du fragment positionné.

- L'Arg 19 est à la place de la Pro 8 qui habituellement s'empile avec la base U2585 (numérotation *E. coli*), à cette position on peut observer une densité ne correspondant pas à l'ARNr qui pourrait correspondre à la chaine latérale de l'arginine qui s'empilerait sur la base A2062 de l'ARNr
- La Gly 4 est remplacée par la Pro 15, mais à cette position on n'observe aucune densité, ce qui serait plutôt en faveur de la présence d'une glycine plutôt qu'une proline.

Deuxièmement, le fait qu'aucune densité ne puisse être observée après le macrolide, vers la sortie du tunnel, appuie l'hypothèse d'un déplacement ou que le peptide n'établit d'interaction stables avec le tunnel au niveau C-terminal en présence d'érythromycine. La densité dans laquelle est accommodée la structure du macrolide ne laisse pas de place au passage potentiel du peptide. La position des résidus de l'ARNr autour du site d'interaction du macrolide ne varie pas en comparaison avec la structure d'un ribosome d'*E. coli* lié à l'érythromycine (PDB = 7NSP, Beckert et al. 2021).

Une subtilité sur le déroulé du déplacement pourrait être ajoutée à ces hypothèses. En effet, la pyrrhocoricine a pu être totalement déplacée par le macrolide, puis le peptide s'accommode à nouveau dans l'espace restant. Afin d'écarter cette hypothèse, une expérience d'ITC dans laquelle la compétition est réalisée en inversant l'injection des ligands est réalisée. La titration du macrolide se déroule d'abord, le

complexe est conservé dans la cellule échantillon et la pyrrhocoricine est ajoutée lors d'une deuxième titration. Aucune fixation n'a été observée lors de la deuxième titration (**Annexe 8**). Cela signifie que la pyrrhocoricine n'est pas capable de s'accommoder dans un ribosome où le macrolide a été fixé préalablement.

2.4. Conclusions sur la co-fixation d'un peptide et d'un macrolide dans le tunnel de sortie

En conclusion, la liaison de l'érythromycine à son site de fixation dans le tunnel du ribosome en présence de la pyrrhocoricine est certaine.

En revanche, comprendre à quelle partie de la pyrrhocoricine correspond la densité observée dans le tunnel reste discutable. Il est difficile de valider l'une ou l'autre des hypothèses sur le mécanisme de déplacement de la pyrrhocoricine par le macrolide. En effet les arguments pour l'une ou l'autre des hypothèses concernant l'accommodation des acides aminés dans la densité observée sont partagés. De plus, le fait de ne pas observer de densité ni au niveau de l'entrée du tunnel, dans l'espace inter-sous-unités, ni au niveau de la sortie du tunnel ne favorise aucun des hypothèses. Bien qu'il soit peu concevable que la pyrrhocoricine puisse contourner l'érythromycine, l'espace restant semblant trop limité, il n'est pas possible de trancher en se basant uniquement sur ces arguments.

Afin d'aborder ces deux hypothèses sous un autre angle, il serait intéressant d'effectuer des expériences d'ITC par compétition avec des peptides synthétiques comportant uniquement les résidus 1 à 10 ou 10 à 20 de la pyrrhocoricine. En effet, ces expériences permettraient de mettre en évidence, premièrement, si les deux fragments de pyrrhocoricine sont capables de se fixer en présence d'un macrolide. Deuxièmement, on pourrait estimer si l'un ou l'autre des fragments de pyrrhocoricine a une affinité plus élevée pour le ribosome. Les expériences de compétition pourraient être réalisées dans les deux sens, c'est-à-dire en injectant premièrement le fragment de peptide puis le macrolide, ou inversement. Ainsi, nous pourrions mettre en évidence si les fragments de peptide peuvent s'accommoder en présence d'un macrolide. Nous pourrions également observer si la valeur d'enthalpie mesurée pour la fixation d'un macrolide seul correspond à la valeur d'enthalpie calculée après compétition avec l'un ou l'autre des fragments. Cependant, ces expériences dépendent de l'affinité des peptides tronqués, dont l'interaction pourrait être diminuée voir abolie.

Néanmoins, cette observation ouvre des perspectives telles que la création d'une molécule hybride entre un macrolide et un peptide. Une telle molécule pourrait avoir une affinité plus forte et un pouvoir d'inhibition de la traduction plus élevé. Pour appuyer cette idée, il serait nécessaire d'étudier la fixation d'un peptide et d'un macrolide avec le ribosome dans un contexte traductionnel.

B. Études des paramètres d'interaction des aminoglycosides avec le ribosome

Comme décrit en introduction, les aminoglycosides sont une ancienne classe d'antibiotiques sujets d'un nouvel intérêt car bien que générant des effets secondaires importants, ils sont efficaces contre de nombreuses infections. Afin d'améliorer l'efficacité et/ou de diminuer leurs effets secondaires, la modification d'aminoglycosides existants est une approche utilisée pour créer de nouveaux antibiotiques qui pourraient être facilement intégrer sur le marché.

C'est sur cette thématique que porte cette partie du projet. Plus particulièrement, cette partie porte sur l'étude de l'interaction de dérivés de la néomycine. Les dérivés ont été produits par Pr. Jean-Marc Weibel du Laboratoire de Synthèse, Réactivité Organiques et Catalyse de l'Université de Strasbourg.

Ce sont des composés issus de la néomycine modifiée à la position 5'' du cycle III uniquement ou modifiée à la position 5'' et à la position 6' du cycle I (***Figure 34***). La néomycine est l'aminoglycoside avec le plus de charges positives à pH physiologique. Les modifications présentent des caractéristiques différentes au niveau du nombre et du type de charges, de l'encombrement stérique et de leur longueur.

La position 6' est un groupe amine dans la structure de la néomycine et établit des liaisons hydrogènes avec le résidu A1408 de l'ARNr 16 S et une molécule d'eau (François et al. 2005). Le résidu 1408 de l'ARNr (numérotation *E. coli*) participe à la sélectivité des aminoglycosides pour le site A bactérien, ce résidu étant un G dans l'ARNr eucaryote cytoplasmique. La position 5'' est un groupe hydroxyle dans la structure de la néomycine et établit des liaisons hydrogènes avec le résidu G1491 de l'ARNr 16 S et avec l'amine en position 2' du cycle I de la néomycine (François et al. 2005). La modification de ces positions pourrait donc influer sur le mécanisme d'interaction entre l'aminoglycoside et le site A.

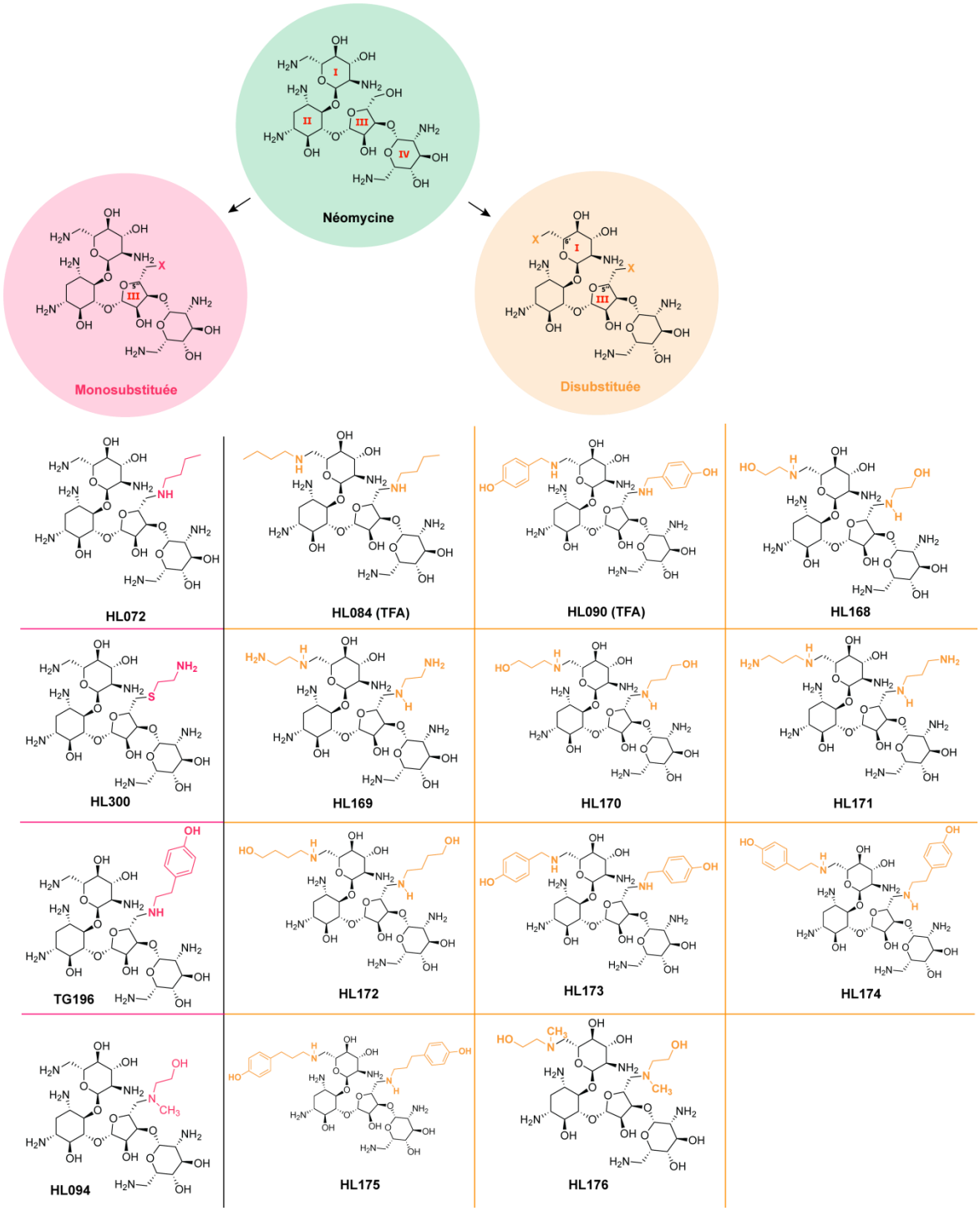


Figure 34 - Structures des dérivés de Néomycine. Les dérivés sont monosubstitués en position 5'' ou disubstitués aux positions 5'' et 6' du squelette de la Néomycine.

1. Limites de l'étude des paramètres thermodynamiques de l'interaction des aminoglycosides avec le ribosome entier

Les aminoglycosides sont des antibiotiques majoritairement chargés positivement. L'étude des paramètres thermodynamiques d'une interaction avec le ribosome est contrainte par le fait que les aminoglycosides sont chargés positivement alors que le ribosome, composé en majorité d'ARN, présente de nombreuses charges négatives. De ce fait, les aminoglycosides interagissent fortement de manière aspécifique avec l'ARNr du ribosome, ce qui biaise l'acquisition de données thermodynamiques correspondant au site d'interaction spécifique. J'ai réalisé des tests dans le but de limiter l'impact de ces sites aspécifiques sur l'acquisition de données en microcalorimétrie. Ces tests consistent à faire varier le tampon utilisé pour l'ITC, en faisant varier le pH ou la concentration en sels, ou à faire interagir le ribosome avec un compétiteur largement chargé positivement, ce qui permettrait de saturer les charges négatives du ribosome. De plus, certains tests ont été réalisés avec la sous-unité 30 S du ribosome d'E. coli dissocié (***Figure 35A***) car les aminoglycosides interagissent majoritairement avec des résidus de l'ARNr 16 S (***Annexe 9***).

La première approche consiste à modifier le tampon utilisé pour les expériences d'ITC, de manière à diminuer la charge globale négative du ribosome. Le tampon utilisé pour étudier des interactions avec le ribosome est le suivant : 50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM $MgCl_2$, 3 M NH_4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycérol, 30 mM KCl. Ce tampon est optimal pour maintenir le ribosome dans des conditions stables tout au long de la titration.

Premièrement, j'ai réalisé des tests d'interaction de la néomycine avec un tampon composé de MOPS à pH 7.0 pour observer si un pH neutre diminue le nombre de sites aspécifiques. Ensuite, j'ai utilisé un tampon avec une concentration de KCl à 60 mM au lieu de 30 mM afin d'augmenter l'écrantage des sites aspécifiques (***Figure 35C***). Les expériences d'ITC avec un tampon modifié n'ont pas apporté de changement dans les résultats observés. Les profils observés ne montrent pas de tendance caractéristique, signifiant que les interactions de l'antibiotique avec la surface résiduelle du 70 S masquent toujours l'interaction spécifique (**Figure *35***).

La deuxième approche consiste à saturer les charges négatives de l'ARN ribosomal avec un composé fortement chargé positivement. Les composés envisagés

sont la streptomycine et la spermine. La streptomycine est un aminoglycoside et la spermine est un composé polyamine.

Les expériences consistaient en la titration d'une polyamine pour saturer les sites de fixation aspécifiques, suivie de la titration de la néomycine sur le 30 S en interaction avec la première polyamine (***Figure 35B***).

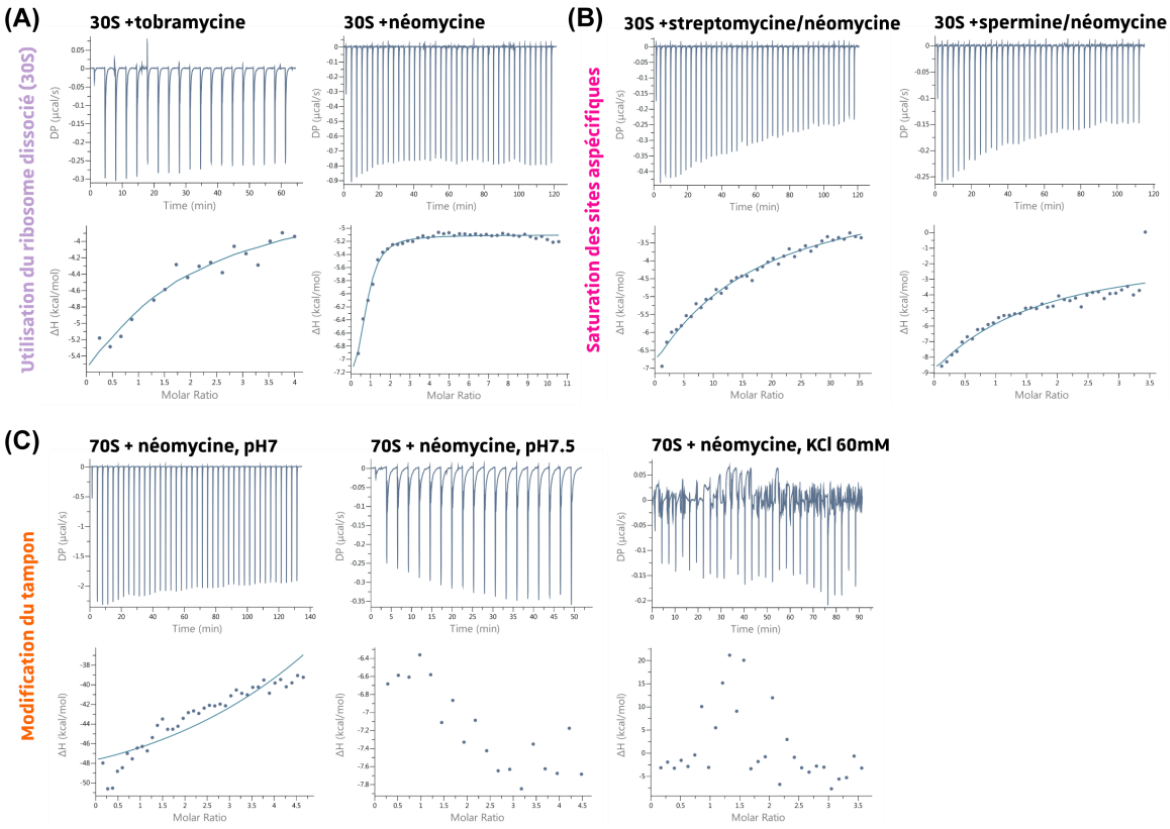


Figure 35 – Titration isotherme par calorimétrie d'un aminoglycoside avec le ribosome. (A) Thermogrammes et isothermes d'interaction d'aminoglycosides avec la sous-unité 30 S du ribosome d'*E. coli*. (B) Thermogrammes et isothermes d'interaction de compétition pour le 30 S entre une polyamine et la néomycine. (C) Thermogrammes et isothermes d'interaction de la néomycine avec le ribosome entier d'*E. coli* dans différents tampons. Tous les résultats sont normalisés par un contrôle de titration de chaque dérivé dans du tampon seul.

De plus, des tests avec une concentration élevée de néomycine, afin de parvenir à la saturation du ribosome, et avec un tampon sans glycérol ont été réalisés (***Annexe 9***).

Quelles que soient les conditions testées, aucun signal interprétable n'a pu être obtenu. Les thermogrammes présentés ci-dessus démontrent que la saturation du ribosome ne peut pas être atteinte. Cette absence de saturation empêche de déterminer les paramètres thermodynamiques car aucune courbe significative ne peut être identifiée à partir de l'intégration des points du thermogramme. Les grands pics observés sont caractéristiques de signal induit par une chaleur de dilution. Cette chaleur générée tout au long de la titration, sans atteindre la saturation peut être liée à des associations et dissociations aspécifiques constantes entre le ribosome et l'aminoglycoside.

Afin de surmonter ce problème, j'ai adopté une stratégie qui consiste en l'utilisation d'un oligonucléotide mimant le site d'interaction minimal des aminoglycosides, le site A (Recht et al. 1996). Ce site d'interaction minimal sera utilisé à la place du ribosome entier ou dissocié pour les mesures des paramètres thermodynamiques. Cette stratégie permet de diminuer drastiquement le nombre de sites aspécifiques potentiels.

2. Étude des paramètres d'interaction de dérivés de la néomycine avec le site A

2.1. Profils thermodynamiques

2.1.1. Profils thermodynamiques d'interaction avec le site A bactérien

Un oligonucléotide mimant le site A bactérien a été synthétisé chimiquement puis purifié sur colonne à échangeur d'ions par HPLC ou alternativement transcrit *in vitro* avec la polymérase T7, puis purifié sur colonne échangeuse d'ions. La séquence de cet oligonucléotide est telle qu'elle permet de reproduire la structure secondaire correspondant une partie de l'hélice 44 de l'ARNr 16 S (***Figure 36***). Cette partie de l'hélice comporte des résidus qui interagissent avec les aminoglycosides. Je nommerai par la suite cet oligonucléotide « site A », même si cette appellation est un raccourci, car d'autres résidus de l'ARNr 16 S sont impliqués dans la formation du site A dans la structure 3D du ribosome (***page 33***, **Figure *12***).

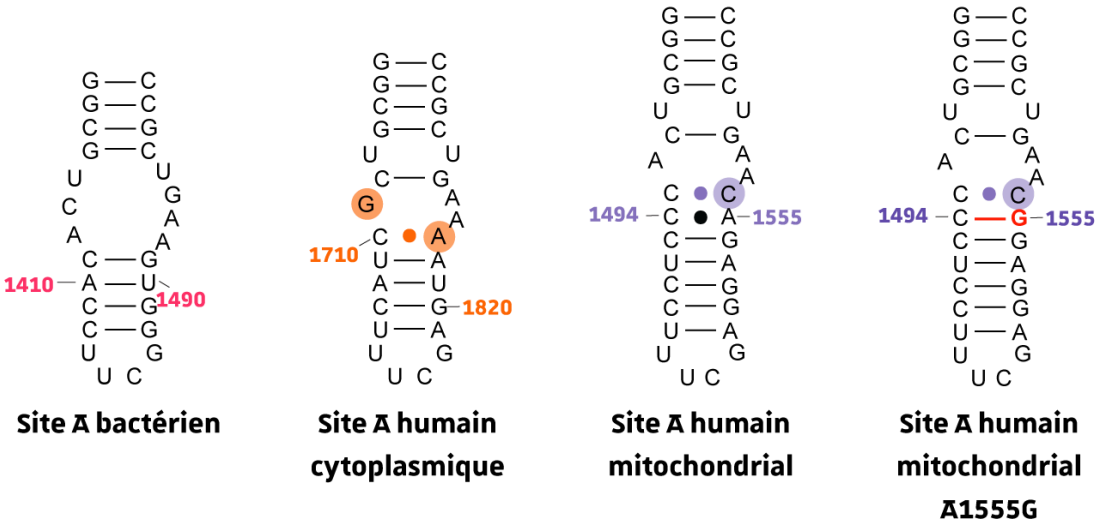


Figure 36 - Oligonucléotides mimant les sites A. Les séquences des oligonucléotides permettent de reproduire une partie de l'hélice 44, correspondant au site A de l'ARNr 16 S du ribosome bactérien (*E. coli)*, de l'ARNr 18 S du ribosome humain (*H. sapiens*) ou de l'ARNr 12 S du ribosome mitochondrial (*H. sapiens*).

Des expériences d'ITC ont donc été réalisées pour étudier l'interaction du site A avec des aminoglycosides commercialisés, telle que la néomycine, en guise de contrôle, et les dérivés chimiques de la néomycine produits par Pr. Jean-Marc Weibel (**Annexe *10***). L'oligonucléotide est restructuré *in vitro* pour favoriser la formation de la tige boucle et reproduire le site A. Il est ensuite placé dans la cellule échantillon de l'appareil d'ITC et l'antibiotique est placé dans la seringue pour être titré au cours du temps.

Le but est d'identifier un composé qui pourrait avoir une affinité pour le site A bactérien meilleure que le parent néomycine et d'observer si les paramètres thermodynamiques de l'interaction varient en fonction de la modification du dérivé.

Les profils thermodynamiques de l'interaction de la néomycine et de ses dérivés avec le site A bactérien présentent une signature globale semblable (***Figure 37***). En analysant la distribution des valeurs de ΔH, -TΔS et ΔG pour chaque dérivé en interaction avec le site A bactérien, on observe que :

- La valeur de ΔH est toujours négative, donc exothermique, montrant l'effet favorable de l'enthalpie
- La valeur de -TΔS est toujours positive, donc endothermique, montrant l'effet défavorable de l'entropie
- La valeur de ΔG reste dans le même ordre de grandeur pour toutes les titrations.

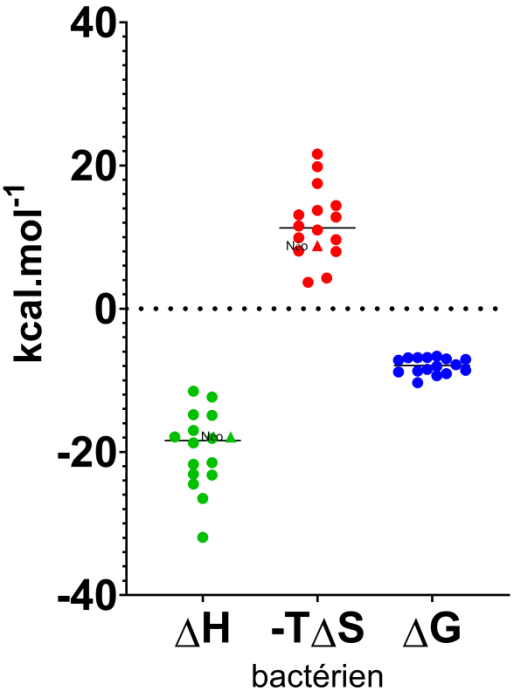


Figure 37 - Représentations de la distribution des profils thermodynamiques pour tous les dérivés de la néomycine en interaction avec le site A bactérien. Les valeurs moyennes de ΔH, -TΔS et ΔG pour chaque dérivé (Néomycine, HL072, TG196, HL094, HL084, HL090, HL168, HL169, HL170, HL171, HL172, HL173, HL174, HL175, HL176, HL300) sont représentées pour mettre en valeur la dispersion. Les points correspondant à la néomycine (Néo) et aux dérivés avec les valeurs les plus éloignées de la moyenne sont indiqués. Tous les résultats sont normalisés par un contrôle de titration de chaque dérivé dans du tampon seul.

Le fait que l'enthalpie soit le terme qui dirige favorablement et, au contraire, l'entropie, qui est un terme relié au désordre des molécules soit défavorable à la réaction met en évidence l'importance de la formation de liaisons hydrogènes et ioniques entre le composé et le site A. Au contraire, l'entropie, qui est un terme relié au désordre des molécules, est défavorable à la réaction. Une modification d'une position impliquée dans la formation de liaisons devrait donc impacter la valeur du ΔH et par conséquent la dispersion des valeurs ΔH, -TΔS et ΔG en fonction de chaque dérivé. Or, la dispersion est relativement faible (**Figure 37**).

L'interaction est alors probablement favorisée par le corps de la structure du composé, commun à tous les dérivés et à la néomycine. Le choix d'utiliser le critère de l'affinité pour distinguer des dérivés plus intéressants que les autres est donc basé sur l'observation d'une signature de profil dynamique propre à la structure parente de la néomycine.

2.1.2. Profils thermodynamiques d'interaction avec les sites A eucaryotes

Un aspect important de l'efficacité des aminoglycosides et de leur amélioration potentielle est liée à leur spécificité. Comme décrit précédemment, le plus gros inconvénient de ces antibiotiques est leur forte ototoxicité et néphrotoxicité. Ces effets secondaires étant liés notamment à la spécificité relativement faible des aminoglycosides qui sont capables d'interagir avec les sites A des ribosomes humains cytoplasmique et mitochondrial.

Il est donc question ici de rechercher si la spécificité des aminoglycosides peut être modifiée pour augmenter la sélectivité au niveau de la cible malgré les contraintes imposées par la conservation élevée du site d'interaction des aminoglycosides.

Afin de tester la spécificité des dérivés pour le site A bactérien, les sites A humain cytoplasmique, mitochondrial et une séquence mutante du site A humain mitochondrial ont également été transcrit et purifié sur colonne échangeuse d'ions (***Figure 36***). En effet, il est reconnu qu'une certaine mutation portée par le site A mitochondrial (A1555G) favorise l'apparition d'effets secondaires dus à un traitement aux aminoglycosides (***cf. I.B.3.5.3***). Des expériences d'ITC ont été réalisées pour comparer l'interaction de ces différents sites A avec les dérivés de néomycine (***Annexe 11, Annexe 12, Annexe 13***).

Les profils thermodynamiques de l'interaction de la néomycine et de ses dérivés avec les sites A humains cytoplasmique, mitochondriaux sauvage (WT) et mutant (A1555G) présentent également une signature globale semblable (***Figure 38***). L'enthalpie (ΔH) est le terme favorable à l'interaction et l'entropie ($-T\Delta S$) est le terme défavorable. La valeur de ΔG est dans le même ordre de grandeur et très peu dispersée en fonction du site A ou des dérivés testés.

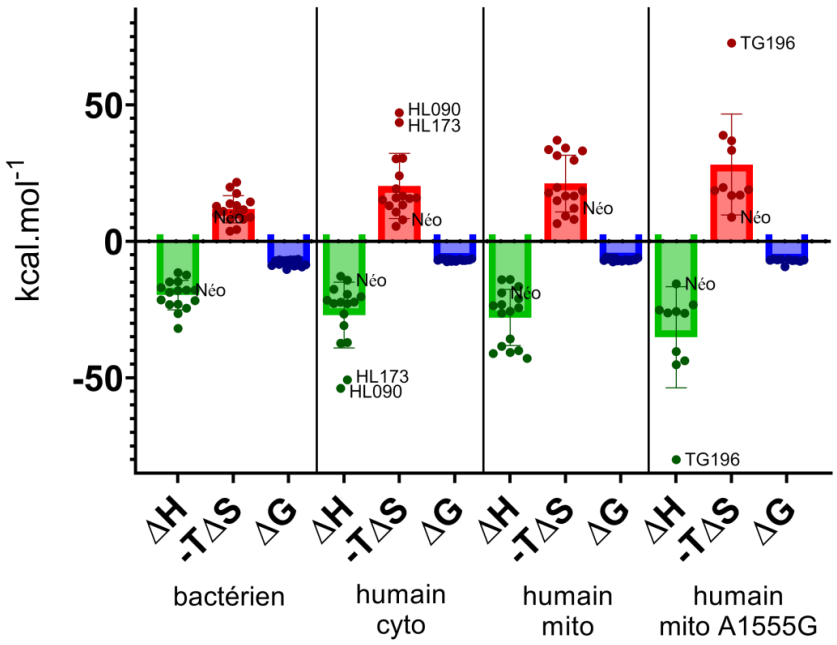


Figure 38 - Représentation de la distribution des profils thermodynamiques pour tous les dérivés de la néomycine en interaction avec les sites A humains cytoplasmique, mitochondrial et mitochondrial mutant. Humain cyto = Site A humain cytoplasmique. Humain mito = Site A humain mitochondrial WT. Humain mito A1555G = Site A humain mitochondrial mutant A1555G (numérotation ARNr 12 S, *H. sapiens*). Les valeurs moyennes de ΔH, -TΔS et ΔG pour chaque dérivé (Néomycine, HL072, TG196, HL094, HL084, HL090, HL168, HL169, HL170, HL171, HL172, HL173, HL174, HL175, HL176, HL300) sont représentées pour mettre en valeur la dispersion. Les points correspondant à la néomycine (Néo) et aux dérivés avec les valeurs les plus éloignées de la moyenne sont indiqués. Tous les résultats sont normalisés par un contrôle de titration de chaque dérivé dans du tampon seul.

2.2. Sélectivité des dérivés

2.2.1. Affinités d'interaction avec le site A bactérien

Les valeurs des paramètres thermodynamiques sont obtenues après ajustement d'une courbe par rapports aux données de titration, réalisée à l'aide du logiciel PEAQ-ITC de Malvern. Le logiciel permet de choisir le modèle avec lequel la courbe est ajustée aux données.

Dans la plupart des expériences d'interaction d'un dérivé de la néomycine avec le site A bactérien, le modèle utilisé est un modèle à deux sites, ce qui signifie que les

pics correspondent à la fixation d'un ligand sur un site à haute affinité (spécifique) et d'un second sur un site de plus faible affinité (non spécifique) (**Figure *39***).

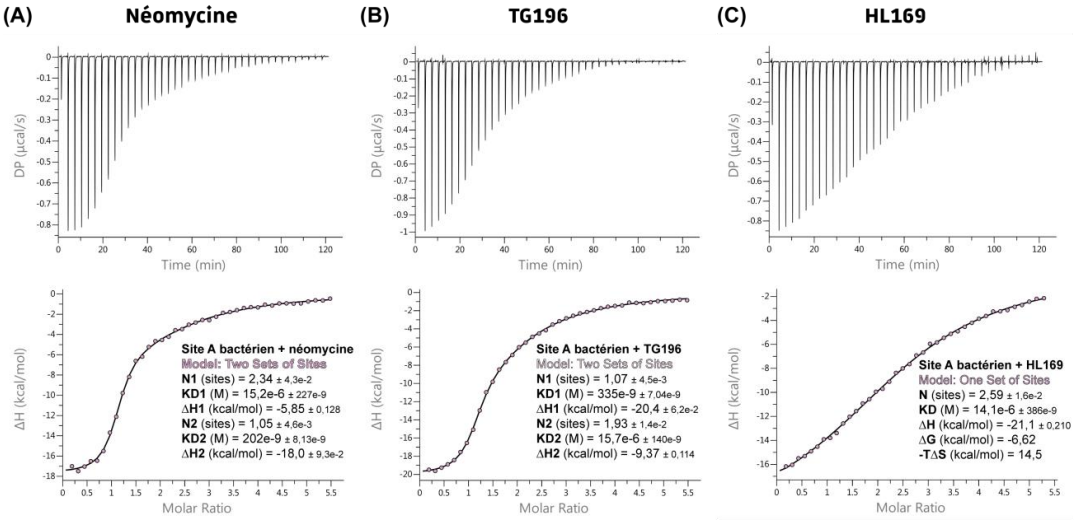


Figure 39 - Thermogrammes et isothermes d'interaction de dérivés de néomycine avec le site A bactérien. (A) Titration du site A bactérien avec la néomycine. La courbe est ajustée avec un modèle à deux sites. (B) Titration du site A bactérien avec le dérivé TG196. La courbe est ajustée avec un modèle à deux sites. (C) Titration du site A bactérien avec le dérivé HL169. La courbe est ajustée avec un modèle à un site.

Mais certains dérivés comme HL168, HL169, HL172, HL173, HL174 et HL175, les pics de titration ne peuvent pas être adaptés à un modèle à deux sites. Les valeurs sont alors adaptées avec un modèle à un site de fixation (**Figure *39C***) et les valeurs de K_D sont relativement élevées par rapport à la néomycine, indiquant une affinité pour le site A bactérien plus faible (**Figure *40***). Cela signifie que ces dérivés ne possèdent qu'un seul site de fixation de faible affinité ou plusieurs sites avec des affinités équivalentes et relativement faibles.

Aucun des dérivés testés ne présente une constante de dissociation plus faible que celle de la néomycine, le composé parent (***Figure 40***). Aucun des dérivés ne présente donc de meilleure affinité que la néomycine. Les composés ayant des valeurs d'affinité moyennes proches de celle de la néomycine sont HL072, TG196, HL094, HL171, HL176 et HL300. Ces composés comportent les modifications suivantes (***Figure 34***) :

- HL072 : monosubstitution du groupe hydroxyle par un butane en position C-5", ce qui induit la suppression d'une charge négative potentielle
- TG196 : monosubstitution du groupe hydroxyle par un groupement 1-amino-2-phényléthane en position C-5", ce qui induit un encombrement stérique plus élevé à cause de la présence d'une chaine plus longue et du phénol
- HL094 : monosubstitution du groupe hydroxyle par un groupement 1-(méthylamino)éthane-2-ol en position C-5", ce qui induit et un encombrement stérique plus élevé généré par la présence d'une chaine plus longue
- HL171 : disubstitué par un groupement 1,3-diaminopropane aux positions C-5" et C-6', ce qui induit un encombrement stérique lié à une chaine plus longue en position 6' et 5", et une substitution d'une charge négative par une charge positive en position 5"
- HL176 : disubstitué par un groupement 1-(méthylamino)éthanol aux positions C-5" et C-6', ce qui induit un encombrement stérique lié à une chaine plus longue en position 6' et 5", et une substitution d'une charge positive par une charge négative en position 6'
- HL300 : monosubstitution du groupe hydroxyle par un 2-aminoéthane-1-thiol en position C-5", ce qui induit une substitution d'une charge négative par une charge positive en position 5".

Certains composés ont donc des charges différentes de la néomycine, à des positions variées. D'autres auraient un encombrement stérique potentiellement plus élevé. La diversité des modifications des composés ayant des affinités proches de celle de la néomycine ne permet pas d'établir une tendance de modifications améliorant l'affinité pour le site A bactérien.

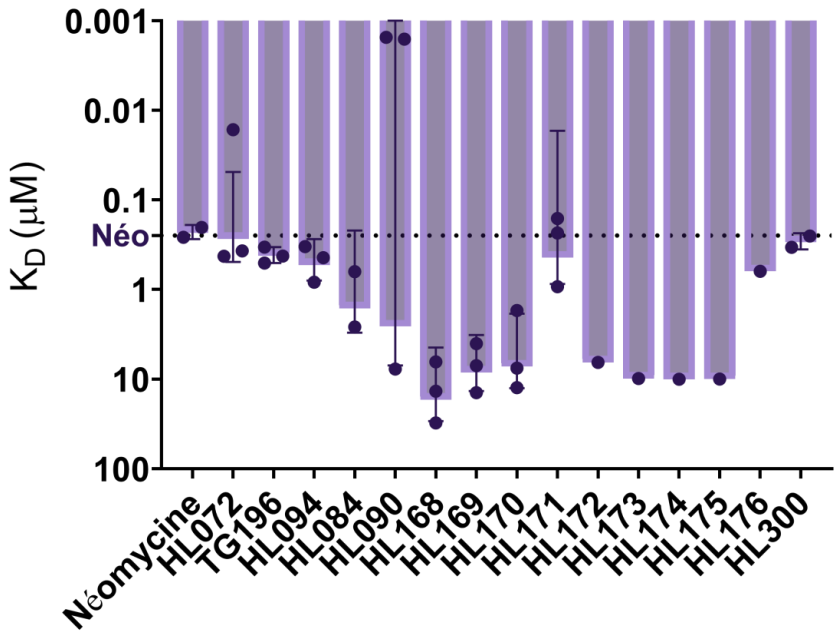


Figure 40 - Affinités des dérivés de néomycine pour le site A bactérien. Les valeurs de constante de dissociation (K_D) reflètent l'affinité des composés pour le site A, plus la valeur est faible, plus l'affinité est forte. La ligne pointillée représente la valeur de K_D pour la néomycine (Néo).

2.2.2. Affinités d'interaction avec les sites A eucaryotes

Contrairement à la majorité des courbes ajustées pour le site A bactérien, les données résultantes de l'interaction des dérivés avec les sites A eucaryotes sont toutes ajustées avec un modèle à un site de fixation qui semble mieux correspondre à la situation au vu des données.

Il apparait que certains dérivés ont une affinité pour le site A bactérien s'approchant de celle du parent néomycine et une affinité réduite pour les différents sites A humains, comme la néomycine également (***Figure 41***). C'est le cas des dérivés HL072, TG196, HL094, HL171 et HL300. Cependant, comme décrit précédemment, il est difficile de définir un type ou une position de substitution influant sur l'interaction en se basant sur ces résultats.

Les tests n'ont pas été effectués avec les composés HL172, HL173, HL174, HL175 et HL176, qui ne présentaient pas un avantage au niveau de l'affinité observée pour l'interaction avec le site A bactérien.

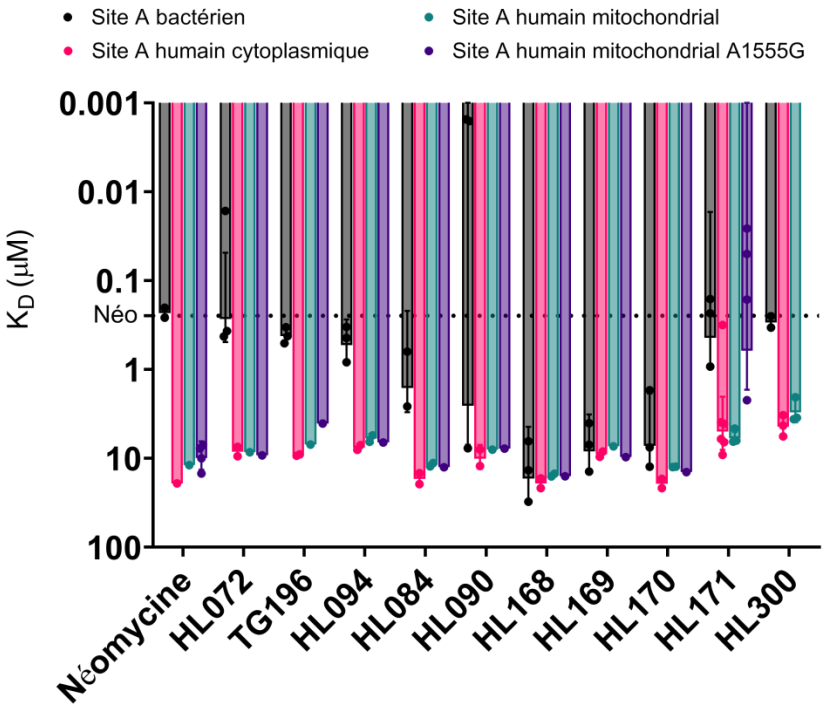


Figure 41 – Affinités des dérivés de néomycine pour les sites A bactérien, humain cytoplasmique, mitochondrial et mitochondrial mutant. Les valeurs de constante de dissociation (K_D) reflètent l'affinité des composés pour le site A, plus la valeur est faible, plus l'affinité est forte. La ligne pointillée représente la valeur de K_D pour la néomycine (Néo).

3. Étude du potentiel inhibiteur des dérivés

3.1. Tests d'inhibition de la traduction in vitro

Afin d'étudier le potentiel inhibiteur des dérivés dans un contexte plus grand que le site A, le site d'interaction minimal, j'ai réalisé des tests d'inhibition de la traduction *in vitro*. Pour cela, l'interaction des dérivés de la néomycine avec le ribosome par le biais d'expériences de traduction *in vitro* d'un gène rapporteur en présence ou non de différentes concentrations des dérivés a été effectuée.

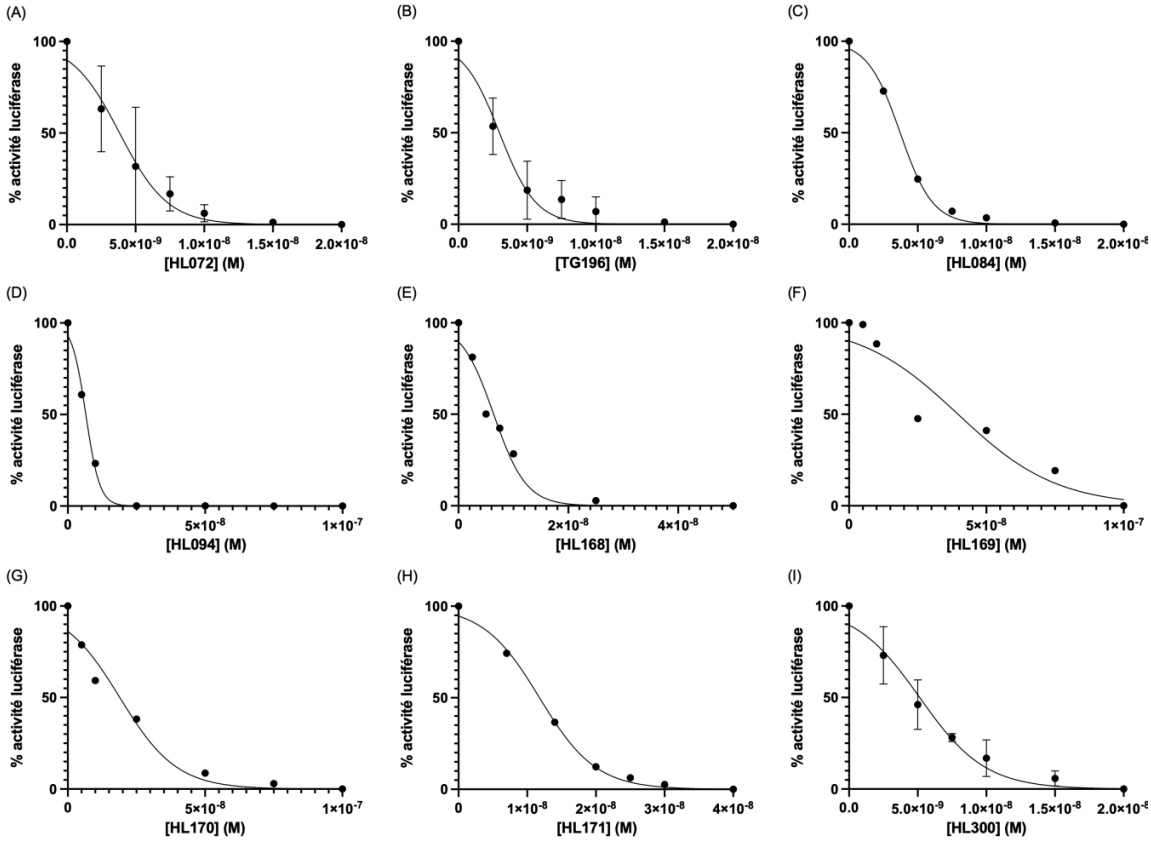


Figure 42 – Inhibition de la traduction *in vitro* par les dérivés de la néomycine. Courbes représentant le pourcentage d'activité luciférase en présence du dérivé HL072 (A), TG196 (B), HL084 (C), HL094 (D), HL168 (E), HL169 (F), HL170 (G), HL171 (H) ou HL300 (I). L'activité luciférase est proportionnelle au taux de traduction du gène de la luciférase.

Tous les dérivés testés sont capables d'inhiber la traduction *in vitro* car l'activité luciférase diminue en présence de concentrations croissantes en dérivé de néomycine (**Figure *42***). Les valeurs d'IC_{50}, représentant la concentration de dérivé nécessaire pour obtenir 50% d'activité luciférase, donc 50% d'inhibition de la traduction, sont indiquées dans le ***Tableau 2***. Les expériences doivent être répétées pour assurer une fiabilité statistique.

Cependant, on peut observer que certains composés, pour lesquels les valeurs de K_D obtenues en ITC étaient plus élevées que pour la néomycine, ont des valeurs d'IC_{50} montrant une capacité relativement élevée d'inhiber la traduction. L'environnement du dérivé lorsqu'il est titré dans une solution de site A minimal avec un tampon homogène et lorsqu'il est mis en présence d'un lysat bactérien n'est pas le même. La comparaison des données d'ITC aux données d'activité luciférase doit donc être faite en précisant que les contextes sont différents. En ITC, le dérivé interagit

uniquement avec l'oligonucléotide mimant le site A. Dans les tests d'inhibition de la traduction, le dérivé est en présence du ribosome entier et de tous les facteurs de traduction. Connaissant la propension des aminoglycosides à se fixer de manière aspécifique au ribosome, il est possible que le pouvoir inhibiteur soit le reflet du site de fixation spécifique combiné aux sites aspécifiques.

Tableau 2 - IC_{50} des dérivés de la néomycine.

Composé	IC_{50} (nM)
Néomycine	2,1 ± nd
HL171	11,8 ± 0,9
HL300	5,2 ± 0,9
TG196	3,0 ± 0,8
HL072	3,8 ± 1,1
HL084	3,7 ± 0,3
HL094	6,6 ± 0,9
HL169	39,7 ± 18,3
HL170	18,9 ± 8,1
HL168	6,4 ± 1,6

En reportant les valeurs de K_D obtenus par ITC en fonction des IC50 pour chaque dérivé, on observe des points éloignés d'une droite à 45 ° passant par zéro. Ces points représentent des dérivés pour lesquels il y a une faible corrélation entre la valeur d'ITC et d'IVT en nM (***Figure 43***). Ils correspondent donc à des composés ayant une plus faible affinité pour le site A bactérien que le parent néomycine mais une capacité d'inhibition de la traduction *in vitro* proche de celle de la néomycine.

La structure de ces composés peut-elle expliquer le manque de corrélation entre ces deux valeurs ?

Prenons l'exemple de HL168 qui a un K_D en ITC d'en moyenne 16,9 µM et un IC50 de 6,4 nM. Son K_D en ITC est 73 fois plus élevé que celui de la néomycine alors que l'IC50 est seulement 3 fois plus élevé. HL168 est disubstitué avec 1-aminoéthanol en C-6' et C-5". Au contraire, on trouve une corrélation entre les valeurs de K_D obtenu par ITC et d'inhibition de la traduction pour TG196. Ces valeurs sont proches de celles obtenues pour la néomycine. Le K_D moyen d'interaction de TG196 avec le site A bactérien est 1,8 fois plus élevé que celui de la néomycine et son IC50 est 1,4 fois plus élevé. Ce composé est monosubstitué par un 1-amino-2-phényléthane en position C-

5”. Il serait intéressant d’étudier l’inhibition de la traduction par un dérivé disubstitué par des groupements phénol comme HL173 ou HL174 pour voir si les valeurs sont corrélées.

On observe également une faible corrélation pour le dérivé HL169, qui est substitué par un groupement 1,3-diaminoéthane aux positions C-5” et C-6’, mais une bonne corrélation pour le dérivé HL171, qui est substitué par un groupement 1,3-diaminopropane aux positions C-5” et C-6’. Ces deux substitutions se ressemblant, il est donc difficile d’établir un lien clair entre les substitutions des dérivés et la corrélation des valeurs d’ITC et d’inhibition de la traduction *in vitro*.

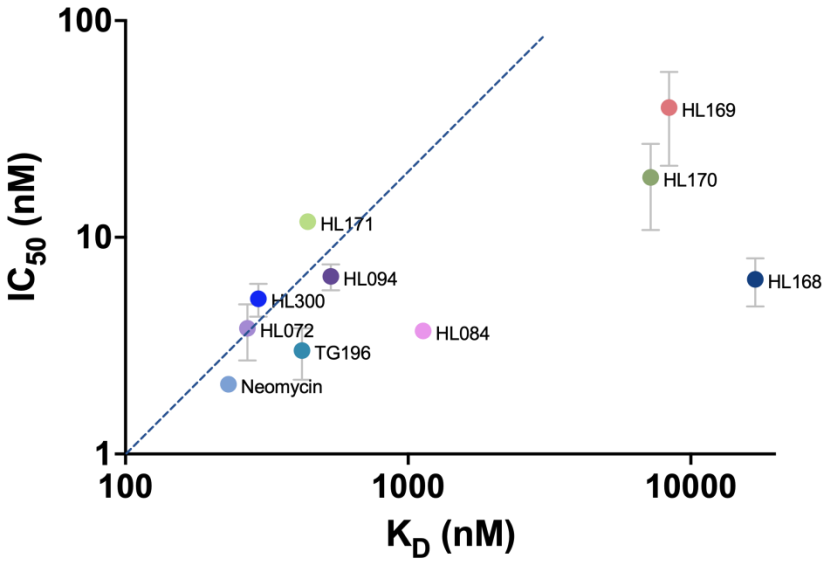


Figure 43 - Corrélation entre les valeurs de K_D obtenues en ITC et d’IC_{50} obtenues par traduction *in vitro*. Les valeurs moyennes d’IC_{50} en fonction de leurs valeurs moyennes de K_D sont représentées. La droite pointillée est une droite théorique représentant une corrélation entre les valeurs d’IC_{50} et de K_D.

3.2. Perspectives d’étude de l’inhibition de la traduction in vitro par les dérivés de néomycine

Afin d’étudier la sélectivité des dérivés pour le ribosome bactérien, une perspective est d’étudier l’activité luciférase *in vitro* en présence des dérivés dans un extrait cellulaire eucaryote.

Une autre approche a été envisagée : le développement de ribosomes hybrides. Ces ribosomes hybrides consistent en des ribosomes bactériens dont seules les bases qui diffèrent entre les sites A bactériens et humains sont mutées. Le but étant d’établir

si les mutations observées entre les différents sites A ont un impact sur le pouvoir inhibiteur des dérivés *in vitro.*

La stratégie consiste à réaliser des mutations par mutagénèse dirigée sur un plasmide codant pour un opéron d'ARN ribosomaux (pKK3535 qui code pour rrnB) puis de transformer avec ce plasmide la souche TA531. Cette dernière est une souche d'*E. coli* délétée de tous les opérons d'ARN ribosomaux et comporte un plasmide codant pour l'opéron rrnC (Asai et al. 1999). Ensuite, une sélection des souches ayant été transformée par le plasmide pKK3535 muté sera faite sur la base des gènes de résistance codés par chaque plasmide. Une fois les souches mutées identifiées, les ribosomes sont extraits et utilisés avec un extrait cellulaire sans ribosomes (S100) pour des expériences de traduction *in vitro* (***Figure 44***).

La mutation des ARNr est plus facilement mise en place dans une souche telle que *M. smegmatis* qui comporte naturellement une seule copie de l'opéron codant les ARN ribosomaux (Hobbie et al. 2006). De plus certaines mutations au niveau de l'hélice 44 de l'ARNr 16 S semblent létales pour une souche *E. coli* ne comportant qu'une copie de l'opéron codant les ARNr (Recht et al. 1999). Cependant, la mutation A1408G a été reportée comme viable, c'est donc celle privilégiée pour étudier les différences d'inhibition de la traduction *in vitro* dues aux mutations du site A retrouvée entre les sites A bactérien et humain. En effet, le fait d'utiliser un ribosome d'*E. coli* muté au niveau du site A permet de mettre en évidence si ces mutations précisément ont un impact sur la sélectivité.

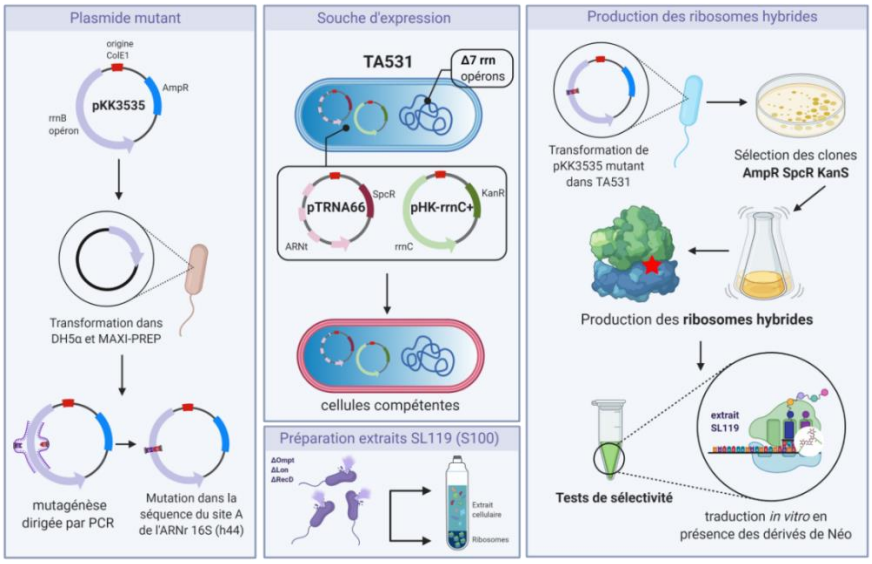


Figure 44 - Protocole de production de ribosomes hybrides

4. Les composés les plus intéressants ?

Les résultats présentés dans les parties précédentes permettent difficilement d'identifier un dérivé plus efficace que la néomycine. En se basant sur l'affinité observée pour le site A bactérien, certains composés, comme HL171 et HL300 se révèlent intéressants (***Figure 45***). La sélectivité de HL171 reste à discuter car son affinité pour le site A mitochondrial mutant est relativement forte bien que l'affinité pour les sites A humains cytoplasmique et mitochondrial soient plus faibles que l'affinité pour le site A bactérien. L'affinité de HL300 pour le site A mitochondrial mutant n'a pas été testée mais son affinité pour les autres sites A humains est également diminuée par rapport au site A bactérien. Cette sélectivité relative est également observée pour a néomycine.

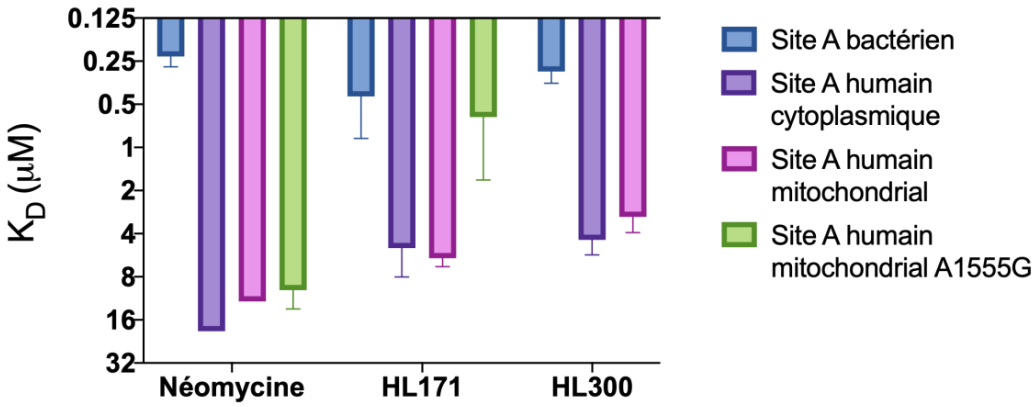


Figure 45 - Comparaison des affinités de HL171 et HL300 par rapport à la néomycine. Les valeurs de constante de dissociation (K_D) reflètent l'affinité des composés pour le site A, plus la valeur est faible, plus l'affinité est forte.

Ce qui pèse en faveur de ces dérivés est le fait que des expériences réalisées l'équipe de Dr. Gilles Prévost montrent que les dérivés HL171 et HL300 ont une activité antibactérienne intéressante par rapport à celle de la néomycine notamment. Ils présentent la particularité d'avoir une CMI plus faible sur certaines souches de *S. aureus* et *E. coli*. Cependant, des tests ont été réalisés par nos collaborateurs pour évaluer la toxicité. Le taux de survie de cellules NRK-52E qui est une lignée cellulaire rénale épithéliale du rat a été mesuré. Il a été montré que HL171 était plus toxique que la néomycine. Au contraire, HL300 présente des taux de toxicités plus faibles que HL171

et dans le même ordre de grandeur que la néomycine, ce qui en fait une molécule particulièrement intéressante.

Pour rappel, ces dérivés comportent les modifications suivantes par rapport à la néomycine (***Figure 46***) :

- HL171 : disubstitué par un groupement 1,3-diaminopropane aux positions C-5" et C-6', ce qui induit un encombrement stérique lié à une chaine plus longue en position 6' et 5", et une substitution d'une charge négative par une charge positive en position 5"
- HL300 : monosubstitution du groupe hydroxyle par un 2-aminoéthane-1-thiol en position C-5", ce qui induit une substitution d'une charge négative par une charge positive en position 5".

La présence d'une substitution par une chaine plus longue comportant une amine en position C-5" de la néomycine semble être favorable à la conservation de l'affinité pour le site A. Cependant les deux substitutions de HL171 semblent également augmenter son niveau de toxicité et sa capacité à intégrer les cellules eucaryotes.

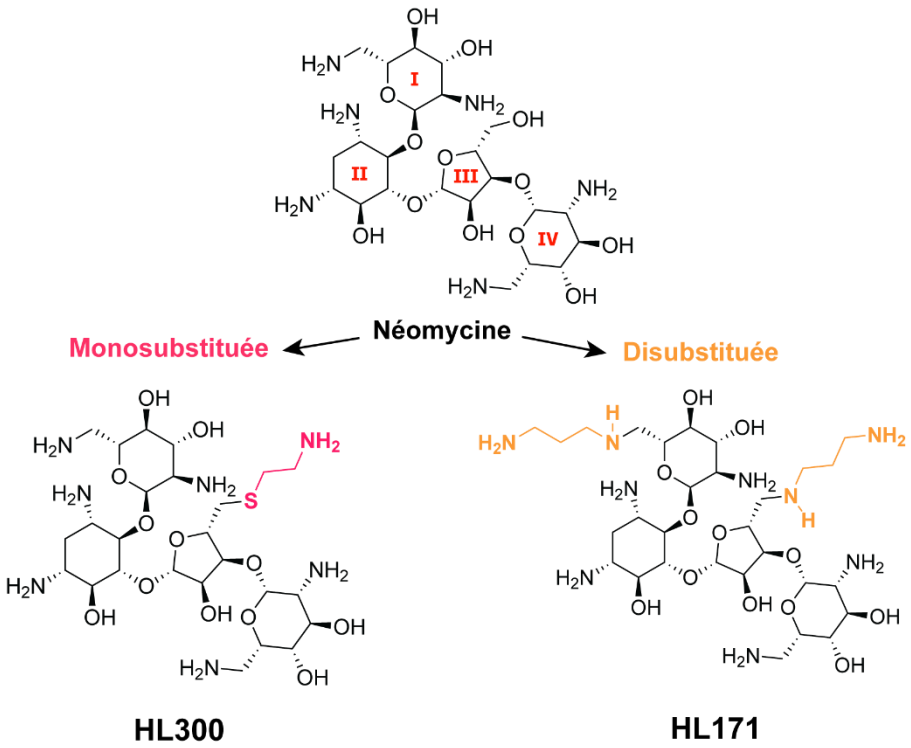


Figure 46 - Structures des dérivés HL300 et HL171.

5. Études structurales

5.1. Observation de l'interaction d'un dérivé avec un ribosome entier par cryo-EM

5.1.1. Motivations

Dans le but d'observer un dérivé dans le contexte d'un ribosome entier, un complexe entre le ribosome de la souche *Enterobacter cloacae* et le dérivé de néomycine, le composé TG196 a été étudié par cryo-microscopie électronique.

Pour rappel, le dérivé TG196 comporte une monosubstitution du groupe hydroxyle par un groupement 1-amino-2-phényléthane en position C-5". Il a été sélectionné pour l'étude structurale par cryo-EM de l'interaction d'un dérivé dans le ribosome et des potentiels changements de conformation, notamment car la substitution induirait probablement un encombrement stérique plus élevé en raison de la présence d'un groupement phénol. Une collaboration avec l'entreprise NovAliX (Illkirch, Strasbourg) a permis une collecte de données avec un microscope Glacios.

5.1.2. Analyse des images obtenues par Cryo-EM

Dans un premier temps, l'analyse des images a été réalisée par Dr. Angelita Simonetti à l'aide de la suite logicielle Scipion. Les reconstructions ont été obtenues à une résolution autour de 5 Å. L'analyse que j'ai réalisée avec RELION a débouché sur une reconstruction à une résolution de 4,75 Å. J'ai à nouveau analysé les images obtenues sous la supervision du Dr. Emmanuel Giudice. Le prétraitement des données a été réalisé avec les logiciels cryoSPARC™ puis l'affinement sur RELION. Dans les deux analyses, la présence du dérivé au sein du ribosome n'est pas confirmée, notamment à cause de la résolution obtenue trop faible (environ 5 Å) pour observer le site d'interaction en détails. La faible résolution obtenue est liée aux paramètres d'acquisition des images. En effet, la taille du pixel utilisée pour enregistrer les images (1,55 Å/pixel) fait que la résolution obtenue ne pourra pas être meilleure que 3,1 Å.

Cependant, plusieurs observations pourraient constituer des preuves de la présence du dérivé au sein du ribosome. L'analyse des données réalisées avec Angelita Simonetti a permis d'obtenir une reconstruction avec deux classes majoritaires. La première classe représente 20 % des particules et comporte un ARNt dans le site A et

la protéine L1 en position ouverte. La deuxième représente 80 % des particules, ne comporte pas d'ARNt dans le site A et la protéine L1 est en position fermée (**Figure *47***).

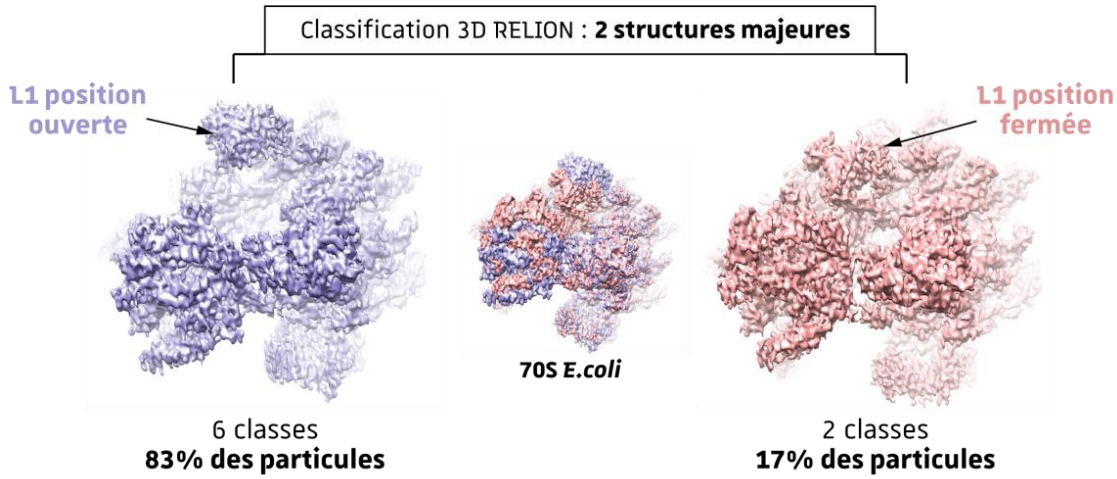


Figure 47 - Classes majeures du complexe *E. coli*-TG196 obtenues avec Scipion. La protéine L1 indiquée fait partie des protéines composant le 50 S. Les reconstructions ont été obtenues à des résolutions entre 4,9 et 5 Å.

D'après Wang et al. (2012), la position de la protéine L1 pourrait confirmer la présence d'un aminoglycoside. En effet, après l'ajout de faibles concentrations en néomycine, les auteurs observent une stabilisation d'une conformation verrouillée du ribosome dans laquelle la protéine L1 est en position ouverte. Avec des concentrations plus élevées en néomycine, ils observent une conformation du ribosome entre verrouillée et déverrouillée. Ce passage entre une conformation verrouillée et déverrouillée du ribosome crucial pour la translocation des ARNm et ARNt et pour le recyclage du ribosome, se passe spontanément dans des conditions physiologiques. Le fait d'observer ici une majorité de ribosomes en position verrouillée (L1 en position ouverte) pourrait signifier que le dérivé s'est bien fixé et stabilise une des conformations.

Les résultats de classification 3D obtenus avec cryoSPARC™ et RELION ressortent identiques car une classe majoritaire comportant la protéine L1 en position ouverte est présente (**Figure *48***).

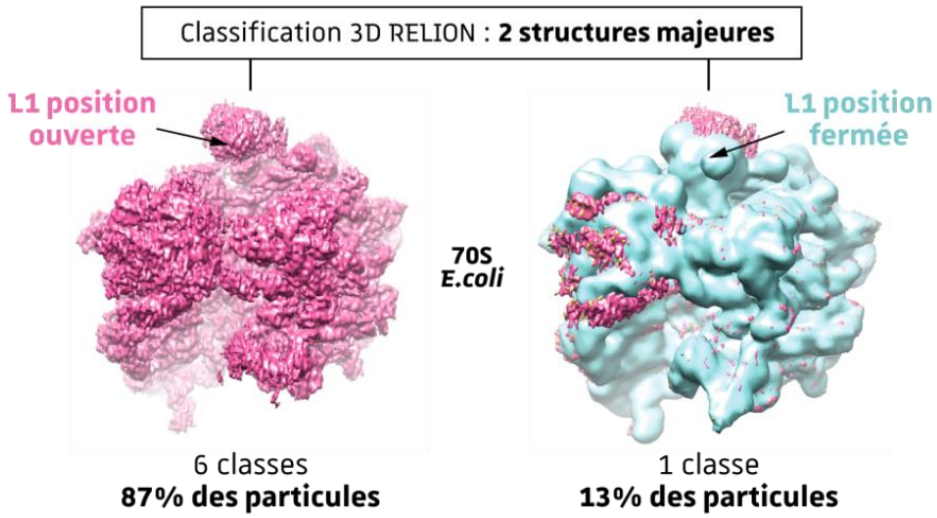


Figure 48 - Classes majeures du complexe E. coli-TG196 obtenues avec cryoSPARC™ et RELION. La reconstruction rose a été obtenue à une résolution de 4,66 Å, la bleue à une résolution de 7,47 Å.

De plus, en l'hélice 69 de l'ARNr 23 S, qui peut constituer un site d'interaction de la néomycine lorsqu'elle est présente en concentration élevée (Borovinskaya et al. 2007), semble plus orientée vers le 30 S dans la classe avec l'ARNt et la protéine L1 en conformation fermée.

5.1.3. Conclusions et perspectives

La première amélioration à envisager est l'augmentation de la stabilité du ribosome. Pour observer l'interaction avec le dérivé d'aminoglycoside, il faut favoriser la stabilisation du complexe. Il serait donc nécessaire d'améliorer les conditions de préparation du complexe en vue d'une nouvelle acquisition.

La présence d'un ARNt est importante car elle favorise la stabilisation du ribosome. Le ribosome pourrait être dissocié et réassocié en présence d'un ARNt et d'un ARNm qui permettrait également de stabiliser la structure. En effet, l'ajout de partenaires tels que l'ARN messager, des facteurs d'initiation ou l'augmentation de la concentration en magnésium pourrait favoriser l'interaction d'un aminoglycoside. La dissociation est importante car elle permet de s'affranchir de tous les facteurs et séquences d'ARNm ou ARNt liés au ribosome afin d'insérer des facteurs connus. La dissociation et réassociation serait essentielle car un simple « breathing » du ribosome, c'est-à-dire une légère dissociation des sous-unités 30 S et 50 S par diminution de la concentration en magnésium, ne suffit pas à rendre totalement homogène la solution.

Par conséquent, pour améliorer la résolution, il faut maximiser l'homogénéité des complexes en augmentant leur stabilité.

La seconde amélioration importante est le changement des paramètres d'acquisition. Premièrement, en diminuant la taille du pixel, la résolution maximale atteignable diminuera également et sera donc potentiellement meilleure. De plus, l'utilisation d'un microscope permettant l'acquisition d'images à très haute résolution, tel que le Titan Krios.

De plus, il peut être important de se demander si un autre dérivé que TG196 pourrait être plus intéressant à étudier. La présence du groupement phénol sur le dérivé ne perturbe pas l'interaction avec l'oligonucléotide mimant le site A mais peut peut-être diminuer l'insertion et l'interaction avec le ribosome entier. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction d'un dérivé avec des substitutions avec un plus faible encombrement stérique et qui présente une activité plus efficace sur les bactéries.

5.2. Observation de l'interaction des dérivés avec un petit ARN par cristallographie

L'étude cristallographique du site A bactérien en interaction avec les dérivés a été réalisée, sur certains dérivés de néomycine, par le Dr. Jiro KONDO de l'Université de Sophia à Tokyo. C'est pourquoi j'ai étudié par cristallographie l'interaction des dérivés de néomycine avec un fragment d'ARN ayant une structure très proche de celle du site A du ribosome bactérien.

Le but est donc d'étudier l'interaction des dérivés d'aminoglycosides avec le DIS du VIH. Cet ARN, étudié notamment par le Dr. Éric Ennifar, est ciblé par les aminoglycosides (Ennifar et al. 2003). La similarité de structure entre l'ARN DIS et le site A bactérien se retrouve non seulement au niveau de la séquence primaire mais également au niveau de la structure tridimensionnelle (***Figure 49***). C'est pourquoi je vais introduire très brièvement le DIS et pourquoi, outre l'aspect purement structural, l'étude de l'interaction de ce dernier avec les dérivés de néomycine est intéressante.

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) possède un génome ARN intégré à la capside sous forme de dimère. L'étape de dimérisation du génome ARN viral constitue un point clé du cycle viral. La dimérisation peut alors être envisagé comme une étape cible d'une approche thérapeutique.

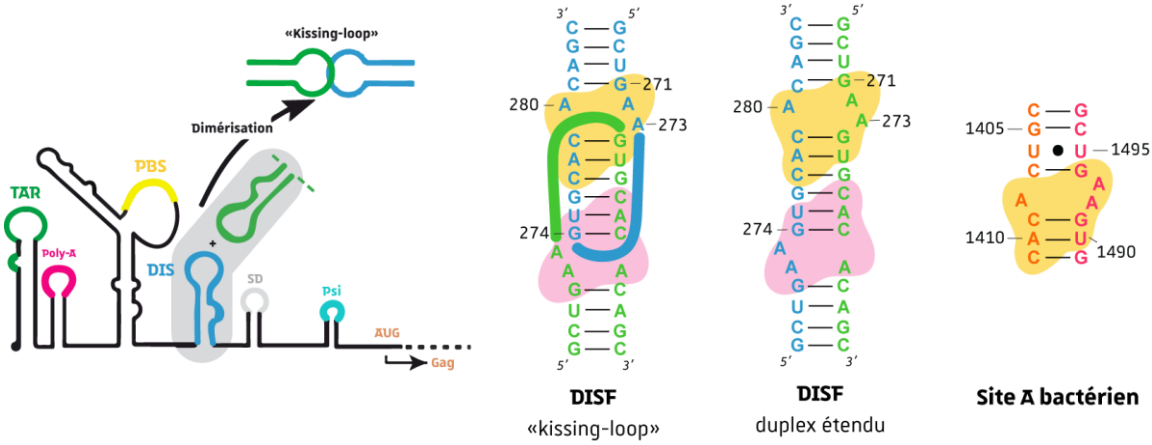


Figure 49 - Similarité entre le DIS et le site A bactérien (adapté de Ennifar 2006)

Les aminoglycosides ciblent ce génome viral au niveau d'une séquence très conservée appelée site d'initiation de la dimérisation ou DIS (« *Dimerization Initiation Site* »). La structure adoptée par le DIS est une tige-boucle, avec 9 nucléotides composant la boucle. Parmi ces derniers, 6 nucléotides sont auto-complémentaires et peuvent s'apparier avec les mêmes 6 résidus d'une autre copie de l'ARN viral, les trois autres étant des purines conservées (***Figure 49***). La dimérisation s'initie grâce à la formation d'une interaction boucle-boucle, nommée « kissing-loop », permise par l'auto-complémentarité des 6 nucléotides de la boucle. *In vitro*, ce complexe est stabilisé sous forme de duplex étendu par la protéine NCp7, protéine de la nucléocapside. Cette forme duplex étendu interagit également avec les aminoglycosides via des interactions quasiment identiques à celles observées dans le cas du site A du ribosome bactérien, la topologie de l'ARN étant la même, contrairement au complexe boucle-boucle qui a une topologie différente.

5.2.1. Études thermodynamiques

Les paramètres thermodynamiques de l'interaction des différents dérivés ont été étudiés de la même manière que pour le site A bactérien (**Annexe *14***).

Les expériences par ITC d'interaction d'un dérivé de la néomycine et le DIS, le modèle utilisé est un modèle à deux sites, ce qui signifie que les pics correspondent à la fixation d'un ligand sur un site à haute affinité et d'un second sur un site de plus faible affinité (***Figure 50***).

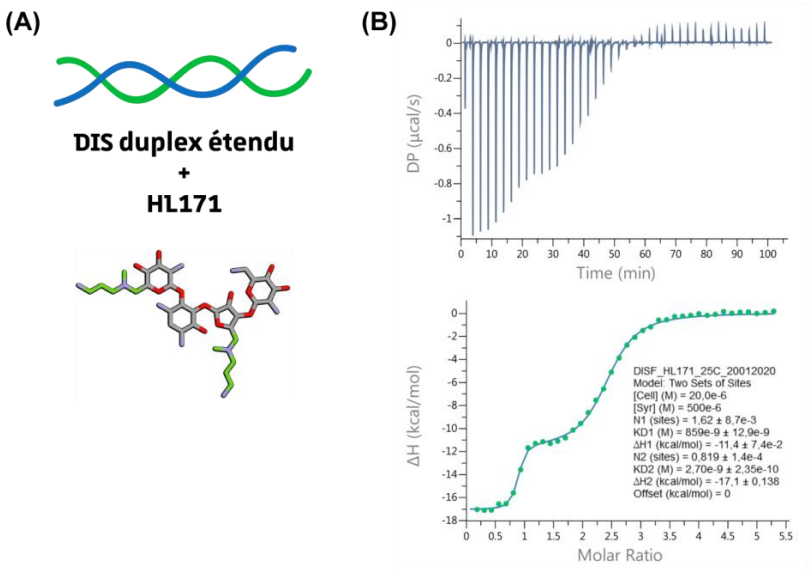


Figure 50 - Profil thermodynamique de l'interaction entre l'ARN DIS et le dérivé HL171

En analysant dans un premier temps les signatures énergétiques de l'interaction des dérivés avec le DIS, on remarque que tout comme pour l'interaction avec le site A, les valeurs d'enthalpie et d'entropie sont relativement peu dispersées entre les différents composés (***Figure 51***). Tout comme pour l'interaction avec le site A, la valeur d'enthalpie (ΔH) contribue de manière favorable à la diminution de l'énergie libre nécessaire à la réaction. Au contraire, la valeur d'entropie (-TΔS) participe défavorablement à l'énergie libre totale. Cela indique qu'au regard de la signature énergétique, le mécanisme d'interaction est relativement proche de celui observé pour le site A bactérien notamment.

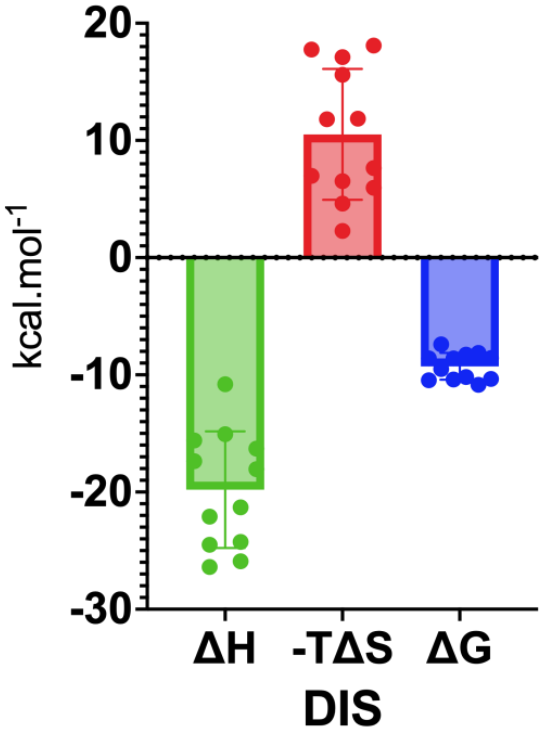


Figure 51 - Représentation de la distribution des profils thermodynamiques pour tous les dérivés de la néomycine en interaction avec DIS. Les valeurs moyennes de ΔH, -TΔS et ΔG pour chaque dérivé (Néomycine, HL072, TG196, HL094, HL084, HL090, HL168, HL169, HL170, HL171, HL172, HL173, HL300) sont représentées pour mettre en valeur la dispersion. Tous les résultats sont normalisés par un contrôle de titration de chaque dérivé dans du tampon seul.

Dans un second temps, en analysant les valeurs de K_D de l'interaction des dérivés avec le DIS, on peut observer que, de manière globale, les composés qui présentaient une affinité proche de celle de la néomycine pour le site A bactérien ont également une affinité proche de celle de la néomycine pour le DIS (***Figure 52***).

Les dérivés HL171 et HL300 qui présentent une affinité équivalente à l'affinité de la néomycine pour le site A bactérien ont des valeurs de K_D en moyenne plus élevée. En effet, HL171 présente une affinité d'environ 3 nM alors que la néomycine a une affinité de seulement 15 nM. Il serait intéressant de comparer la structure du DIS en présence de HL171 ou de la néomycine afin de mettre en évidence les interactions potentielles qui améliorent l'affinité du dérivé pour le DIS.

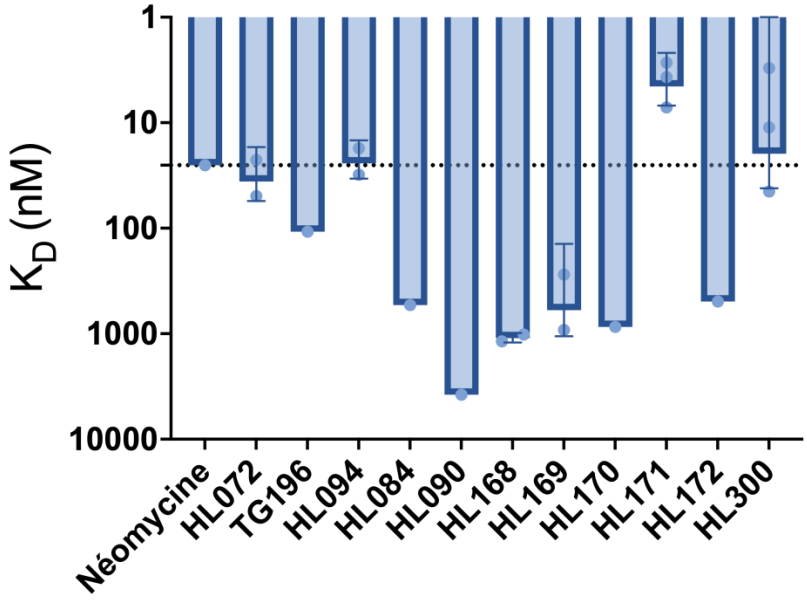


Figure 52 - Affinités des dérivés de néomycine pour l'ARN DIS. Les valeurs de constante de dissociation (K_D) reflètent l'affinité des composés pour le DIS, plus la valeur est faible, plus l'affinité est forte. La ligne pointillée représente la valeur de K_D pour la néomycine.

5.2.2. Études structurales des dérivés

Dans le but d'observer l'interaction des dérivés avec le DIS, j'ai réalisé des expériences de co-cristallisation des dérivés et le DIS de sous-type F (DISF) (

Annexe *1*). Pour cela, un oligonucléotide ayant la même séquence que le fragment DIS de l'ARN viral est utilisé. Pour obtenir un DIS sous forme de « kissing-loop », il est nécessaire de réaliser une renaturation en conditions de faibles concentrations en DIS. Ces conditions favorisent la formation de la structure tige-boucle du DIS en en favorisant les interactions intramoléculaires au détriment de la formation de duplex étendus en diminuant les interactions intermoléculaires.

L'ARN DIS a été préparé en conditions diluées, de manière à favoriser la formation du duplexe « kissing-loop ». Des co-cristaux de DISF avec des dérivés de la néomycine (HL168, HL171, HL170, HL300, TG196, HL172, HL072, HL084, HL169, HL090, HL094) ont été obtenus (***Figure 53***) et ont pu être diffractés aux rayons X au synchrotron SLS (Swiss Light Source) et les structures résolues par remplacement moléculaire à l'aide des précédentes structures de DIS connues.

Figure 53 - Cristaux obtenus pour le DISF en présence de dérivés de néomycine ou de la lividomycine.

Je vais décrire le cas des co-cristaux obtenus pour le dérivé HL171, qui fait partie des dérivés les plus intéressants au regard des autres types d'expérience, mais tous les co-cristaux obtenus ont débouchés sur les mêmes observations, sauf dans le cas du dérivé HL300 pour lequel des co-cristaux ont également pu être obtenus (**Figure *53***) mais n'ont pas permis d'obtenir des données exploitables.

La structure obtenue est résolue par remplacement moléculaire avec le programme MolRep en utilisant comme modèle le PDB 3C7R, qui est une structure de DIS en duplex étendu en interaction avec la néomycine. La structure a été affinée avec la suite logicielle Phenix (***Tableau 3***). On peut observer deux molécules du dérivé au sein de la structure. La résolution obtenue est de 2,3 Å.

Les structures obtenues correspondent finalement au DIS sous forme de duplex étendu et non pas de « kissing-loop » (**Figure *54B***). Malgré la renaturation favorisant la structure « kissing-loop » du DIS, le fait d'obtenir des structures en complexe étendu peut être dû à la concentration élevée, nécessaire à la cristallisation, utilisée lors de la préparation des gouttes.

Concernant l'interaction du dérivé avec le DIS, seul le cœur de la structure du dérivé d'aminoglycoside est retrouvé dans la densité, les modifications semblent trop flexibles pour pouvoir être observées dans la densité électronique (**Figure *54C*, *Annexe* 15**).

Tableau 3 - Paramètres cristallographiques du complexe ARN DIS - HL171

	HL171
Groupe d'espace	C121
a (Å)	99.36
b (Å)	31.23
c (Å)	58.64
β	119.742
Ligne de faisceau	PXIII / SLS
Longueur d'onde (Å)	1
Gamme de résolution (Å)	43.13 – 2.23
Réflexions uniques	391
Exhaustivité	0.99
R/Rfree	0.22/0.25
Molécules d'eau	6
Aminoglycosides	2

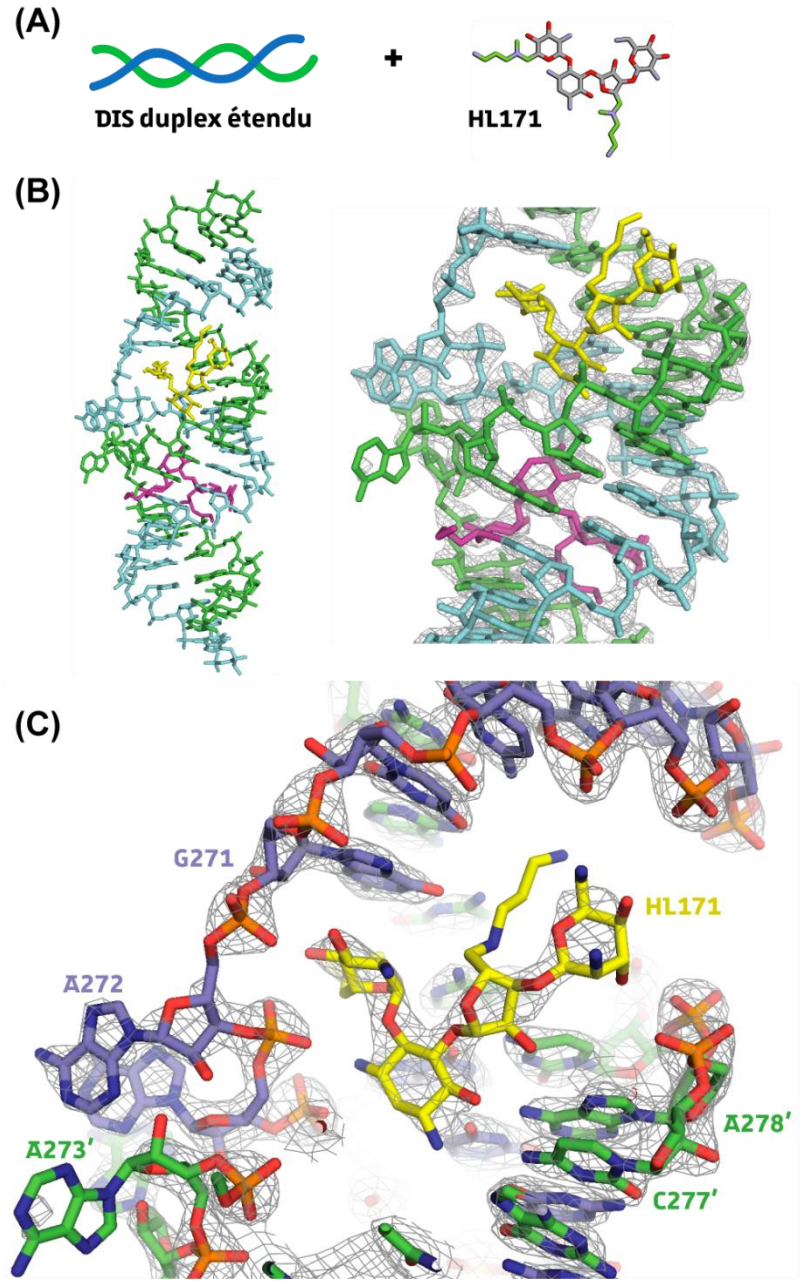


Figure 54 - Structure cristallographique du dérivé HL171 avec l'ARN DIS. (A) Schéma des du DISF et du composé ajouté pour la co-cristallisation. (B) Structure obtenue pour le co-cristal DISF-HL171. A gauche : vue globale du DISF en duplex étendu. A droite : zoom sur les deux molécules de dérivés HL171 observées au site d'interaction. (C) Carte de densité et reconstruction de la structure au niveau du site d'interaction de HL171 dans le DISF.

En comparant les structures obtenues pour différents dérivés de néomycine (HL171 et HL168) à la structure de la néomycine en complexe avec le DISF en duplex étendu (PDB 3C7R), on remarque que la structure du DIS ne varie pas de manière

significative. Cela indique que les modifications ne perturbent pas la fixation du composé par rapport à la néomycine et n'influent pas non plus sur la structure du DIS (***Figure 55***). Ces observations confirment que les substitutions n'établissent probablement pas d'interactions avec l'ARN au sein du complexe et sont par conséquent trop flexibles pour être observées dans la densité.

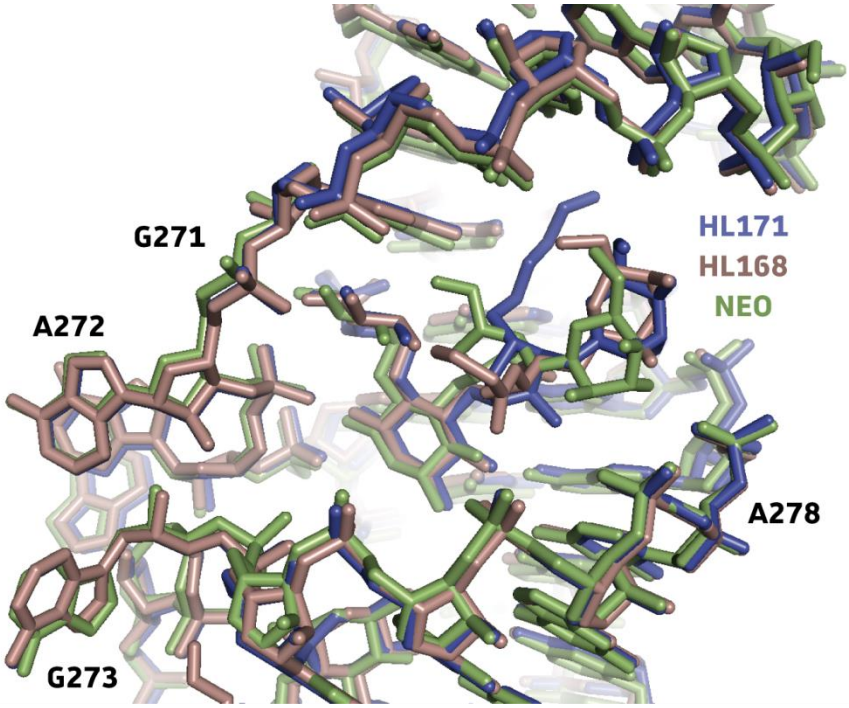


Figure 55 - Comparaison des structures obtenues pour HL168 (rose saumon), HL171 (violet) et la néomycine (vert, PDB = 3C7R)

L'étude de l'interaction des dérivés avec l'ARN DIS reste intéressante d'un point de vue thérapeutique car la présence d'aminoglycosides stabilise le dimère d'ARN viral, ce qui pourrait avoir un effet inhibiteur sur sa rétrotranscription par la rétrotranscriptase virale. L'étude de l'interaction avec les dérivés de néomycine ouvre ainsi potentiellement des perspectives thérapeutiques contre le SIDA.

En effet, il a été prouvé *in vitro* que certains aminoglycosides, y compris la néomycine, sont capables de se fixer de manière spécifique à l'ARN génomique dans des cellules infectées ou des virions et d'empêcher la dissociation dimère en « kissing-loop » (Ennifar 2006). En temps normal, la rétrotranscriptase (RT) de HIV va rétrotranscrire l'ARN génomique pour produire l'ADN proviral qui sera ensuite intégré

dans l'ADN de l'hôte. Lorsque la RT arrive au niveau du DIS, la structure pourrait être trop stable pour permettre à la RT d'ouvrir la structure double-brin, ce qui induit le blocage de la RT. Normalement, en cas de problème, la RT opère un « template switching », c'est-à-dire un changement de brin modèle afin d'achever la production d'ADN proviral fonctionnel. L'ARN viral étant sous forme d'homodimère du fait de l'interaction boucle-boucle au niveau du DIS, cela permet à la RT d'avoir à proximité deux modèles d'ARN viraux en cas de problèmes. Mais dans le cas où un aminoglycoside est fixé au niveau du DIS, la RT sera également bloquée sur l'autre brin, inhibant ainsi la rétrotranscription.

V. CONCLUSION

Le ribosome bactérien est une des cibles majeures des principaux antibiotiques. La moitié des antibiotiques actuellement utilisés, comme les macrolides, les aminoglycosides ou les oxazolidinones ciblent différentes étapes du mécanisme de traduction. Cependant, le mécanisme exact d'inhibition de plusieurs de ces composés n'est pas encore parfaitement compris. Il est devenu urgent de rendre disponible de nouveaux médicaments, possiblement avec un nouveau mécanisme d'action, pour surpasser cette augmentation de cas de résistance et multi-résistance.

J'ai utilisé une approche intégrative utilisant divers outils biophysiques, pour prodiguer une meilleure compréhension du mécanisme d'inhibition des macrolides et des aminoglycosides ciblant respectivement le tunnel de sortie des peptides néosynthétisés (PET, Peptide Exit Tunnel) et le site A accepteur du ribosome. J'ai étudié les aspects thermodynamiques de l'interaction d'un antibiotique avec le ribosome en utilisant la technique de microcalorimétrie ITC (Isothermal Titration Calorimetry). Les sites d'interaction ont été observés plus précisément grâce à la biologie structurale (cristallographie, cryo-microscopie électronique).

Concernant l'étude de l'interaction des macrolides avec le ribosome, j'ai étudié la structure d'un complexe entre un ribosome et un peptide antimicrobien et un macrolide formé en ITC par cryo-microscopie électronique. L'acquisition des images faisant suite à l'observation que le modèle à adopter pour les compétitions en ITC était probablement plus complexe que celui utilisé. Nous avons mis en évidence que le macrolide est présent au sein du complexe et que le peptide est également présent, probablement déplacé partiellement par le macrolide. Ces études ouvrent des perspectives telles que la création d'une molécule hybride entre un peptide et un macrolide. Cette molécule pourrait présenter une affinité et un spectre d'action accrus en combinant les avantages des deux types de molécules.

Une autre partie du projet porte sur l'étude de l'interaction de dérivés de l'aminoglycoside néomycine. J'ai réalisé des tests afin d'observer les paramètres thermodynamiques d'une interaction entre les aminoglycosides et le ribosome. Des expériences d'ITC ont été réalisées pour observer l'interaction de l'oligonucléotide mimant le site A bactérien avec des dérivés de la néomycine. Afin de tester la spécificité des dérivés pour le site A bactérien, les sites A humain cytoplasmique et mitochondrial WT et mutant ont également été utilisés. En effet, il est reconnu qu'une mutation portée par le site A mitochondrial favorise l'apparition d'effets secondaires

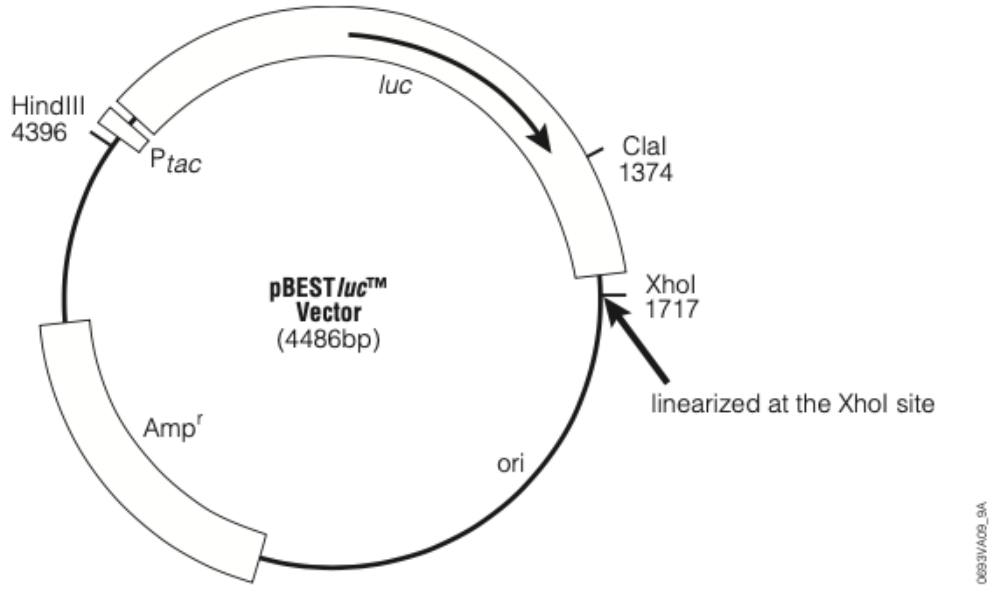
(ototoxicité, néphrotoxicité) dus à un traitement aux aminoglycosides. Des expériences d'ITC ont été réalisées pour comparer l'interaction de ces différents sites A avec les dérivés à l'interaction avec le site A bactérien, afin d'évaluer la sélectivité. Certains dérivés ont une affinité pour le site A bactérien s'approchant de celle du parent néomycine et une affinité décrue pour les différents sites A humains. Finalement, il apparait difficile d'établir un lien clair entre les substitutions des dérivés et leur affinité pour les différents sites A.

J'ai également co-cristallisé les dérivés de néomycine avec un ARN ayant une structure très semblable à celle du site A, le DIS du VIH-1. Cette partie de l'ARN génomique viral, nommée DIS pour Dimerization Initiation Site, a une très forte affinité pour les aminoglycosides du fait de sa grande ressemblance avec le site A du ribosome bactérien. Les structures obtenues démontrent que les dérivés peuvent se fixer au DIS de la même manière que la néomycine, sans modifier drastiquement la structure de l'ARN car les substitutions ne semblent pas interagir directement avec le DIS. L'étude de l'interaction avec les dérivés de néomycine ouvre ainsi également de potentielles perspectives thérapeutiques contre le SIDA, en plus de fournir une image précise de ce que devrait être l'interaction avec le site A bactérien

De plus j'ai effectué l'étude de l'interaction des dérivés de la néomycine avec le ribosome par le biais d'expériences de traduction *in vitro* d'un gène rapporteur en présence ou non de différentes concentrations des dérivés. Les perspectives sont nombreuses pour évaluer également la sélectivité des dérivés via la traduction *in vitro*, notamment, le développement de ribosomes hybrides afin d'étudier la sélectivité des dérivés pour le site A bactérien. Ces ribosomes hybrides consistent en des ribosomes bactériens dont seules les bases au sein du site A qui différent entre les sites A bactériens et humains sont mutées.

ANNEXES

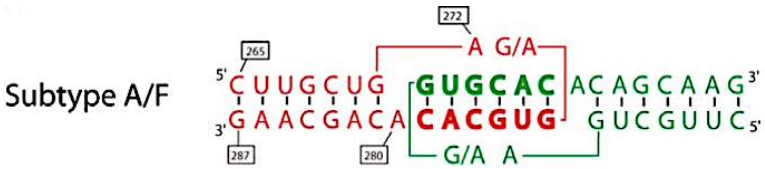
Annexe 1 - Carte du plasmide pBESTluc™ (Promega, adapté du bulletin technique E. coli S30 Extract System for Linear Templates)



Annexe 2 - Séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S (Brosius et al. 1978) présente dans le plasmide pKK3535 (Brosius et al. 1981). La séquence correspondant à la partie de l'hélice 44 appelée site-A est surlignée en bleu. La séquence surlignée en gris correspond à l'oligonucléotide utilisé pour le séquençage du gène.

5'-
aaattgaagagtttgatcatggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggtaacaggaagaagcttgcttctttgctgacgagtggcggacgggtgagtaatg
tctgggaaactgcctgatggaggggataactactggaaacggtagctaataccgcataacgtcgcaagaccaaagaggggaccttcgggcctcttgccatcggatgtgcccagatggga
ttagctagtaggtggggtaacggctcacctaggcgacgatccctagctggtctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaa
tattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatgccgcgtgtatgaagaaggccttcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaagggagtaaagttaatacctttgctcattgacgtta
cccgcagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccgcggtaatacggagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgcacgcaggcggtttgttaagtcagatgtgaa
atccccgggctcaacctgggaactgcatctgatactggcaagcttgagtctcgtagaggggggtagaattccaggtgtagcggtgaaatgcgtagagatctggaggaataccggtggcgaa
ggcggccccctggacgaagactgacgctcaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgtcgacttggaggttgtgcccttgaggcgt
ggcttccggagctaacgcgttaagtcgaccgcctggggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgatgcaacg
cgaagaaccttacctggtcttgacatccacggaagttttcagagatgagaatgtgccttcgggaaccgtgagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgttgtgaaatgttgggttaagt
cccgcaacgagcgcaaccccttatcctttgttgccagcggtccggccgggaactcaaaggagactgccagtgataaactggaggaaggtggggatgacgtcaagtcatcatggcccttacgac
cagggctacacacgtgctacaatggcgcatacaaagagaagcgacctcgcgagagcaagcggacctcataaagtgcgtcgtagtccggattggagtctgcaactcgactccatgaagtcgg
aatcgctagtaatcgtggatcagaatgccacggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtgggttgcaaaagaagtaggtagcttaaccttcgggagggc
gcttaccactttgtgattcatgactggggtgaagtcgtaacaaggtaaccgtaggggaacctgcggttggatcacctcctta-3'

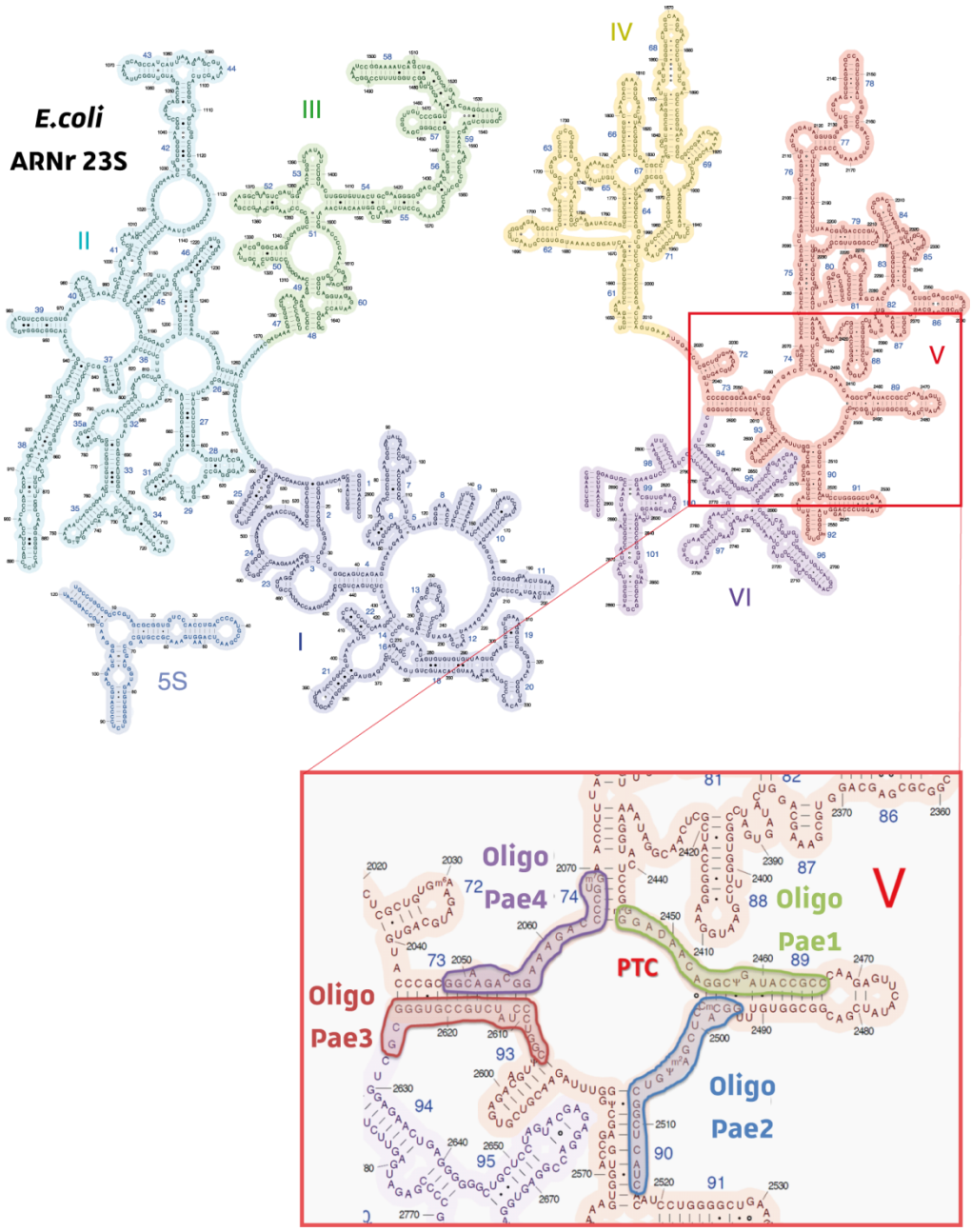
Annexe 3 - Séquence et structure secondaires de complexes de sous-type-A et sous-type-F (complexe kissing-loop) utilisées pour les études cristallographiques (Ennifar et Dumas 2006)



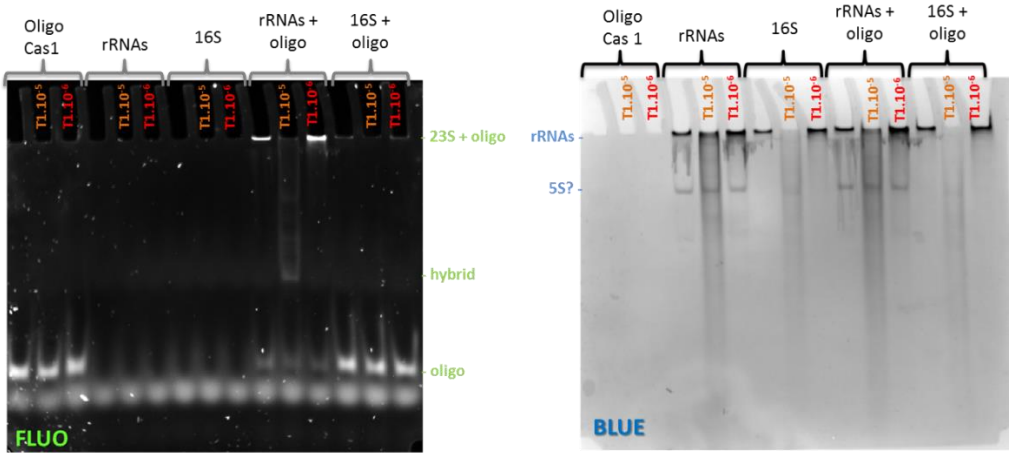
Annexe 4 - Tableau des valeurs obtenues pour les expériences d'ITC par compétition avec les ribosomes ESKAPE

			ΔH (kcal.mol^{-1})	-TΔS (kcal.mol^{-1})	ΔG (kcal.mol^{-1})	K_D (nM)	N
Pyrrhocoricine	Pae	1	-27,7 ± 0,113	17,5	-10,3	38,4 ± 2,35	0,72 ± 1,2e-3
		2	-25,1 ± 0,125	15,2	-9,94	67,9 ± 4,09	1,06 ± 2,1e-3
		Moyenne	*-26,45*	*16,35*	*-10,15*	*53,15*	*0,89*
		Ecart-type	*1,77*	*1,63*	*0,22*	*20,86*	*0,24*
	Kpn	1	-35,0 ± 0,186	25,1	-9,93	69,0 ± 4,27	0,81 ± 1,9e-3
		2	-31,3 ± 0,186	21,2	-10,1	49,4 ± 2,89	0,73 ± 1,4e-3
		Moyenne	*-33,15*	*23,15*	*-10,02*	*59,20*	*0,80*
		Ecart-type	*2,62*	*2,76*	*0,12*	*13,86*	*0,01*
	Ecl	1	-30,3 ± 0,358	20,9	-9,41	164 ± 15,9	0,75 ± 4,9e-3
Erythromycine (déplacement pyrrho)	Pae	1	-0,9 ± 0,271	-10,5	-11,4	6,12 ± 0,42	0,88 ± 7,0e-3
	Kpn	1	-5,73 ± 0,921	-5,6	-11,3	6,85 ± 1,09	0,64 ± 1,6e-2
	Ecl	1	-0,94 ± 0,238	-10,8	-11,8	3,21 ± 0,21	0,55 ± 3,1e-3
Azithromycine (déplacement pyrrho)	Pae	1	12,7 ± 1,24	-24,4	-11,6	4,21 ± 0,54	0,69 ± 1,5e-2
	Kpn	1	-7,05 ± 0,252	-5,78	-12,8	0,569 ± 0,06	0,59 ± 4,0e-3

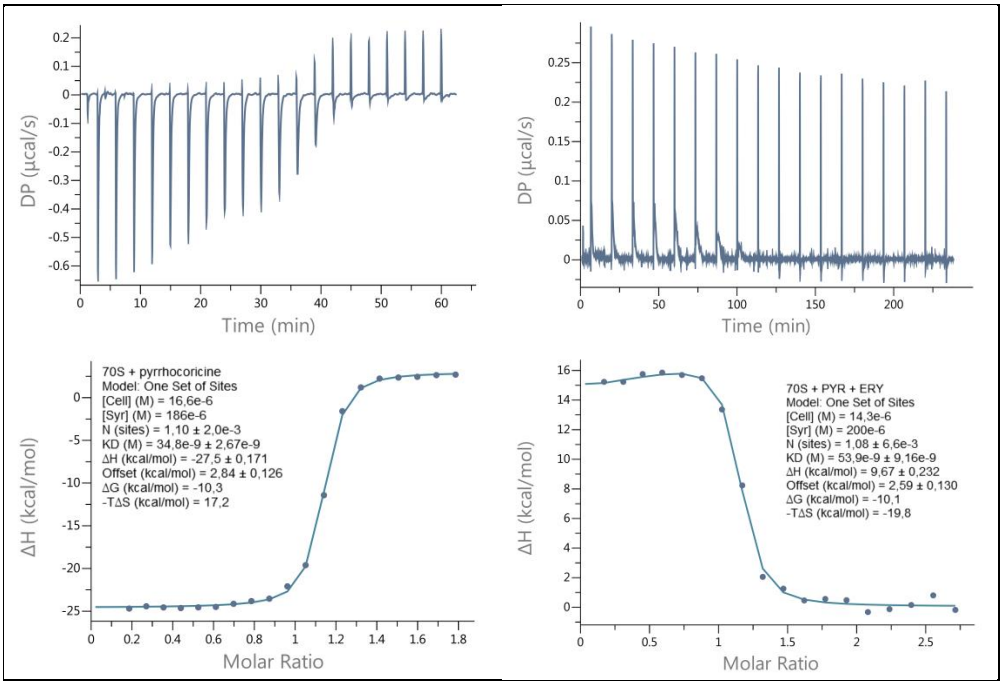
Annexe 5 – Structure secondaire de l'ARNr 23S (CC BY-SA, ©2013-2015 Georgia Institute of Technology) et de la position complémentaire aux oligonucléotides Pae1, 2, 3 et 4. L'ARNr 23S d'*E. coli* est représenté à titre d'illustration, l'ARNr ciblé étant celui de *P. aeruginosa*. PTC = Centre Peptidyle-transférase.



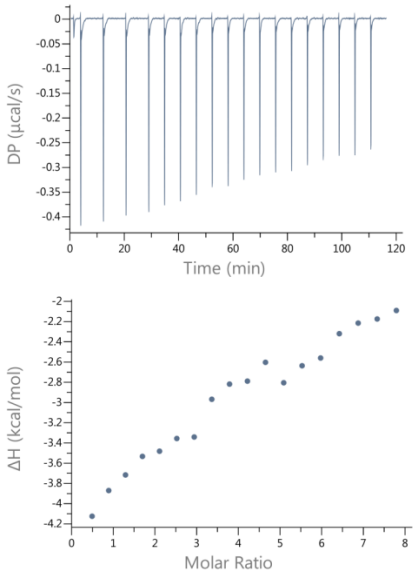
Annexe 6 – Hybridation d'oligonucléotides fluorescents avec les ARNr de *Pseudomonas aeruginosa*. Gel natif acrylamide 12 %, MgCl2 5 mM. Les bandes du gel sont révélées par fluorescence puis le gel est incubé dans du bleu de méthylène. Les différentes conditions correspondent aux ARNr hybridés à l'oligonucléotide (ARNr + oligo) ou à des contrôles : l'oligonucléotide seul (Oligo Cas1), les ARN ribosomaux seuls (ARNr), l'ARNr 16 S seul, ou l'ARNr 16 S hybridé à l'oligonucléotide (la cible étant le 23 S). Chaque échantillon a subi le protocole d'hybridation et a été soit non traité soit traité avec deux concentrations de RNase T1 puis incubé 3 h à 37 °C. Les échantillons sont ensuite directement déposés sur gel.



Annexe 7 - ITC de compétition pyrrhocoricine-érythromycine. Isotherme d'interaction obtenu pour l'interaction du ribosome d'*E. coli* avec la pyrrhocoricine (à gauche) ou avec le ribosome lié à la pyrrhocoricine (PYR) avec l'érythromycine (ERY) (à droite). Les paramètres indiqués correspondent à l'interaction de l'érythromycine seule.



Annexe 8 - ITC de compétition érythromycine-pyrrhocoricine. Isotherme obtenu pour l'interaction du ribosome d'E. coli lié à l'érythromycine (ERY) avec la pyrrhocoricine (PYR). Aucune interaction n'est observée, les pics correspondent à de la chaleur de dilution due à la concentration élevée en ribosome.



Annexe 9 - Conditions d'expériences d'ITC d'interaction d'aminoglycosides avec le ribosome

	70S/30S	[Ribosome] (µM)	Ami	[Ami] (µM)	Température (°C)	Tampon
Tampon pH7,5	30S	17	Tobramycine	350	30	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	30S	13,5	Tobramycine	300	15	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	70S	20	HL072	500	30	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	30S	17	Amikacine	300	30	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	70S	13	Néomycine	300	25	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	30S	2,2	Néomycine	300	15	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	30S	2,2	Néomycine	300	15	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
Tampon sans glycérol	30S	20	Néomycine	1000	35	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 30 mM KCl
	30S	13,5	Néomycine	1000	35	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 30 mM KCl
Tampon pH7	70S	15	Néomycine	330	25	50 mM MOPS pH 7, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	70S	13,2	Néomycine	300	25	50 mM MOPS pH 7, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
Tampon KCl 60mM	70S	13	Néomycine	300	25	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 60 mM KCl
Compétitions	30S	3	Streptomycine/Néomycine	500	25	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	30S	5	Streptomycine/Néomycine	500	15	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	30S	15	Spermine/Néomycine	250	25	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl
	30S	3	Spermine/Néomycine	500	15	50 mM MOPS pH 7.5, 7 mM MgCl2, 3 M NH4Cl, 1 mM DTT, 5 % glycerol, 30 mM KCl

Annexe 10 - Tableau des valeurs obtenues pour les expériences d'ITC avec le site A bactérien

			ΔH (kcal.mol^{-1})	-TΔS (kcal.mol^{-1})	ΔG (kcal.mol^{-1})	K_D (µM)	N	Modèle
Site A bactérien	Néomycine	1	-17,8 ±4,5e^{-2}	8,79	-8,98	0,261 ±2,8e^{-3}	1,09 ±4,4e^{-3}	2 sites
		2	-18 ±9,3e^{-2}	8,85	-9,14	0,202 ±8,1e^{-3}	1,05 ±4,6e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-17,90***	***8,82***	***-9,06***	***0,23***	***1,07***	
		Ecart-type	***0,14***	***0,04***	***0,11***	***0,04***	***0,03***	
	HL072	1	-20,4 ±0,151	11,6	-8,78	0,369 ±11,3e^{-3}	0,9 ±1,0e^{-2}	2 sites
		2	-20,3 ±8,2e^{-2}	11,6	-8,7	0,425 ±5,2e^{-3}	0,99 ±1,2e^{-2}	2 sites
		3	-28,6 ±0,238	18	-10,6	0,016 ±1,8e^{-4}	0,86 ±5,5e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-17,90***	***8,82***	***-9,06***	***0,27***	***0,92***	
		Ecart-type	***0,14***	***0,04***	***0,11***	***0,22***	***0,07***	
	TG196	1	-20,4 ±6,2e^{-2}	11,6	-8,84	0,335 ±7,1e^{-3}	1,07 ±4,5e^{-3}	2 sites
		2	-24,9 ±0,123	16,2	-8,7	0,422 ±3,8e^{-3}	1,05 ±3,1e^{-3}	2 sites
		3	-19,2 ±7,4e^{-2}	10,6	-8,59	0,506 ±11,0e^{-3}	1,07 ±7,3e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-21,50***	***12,80***	***-8,71***	***0,42***	***1,06***	
		Ecart-type	***3,00***	***2,99***	***0,13***	***0,09***	***0,01***	
	HL084	1	-15,6 ±0,193	7,94	-7,62	2,61 ±57e^{-3}	1,11 ±2,0e^{-2}	2 sites
		2	-9,1 ±3,1e^{-2}	0,613	-8,46	0,629 ±1,8e^{-3}	1,86 ±5,7e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-12,34***	***4,28***	***-8,04***	***1,62***	***1,49***	
		Ecart-type	***4,61***	***5,18***	***0,59***	***1,40***	***0,53***	
	HL090	1	-62,8 ±5,57	55,8	-6,98	7,71 ±285e^{-3}	0,582 ±4,1e^{-2}	2 sites
		2	-16,2 ±3,9e^{-2}	4,19	-12	0,422 ±3,8e^{-3}	1,05 ±3,1e^{-3}	2 sites
		3	-16,8 ±4,5e^{-2}	4,82	-12	0,0016 ±6,42e^{-6}	1,74 ±1,1e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-21,50***	***12,80***	***-8,71***	***0,42***	***1,12***	
		Ecart-type	***3,00***	***2,99***	***0,13***	***0,09***	***0,58***	
	HL094	1	-17,3 ±0,234	8,43	-8,84	0,331 ±19,5e^{-3}	0,649 ±4,8e^{-2}	2 sites
		2	-18,4 ±6,5e^{-2}	10,1	-8,3	0,829 ±9,54e^{-3}	1,11 ±6,1e^{-3}	2 sites
		3	-29,5 ±0,19	20,8	-8,67	0,441 ±11,0e^{-3}	0,849 ±4,9e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-21,73***	***13,11***	***-8,60***	***0,53***	***0,75***	
		Ecart-type	***6,75***	***6,71***	***0,28***	***0,26***	***0,32***	
	HL168	1	-24,9 ±1,59	18,8	-6,16	30,7 ±2,56	1,99 ±8,9e^{-2}	1 site
		2	-19,8 ±0,412	13,1	-6,64	13,6 ±731e^{-3}	2,65 ±2,7e^{-2}	1 site
		3	-34,8 ±0,782	27,7	-7,09	6,41 ±364e^{-3}	1,28 ±1,5e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-26,50***	***19,83***	***-6,63***	***16,90***	***1,97***	
		Ecart-type	***7,63***	***7,31***	***0,47***	***12,48***	***0,69***	
	HL169	1	-21,1 ±0,21	14,5	-6,62	14,1 ±386e^{-3}	2,59 ±1,6e^{-2}	1 site
		2	-21,2 ±0,311	14,2	-7,05	6,78 ±327e^{-3}	2,77 ±2,2e^{-2}	1 site
		3	-31,0 ±0,452	23,6	-7,36	4,01 ±204e^{-3}	1,47 ±1,2e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-24,50***	***17,50***	***-7,00***	***8,38***	***2,28***	
		Ecart-type	***5,63***	***5,28***	***0,37***	***5,18***	***0,70***	
	HL170	1	-15,6 ±0,301	8,58	-6,99	7,51 ±465e^{-3}	2,58 ±2,4e^{-2}	1 site
		2	-13,5 ±0,228	6,4	-7,05	6,78 ±339e^{-3}	4,04 ±4,1e^{-2}	1 site
		3	-20,6 ±0,478	13,9	-6,71	12,2 ±759e^{-3}	2,65 ±3,1e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-18,73***	***11,56***	***-7,18***	***8,83***	***3,09***	
		Ecart-type	***2,76***	***2,78***	***0,61***	***2,94***	***0,82***	
	HL171	1	-27,4 ±0,103	19,2	-8,19	0,989 ±6,8e^{-3}	1,67 ±1,2e^{-2}	2 sites
		2	-21,4 ±0,228	12,4	-9,05	0,233 ±1,58e^{-3}	1,72 ±3,2e^{-3}	2 sites
		3	-20,9 ±5,3e^{-2}	11,6	-9,27	0,161 ±9,2e^{-4}	1,7 ±2,5e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-23,23***	***14,40***	***-8,84***	***0,44***	***1,70***	
		Ecart-type	***3,62***	***4,18***	***0,57***	***0,42***	***0,03***	
	HL172	1	-17,0 ±0,121	9,92	-7,08	6,48 ±318e^{-3}	3,99 ±1,8e^{-2}	1 site
	HL173	1	-17,9 ±0,169	11	-6,84	9,81 ±469e^{-3}	4,6 ±2,3e^{-2}	1 site
	HL174	1	-14,9 ±0,842	8,06	-6,82	10,0 ±744e^{-3}	4,66 ±0,18	1 site
	HL175	1	-14,8 ±1,17	7,99	-6,83	9,95 ±687e^{-3}	5,19 ±0,26	1 site
	HL176	1	-18,9 ±0,219	11,7	-7,17	5,57 ±230e^{-3}	2,32 ±1,3e^{-2}	1 site
	HL300	1	-14,5 ±7,9e^{-2}	5,69	-8,81	0,338 ±2,09e^{-3}	2,19 ±1,4e^{-2}	2 sites
		2	-8,54 ±0,228	1,69	-9,02	0,252 ±2,94e^{-3}	2,43 ±3,3e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-14,15***	***5,24***	***-8,92***	***0,30***	***2,31***	
		Ecart-type	***0,49***	***0,64***	***0,15***	***0,06***	***0,17***	

Annexe 11- Tableau des valeurs obtenues pour les expériences d'ITC avec le site A humain cytoplasmique

			ΔH (kcal.mol^{-1})	-TΔS (kcal.mol^{-1})	ΔG (kcal.mol^{-1})	K_D (µM)	N	Modèle
Site A humain	Néomycine	1	-14,3 ±0,137	7,89	-6,44	19,1 ±516e^{-3}	3,18 ±1,6e^{-2}	1 site
	HL072	1	-35,7 ±0,240	28,9	-6,86	9,49 ±185e^{-3}	1,99 ±9,2e^{-3}	1 site
		2	-38,5 ±0,293	31,5	-7	7,42 ±165e^{-3}	1,75 ±9,6e^{-3}	1 site
		Moyenne	***-37,10***	***30,20***	***-6,93***	***8,46***	***1,87***	
		Ecart-type	***1,98***	***1,84***	***0,10***	***1,46***	***0,17***	
	TG196	1	-23,0 ±0,115	16,1	-6,89	9,0 ±184e^{-3}	3,08 ±9,7e^{-3}	1 site
		2	-38,8 ±0,258	31,9	-6,86	9,35 ±180e^{-3}	2,05 ±9,5e^{-3}	1 site
		Moyenne	***-30,90***	***24,00***	***-6,88***	***9,18***	***2,57***	
		Ecart-type	***11,17***	***11,17***	***0,02***	***0,25***	***0,73***	
	HL084	1	-20,5 ±0,345	14,1	-6,43	19,5 ±762e^{-3}	2,66 ±2,7e^{-2}	1 site
		2	-24,2 ±0,178	17,6	-6,59	14,7 ±284e^{-3}	2,53 ±1,2e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-22,35***	***15,85***	***-6,51***	***17,10***	***2,60***	
		Ecart-type	***2,62***	***2,47***	***0,11***	***3,39***	***0,09***	
	HL090	1	-72,4 ±0,824	65,7	-6,71	12,2 ±256e^{-3}	1,13 ±8,2e^{-3}	1 site
		2	-35,4 ±0,937	28,4	-6,96	7,94 ±507e^{-3}	1,44 ±2,8e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-53,90***	***47,05***	***-6,84***	***10,07***	***1,29***	
		Ecart-type	***26,16***	***26,38***	***0,18***	***3,01***	***0,22***	
	HL094	1	-36,4 ±0,35	29,5	-6,95	8,0 ±252e^{-3}	2,18 ±1,5e^{-2}	1 site
		2	-38,3 ±0,256	31,3	-7,03	7,1 ±146e^{-3}	1,82 ±8,8e^{-3}	1 site
		Moyenne	***-37,35***	***30,40***	***-6,99***	***7,55***	***2,00***	
		Ecart-type	***1,34***	***1,27***	***0,06***	***0,64***	***0,25***	
	HL168	1	-17,6 ±0,176	11,2	-6,38	21,1 ±654e^{-3}	3,67 ±1,7e^{-2}	1 site
		2	-21,3 ±0,212	14,8	-6,52	16,8 ±477e^{-3}	2,99 ±1,7e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-19,45***	***13,00***	***-6,45***	***19,20***	***3,33***	
		Ecart-type	***2,62***	***2,55***	***0,10***	***3,39***	***0,48***	
	HL169	1	-21,6 ±0,108	14,7	-6,85	9,58 ±206e^{-3}	3,35 ±1,0e^{-2}	1 site
		2	-24,1 ±0,141	17,2	-6,93	8,38 ±206e^{-3}	3,03 ±1,1e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-22,85***	***15,95***	***-6,89***	***8,98***	***3,19***	
		Ecart-type	***1,77***	***1,77***	***0,06***	***0,85***	***0,23***	
	HL170	1	-19,3 ±0,210	12,9	-6,37	21,6 ±686e^{-3}	3,51 ±1,9e^{-2}	1 site
		2	-23,9 ±0,252	17,4	-6,51	17,0 ±500e^{-3}	2,95 ±1,8e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-21,60***	***15,15***	***-6,44***	***19,30***	***3,23***	
		Ecart-type	***3,25***	***3,18***	***0,10***	***3,25***	***0,40***	
	HL171	1	-21 ±0,101	13,9	-7,13	6,06 ±204e^{-3}	3,29 ±1,0e^{-2}	1 site
		2	-21 ±0,111	13,9	-7,07	6,56 ±250e^{-3}	3,45 ±1,2e^{-2}	1 site
		3	-21,1 ±0,129	14,2	-6,88	9,15 ±419e^{-3}	3,42 ±1,6e^{-2}	1 site
		4	-19,9 ±0,185	12,4	-7,5	3,17 ±128e^{-3}	3,44 ±2,4e^{-2}	1 site
		5	-38,1 ±0,692	30,8	-7,37	3,92 ±266e^{-3}	2,06 ±2,0e^{-2}	1 site
		6	-39,3 ±0,838	31,9	-7,36	4,09 ±313e^{-3}	2,04 ±2,1e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-26,67***	***19,22***	***-7,45***	***0,50***	***2,95***	
		Ecart-type	***9,35***	***9,50***	***0,72***	***0,30***	***0,70***	
	HL172	1	-17,6 ±0,711	10,7	-6,85	9,47 ±1,13	2,94 ±6,0e^{-2}	1 site
	HL173	1	-50,8 ±0,962	43,5	-7,31	4,44 ±212e^{-3}	0,971 ±1,1e^{-2}	1 site
	HL174	1	-22,3 ±0,665	15,7	-6,52	16,8 ±1,21	3,08 ±5,4e^{-2}	1 site
	HL175	1	-22,8 ±2,83	16,6	-6,25	26,2 ±6,13	4,65 ±0,511	1 site
	HL176	1	-20,3 ±0,395	13,3	-7,03	7,06 ±435e^{-3}	1,98 ±1,8e^{-2}	1 site
	HL300	1	-12,6 ±0,262	5,12	-7,49	3,27 ±221e^{-3}	3,64 ±3,9e^{-2}	1 site
		2	-12,6 ±0,124	5,47	-7,16	5,66 ±264e^{-3}	4,4 ±2,3e^{-3}	1 site
		3	-13,2 ±0,309	5,87	-7,32	4,28 ±267e^{-3}	3,88 ±5,0e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-12,80***	***5,49***	***-7,32***	***0,44***	***3,97***	
		Ecart-type	***0,35***	***0,38***	***0,17***	***0,12***	***0,39***	

Annexe 12- Tableau des valeurs obtenues pour les expériences d'ITC avec le site A humain mitochondrial

			ΔH (kcal.mol^{-1})	-TΔS (kcal.mol^{-1})	ΔG (kcal.mol^{-1})	K_D (µM)	N	Modèle
Site A humain mitochondrial	Néomycine	1	-18,9 ±0,229	12,1	-6,72	11,9 ±653e^{-3}	3,9 ±2,5e^{-2}	1 site
	HL072	1	-41,1 ±0,384	34,2	-6,92	8,54 ±200e^{-3}	1,61 ±1,1e^{-2}	1 site
	TG196	1	-38,5 ±0,297	31,4	-7,04	6,99 ±205e^{-3}	2,4 ±1,3e^{-2}	1 site
	HL084	1	-25,7 ±0,177	19	-6,7	12,3 ±307e3^{-3}	3,19 ±1,3e^{-2}	1 site
		2	-27,1 ±0,274	20,4	-6,75	11,3 ±277e^{-3}	1,93 ±1,4e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-26,40***	***19,70***	***-6,73***	***11,80***	***2,56***	
		Ecart-type	***0,99***	***0,99***	***0,04***	***0,71***	***0,89***	
	HL090	1	-40,1 ±0,836	33,1	-6,96	7,96 ±348e^{-3}	1,2 ±1,9e^{-2}	1 site
	HL094	1	-39,8 ±0,374	32,6	-7,18	5,52 ±190e^{-3}	1,91 ±1,3e^{-2}	1 site
		2	-41,7 ±0,333	34,6	-7,08	6,5 ±149e^{-3}	1,54 ±9,1e^{-3}	1 site
		Moyenne	***-40,75***	***33,60***	***-7,13***	***6,01***	***1,73***	
		Ecart-type	***1,34***	***1,41***	***0,07***	***0,69***	***0,26***	
	HL168	1	-23,5 ±0,148	16,9	-6,59	14,9 ±343e^{-3}	3,57 ±1,2e^{-2}	1 site
		2	-22,9 ±0,230	16,3	-6,54	16,0 ±444e^{-3}	2,81 ±1,7e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-23,20***	***16,60***	***-6,57***	***15,50***	***3,19***	
		Ecart-type	***0,42***	***0,42***	***0,04***	***0,78***	***0,54***	
	HL169	1	-23,6 ±0,112	16,6	-7,01	7,33 ±141e^{-3}	2,68 ±8,6e^{-3}	1 site
	HL170	1	-25,8 ±0,277	19,1	-6,69	12,5 ±430e^{-3}	2,87 ±1,9e^{-2}	1 site
		2	-23,0 ±0,182	16,3	-6,69	12,4 ±277e^{-3}	2,46 ±1,3e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-24,40***	***17,70***	***-6,69***	***12,50***	***2,67***	
		Ecart-type	***1,98***	***1,98***	***0,00***	***0,71***	***0,29***	
	HL171	1	-20,8 ±0,197	13,7	-7,08	6,47 ±460e^{-3}	3,66 ±2,4e^{-2}	1 site
		2	-20,4 ±0,199	13,3	-7,1	6,27 ±474e^{-3}	3,7 ±2,5e^{-2}	1 site
		3	-21,3 ±0,186	14,2	-7,09	6,32 ±422e^{-3}	3,68 ±2,2e^{-2}	1 site
		4	-40,0 ±0,972	32,7	-7,28	4,63 ±438e^{-3}	2,47 ±3,1e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-25,63***	***18,48***	***-7,14***	***5,92***	***3,38***	
		Ecart-type	***9,59***	***9,49***	***0,10***	***0,87***	***0,61***	
	HL172	1	-14,1 ±7,34	7,97	-6,14	31,4 ±7,43	10 ±4,53	1 site
	HL173	1	-21,0 ±12	14,9	-6,1	33,9 ±10,4	10 ±5,23	1 site
	HL174	1	-35,8 ±8,91	29,7	-6,1	34,0 ±14,5	5,01 ±1,23	1 site
	HL175	1	-42,9 ±26,4	37	-5,85	51,9 ±32,3	10 ±7,21	1 site
	HL176	1	-16,6 ±0,215	9,25	-7,3	4,47 ±201e^{-3}	3,33 ±2,4e^{-2}	1 site
	HL300	1	-12,3 ±0,238	4,58	-7,76	2,05 ±171e^{-3}	3,35 ±3,0e^{-2}	1 site
		2	-14,7 ±0,178	7,27	-7,45	3,49 ±239e^{-3}	3,72 ±2,5e^{-2}	1 site
		3	-15,1 ±0,211	7,63	-7,43	3,63 ±281e^{-3}	3,58 ±2,8e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-14,03***	***6,49***	***-7,55***	***30,60***	***3,55***	
		Ecart-type	***1,51***	***1,67***	***0,19***	***0,88***	***0,19***	

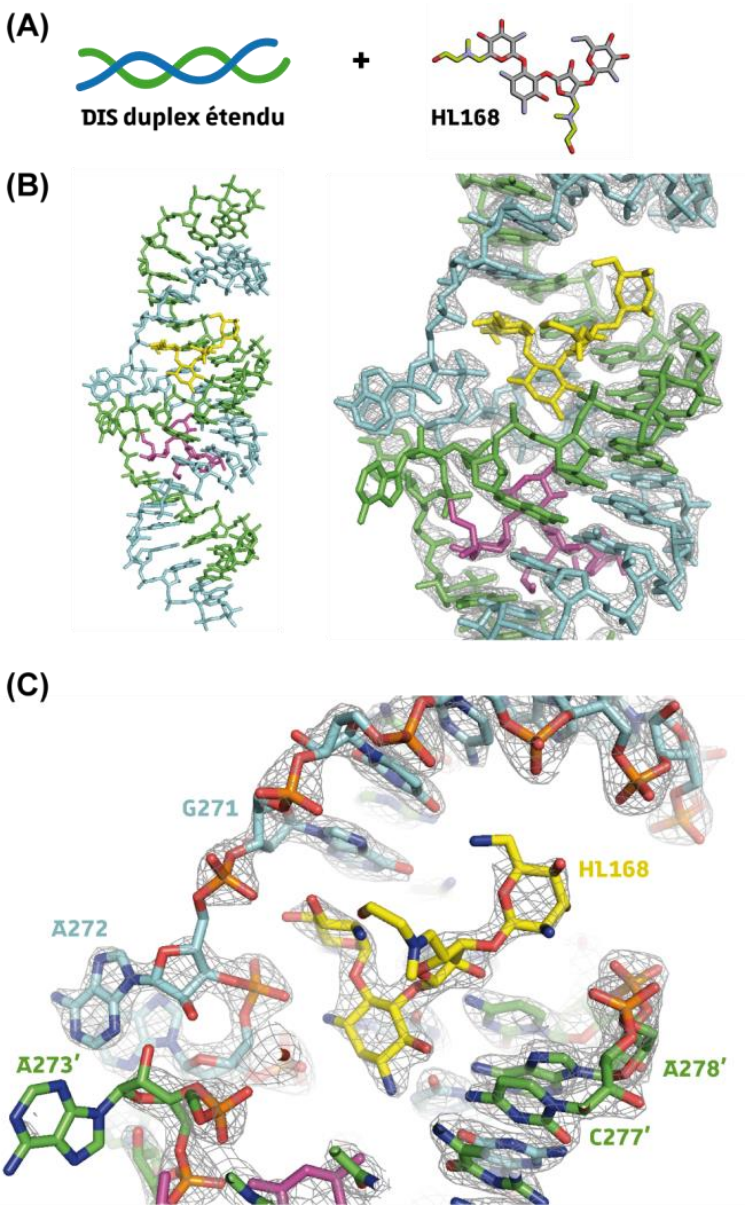
Annexe 13- Tableau des valeurs obtenues pour les expériences d'ITC avec le site A humain mitochondrial mutant

			ΔH (kcal.mol^{-1})	-TΔS (kcal.mol^{-1})	ΔG (kcal.mol^{-1})	K_D (µM)	N	Modèle
Site A humain mitochondrial mutant A1555G	Néomycine	1	-20,8 ±0,266	14,2	-6,59	14,8 ±543e^{-3}	2,8 ±2,2e^{-2}	1 site
		2	-14 ±1,62	7,14	-6,82	10,0 ±1,87	4,67 ±0,38	1 site
		3	-13,4 ±1,62	6,44	-6,98	7,72 ±468e^{-3}	4,17 ±3,1e^{-2}	1 site
		4	-14,3 ±0,218	7,29	-7,03	7,11 ±415e^{-3}	3,82 ±3,0e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-15,63***	***8,77***	***-6,86***	***9,91***	***3,87***	
		Ecart-type	***3,47***	***3,64***	***0,20***	***3,49***	***0,79***	
	HL072	1	-45,7 ±0,375	38,8	-6,87	9,27 ±178e^{-3}	1,58 ±9,5e^{-3}	1 site
	TG196	1	-80 ±0,689	72,6	-7,36	4,05 ±100e^{-3}	0,924 ±5,7e^{-3}	1 site
	HL084	1	-26,4 ±0,44	19,7	-6,68	12,6 ±495e^{-3}	1,99 ±2,3e^{-2}	1 site
	HL090	1	-43,8 ±0,95	36,8	-6,97	7,76 ±377e^{-3}	1,29 ±2,1e^{-2}	1 site
	HL094	1	-40,4 ±0,304	33,3	-7,07	6,62 ±146e^{-3}	1,6 ±8,8e^{-3}	1 site
	HL168	1	-23,3 ±0,257	16,8	-6,55	15,9 ±434e^{-3}	2,5 ±1,7e^{-2}	1 site
	HL169	1	-25,7 ±0,163	18,9	-6,84	9,69 ±226e^{-3}	2,81 ±1,1e^{-2}	1 site
	HL170	1	-25,2 ±0,178	18,6	-6,61	14,3 ±288e^{-3}	2,72 ±1,2e^{-2}	1 site
	HL171	1	-21,1 ±6,0e^{-2}	11,1	-9,96	0,05 ±1,61e^{-4}	2,17 ±9,4e^{-4}	2 sites
		2	-20,7 ±3,7e^{-2}	10,3	-10,3	0,026 ±8,31e^{-5}	2,17 ±1,0e^{-4}	2 sites
		3	-20,5 ±3,0e^{-2}	11,3	-9,27	0,163 ±3,68e^{-4}	2,04 ±1,4e^{-3}	2 sites
		4	-42,8 ±0,972	35	-7,72	2,22 ±247e^{-3}	1,51 ±2,3e^{-2}	1 site
		Moyenne	***-26,28***	***16,93***	***-9,31***	***0,62***	***1,97***	
		Ecart-type	***11,02***	***12,06***	***1,14***	***1,07***	***0,31***	

Annexe 14- Tableau des valeurs obtenues pour les expériences d'ITC avec le DISF

			ΔH (kcal.mol^{-1})	-TΔS (kcal.mol^{-1})	ΔG (kcal.mol^{-1})	K_D (µM)	N	Modèle
DISF	Néomycine	1	-16,3 ±8,0e^{-2}	5,95	-10,35	0,025 ±7,04e^{-4}	0,610 ±6,5e^{-4}	2 sites
	HL072	1	-22,6 ±9,2e^{-2}	12,1	-10,4	0,023 ±7,34e^{-4}	0,921 ±3,6e^{-3}	2 sites
		2	-21,6 ±4,9e^{-2}	11,6	-9,96	0,05 ±3,63e^{-4}	0,875 ±1,2e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-22,10***	***11,85***	***-10,18***	***0,04***	***0,90***	
		Ecart-type	***0,71***	***0,35***	***0,31***	***0,02***	***0,03***	
	TG196	1	-21,3 ±9,9e^{-2}	11,8	-9,51	0,108 ±2,67e^{-3}	0,874 ±2,7e^{-3}	2 sites
	HL084	1	-10,8 ±8,2e^{-2}	2,28	-8,56	0,535 ±16,4e^{-3}	1,32 ±1,2e^{-2}	2 sites
	HL090	1	-24,5 ±1,16	17,1	-7,4	3,8 ±258e^{-3}	0,845 ±2,7e^{-2}	2 sites
	HL094	1	-18,6 ±1,34	8,32	-10,2	0,031 ±16,3e^{-3}	0,97 ±4,8e^{-2}	2 sites
		2	-17,5 ±3,2e^{-2}	6,95	-10,6	0,017 ±5,92e^{-5}	1,12 ±4,9e^{-4}	2 sites
		Moyenne	***-18,05***	***7,64***	***-10,40***	***0,02***	***1,05***	
		Ecart-type	***0,78***	***0,97***	***0,28***	***0,01***	***0,11***	
	HL168	1	-25,7 ±0,394	17,5	-8,17	1,02 ±58,2e^{-3}	0,684 ±2,2e^{-2}	2 sites
		2	-26,1 ±0,364	18	-8,09	1,18 ±49,7e^{-3}	0,833 ±2,4e^{-2}	2 sites
		Moyenne	***-25,90***	***17,75***	***-8,13***	***1,10***	***0,76***	
		Ecart-type	***0,28***	***0,35***	***0,06***	***0,11***	***0,11***	
	HL169	1	-23,0 ±0,	14	-8,95	0,275 ±33,2e^{-3}	0,526 ±5,9e^{-2}	2 sites
		2	-25,5 ±1,21	17,2	-8,23	0,922 ±99,7e^{-3}	0,509 ±0,131	2 sites
		Moyenne	***-24,25***	***15,60***	***-8,59***	***0,60***	***0,52***	
		Ecart-type	***1,77***	***2,26***	***0,51***	***0,46***	***0,01***	
	HL170	1	-26,4 ±0,250	18,1	-26,4	0,861 ±40,2e^{-3}	0,782 ±1,9e^{-2}	2 sites
	HL171	1	-17,1 ±0,138	5,41	-11,7	0,003 ±2,35e^{-4}	0,819 ±1,4e^{-4}	2 sites
		2	-16,7 ±0,171	5,6	-11,1	0,007 ±5,08e^{-4}	0,808 ±4,8e^{-4}	2 sites
		3	-17,3 ±0,104	5,75	-11,5	0,004 ±8,05e^{-5}	0,792 ±6,7e^{-4}	2 sites
		Moyenne	***-17,03***	***5,59***	***-11,60***	***0,005***	***0,81***	
		Ecart-type	***0,31***	***0,17***	***0,12***	***0,002***	***0,01***	
	HL172	1	-15,6 ±8,8e^{-2}	6,98	-8,6	0,495 ±10,4e^{-3}	0,96 ±1,1e^{-2}	2 sites
	HL300	1	-16,3 ±0,166	5,46	-10,84	0,011 ±5,14e^{-4}	0,699 ±1,5e^{-3}	2 sites
		2	-21,1 ±0,475	11	-10,1	0,045 ±3,5e^{-3}	1,1 ±9,6e^{-3}	2 sites
		3	-14,7 ±8,2e^{-2}	3,11	-11,59	0,003 ±3,22e^{-6}	0,671 ±1,7e^{-3}	2 sites
		Moyenne	***-17,37***	***6,52***	***-10,84***	***0,02***	***0,82***	
		Ecart-type	***3,33***	***4,05***	***0,75***	***0,02***	***0,24***	

Annexe 15 - Structure cristallographique du dérivé HL168 avec l'ARN DIS



AUTRES TRAVAUX

Durant ma thèse, j'ai pu participer à d'autres travaux qui ont débouché sur plusieurs publications :

- **Article 1** : Marion Thépaut, Rodrigo Campos-Silva, Eva Renard, Frédérique Barloy-Hubler, Éric Ennifar, Daniel Boujard, and Reynald Gillet. « Safe and easy *in vitro* evaluation of tmRNA-SmpB-mediated trans-translation from ESKAPE pathogenic bacteria ». *RNA journal.* 2021.

- **Article 2** : Bereiter, Raphael, Maximilian Himmelstoß, Eva Renard, Elisabeth Mairhofer, Michaela Egger, Kathrin Breuker, Christoph Kreutz, Éric Ennifar, et Ronald Micura. « Impact of 3-deazapurine nucleobases on RNA properties ». *Nucleic Acids Research* 49, n° 8. Avril 2021.

- **Article 3** : Himmelstoß, Maximilian, Kevin Erharter, Eva Renard, Éric Ennifar, Christoph Kreutz, et Ronald Micura. « 2′-O-Trifluoromethylated RNA – a powerful modification for RNA chemistry and NMR spectroscopy ». *Chemical Science* 11, n° 41. Août 2021.

Article 1

« Safe and easy *in vitro* evaluation of tmRNA-SmpB-mediated trans-translation from ESKAPE pathogenic bacteria »

Marion Thépaut, Rodrigo Campos-Silva, Eva Renard, Frédérique Barloy-Hubler, Eric Ennifar, Daniel Boujard, and Reynald Gillet. *RNA journal.* 2021.

L'équipe de Reynald Gillet étudie la trans-traduction, qui est le principal système de contrôle de la qualité pour sauver les ribosomes bloqués chez les bactéries. Le mécanisme de trans-traduction est médié par l'ARNtm, un ARN hybride possédant à la fois les propriétés d'un ARNt et d'un ARNm, et de la petite protéine SmpB. Ce mécanisme est propre aux bactéries et est donc une cible thérapeutique potentielle prometteuse. Dans cet article, Thépaut *et al.* décrivent la création d'un test permettant l'évaluation *in vitro* de la trans-traduction chez différentes bactéries ESKAPE basé sur le réassemblage de protéine fluorescente verte (GFP). Ce test peut être utilisé pour un criblage de divers composés chimiques.

Ma contribution a consisté en la production de ribosomes de différentes souches bactériennes ESKAPE (*A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*). J'ai purifié ces ribosomes dans le laboratoire de Dr. Gilles Prévost et sous la supervision de Daniel Keller (Université de Strasbourg, CHRU Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, EA 7290). Ainsi, Thépaut *et al.* ont pu diversifier et augmenter le nombre de souches testées pour valider l'utilisation de la GFP pour la mesure de l'activité de trans-traduction *in vitro* de bactéries ESKAPE.

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

METHOD

Safe and easy in vitro evaluation of tmRNA-SmpB-mediated *trans*-translation from ESKAPE pathogenic bacteria

MARION THÉPAUT,[1,2,5] RODRIGO CAMPOS-SILVA,[1,3,5] EVA RENARD,[4] FRÉDÉRIQUE BARLOY-HUBLER,[1] ERIC ENNIFAR,[4] DANIEL BOUJARD,[1] and REYNALD GILLET[1]

[1]Université Rennes, CNRS, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR) UMR 6290, 35043 Rennes, France

[2]SATT Ouest-Valorisation, 35750 Rennes, France

[3]Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, Brazil

[4]Architecture et Réactivité de l'ARN—CNRS UPR 9002, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

ABSTRACT

In bacteria, *trans*-translation is the major quality control system for rescuing stalled ribosomes. It is mediated by tmRNA, a hybrid RNA with properties of both a tRNA and a mRNA, and the small protein SmpB. Because *trans*-translation is absent in eukaryotes but necessary for bacterial fitness or survival, it is a promising target for the development of novel antibiotics. To facilitate screening of chemical libraries, various reliable in vitro and in vivo systems have been created for assessing *trans*-translational activity. However, the aim of the current work was to permit the safe and easy in vitro evaluation of *trans*-translation from pathogenic bacteria, which are obviously the ones we should be targeting. Based on green fluorescent protein (GFP) reassembly during active *trans*-translation, we have created a cell-free assay adapted to the rapid evaluation of *trans*-translation in ESKAPE bacteria, with 24 different possible combinations. It can be used for easy high-throughput screening of chemical compounds as well as for exploring the mechanism of *trans*-translation in these pathogens.

Keywords: *trans*-translation; tmRNA; ESKAPE; antibiotics; HTS; ribosome

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) designated six "ESKAPE" pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter spp.*) as critical targets for drug discovery (Rice 2008; Tacconelli and Magrini 2017). Indeed, these bacteria are the leading cause of nosocomial infections throughout the world, and most are multidrug-resistant isolates (Santajit and Indrawattana 2016). The WHO recommendation is to focus specifically on the discovery and development of new antibiotics that are active against multidrug- and extensively drug-resistant ESKAPE bacteria. However, the hazardous nature of these pathogens makes it highly challenging to develop high-throughput screening methods for identifying and evaluating any new antimicrobial agents for future clinical use. To aid in this, the molecular process to be targeted must first be identified, and ideally this process should be: (i) conserved among all pathogenic ESKAPE bacteria; (ii) indispensable to bacterial survival or at least its fitness; (iii) sufficiently variable that different species can be distinguished from each other; (iv) absent in eukaryotes; (v) not targeted by current antibiotics; (vi) unrelated to existing resistance mechanisms; and finally (vii) reproducible in nonhazardous in vitro experiments.

In fact, *trans*-translation appears to be the perfect candidate. This mechanism is the primary bacterial rescue system, allowing for the release of ribosomes stalled on faulty mRNAs that lack stop codons as well as the elimination of these mRNAs and mistranslated peptides. The *trans*-translation process is performed by hybrid transfer-messenger RNA (tmRNA) and its protein partner SmpB (Giudice et al. 2014). Briefly, the tmRNA–SmpB complex recognizes the stalled ribosome and associates with it. In a finely orchestrated ballet, translation then resumes on

[5]These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: reynald.gillet@univ-rennes1.fr

Article is online at http://www.majournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.078773.121.

© 2021 Thépaut et al. This article is distributed exclusively by the RNA Society for the first 12 months after the full-issue publication date (see http://majournal.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

tmRNA's internal mRNA-like domain (MLD), which encodes a specific sequence that is recognized by proteases. This process permits the stalled ribosomes to be recycled, the degradation of the incomplete peptide after its release, and elimination of the problematic nonstop mRNA. Remarkably, genes coding for tmRNA and SmpB have been found in nearly all bacterial genomes, yet not in eukaryotes, with the exception of a very few rare organelles (Hudson and Williams 2015). Despite high sequence conservation at both the 5′- and 3′-ends of tmRNA genes, the internal sequences of tmRNA are considerably divergent among different species (Supplemental Fig. 1), and this property makes tmRNA a good tool for species identification (Schönhuber et al. 2001). In the same way, despite global structural conservation, variations in *smpB* sequences are also considerably divergent among different species (Supplemental Fig. 1).

While resolving stalled ribosomal complexes is undoubtedly a matter of life or death (Keiler and Feaga 2014), *trans*-translation itself is not always indispensable to bacterial survival. This irregularity was the subject of a long debate until the discovery of backup systems, mechanisms which take over if *trans*-translation is deficient or overwhelmed. However, even when they are present, these systems are not enough to ensure a steady and prolonged fitness to the cell, as impaired *trans*-translation is known to result in various phenotypes varying from mild (such as loss of tolerance to multiple antibiotics and stresses) to severe (including lethality or loss of virulence) (Li et al. 2013; Keiler and Feaga 2014). To date, *trans*-translation has not been yet exploited for clinical use. In the search for inhibitors specific to the process, initial assays led to the discovery of 1,3,4 oxadiazole molecules (Ramadoss et al. 2013), but their specificity for *trans*-translation in vivo is still in question (Macé et al. 2017; Brunel et al. 2018). It has been suggested that *trans*-translation is inhibited by pyrazinamide (PZA), a first-line anti-tuberculosis drug (Shi et al. 2011), but it was finally recently shown the action of PZA is entirely independent of *trans*-translation in *M. tuberculosis* (Dillon et al. 2017).

Because of its biological properties, transfer of *trans*-translation into a nonhazardous system that could allow for rapid and easy evaluation of its activity would greatly help in the search for new antibiotics which target this system. While there are routine methods for screening the antimicrobial activity of compounds from chemical libraries, a combination of this primary screening with the specification of a molecular target is much harder to implement (Osterman et al. 2016). An ideal method would allow not just the identification of the targeted cellular process, but also its level of specificity toward a bacterial genus or species. Furthermore, an easy quantitative and rapid analysis of the process should be possible even in small volumes. Reporter assays are the best candidates for efficient initial high-throughput screening (HTS) methods, as they can be quick and automated, as well as quite useful for screening unpurified mixtures of natural extracts (Osterman et al. 2016). Accordingly, we recently used a commercial reconstituted in vitro translation system (PURExpress) to create a reliable in vitro reporter system that detects the *E. coli trans*-translation activity (Guyomar et al. 2020). This assay, based on reassembling an active "superfolder" Green Fluorescent Protein (sfGFP) after tmRNA tagging (Fig. 1), was designed and validated for the specific in vitro quantification of *trans*-translation in ESKAPE pathogenic bacteria, and we report on that here.

RESULTS

Distribution of ArfA, ArfB, and RQC in ESKAPE bacterial genomes

While some bacteria can survive without *trans*-translation, this is only because of the existence of backup systems, such as the two alternative release factors, ArfA and ArfB or the bacterial ribosome-associated quality control (RQC) mediated by RqcH and RqcP. The Arf mechanisms can be divided in release factor (RF)-dependent and RF-independent mechanisms. ArfA recruits RF2 to hydrolyze the nascent polypeptide chain from the P-site tRNA, while ArfB, a class I release factor homolog, performs hydrolysis itself (Himeno et al. 2015; Müller et al. 2021)

On the other hand, RqcH and RqcP act in concert to mediate the ribosome-associated quality control (RQC) pathway, triggering carboxy-terminal tailing of stalled peptides in the large ribosomal subunit. RqcH belongs to the NEMF family proteins (homolog of the eukaryotic RQC factor Rqc2/NEMF, while RqcP (ribosome quality control P-tRNA, formerly YabO), belongs to the widely distributed S4 RNA-binding family, and is homologous to *E. coli* heat shock protein 15 (Hsp15) (Lytvynenko et al. 2019; Müller et al. 2021). Depending on backup system status, therefore, the effects of specific inhibitors of *trans*-translation will vary, from increasing the activity of currently used antibiotics to outright cell death. It was therefore important for us to begin by pinpointing the phylogenetic distribution of ArfA, ArfB, and RQC in ESKAPE pathogens. To do this, we investigated the sequences of those rescue factors using a combination of in silico methods including keyword searches, similarity detection, protein domain prediction, ortholog clustering, and synteny analysis. This pipeline was applied to the complete genomic sequences of 1670 species: 147 *E. faecium*, 473 *S. aureus*, 465 *K. pneumoniae*, 188 *A. baumannii*, 259 *P. aeruginosa*, and 151 *Enterobacter* spp. Interestingly, among these ESKAPE pathogens, none of the back-up systems were found in *A. baumannii* while the two Gram-positive bacteria *E. faecium* and *S. aureus* displayed RQC only (Table 1). While we cannot categorically state that no other backup systems exist in these bacteria—see for instance the recent reports on ArfT

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

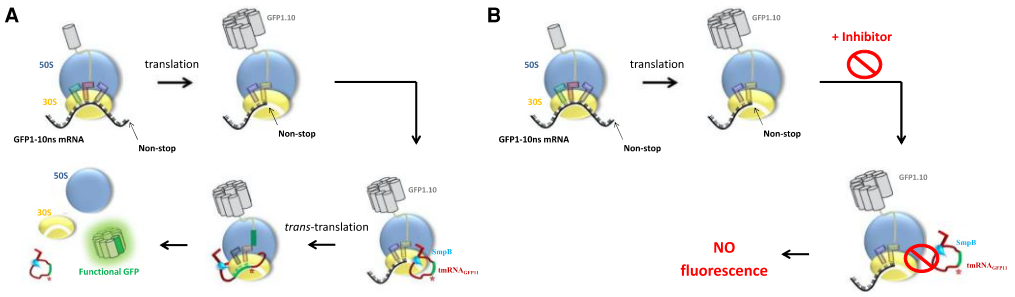


FIGURE 1. (*A*) *Trans*-translation of sfGFP1-10 mRNA lacking a stop codon. The tmRNA$_{GFP11}$-SmpB complex binds to the stalled ribosome, and translation resumes thanks to the tmRNAGFP11 mRNA-like domain (MLD). The MLD encodes the missing eleventh beta-strand of the sfGFP, and the complete sfGFP is released and becomes fluorescent. (*B*) Impairment of the process in the presence of *trans*-translation inhibitors. The ribosomes stay stalled on the problematic mRNA and fluorescence is impaired.

in *Francisella tularensis* and BrfA in *Bacillus subtilis* (Goralski et al. 2018; Shimokawa-Chiba et al. 2019)—we can however suppose that their viability highly depends on *trans*-translation impairment. On the other hand, we found genes encoding ArfA and/or ArfB in most if not all of the *K. pneumonia, P. aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. studied. The impairment of *trans*-translation in these bacteria is probably less severe, therefore, even if it still detrimental to bacterial fitness.

ESKAPE tmRNA and SmpB production

To allow for independent monitoring of *trans*-translation in the six ESKAPE pathogens, we engineered their tmRNAs by replacing their internal MLD with a sequence of 16 amino acids that encodes GFP's eleventh beta-strand (Supplemental Table 1). To conserve the tmRNA H5 helix that is instrumental during *trans*-translation, we also engineered compensatory mutations (Supplemental Fig. 2A, B; Guyomar et al. 2020). Unlike those of the other bacteria, the natural tmRNA 3′-ends in *E. faecium* and *S. aureus* are not CCA but UUG and UAU, respectively, so these were replaced by CCA to ensure correct aminoacylation by *E. coli* AlaRS (Barends et al. 2000), and these variants were named tmRNA$_{GFP11}$. Urea-PAGE analysis indicated that the six tmRNA variants were successfully produced at the expected size, without any noticeable degradation or unexpected bands (Supplemental Fig. 2D). We started with 10 µg plasmidic DNA, and the final yields were about 4 nmol of transcribed RNAs for each reaction. The six corresponding SmpB proteins were cloned and produced in vivo in *E. coli* (see Materials and Methods). After purification, polyacrylamide gel analysis confirmed the correct size of each protein (Supplemental Fig. 2E). The final yields for each ESKAPE SmpB were about half the amount of the *E. coli* SmpB produced.

ESKAPE trans-translation reactions

In order to obtain nonproductive translation complexes (NTCs) to be targeted by *trans*-translation, we used a reconstituted cell-free protein synthesis (NEB PURExpress) system from *E. coli* (Shimizu et al. 2001; Shimizu and Ueda 2002). By adding a nonstop DNA template, we accumulated stalled ribosomes with the ten first beta-strands of sfGFP stuck in the ribosome exit tunnel (Fig. 1A). When tmRNA$_{GFP11}$ and *E. coli* SmpB are added, the ribosomes are freed and the intensity of the fluorescent signal

TABLE 1. Distribution of *arfA*, *arfB*, *rqcH*, and *rqcP* in ESKAPE bacteria

ESKAPE pathogen	# of screened genomes	*arfA*	*arfB*	*rqcH*	*rqcP*
Enterococcus faecium	147	0	0	147	147
Staphylococcus aureus	473	0	0	473	473
Klebsiella pneumoniae	465	464 + 1 Δ	459 + 6 Δ	0	0
Acinetobacter baumannii	188	0	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa	259	259	259	0	0
Enterobacter spp.	151	151	150 + 3 Δ	0	0

(Δ) Pseudogenes with frameshift or "in-frame" stop codon.

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

increases over time while the complete sfGFP protein is produced. A plateau is reached at ~4 h of incubation, and the fluorescence remains stable for at least 710 min (Fig. 2A, black curve).

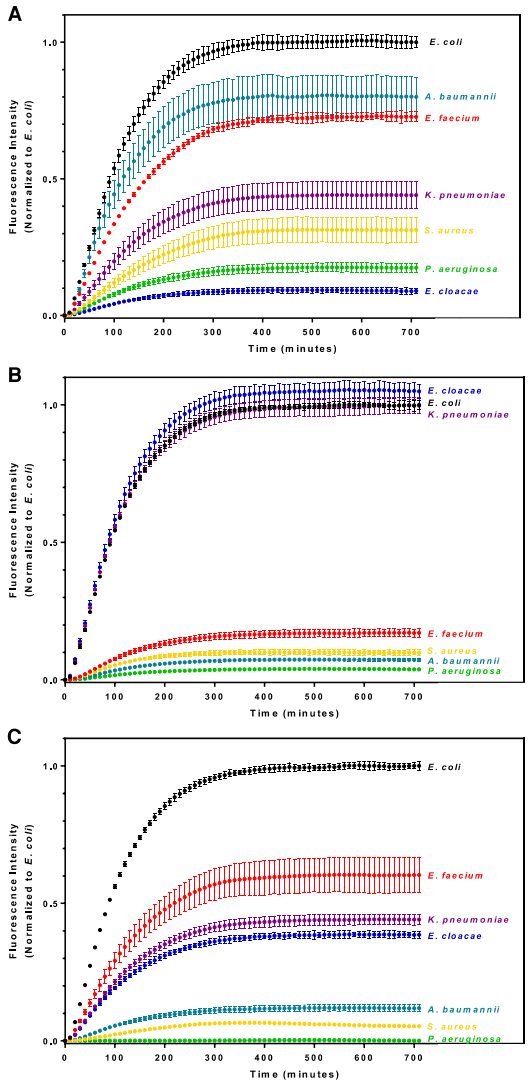


FIGURE 2. *Trans*-translation kinetics over time using *Escherichia coli* ribosomes. Fluorescence increases are directly linked to *trans*-translation activity. (*A*) *Trans*-translation assays were done on *E. coli* $tmRNA_{GFP11}$ using the SmpBs from each ESKAPE pathogen, with the *E. coli* SmpB as a control. (*B*) *Trans*-translation assays keeping the *E. coli* SmpB but using the $tmRNA_{GFP11}$ variants of each ESKAPE pathogen, with an *E. coli* $tmRNA_{GFP11}$ as the control. (*C*) Both SmpB and $tmRNA_{GFP11}$ are from each ESKAPE pathogen, with the *E. coli* SmpB-$tmRNA_{GFP11}$ as a control. The results are shown as means ± standard deviation and normalized to the *E. coli* conditions.

In a first set of heterologous experiments, we kept the *E. coli* $tmRNA_{GFP11}$, but replaced its SmpB by one from an ESKAPE pathogen. A fluorescent signal was still recovered with each one of the hetero-complexes, albeit at different levels (Fig. 2A). The *E. cloacae*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa* SmpBs displayed the lowest signals, less than 30% of the *E. coli* control, while the *K. pneumoniae* SmpB signal was about half the control, and *E. faecium* and *A. baumannii* at 80%. This demonstrates that all of the ESKAPE SmpBs are functional and sufficiently conserved to be interchangeable in the presence of *E. coli* tmRNA. While it confirms that SmpB is highly conserved (Supplemental Fig. 1), it also supports the use of this simple system for screening molecules that target SmpB but not tmRNA. Indeed, since SmpB is essential for tmRNA's peptide-tagging activity (Karzai et al. 1999), disrupting SmpB is one of the most promising ways to impair *trans*-translation. In fact, aptamers that inhibit SmpB functioning were recently shown to trigger strong growth defects in *Aeromonas veronii* C4 (Liu et al. 2016).

We then performed the experiments the other way around, using the *E. coli* SmpB but the tmRNAs from the ESKAPE pathogens. Contrary to the previous experiments, only the heteroduplexes combining *E. coli* SmpB and the tmRNAs from *K. pneumoniae* and *E. cloacae* gave out strong signals, about the same levels as those recovered in the *E. coli* tmRNA control (Fig. 2B). This is not a surprise since, like *E. coli*, both *K. pneumoniae* and *E. cloacae* are *Enterobacteriaceae* with very similar tmRNA sequences (≥95% identity with *E. coli*, see Supplemental Fig. 1). The four other bacterial species all produced signals, but at lower levels (about 5% to 20% of the reference).

We continued by performing homologous experiments, using SmpB and $tmRNA_{GFP11}$ from the same ESKAPE pathogen, but still with *E. coli* ribosomes (Fig. 2C). Five of the six complexes yielded positive results. Three of these were at high levels (~50% compared to the *E. coli* reference): *K. pneumonia*; *E. cloacae* and *E. faecium*. The other two were at lower levels (about 5%–10% of the reference): *A. baumannii*, another Gammaproteobacteria that is relatively close to *Enterobacteriaceae*; and the Gram-positive *S. aureus*. The Gammaproteobacteria *P. aeruginosa* did not work at all.

In a final set of experiments, we used homologous tmRNA–SmpB complexes in the presence of their corresponding ESKAPE ribosomes. The use of the PURExpress Δ Ribosome Kit allowed us to substitute commercial *E. coli* ribosomes with ESKAPE variants we had prepared in-house. We first confirmed the effectiveness of translation using these ribosomes by synthesizing full-size sfGFP. For all ribosomes used, a fluorescent signal was recovered, indicating that the ESKAPE ribosomes translate well even if at lower levels (Fig. 3A). The *P. aeruginosa* and *E. cloacae* *Enterobacteriaceae* ribosomes gave the strongest signals,

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

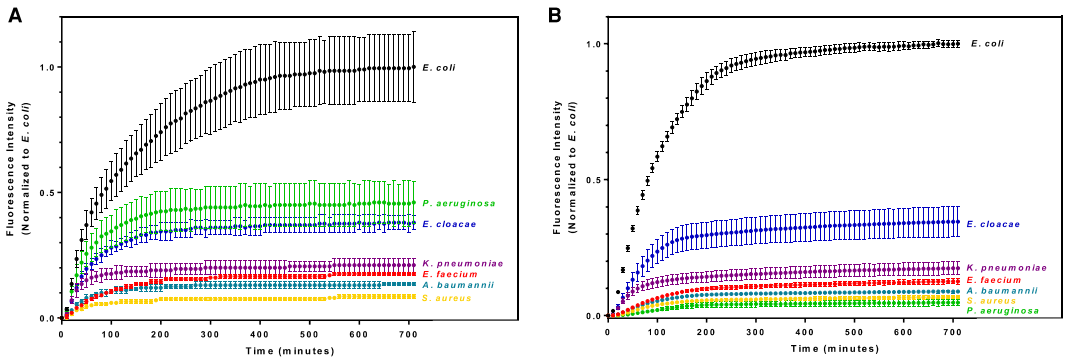


FIGURE 3. Translation and *trans*-translation kinetics over time. (*A*) Translation kinetics over time: the increase in fluorescence of full-length GFP (i.e., encompassing the 12 beta-strands) is directly linked to translation. (*B*) *Trans*-translation kinetics over time using ESKAPE ribosomes. All results are shown as means ± standard deviation and normalized to *E. coli*.

~45% and 35%, respectively, as compared to that of *E. coli*. All of the other signals were below 20%, even dropping under 10% in the case of *S. aureus*.

Despite these rather poor translation rates, fluorescence was easily detected, so we also performed *trans*-translation experiments using ESKAPE ribosomes (Fig. 3B). The goal was to improve the levels of the *trans*-translation signals previously recovered, but more importantly to obtain a positive result for *P. aeruginosa*. The results were finally conclusive for that bacteria, which gave a fluorescent signal of ~10% compared to the control. This positive result could be linked to the quite efficient translation obtained with these ribosomes (Fig. 3A). On the other hand, the *trans*-translation levels of the other bacteria did not improve, and were even lower in *S. aureus*. This could be due to the fact that the PURExpress system is based on only *E. coli* translation factors, and their low count limits their handling of canonical translation (see Fig. 3A) or specific tmRNAs (e.g., tmRNA aminoacylation by *E. coli* AlaRS or tmRNA–SmpB transport by *E. coli* EF-Tu-GTP). However, and since our goal was to detect variations of fluorescence after drug treatment within each of the ESKAPE species, rather than comparing the strains between each other, it was important to get a correct and satisfactory signal for each one of the strains individually. Toward this aim, we decided to use a more sensitive spectrophotometer, that is, Synergy HTX from BioTek. We adjusted the spectrophotometer gain function in order to ensure optimal detection of GFP fluorescence without saturation and applied the technique to the homologous systems (tmRNA–SmpB and ribosomes from the same ESKAPE), the ones that are the most interesting for developing new inhibitors. The data obtained were finally conclusive, within a range of 20,000–90,000AU for translation as well as for *trans*-translation, allowing for an accurate internal control in case of inhibition (Supplemental Fig. 3).

DISCUSSION

Here we describe the use of GFP as a reporter for safe measurement of the *trans*-translation activity of the six ESKAPE systems in a cell-free protein synthesis system. The various combinations we evaluated (four for each ESKAPE pathogen) have yielded different interesting strategies for the disruption of *trans*-translation (Fig. 4).

The molecules being investigated for the development of new anti-*trans*-translation antibiotics will have different ways of interfering with tmRNA–SmpB binding to stalled ribosomes. They could disrupt tmRNA–SmpB interactions, or they could prevent interactions between the complex and the ribosome, such as by blocking the entrance of SmpB entirely or by preventing the passage of the complex through the bridges which have to be open during the process. Therefore, it is of great interest to have the ability to evaluate the targeting of the three main actors (tmRNA, SmpB, and the ribosome) independently as well as in each ESKAPE system. Of the 24 combinations we tested, 23 exhibited a signal strong enough for evaluating the possible activity of inhibitors. The only one that did not was the *P. aeruginosa* tmRNA–SmpB complex when used with *E. coli* ribosomes. We first suspected that the tmRNA H5 helix, inspired from the *E. coli* helix (Supplemental Fig. 2B), might somehow have altered its activity. Therefore, to avoid any possible effects of the helical rearrangement, we constructed and tested new $tmRNA_{GFP11}$ variants for *P. aeruginosa* but also *E. coli*, *S. aureus*, and *E. faecium*. These $tmRNA_{GFP11}$V2 constructs all have the full sequence that encodes the eleventh beta-strand of GFP upstream of the natural H5 helix (Supplemental Fig. 2C). However, these variants did not have improved fluorescence, and *P. aeruginosa* still did not emit signals. We also performed new experiments by increasing twofold the amounts of SmpB and two- to fourfold the amounts of tmRNA, but without further success (not shown). We can thus exclude

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

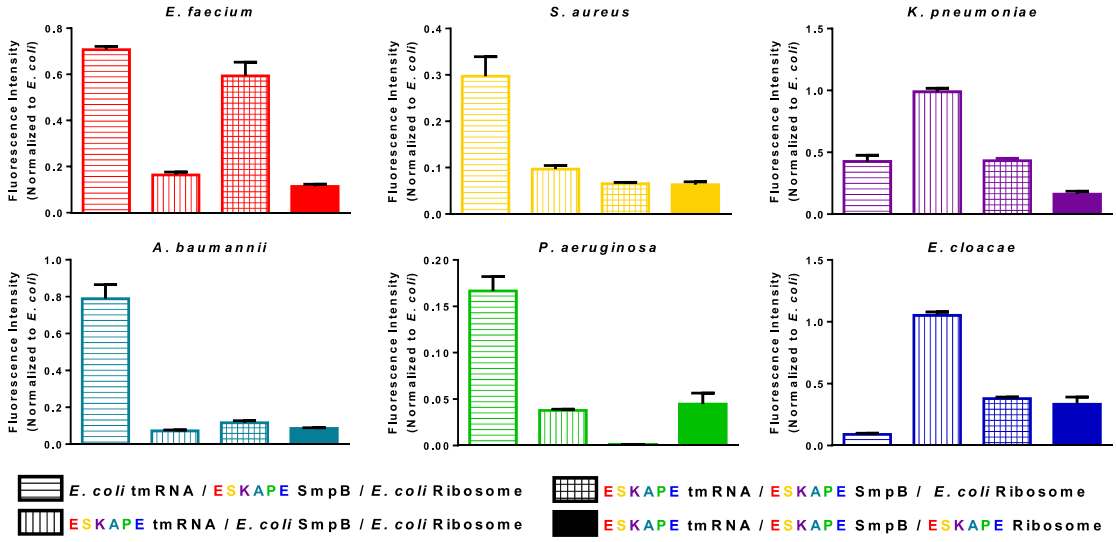


FIGURE 4. Quantification of in vitro *trans*-translation. Normalized fluorescence obtained in heterologous and homologous systems are shown at 310 min of incubation and reassembled by species. The results were normalized to the *E. coli* conditions and are shown as means ± standard deviations.

the idea that the different structural features between the *P. aeruginosa* and *E. coli* ribosomes (Halfon et al. 2019) are important enough to prevent the correct process from occurring.

To permit the high-throughput screening of chemical compounds in multiwell microplates it was important to lower average screening costs of the current assay. To enable this, we decreased the reaction scale of the assays by reducing the final reaction volumes down to a microliter scale. Proof-of-concept experiments were performed with *E. coli* or ESKAPE homologous systems in final volumes of 2 µL using the MANTIS liquid-handler instrument (Formulatrix) or simply by using an electronic micropipette. The resulting signals were strong enough to allow for the easy detection of *trans*-translational activity. Indeed, the objective of this study was to create a nonhazardous in vitro screening system for evaluating *trans*-translation in ESKAPE pathogens, and to miniaturize it for HTS applications, and the assays we performed were convincing. We then decided to perform an experiment demonstrating proof of principle by using an oligonucleotide that interferes with the mRNA-like domain (MLD) of tmRNA as well as CT1-83 and KKL-35, two 1,3,4-oxadiazole derivatives that were recently shown to display a low in vitro activity against *E. coli trans*-translation (Guyomar et al. 2020). Toward this aim we used again the homologous system including tmRNA, SmpB and ribosomes from the same ESKAPE. The results on *trans*-translation show a total inhibition of the process when using the anti-sense, whatever the pathogen. On the other hand, and despite a very slight and dose-dependent effect of CT1-83 on *P. aeruginosa* and *E. cloacae* and KKL-35 on *S. aureus*, none of the compounds displayed any noticeable activity on the six ESKAPE systems (Fig. 5A). Of course, to avoid compounds that inhibit any necessary step for fluorescence (e.g., transcription, translation, or GFP folding) to be scored as positive and result in false positive hits, transcription-translation assays were also performed using full GFP in the absence of tmRNA–SmpB. This set of results confirmed the absence of noticeable effect of the two oxadiazole compounds on transcription-translation, while the signal was completely abolished after chloramphenicol treatment (Fig. 5B). While this is interesting, it especially confirms that new classes of more efficient molecules are needed to target *trans*-translation in ESKAPE pathogens.

Therefore, the system will clearly be very effective for benchmarking the effects of new antibiotic compounds that target *trans*-translation in highly pathogenic bacteria, as well as aiding us to better understand the *trans*-translation process in these bacteria. Its flexibility in the choice of target bacterial species and the possibility for varying the combinations of tmRNA, SmpB, and ribosomes are advantageous, making the identification of new specific antimicrobial inhibitors easier. Ongoing experiments in our laboratory are using this to screen large chemical and natural product libraries for drug discovery.

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

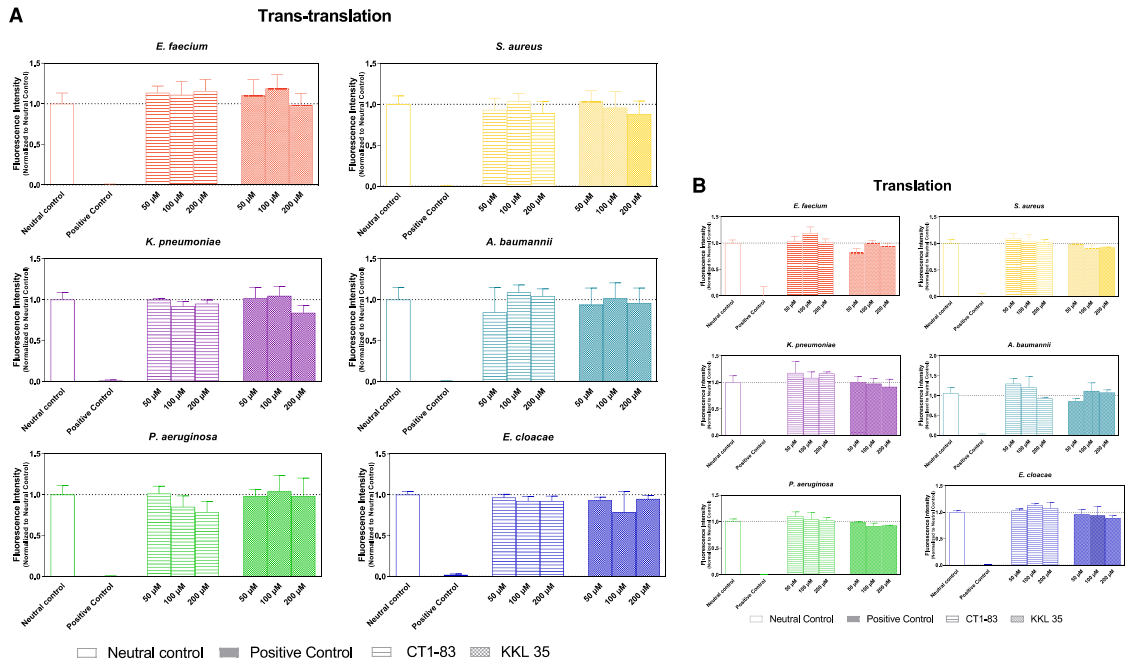


FIGURE 5. Quantification of in vitro ESKAPE *trans*-translation and translation assays after CT1-83 and KKL-35 treatment. Experiments were conducted in microplates, using ESKAPE homologous systems and increasing concentrations (50, 100, and 200 µM) of CT1-83 and KKL-35 oxadiazole compounds. Normalized fluorescence intensities obtained are presented after 310 min of incubation and sorted by species. The results were normalized to the neutral control conditions and are shown as means ± standard deviations. (*A*) *Trans*-translation assay with the oxadiazole compounds CT1-83 and KKL-35. The positive control was obtained by using 10 µM Antisense B in 10% DMSO. (*B*) Translation assay with the oxadiazole compounds CT1-83 and KKL-35. The positive control was obtained by using Chloramphenicol at 100 µM in 10% DMSO. Using the Anova test, results were considered statistically significant when $P \leq 0.01$. Only positive controls presented a difference of $P \leq 0.0001$ for translation and *trans*-translation (stars were not represented to facilitate graph reading).

MATERIALS AND METHODS

In silico analysis

Complete genomes were retrieved from the NCBI database (March 2020). Chromosomes and plasmids (when present) were studied separately. GenBank files were first searched based on their textual annotation entries, using the keywords "ArfA," "yhdL," and "alternative ribosome-rescue factor" (for ArfA), or "ArfB," "yaeJ, " "ribosome-associated protein," and "peptidyl-tRNA hydrolase" (for ArfB), or "RqcH," "Rqc2 homolog" (for RqcH), or "RqcP," "YabO" (for RqcP). Missing loci were checked using BlastN, BlastP, and tBlastN similarity-detection strategies (Altschul et al. 1990) as well as comparative genomics, with synteny analysis done using progressiveMauve (Darling et al. 2010). All retrieved loci were compared using the Reciprocal Best Hits method, and InterProScan (Jones et al. 2014) was used on the corresponding proteins to check for the presence of the IPR005589/PF03889 (ArfA) and IPR000352/PF00472 (ArfB) domains. Frameshifted loci were indicated as annotated in the GenBank files. Finally, the presence and absence of K09890 (ArfA) and K15034 (ArfB) were checked in the KEGG ORTHOLOGY database (Kanehisa et al. 2016).

Plasmid construction and preparation

For each ESKAPE tmRNA, the internal open reading frame was replaced by the eleventh beta-strand of the superfolder GFP (sfGFP) preceded by the first conserved alanine of native tmRNA. In order to preserve the H5 helix, compensatory mutations were added (Fig. 2B). Additionally, the sequences were designed to carry a T7 promotor sequence in the 5′-end in order to realize transcription in vitro. Note that the tmRNA 3′-end natural sequences from *E. faecium* (UUG) and *S. aureus* (UAU) were replaced by CCA so that the *E. coli* AlaRS could correctly aminoacylate them.

We also produced $tmRNA_{GFP11}$V2 variants for *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *E. faecium* species. This $tmRNA_{GFP11}$ series carries the full sequence encoding the eleventh beta-strand of GFP upstream of the *E. coli*

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

H5 helix (Supplemental Fig. 2C). In order to obtain mature tmRNA$_{GFP11}$ by in vitro transcription, the tmRNA$_{GFP11}$ and tmRNA$_{GFP11}$V2 ESKAPE sequences were synthesized and cloned into the pUC19 vector between the HindIII and BamHI restriction sites (Supplemental Table 1). For each ESKAPE SmpB, GenScript synthesized the sequences with codon optimization for *E. coli*, cloning them into the pET22b(+) vector between the NdeI and XhoI restriction sites to add a 6His histidine tag (Supplemental Table 2). The generated plasmids, pUC19ESKAPEtmRNA$_{GFP11}$ and pET22b + ESKAPESmpB (Supplemental Table 5), were amplified in *E. coli* NM522 cells, then extracted using a NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel). Quantification was performed using a SimpliNano Spectrophotometer (Biochrom).

SmpB purification

The bacterial cultures and SmpB purification were all done as previously described (Guyomar et al. 2020). His-tagged *E. coli* and ESKAPE SmpB proteins (Supplemental Table 2) were expressed from the pF1275 and the pET22b + ESKAPE SmpB vectors under the control of a T7 promoter in BL21(DE3)Δ*ssrA* cells (Cougot et al. 2014). Briefly, BL21 (DE3)Δ*ssrA* cells were grown in lysogeny broth (LB) at 30°C supplemented with ampicillin (100 µg/ml) and kanamycin (50 µg/mL). Protein expression was induced in the exponential phase (OD_{600} = 0.6) with 0.1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) overnight at 16°C. Cells were harvested and washed, then resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES-KOH, 200 mM KCl, 20 mM imidazole, and 1 mM DTT pH 7.5). Cell lysis was performed using a French press, and the lysate was centrifuged at 15,000 rpm for 45 min at 4°C in a Beckman J2-MC with a JA-17 rotor. The supernatant was then filtrated (0.2 µm) and injected onto a Ni-NTA sepharose column (HisTrap FF, GE Healthcare) previously equilibrated with the lysing buffer. The column was washed with 100 mL lysis buffer and 50 mL washing buffer (50 mM HEPES-KOH, 200 mM KCl, 1 M NH_4Cl, imidazole 20 mM, and 1 mM DTT pH 7.5) before elution with 500 mM imidazole. Finally, a 10 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filter (Merck Millipore) was used to concentrate the fractions containing pure SmpB, changing the buffer to a concentration buffer (50 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, 10% glycerol, and 1 mM DTT pH 7.5). In order to visualize SmpB, 50 pmol of denatured proteins was analyzed on 15% SDS-PAGE gels. Proteins were detected using InstantBlue protein stain (Expedeon) according to the supplier's instructions.

tmRNA$_{GFP11}$ production

E. coli and ESKAPE tmRNA$_{GFP11}$ were produced as previously described (Guyomar et al. 2020). Each ESKAPE tmRNA$_{GFP11}$ was transcribed in vitro from the pUC19ESKAPEtmRNA$_{GFP11}$ plasmids. To generate the 3′ end needed for aminoacylation by AlaRS, the plasmid (10 µg) was completely digested by NEB BsmBI or EarI restriction enzymes (Supplemental Table 5). After phenol/chloroform extraction, the purified digested plasmid was precipitated, and the resulting pellets resuspended in 40 µL nuclease-free water. A MEGAscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to produce each ESKAPE tmRNA$_{GFP11}$ before its purification using the corresponding MEGAclear Kit. Denatured tmRNA$_{GFP11}$ was checked by electrophoresis on 8% Urea-PAGE gels, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light.

DNA templates and oligonucleotide production

For *trans*-translation assays, the nonstop GFP1-10 sequence was produced by PCR using primers #1 and #2 and Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) with pETGFP 1–10 vector as a template (Cabantous and Waldo 2006; Supplemental Tables 3, 4). For translation assays, primers #1 and #3 from the same template were used to amplify sfalaGFP, the superfolder GFP having an additional conserved alanine between the sfGFP1–10 and sfGFP11 beta-strands (Supplemental Tables 3, 4). The resulting PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and checked by agarose electrophoresis. Both PCR products have a T7 promoter upstream of their coding sequences. Antisense oligonucleotide "A" was supplied by Eurofins (Supplemental Table 3).

ESKAPE ribosome purification

Ribosomes were purified from *Acinetobacter baumannii* (clinical isolate); *Staphylococcus aureus* (clinical isolate); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Enterobacter cloacae* (clinical isolate); *Klebsiella pneumoniae* (clinical isolate); and *Enterococcus faecium* (HM1070). From an overnight starter culture, 6–9 L of LB medium were inoculated to reach an OD_{600} of 0.05, then stirred at 150 rpm at 37°C. Bacterial growth was stopped when the OD_{600} reached 0.8 to 1.0. The cells were then centrifuged at 4000 rpm for 20 min at 4°C. Pellets (~2 g/L of culture) were washed in a lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 200 mM NH_4Cl, 0.1 mM EDTA, and 6 mM β-mercaptoethanol), centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4°C, and kept overnight at –80°C. Pellets were then suspended in a Potter homogenizer in another lysis buffer complemented with 1 mM $CaCl_2$. Cells were lysed in a French press at 1.0 kbar. To remove cellular debris, the lysates were centrifuged using a type 50.2 Ti rotor at 18,200 rpm for 30 min at 4°C. The superficial pellet layer was then discarded, and the pellet resuspended in lysis buffer. Ribosomes were isolated by centrifuging lysates on a

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

30% sucrose cushion at 31,500 rpm for 19 h at 4°C. The superficial layer of pellets was again discarded, leaving only the transparent pellets which were then resuspended in conservation buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl, 0.1 mM EDTA, and 6 mM β-mercaptoethanol). Any remaining contaminants were removed by a final centrifugation at 18,200 rpm for 1 h at 4°C. Ribosomes were concentrated using a Centricon (Merck Millipore) with a cut-off of 100K, flash-frozen in nitrogen, and conserved at −80°C.

Trans-translation assays

In vitro *trans*-translation assays were performed using the PURExpress In Vitro Protein Synthesis and Δ Ribosome Kits (New England Biolabs). For *trans*-translation assays, PURExpress was supplemented by 62.5 ng purified PCR product encoding for nonstop sfGFP1-10, 12.5 pmol $tmRNA_{GFP11}$, 25 pmol SmpB, and 50 pmol antisense A. Where necessary (Δ Ribosome), 6.725 pmol ribosomes were also added. These reactions were performed in a final reaction volume of 10 µL, with PURExpress diluted by a final factor of 1.6 with Buffer III (HEPES-KOH 5mM pH7.5, MgOAc 9mM, NH4Cl 10mM, KCl 50mM, and DTT 1mM). A Step One Plus PCR system (Applied Biosystems) was used for incubation at 37°C as well as for fluorescence measurements over 710 min.

Translation assays

In vitro translation assays were performed using a PURExpress Δ Ribosome Kit. To produce the sfalaGFP, the PURExpress Δ Ribosome was diluted to a final factor of 1.6 with Buffer III, to which was added 62.5 ng purified PCR product and 6.725 pmol of the appropriate ribosomes in a final reaction volume of 10 µL. The translation reactions were incubated at 37°C, and fluorescence was measured over 710 min using a Step One Plus.

Miniaturization of the *trans*-translation assays for HTS

In vitro miniaturization of the *trans*-translation assays was performed using the PURExpress In Vitro Protein Synthesis Δ Ribosome Kit (New England Biolabs). The mix was diluted by a factor of 1.6 after addition of 2.5 µM SmpB, 1.25 µM tmRNAGFP11, 672.5 nM ribosomes, 6.25 ng/µL of purified PCR product encoding for nonstop sfGFP1-10 and 5 µM antisense A. A total of 2 µL of neutral control (10% DMSO), 2 µL of positive control (10 µM Antisense B in 10% DMSO) and compounds in 10% DMSO were mixed together in a qPCR 96-well plate. CT1-83 oxadiazole compound was provided by Dr. Mickael Jean (Univ. Rennes) and KKL35 by Sigma Chemicals, respectively. Compounds and controls were then dried in a SpeedVac Concentrator before being resolubilized by adding 2 µL of PURExpress Mix in the same plate. Incubation at 37°C and fluorescence measurements over 310 min were simultaneously performed thanks to Synergy HTX from BioTek. The intensities of GFP were measured with the excitation filter at 485/20 and the emission filter at 528/20. The gain used was 116 for *E. faecium*, *S. aureus*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* and 100 for *K. pneumoniae* and *E. cloacae*.

The transcription-translation control assays were performed in the same way, except that nonstop sfGFP1-10 was replaced by full sfGFP, in the absence of tmRNA and SmpB. The positive control was then Chloramphenicol at 100 µM in 10% DMSO.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available for this article.

COMPETING INTEREST STATEMENT

Reynald Gillet is co-inventor of the system described here (patent application #EP/2018/063780).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are particularly grateful to Axel Innis and Anne-Xander van der Stel for sharing their Mantis experiment expertise and to Charlotte Guyomar and Emmanuel Giudice for insightful comments on the manuscript. We thank Sylvie Georgeault and Fanny Demay for their help in purifying *E. faecium*, *S. aureus*, and *A. baumanni* ribosomes and to Mickael Jean for providing CT1-83 oxadiazole compound. This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche as part of the EU's Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance project (JPIAMR) project "Ribotarget—Development of novel ribosome-targeting antibiotics" as well as by SATT Ouest-Valorisation (DV 2552 and DV 3506).

Author contributions: M.T. cloned and purified the SmpB and tmRNA variants and performed and analyzed the *trans*-translation in vitro assays. R.C.D.S. performed translation and *trans*-translation in vitro assays. E.R. purified ribosomes from *A. baumannii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*. F.B.H. performed in silico analysis of ArfA and ArfB in bacterial genomes. R.G. designed the study. E.E., D.B., and R.G. supervised the project. M.T. and R.G. wrote the manuscript, and all authors approved its final version.

Received April 14, 2021; accepted July 27, 2021.

REFERENCES

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215:** 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Barends S, Wower J, Kraal B. 2000. Kinetic parameters for tmRNA binding to alanyl-tRNA synthetase and elongation factor Tu from

Downloaded from rnajournal.cshlp.org on October 20, 2021 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Escherichia coli. *Biochemistry* **39:** 2652–2658. doi:10.1021/bi992439d

Brunel R, Descours G, Durieux I, Doublet P, Jarraud S, Charpentier X. 2018. KKL-35 exhibits potent antibiotic activity against *Legionella* species independently of *trans*-translation inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* **62:** e01459-17. doi:10.1128/AAC.01459-17

Cabantous S, Waldo GS. 2006. In vivo and in vitro protein solubility assays using split GFP. *Nat Methods* **3:** 845–885. doi:10.1038/nmeth932

Cougot N, Molza AE, Delesques J, Giudice E, Cavalier A, Rolland JP, Ermel G, Blanco C, Thomas D, Gillet R. 2014. Visualizing compaction of polysomes in bacteria. *J Mol Biol* **426:** 377–388. doi:10.1016/j.jmb.2013.09.035

Darling AE, Mau B, Perna NT. 2010. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE* **5:** e11147. doi:10.1371/journal.pone.0011147

Dillon NA, Peterson ND, Feaga HA, Keiler KC, Baughn AD. 2017. Anti-tubercular activity of pyrazinamide is independent of *trans*-translation and RpsA. *Sci Rep* **7:** 6135. doi:10.1038/s41598-017-06415-5

Giudice E, Macé K, Gillet R. 2014. *Trans*-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB. *Front Microbiol* **5:** 113. doi:10.3389/fmicb.2014.00113

Goralski TDP, Kirimanjeswara GS, Keiler KC. 2018. A new mechanism for ribosome rescue can recruit RF1 or RF2 to nonstop ribosomes. *MBio* **9:** e02436-18. doi:10.1128/mBio.02436-18

Guyomar C, Thépaut M, Nonin-Lecomte S, Méreau A, Goude R, Gillet R. 2020. Reassembling green fluorescent protein for *in vitro* evaluation of *trans*-translation. *Nucleic Acids Res* **48:** e22. doi:10.1093/nar/gkz1204

Halfon Y, Jimenez-Fernandez A, La Rosa R, Espinosa Portero R, Krogh Johansen H, Matzov D, Eyal Z, Bashan A, Zimmerman E, Belousoff M, et al. 2019. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* ribosomes from an aminoglycoside-resistant clinical isolate. *Proc Natl Acad Sci* **116:** 22275–22281. doi:10.1073/pnas.1909831116

Himeno H, Nameki N, Kurita D, Muto A, Abo T. 2015. Ribosome rescue systems in bacteria. *Biochimie* **114:** 102–112. doi:10.1016/j.biochi.2014.11.014

Hudson CM, Williams KP. 2015. The tmRNA website. *Nucleic Acids Res* **43:** D138–D140. doi:10.1093/nar/gku1109

Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, et al. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **30:** 1236–1240. doi:10.1093/bioinformatics/btu031

Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* **44:** D457–D462. doi:10.1093/nar/gkv1070

Karzai AW, Susskind MM, Sauer RT. 1999. SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J* **18:** 3793–3799. doi:10.1093/emboj/18.13.3793

Keiler KC, Feaga HA. 2014. Resolving nonstop translation complexes is a matter of life or death. *J Bacteriol* **196:** 2123–2130. doi:10.1128/JB.01490-14

Li J, Ji L, Shi W, Xie J, Zhang Y. 2013. *Trans*-translation mediates tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **68:** 2477–2481. doi:10.1093/jac/dkt231

Liu P, Chen Y, Wang D, Tang Y, Tang H, Song H, Sun Q, Zhang Y, Liu Z. 2016. Genetic selection of peptide aptamers that interact and inhibit both small protein B and alternative ribosome-rescue factor A of *Aeromonas veronii* C4. *Front Microbiol* **7:** 1228. doi:10.3389/fmicb.2016.01228

Lytvynenko I, Paternoga H, Thrun A, Balke A, Müller TA, Chiang CH, Nagler K, Tsaprailis G, Anders S, Bischofs I, et al. 2019. Alanine tails signal proteolysis in bacterial ribosome-associated quality control. *Cell* **178:** 76–90. doi:10.1016/j.cell.2019.05.002

Macé K, Demay F, Guyomar C, Georgeault S, Giudice E, Goude R, Trautwetter A, Er-mel G, Blanco C, Gillet R. 2017. A genetic tool to quantify *trans*-translation activity in vivo. *J Mol Biol* **429:** 3617–3625. doi:10.1016/j.jmb.2017.10.007

Müller C, Crowe-McAuliffe C, Wilson DN. 2021. Ribosome rescue pathways in bacteria. *Front Microbiol* **12:** 652980. doi:10.3389/fmicb.2021.652980

Osterman IA, Bogdanov AA, Dontsova OA, Sergiev PV. 2016. Techniques for screening translation inhibitors. *Antibiotics (Basel)* **5:** 22. doi:10.3390/antibiotics5030022

Ramadoss NS, Alumasa JN, Cheng L, Wang Y, Li S, Chambers BS, Chang H, Chatter-jee AK, Brinker A, Engels IH, et al. 2013. Small molecule inhibitors of *trans*-translation have broad-spectrum antibiotic activity. *Proc Natl Acad Sci* **110:** 10282–10287. doi:10.1073/pnas.1302816110

Rice LB. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* **197:** 1079–1081. doi:10.1086/533452

Santajit S, Indrawattana N. 2016. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int* **2016:** 2475067. doi:10.1155/2016/2475067

Schönhuber W, Le Bourhis G, Tremblay J, Amann R, Kulakauskas S. 2001. Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. *BMC Microbiol* **1:** 20. doi:10.1186/1471-2180-1-20

Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE III, Wang H, Zhang W, Zhang Y. 2011. Pyrazinamide inhibits *trans*-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **333:** 1630–1632. doi:10.1126/science.1208813

Shimizu Y, Ueda T. 2002. The role of SmpB protein in *trans*-translation. *FEBS Lett* **514:** 74–77. doi:10.1016/S0014-5793(02)02333-5

Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. 2001. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* **19:** 751–755. doi:10.1038/90802

Shimokawa-Chiba N, Müller C, Fujiwara K, Beckert B, Ito K, Wilson DN, Chiba S. 2019. Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nat Commun* **10:** 5397. doi:10.1038/s41467-019-13408-7

Tacconelli E, Magrini N. 2017. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. World Health Organization, Geneva.

Article 2

« Impact of 3-deazapurine nucleobases on RNA properties »

Raphael Bereiter, Maximilian Himmelstoß, Eva Renard, Elisabeth Mairhofer, Michaela Egger, Kathrin Breuker, Christoph Kreutz, Eric Ennifar, et Ronald Micura. *Nucleic Acids Research 49, no 8. Avril 2021.*

L'équipe de Ronald Micura étudie l'impact de la modification des ARN sur leur structure et la formation de liaisons. Dans cet article, Bereiter *et al.* étudient l'impact des nucléosides déazapurine tels que la 3-déazaadénosine (c3A) et de la 3-déazaguanosine (c^3G). Via des expériences de spectroscopie RMN et d'étude de la structure par cristallographie, nous avons mis en évidence une diminution de la stabilité d'appariement en présence de ces modifications, les effets étant plus prononcés pour les nucléosides 3-déazapurine (c^3A) par rapport à leurs isomères constitutionnels (c^7G, c^7A). Cette étude participe à une meilleure compréhension globale de cette classe de modifications nucléosidiques.

J'ai contribué à cet article en produisant les cristaux pour la résolution de la structure d'un ARN modifié avec une 3-déazaadénosine (c^3A). En effet, l'équipe de Ronald Micura utilisent le fragment de la boucle sarcine-ricine (SRL), composé de 27 nucléotides, de l'ARNr 23 S d'*E. coli,* comme charpente afin de visualiser à très haute résolution les modifications introduites dans l'ARN. Cela a permis d'étudier au niveau structural l'impact d'une telle modification. Il a été montré que la modification n'impacte pas la géométrie de la paire de base mais influe sur le réseau local d'interaction avec des molécules d'eau.

Published online 15 April 2021

Nucleic Acids Research, 2021, Vol. 49, No. 8 ***4281–4293***
doi: 10.1093/nar/gkab256

Impact of 3-deazapurine nucleobases on RNA properties

Raphael Bereiter[1,†], Maximilian Himmelstoß[1,†], Eva Renard[2], Elisabeth Mairhofer[1], Michaela Egger[1], Kathrin Breuker[1], Christoph Kreutz[1], Eric Ennifar[2] and Ronald Micura[1,*]

[1]Institute of Organic Chemistry, Center for Molecular Biosciences Innsbruck, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria and [2]Architecture et Réactivité de l'ARN - CNRS UPR 9002, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Received March 05, 2021; Editorial Decision March 26, 2021; Accepted March 29, 2021

ABSTRACT

Deazapurine nucleosides such as 3-deazaadenosine (c^3A) are crucial for atomic mutagenesis studies of functional RNAs. They were the key for our current mechanistic understanding of ribosomal peptide bond formation and of phosphodiester cleavage in recently discovered small ribozymes, such as twister and pistol RNAs. Here, we present a comprehensive study on the impact of c^3A and the thus far underinvestigated 3-deazaguanosine (c^3G) on RNA properties. We found that these nucleosides can decrease thermodynamic stability of base pairing to a significant extent. The effects are much more pronounced for 3-deazapurine nucleosides compared to their constitutional isomers of 7-deazapurine nucleosides (c^7G, c^7A). We furthermore investigated base pair opening dynamics by solution NMR spectroscopy and revealed significantly enhanced imino proton exchange rates. Additionally, we solved the X-ray structure of a c^3A-modified RNA and visualized the hydration pattern of the minor groove. Importantly, the characteristic water molecule that is hydrogen-bonded to the purine N3 atom and always observed in a natural double helix is lacking in the 3-deazapurine-modified counterpart. Both, the findings by NMR and X-ray crystallographic methods hence provide a rationale for the reduced pairing strength. Taken together, our comparative study is a first major step towards a comprehensive understanding of this important class of nucleoside modifications.

INTRODUCTION

Deazapurine nucleosides have been intensively applied in atomic mutagenesis studies of biologically relevant RNAs (1–5). The replacement of a single nitrogen atom by a carbon atom can be critical because the acid-base properties of the nucleobase are dramatically changed and hydrogen acceptor/donor properties are erased at the specific position (6–8). This can be determining for RNA base pairing (8,9), for RNA recognition of other nucleic acids (e.g. DNA, 2′-OCH_3 RNA) (6), proteins (3), small molecules (8), and ions (9), and this can also be crucial with respect to RNA-catalyzed reactions (4,10–13). Concerning the latter, atomic mutagenesis lead to our current in-depth understanding of the chemical mechanism of phosphodiester cleavage of the recently discovered twister and pistol ribozymes (14–16). Similarly, atomic mutagenesis of the peptidyl transferase center in the ribosome center allowed to critically evaluate the mechanistic proposals for peptide bond formation that arose from interpretations of static crystal structures (17–20). These functional assays contributed significantly to a profound comprehension of ribosomal protein synthesis.

Suitable deazanucleosides for informative RNA atomic mutagenesis experiments are 7-deazaadenosine (c^7A) (4,11–13,15,16), 3-deazaadenosine (c^3A) (14,20), 1-deazaadenosine (c^1A) (11,12,14,20), 7-deazaguanosine (c^7G) (13,15) and 3-deazacytidine (c^3C) (13,21). Moreover, 3-deazaguanosine (c^3G) and 1-deazaguanosine (c^1G) would be highly useful for RNA atomic mutagenesis, however, such studies are very rare (22) because synthetic access to appropriate phosphoramidite building blocks and to the corresponding RNAs is challenging (22,23). In general, 3-deazapurine modified RNAs appear underinvestigated when compared to the 7-deazapurine modified counterparts (24–28). Besides, more is known about deaza-modified DNA compared to deaza-modified RNA (29–38).

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +43 512 507 57710; Fax: +43 512 507 57799; Email: ronald.micura@uibk.ac.at
†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

Therefore, we set out to accomplish a thorough chemical and biophysical analysis of 3-deazapurine containing RNA, along with the improvement of the synthesis of c^3G containing RNA beforehand. We here describe the impact of c^3G and c^3A on RNA properties. Based on UV-spectroscopic melting experiments, a detailed thermodynamic analysis of duplex and hairpin stabilities is provided and the effects on base pairing are discussed in the light of the sequence context. Furthermore, solution NMR spectroscopy sheds light on base pair opening dynamics. In addition, we have solved the X-ray structure of a c^3A containing RNA at atomic resolution to disclose crucial structural features, such as ribose puckers, hydrogen-bonding networks, and hydration patterns of the deazanucleoside, and to correlate them to base pairing properties.

MATERIAL AND METHODS

Synthesis and characterization of organic compounds

Reagents were purchased in the highest available quality from commercial suppliers (Merck/Sigma-Aldrich, ABCR, VWR, ChemGenes, CarboSynth) and used without further purification. All reactions were carried out under argon atmosphere, unless otherwise noted. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on Macherey-Nagel Polygram® SIL G/UV_{254} plates. Silica gel 60 (mesh size 0.04 – 0.063 mm) for column chromatography was purchased from Macherey-Nagel. The procedures for chemical synthesis of phosphoramidites **8** and **9**, and the 6-chloro-3-deazapurine **14** and their characterization data are available in the Supporting Information (phosphoramidite **8**: eight steps, eight chromatographic purifications, 13% overall yield; total amount synthesized: 0.90 g; phosphoramidite **9**: ten steps, 10 chromatographic purifications, 9% overall yield; total amount synthesized: 0.80 g; 6-amino-3-deazapurine **15**: 4 steps, four chromatographic purifications, 54% overall yield; total amount synthesized: 5 g). ^1H, ^{13}C, and ^{31}P NMR spectra were recorded on a Bruker Ultrashield™ 400 Plus spectrometer. Chemical shifts (δ) are reported relative to tetramethylsilane (TMS), referenced to the residual solvent signal (DMSO-d_6: 2.50 ppm for ^1H and 39.52 ppm for ^{13}C NMR spectra; $CDCl_3$: 7.26 ppm for ^1H and 77.16 ppm for ^{13}C NMR spectra). The following abbreviations were used to denote multiplicities: s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, b = broad. Signal assignments are based on ^1H–^1H-COSY, ^1H–^{13}C-HSQC and ^1H–^{13}C-HMBC experiments. High resolution mass spectra were recorded in positive ion mode on a Thermo Scientific Q Exactive Orbitrap, ionized via electrospray at 3.7 kV spray voltage.

RNA solid-phase synthesis

Standard phosphoramidite chemistry was applied for RNA strand elongation and incorporation of 3-deazaguanosine (N^2-Tfa, 2′-*O*-Tbs and N^2-Tfa, 2′-*O*-CEM; >98% coupling yield), 3-deazadenosine (N^6-Bz, 2′-*O*-TIPS; >92% coupling yield), 7-deazaguanosine (N^2-*i*Bu, 2′-*O*-Tbs; >98% coupling yield) and 7-deazaadenosine (N^6-Bz, 2′-*O*-Tbs; >98% coupling yield). 2′-*O*-TOM and acetyl protected nucleoside phosphoramidite building blocks and 2′-*O*-Tbs 1000 Å CPG solid support (>15nt) were purchased from ChemGenes, Primer support™ 5G (<15nt) was purchased from GE Healthcare. All oligonucleotides were synthesized on an ABI 391 or ABI 392 Nucleic Acid Synthesizer following standard methods: detritylation (90 sec) with dichloroacetic acid/1,2-dichloroethane (4/96); coupling (5.0 min) with phosphoramidites/acetonitrile (100 mM, 200 μl) and benzylthiotetrazole / acetonitrile (300 mM, 500 μl); capping (2 × 25 s) with Cap A/Cap B (1/1) for c^3A, c^7G & c^7A modified RNA, Cap A: 4-(dimethylamino)pyridine/acetonitrile (500 mM), Cap B: acetic anhydride/*sym*-collidine/acetonitrile (2/3/5) and Cap A mild/Cap B mild (1/1) for c^3G modified RNA, Cap A mild: phenoxyacetic anhydride/acetonitrile (100 mM), Cap B mild: *N*-methylimidazole/*sym*-collidine/tetrahydrofuran (0.160/0.265/10); oxidation (60 sec) with iodine (20 mM) in tetrahydrofuran/pyridine/H_2O (35/10/5). Solutions of phosphoramidites, tetrazole and Cap were dried over activated molecular sieves (3 Å) overnight.

Deprotection, purification and quantification of natural and modified RNA

For basic deprotection of natural, c^3G, c^3A, c^7G and c^7A modified RNA, the solid support was mixed with aqueous methylamine (40%, 0.65 ml) and aqueous ammonia (28%, 0.65 ml) for 15 min at 65°C or 3 h at 37°C. The supernatant was removed and the solid support was washed twice with 0.5 ml tetrahydrofuran/H_2O (1/1). Combined supernatant and washings were evaporated to dryness and the residue was dissolved in a solution of tetrabutylammonium fluoride in tetrahydrofuran (1.0 M, 1.5 ml) and incubated for 14 h at 37°C for removal of 2′-*O*-silyl protecting groups. The reaction was quenched by addition of triethylammonium acetate/H_2O (1.0 M, 1.5 ml, pH 7.4). Tetrahydrofuran was removed under reduced pressure and the sample was desalted with size-exclusion column chromatography (GE Healthcare, HiPrep™ 26/10 Desalting; Sephadex G25) eluting with H_2O; collected fractions were evaporated and the RNA dissolved in H_2O (1 ml). The crude RNA was purified by anion exchange chromatography on a semipreparative Dionex DNAPac® PA-100 column (9 mm × 250 mm) at 80°C with a flow rate of 1 ml/min (eluent A: 6 M urea, 25 mM Tris·HCl, pH 8.0; eluent B: 500 mM $NaClO_4$, 6 M urea, 25 mM Tris·HCl, pH 8.0). Fractions containing RNA were diluted with 0.1 M triethylammonium bicarbonate solution, loaded on a C18 Sep-Pak Plus® cartridge (Waters/Millipore), washed with H_2O and eluted with acetonitrile/H_2O (1/1). Crude and purified RNA were analyzed by anion exchange chromatography on a GE Healthcare Äkta Explorer HPLC System containing a Dionex DNAPac® PA-100 column (4 mm × 250 mm) at 80°C with a flow rate of 1 ml/min. For RNA shorter or equal to 15 nucleotides, a gradient of 0–40% B in 30 minutes and for RNA longer than 15 nucleotides a gradient of 0–60% B was used; Eluent A: 6 M urea, 25 mM Tris·HCl, pH 8.0; Eluent B: 500 mM $NaClO_4$, 6 M urea, 25 mM Tris·HCl, pH 8.0. HPLC traces were recorded at UV absorption by

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

260 nm. RNA quantification was performed on an Implen P300 Nanophotometer.

Mass spectrometry of oligoribonucleotides

RNA samples (3 μl) were diluted with 40 mM $Na_2H_2(EDTA)/H_2O$ (5/4) for a total volume of 30 μl, injected onto a C18 XBridge column (2.5 μm, 2.1 mm × 50 mm) at a flow rate of 0.1 ml/min and eluted with 0–100% B gradient at 30°C (eluent A: 8.6 mM triethylamine, 100 mM 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol in H_2O; eluent B: methanol). RNA HPLC runs were analyzed on a Finnigan LCQ Advantage Max electrospray ionization mass spectrometer with 4.0 kV spray voltage in negative mode. Characterization of the c^3G modified 47mer was performed on a 7 T FT-ICR-MS (Bruker Daltonics – Apex Ultra 70). Sample preparation: 2 μM RNA in 1:1 H_2O/CH_3OH with 20 mM imidazole and 20 mM piperidine (pH ∼ 10). The sample was measured in negative ion mode at a flow rate of 90 μl/h and a skimmer potential of –50 V for ESI and –60 V for CAD (spectra averaged CAD: 400, spectra averaged ESI: 50, capillary voltage 3.1 kV, spray shield 2.7 kV, dry temperature 200°C. A collision energy of 12 V was applied in the CAD experiments.

Melting curve measurements of oligoribonucleotides

RNA samples were lyophilized as triethylammonium salts, dissolved in 800 or 330 μl buffer (10 mM Na_2HPO_4 (pH 7.0) containing 150 mM NaCl) and transferred into UV permeable high precision cells made of quartz SUPRASIL® with a light path of 10 mm or 1 mm. UV melting profiles were recorded at 250 and 260 nm on a Varian Cary-100 spectrophotometer equipped with a multiple cell holder and a peltier temperature control device. Each RNA was measured at five different concentrations ranging from 1 to 100 μM. T_m values were determined by calculating the first derivative. Thermodynamic parameters were determined according to (49,50). The error limits for ΔG, ΔH and ΔS reflect the standard deviation of three (duplex) or five (hairpin) independent measurements for a confidence interval of 95%.

NMR experiments

RNA samples were lyophilized as triethylammonium salts, dissolved in 500 μl NMR buffer (15 mM $Na[AsO_2(CH_3)_2]\cdot 3H_2O$, 25 mM NaCl, 3 mM NaN_3, in H_2O/D_2O 9:1, pH 6.5) and transferred into 5 mm NMR tubes. Sample concentrations varied between 0.05 and 0.3 mM and experiments were run at 298 K unless otherwise stated. All NMR experiments were conducted on a Bruker 600 MHz Avance II+ NMR or a 700 MHz Avance Neo NM both equipped with a Prodigy TCI probe.

Determination of imino proton water exchange rates by CLEANEX-PM experiment. The CLEANEX-PM NMR experiments were carried out in the following buffer: 15 mM $Na[AsO_2(CH_3)_2]\cdot 3H_2O$, 25 mM NaCl, 3 mM NaN_3, in H_2O/D_2O 9:1, pH 6.5. The same buffer stock solution was used for all samples to rule out changes in imino proton—bulk water exchange rates due to differences in the buffer composition. The CLEANEX-PM pulse sequence is available from the Bruker standard experiment collection (*zgcxesgp*) with an excitation sculpting water suppression element. A standard excitation sculpting water suppression experiment (*zgesgp*) was used as the reference experiment. For the determination of the water T_1 relaxation times under the experimental conditions a saturation recovery experiment was used and the longitudinal water relaxation time ranged between 3.03 s (c^3G RNA) and 3.13 s (unmodified RNA). The following experimental parameters were used: spectral width 24 ppm, o1p: 4.7 ppm, number of scans 2048, dummy scans 32, interscan delay 1.5 s. Shaped pulse parameters were set via the *getprosol* command and the hard 90° ^1H pulse. The mixing times were set to 5, 25, 50, 50, 100, 100, 150, 200, 300, 400, 400 and 500 ms for both duplexes. The NMR spectra were processed in TOPSPIN 4.0.9 using a line broadening factor of 10 Hz (lb value set to 10). The absolute peak intensities of the CLEANEX-PM experiments and the reference experiments were determined and used to obtain the relative intensities. The data was then exported to MATLAB and the build-up curves were fitted to the following equation:

$$I/I_0 = \frac{k}{(R_1 A + k - R_{1,water})} \times \left\{e^{-R_{(1,water)}\tau_{mix})} - e^{(-R_{1,A}+k)}\tau_{mix}\right\}$$

with I/I_0 relative peak intensity, k imino proton–bulk water exchange rate (s^{-1}), $R_{1,water}$ longitudinal water exchange rate, τ_{mix} CLEANEX-PM mixing times (s) and $R_{1,A}$ is a combination of the longitudinal and transverse relaxation rate of the imino proton resonance (floating parameter during fitting). Errors in exchange rates were estimated from replicate experiments and obtained from 1000 Monte-Carlo runs.

Determination of the pK_a value of 3-deazaguanosine by NMR spectroscopy. For the pH dependent ^1H and ^{13}C NMR experiments, 22 mg of 3-deazaguanosine were dissolved in 600 μl buffer (15 mM sodium phosphate, 25 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 6.9) and transferred into a 5 mm NMR tube. The chemical shifts of C2 and C6 were recorded on a Bruker 600 MHz Avance II+ equipped with a Prodigy TCI probe. The pH-value was determined using a Sigma-Aldrich micro pH combination glass electrode. At each pH-value, ^1H NMR spectrum and ^{13}C NMR spectra at natural abundance with power gated decoupling were measured.

The pK_a values were obtained by fitting the data to the following equation:

$$\delta_{obs} = \frac{\delta_{deprotonated}\ x\ 10^{(pH-pk_a)} + \delta_{protonated}}{1 + 10^{(pH-pk_a)}}$$

With δ_{obs} observed ^{13}C chemical shift at the respective pH value, $\delta_{deprotonated}$ ^{13}C chemical shift of deprotonated species and $\delta_{deprotonated}$ ^{13}C chemical shift of the protonated species.

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

Table 1. Thermodynamic data of deazapurine modified RNA[a]

No.	RNA sequences 5′ to 3′	T_m (°C) [b]	ΔT_m (°C)	$\Delta G°298$ (kcal mol^{-1}) [c]	$\Delta H°298$ (kcal mol^{-1}) [c]	$\Delta S°$ (cal mol^{-1} K^{-1}) [c]
I	GGCAGAGGC / GCCUCUGCC	**66.7**	-	–16.5 ± 0.4	–79.7 ± 4.6	–212 ± 14
Ia	GGCAc^{3}GAGGC / GCCUCUGCC	**62.8**	–3.9	–15.2 ± 0.5	–74.8 ± 4.7	–199 ± 14
Ib	GGCAGc^{3}AGGC / GCCUCUGCC	**63.8**	–2.9	–16.0 ± 0.3	–80.0 ± 1.8	–215 ± 5
Ic	GGCAc^{7}GAGGC / GCCUCUGCC	**67.2**	+0.5	–16.7 ± 0.6	–80.1 ± 5.4	–213 ± 16
Id	GGCAGc^{7}AGGC / GCCUCUGCC	**66.5**	–0.2	–16.1 ± 0.6	–76.6 ± 4.2	–203 ± 12
II	GAAGGGCAACCUUCG	**73.3**	-	–7.0 ± 0.2	–52.8 ± 1.3	–153 ± 4
IIa	GAAc^{3}GGGCAACCUUCG	**64.2**	–9.1	–6.2 ± 0.2	–53.5 ± 1.6	–159 ± 5
IIb	GAc^{3}AGGGCAACCUUCG	**65.4**	–7.9	–6.4 ± 0.3	–53.8 ± 2.0	–159 ± 6
IIc	GAAc^{7}GGGCAACCUUCG	**68.5**	–4.8	–6.5 ± 0.3	–51.5 ± 1.9	–151 ± 5
IId	GAc^{7}AGGGCAACCUUCG	**69.8**	–3.5	–6.6 ± 0.4	–52.3 ± 3.3	–153 ± 10
III	GGUCGACC	**58.3**	-	–13.2 ± 0.9	–64.6 ± 8.6	–172 ± 26
IIIa	GGUCc^{3}GACC	**44.8**	–13.5	–11.4 ± 0.5	–74.7 ± 6.4	–213 ± 20
IIIb	GGUCGc^{3}ACC	**48.5**	–9.8	–11.7 ± 0.9	–68.1 ± 8.8	–189 ± 26
IIIc	GGUCc^{7}GACC	**55.9**	–2.4	–13.4 ± 1.0	–70.6 ± 8.5	–192 ± 25
IIId	GGUCGc^{7}ACC	**55.6**	–2.7	–13.0 ± 0.6	–67.0 ± 4.6	–181 ± 14
III'	GGCUAGCC	**60.7**	-	–14.5 ± 1.1	–72.3 ± 9.5	–194 ± 28
III'a	GGCUAc^{3}GCC	**47.7**	–13.0	–11.8 ± 0.8	–70.9 ± 8.3	–199 ± 25
III'b	GGCUc^{3}AGCC	**47.7**	–13.0	–10.7 ± 0.6	–56.5 ± 6.2	–154 ± 19
III'c	GGCUAc^{7}GCC	**58.6**	–2.1	–13.7 ± 0.7	–68.8 ± 7.3	–185 ± 22
III'd	GGCUc^{7}AGCC	**59.7**	–1.0	–14.2 ± 0.6	–71.8 ± 6.9	–193 ± 21

[a]Buffer: 10 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 7.0. ΔH and ΔS values were obtained by van't Hoff analysis or based on RNA concentration dependent measurements according to references 49 and 50.
[b]The estimated errors of UV-spectroscopically determined T_m values are ±0.3°C.
[c]Errors for ΔH and ΔS were determined from three (RNAs I, III, and III') and five (RNAs II) independent measurements; in general, errors arising from noninfinite cooperativity of two-state transitions and from the assumption of a temperature-independent enthalpy, are typically 10−15%. Additional error is introduced when free energies are extrapolated far from melting transitions; errors for ΔG are typically 3−5%.

Crystallization and structure solution of a c^{3}A modified RNA

Oligoribonucleotides of 27 nucleotide length corresponding to the sequence of *Escherichia coli* 23 S rRNA sarcin-ricin loop (SRL) and containing a 3-deazaadenosine at position 2670 were used for crystallization. The RNA was dissolved at a concentration of ∼350 μM in a buffer made of Tris–HCl (10 mM), Na_2H_2EDTA (1 mM), pH 8.0. The RNA sample was then heated to 55°C and cooled down to 10°C using a temperature-controlled device equipped with a Peltier element. Only one unique cubic-shaped crystal of c^{3}A2670-modified RNA could be obtained. It grew after one month at 20°C using vapor diffusion method by mixing two volumes of RNA sample with one volume of a crystallization buffer made of ammonium sulfate (2.5 M), magnesium acetate (10 mM), and 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) (50 mM), pH 5.6 (the other drops made in identical conditions led to spherullites). Prior data collection, the crystal was cryoprotected for about 5 min in a reservoir solution containing 15% of glycerol and 3.0 M of ammonium sulfate, flash-frozen in liquid ethane and then transferred into liquid nitrogen. The collection of X-ray diffraction data has been done on the X06DA beamline at the SLS synchrotron, Villigen, Switzerland. Processing of the data was done with the XDS Package (71) and the structure was solved by molecular replacement with MOLREP (72) using the related PDB ID 3DVZ unmodified SRL RNA model. The structure was refined with the PHENIX package (73). Models were built using Coot (74). Alternative conformations were visible for residues 2647–2650. Coordinates have been deposited with the PDB database (PDB ID 7L3R for c^{3}A2670-modified SRL).

RESULTS AND DISCUSSION

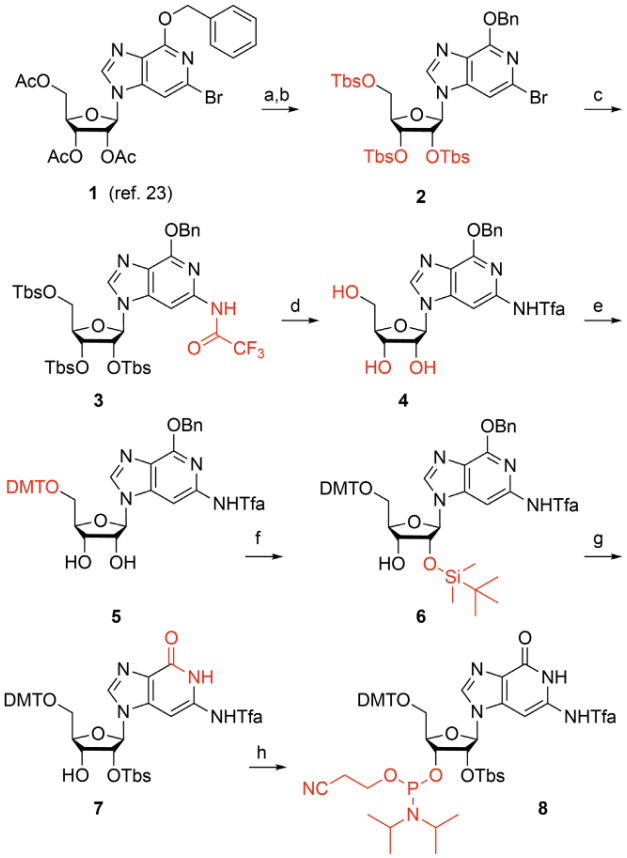
Improved c^{3}G building block with N^2-Tfa and 2′-OTbs protection

For the solid-phase synthesis of c^{3}A and c^{3}G modified RNA, appropriate phosphoramidite building blocks are needed. Their syntheses have been a bottleneck for a long time (18,22), with new and more powerful routes coming up only recently (23,28).

A practical synthesis for c^{3}G phosphoramidites from inexpensive starting materials has been introduced by our research group (23). Therein, the phenoxyacetyl (Pac) and 2-cyanoethoxymethyl (Cem) groups block the N^2- and 2′-hydroxyl functionalities, while the O^6 atom remains unprotected. This building block was successfully incorporated into a short 5 nt RNA strand. Deprotection of the N^2-phenoxyacetyl group, however, requires rather long reaction times and high pH values which causes degradation when longer oligoribonucleotides are envisaged. To solve this problem, we here demonstrate the installation of a more base-labile protection group for the exocyclic amine of c^{3}G, resulting in N^2-trifluoroacetyl protected 3-deazaguanosine phosphoramidite **8**. Distinct to our previously introduced c^{3}G building block, we used 2′-*O*-*tert*.-butyldimethylsilyl (Tbs) protection (instead of the 2′-*O*-Cem group) to guarantee widest possible compatibility with standard RNA solid-phase synthesis.

The synthesis started from the previously reported 3-deazaguanosine key intermediate **1** (23) (Scheme 1). The application of the temporary *O*-*tert*.-butyldimethylsilyl (Tbs) instead *O*-acetyl protection (compound **2**) was necessary because of otherwise partial acetyl transfer to the N^2 amino

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

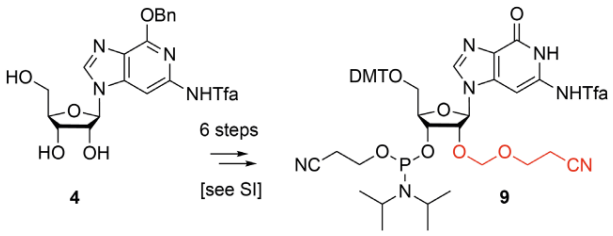


Scheme 1. Synthesis of the novel c^3G phosphoramidite building block **8**. Reagents and conditions: (a) $MeNH_2$ in ethanol, room temperature, 1 h, 99%; (b) 6 equiv *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TbsCl), 7 equiv imidazole in DMF, room temperature, 72 h, 90%; (c) 1.2 equiv trifluoroacetamide, 1.4 equiv Cs_2CO_3, 0.05 equiv $Pd_2(dba)_3$, 0.15 equiv Xantphos in 1,4-dioxane, 110°C, 5 h, 90%; (d) 4.1 equiv tetra-*n*-butylammonium fluoride trihydrate in tetrahydrofuran, room temperature, 2 h, 87%; (e) 1.15 equiv 4,4′-dimethoxytriphenylmethyl chloride, 0.05 equiv 4-(*N*,*N*-dimethylamino)pyridine in pyridine, room temperature, 16 h, 74%; (f) 1.9 equiv TbsCl, 1.9 equiv $AgNO_3$, in tetrahydrofuran, room temperature, 16 h, 39% (after two rounds of 2′,3′ equilibration); (g) 0.33 equiv Pd/C 10%, H_2 in tetrahydrofuran/ethanol 4:1, room temperature, 4 h, 79%; (h) 3.0 equiv 2-cyanoethyl-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetraisopropylphosphorodiamidite, 0.5 equiv 5-(benzylthio)-1*H*-tetrazole in dichloromethane, room temperature, 18 h, 79%.

group under the conditions required for the next step, namely the installation of the N^2-trifluoroacetylamino (Tfa) functionality: Pd catalyzed cross coupling between trifluoroacetamide and bromo compound **2** by using Buchwald-Hartwig conditions gave derivative **3** in excellent yields. Deprotection of the Tbs groups proceeded smoothly with tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) in tetrahydrofuran to furnish compound **4**. Then, the functionalization of **4** into the desired c^3G phosphoramidite **8** required four more transformations. First, nucleoside **4** was converted into the dimethoxytritylated compound **5**, using 4,4′-dimethoxytriphenylmethyl chloride in pyridine. Then, Tbs-protection according to Ogilvie (39) with silver nitrate proceeded with rather low stereoselectivity (about 3:2), but in combination with base-induced equilibration the overall yield was increased to 39% for compound **6**. At this point, we note that we did not follow up our initial attempts to take advantage of the Beigelman 5′,3′-silyl clamp and 2′-*O*-Tbs protection concept (40) for compound **1** because of low yields. The O^6-benzyl group of nucleoside **6** was cleaved by Pd/C-catalyzed hydrogenation to provide the free lactam moiety in derivative **7**. Finally, phosphitylation was executed with 2-cyanoethyl-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetraisopropylphosphorodiamidite in the presence of 5-(benzylthio)-1*H*-tetrazole. Starting from nucleoside **1**, our route provides phosphoramidite **8** with 13% overall yield in eight steps involving eight chromatographic purifications; in total, 0.90 g of compound **8** was obtained during the course of this study.

Additionally, we synthesized the N^2-Tfa protected building block **9** to take advantage of the less bulky 2′-*O*-(2-cyanoethoxy)methyl protecting group if short coupling times during solid-phase synthesis would be needed (see the Supporting Information and Scheme 2).

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021



Scheme 2. Synthesis of the novel c^{3}G phosphoramidite building block **9**. For individual reaction steps, reagents and conditions see the Supporting Information.

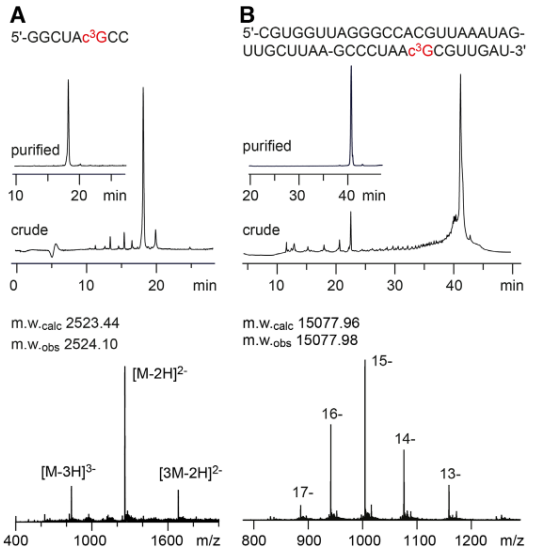


Figure 1. Characterization of c^{3}G-modified RNA. (**A**) Anion-exchange HPLC traces of 8 nt RNA (top) and LC–ESI iontrap mass spectrum (bottom); (**B**) Anion-exchange HPLC traces of 47 nt RNA (top) and ESI FT-ICR mass spectrum (bottom). HPLC conditions: Dionex DNAPac column (4 × 250 mm), 80°C, 1 ml min^{-1}, 0–40% buffer B (for 8 nt RNA) in buffer A within 30 min; 0–60% buffer B (for 47 nt RNA) in buffer A within 30 min; buffer A: Tris–HCl (25 mM), urea (6 M), pH 8.0; buffer B: Tris-HCl (25 mM), urea (6 M), $NaClO_4$ (0.5 M), pH 8.0. See the experimental for LC–ESI MS conditions.

Synthesis of c^{3}G containing RNA

The incorporation of building blocks **8** and **9** into oligoribonucleotides proceeds with high coupling rates and excellent yields using standard RNA solid-phase synthesis protocols and, as intended, significantly milder conditions can be used to reach complete deprotection of the c^{3}G containing oligonucleotides. Figure 1 exemplarily illustrates the synthesis of 8 and 47 nt long RNA oligonucleotides with a single c^{3}G modification (for a complete list of synthesized oligos see Supplementary Table S1). In short, the c^{3}G phosphoramidite building blocks **8** or **9** were applied in combination with standard *N*-acetylated 2′-*O*-[(triisopropylsilyl)oxy]methyl (TOM) phosphoramidites and the oligomers were assembled on controlled pore glass (CPG) supports (41). Cleavage from the solid support and deprotecting of the base labile groups were accomplished by treatment with methylamine/ammonia in water (1:1 mixture of 40% aqueous methylamine and 30% aqueous ammonia (AMA) for 3 h at 37°C room temperature or 15 min at 65°C). Subsequently, deprotection of the 2′-*O*-silyl groups (and the 2′-*O*-Cem group in case of **9**) was carried out with tetra-*n*-butylammonium fluoride trihydrate in tetrahydrofuran for 14 hours at 37°C. The reaction was quenched by the addition of triethylammonium acetate buffer at pH 7.4. Salts were removed by size-exclusion chromatography. Analysis by anion exchange chromatography under strong denaturing conditions usually gave a major peak for the desired RNA which was further purified by anion exchange chromatography on a semipreparative column. The molecular weights of the purified RNAs were confirmed by LC–ESI-MS (Supplementary Table S1) and the sequences were confirmed by top-down mass spectrometry (MS) using a Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer (42) (Supplementary Table S2).

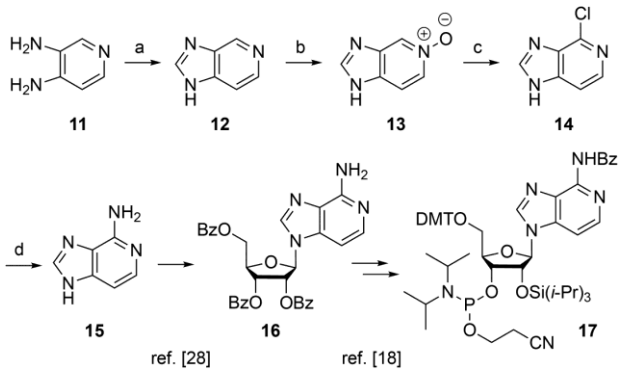
Synthesis of c^{3}A containing RNA

The synthetic path of the c^{3}A nucleoside building block has been merged from two routes that we published earlier (Scheme 3) (18,28). The key reaction is a silyl-Hilbert–Johnson nucleosidation using unprotected 6-amino-3-deazapurine **15** and benzoyl-protected 1-*O*-acetylribose (28). We then proceeded with N^6-benzoyl protection (18) instead of N^6-(di-*n*-butyl)amidine protection (28) for the following reason: The introduction of the 2′-*O*-triisopropylsilyl group is not regioselective and results in a mixture of 2′- and 3′-*O*-regioisomers; the required chromatographic purification of this mixture is more straightforward for the N^6-benzoyl protected regioisomers (compared to the N^6-(di-*n*-butyl)amidine counterparts) because of the significantly larger gap in retention times. Furthermore, in this work we also optimized the access to 6-amino-3-deazapurine **15** and its precursor 6-chloro-3-deazapurine **14** on large scale and starting from cheap materials (Scheme 3) (43,44). Solid-phase synthesis of c^{3}A-modified building block **17** into RNA was performed using standard protocols as described earlier (15).

Base pairing properties of c^{3}G and c^{3}A containing RNA

To the best of our knowledge, hardly anything is known about the impact of 3-deazapurine nucleosides on base pairing in regular RNA. We therefore set out to analyze the

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021



Scheme 3. Synthesis of the novel c^3A phosphoramidite building block **16**. Reagents and conditions: (a) in formic acid, 140°C, 48 h, 97%; (b) 2.0 equiv 3-chloroperbenzoic acid in 2:1 (v/v) CH_2Cl_2/CH_3OH, room temperature, 16 h, 96%; (c) in $POCl_3$, 110°C, 4 h, 67%; (d) in 1:1 (v/v) 30% NH_3 in H_2O/1,4-dioxane, 190°C, autoclave, 120 h, 87%.

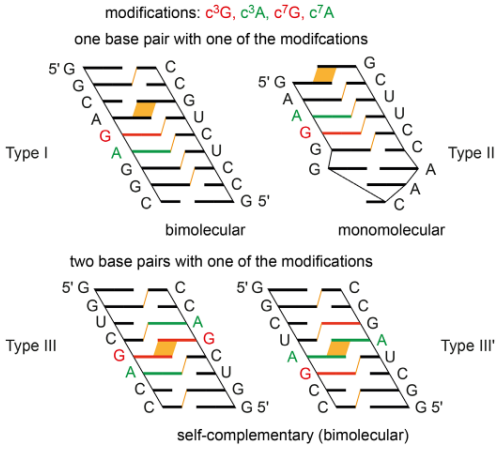


Figure 2. Sequence design for thermodynamic analysis of base pairing of deazapurine modified RNAs. Cartoon presentation to highlight inter-strand stacking interactions (in orange).

influence of c^3G and c^3A on the stability of RNA double helices, and additionally, to compare them to the c^7G and c^7A modified counterparts. Figure 2 illustrates the sequence design of the double helices investigated. The first motif constitutes an asymmetric bimolecular duplex of nine base pairs with a single deazapurine modification in the center (Type I). The second motif forms a hairpin with an extra-stable GNRA loop (GCAA), a five base pair stem with the modification again in the center, and additionally a 3′-dangling guanosine to reduce fraying of the terminal base pair (Type II). The third RNA motif covers two palindromic RNAs of eight base pairs and identical pyrimidine–purine stacking patterns (Type III and III′) with the purine modification either side-by-side in the center (thereby enabling direct inter-strand stacking), or separated by two base pairs. The latter sequence design is highly sensitive for the thermodynamic impact arising from a modification because only two and three regular Watson–Crick base pairs can form next to them: we remind that nucleation of a bimolecular double helix of oligonucleotides becomes thermodynamically favorable only when at least (three to) four continuous Watson–Crick base pairs can form (45,46). Therefore, these palindromic RNAs are expected to markedly respond to a nucleobase modification expressed in significant alterations of their thermal stabilities (T_m) and thermodynamic parameters (ΔG, ΔH, ΔS).

Table 1 summarizes the thermal and thermodynamic data we obtained for the four RNA systems by UV-spectroscopic melting profile measurements (for melting profiles see the Supplementary Figures S1 to S16). The native type I RNA melts at 66.7°C. Both 3-deazapurines exhibit a destabilization, by 3.9 and 2.9°C, for c^3G (in **Ia**) and c^3A (in **Ib**) respectively. Interestingly, in this sequence context, the corresponding 7-deazapurines (c^7G in **Ic** and c^7A **Id**) have negligible effect on the T_m and thermodynamic parameters. For the hairpin RNA (type II), the destabilization of both 3-deazapurines is significant, reflected in a decrease of the T_m-value by 9.1 and 7.9°C, for c^3G (in **IIa**) and c^3A (in **IIb**) respectively, when compared to the native hairpin **II**. In contrast to type I RNA, the monomolecular system (type II) reveals a slight destabilizing effect of 7-deazapurines as well (c^7G in **IIc** and c^7A **IId**).

To further elucidate the impact of 3- and 7-deazapurines on base pairing, we investigated the thermodynamic base pairing properties of 3- and 7-deazapurines in short palindromic RNAs. As mentioned above, the effects become intensified because the self-pairing results in two modified base pairs with regularly Watson-Crick–paired regions next to them that are below the required number of base pairs needed for successful double helix nucleation (45,46). Indeed, for c^3G the reduction in both palindromic RNAs was dramatic, reflected in –13.5/–13.0°C reduced T_m values (**IIIa** and **III'a**), accounting for –6.8/–6.5°C destabilization per single modification which is more than twice of the destabilization that we observed for a single c^3G-C base pair in the bimolecular 9 bp duplex **Ia**. The destabilizing nature was also very pronounced for c^3A in both palindromic RNAs (–9.8°C in **IIIb** and –13.0°C in **III'b**). In contrast,

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

only little destabilization was found for both 7-deazapurines in both palindromic RNAs (c^7G: –2.4°C in **IIIc** and –2.1°C in **III'c**; c^7A: –2.7°C in **IIId** and –1.0°C in **III'd**).

To the best of our knowledge, our data provides the first insights into thermal and thermodynamic stabilities of 3-deazaadenine and 3-deazaguanine containing RNA. Thus far, c^3G was investigated only within the context of 2′-OCH_3–RNA; c^3G caused destabilization when paired to C (–6°C with complementary RNA; –9°C with complementary DNA in a Type I like sequence design) (47). Interestingly, when an acetyl group resided at the exocyclic amino group (N^2-acetyl-3-deazaguanine) the native pairing strength was restored (48).

Furthermore, a single paper points at the strong destabilizing effect of 3-deazaguanine on DNA base pairing (36). In contrast, in several early studies, the slight destabilizing effect of 3-deazaadenine within DNA double helices has been recognized (31,32,35,36). 7-Deazaguanine and 7-deazaadenine modified DNAs have been investigated most intensively with respect to base pairing stabilities; generally, they act slightly destabilizing compared to their native counterparts (29,30,34–38).

NMR spectroscopy of 3-deazapurine modified RNA

The NMR resonances for the hydrogen-bonded protons of Watson–Crick base-pairs ('imino protons') directly reflect the double helical segments within folded RNA. The chemical shifts of these signals are characteristic for A-U (>14 ppm) and C-G base pairs (~12–13 ppm), and the linewidths reflect proton exchange with the solvent. Clearly, they are very sensitive to modifications, in particular, if they concern the nucleobases. Figure 3A depicts ^{1}H NMR spectra of the palindromic duplex 5′-GGUCGACC **III** that were collected as a function of temperature, over the range 5–25°C. The signal assignment was based on 2D ^{1}H/^{1}H-NOESY spectroscopy (Supplementary Figure S17). With increasing temperature, the signal of the base pair G1-C becomes broader and loses intensity, consistent with base pair fraying of the duplex termini; the internal base pairs remain and reflect stable duplex formation at ambient temperatures.

In comparison, the c^3G imino proton resonance of the modified duplex **IIIa** was shifted highfield (Figure 3B), consistent with the increased pK_a of c^3G (compared to G) of almost 3 pK_a units (Table 2). Interestingly, the neighboring U3-A base pair senses the perturbation caused by c^3G, reflected in a decrease in intensity of the U3 imino proton signal at higher temperature. The enhanced exchange with the solvent indicates a dynamic hot spot of base pair opening at this particular position.

Concerning the c^3A-modified duplex **IIIb**, the thermal destabilization is reflected in the imino proton ^{1}H NMR spectra as well (Figure 3C), with a tiny signal barrow at 5°C in the typical ppm region of A–U base pairs; no signal was observed at higher temperature. This stands for intensive proton exchange with the solvent of the uridine N3-H in the c^3A–U base pair and is reminiscent to ^{1}H NMR spectroscopy of 5F–U–A base pairs (52).

To investigate these effects in more detail, we quantified the water imino proton exchange kinetics of a c^3G–C base pair containing duplex (**IIIa**) by the application of

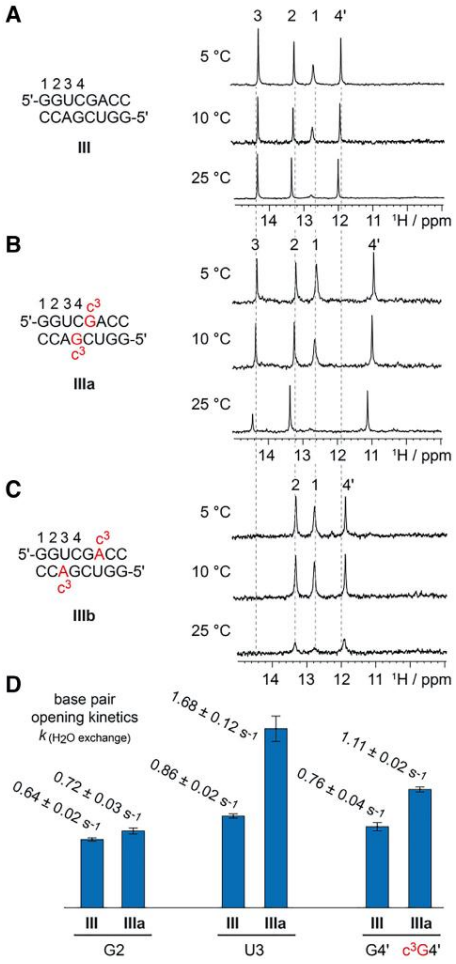


Figure 3. Comparative ^{1}H NMR imino proton spectra of (**A**) unmodified, (**B**) c^3G-, and (**C**) c^3A-modified oligoribonucleotides; conditions: c_{RNA} = 0.1 mM, 15 mM $Na[AsO_2(CH_3)_2]\bullet 3H_2O$, 25 mM NaCl, 3 mM NaN_3, in H_2O/D_2O 9/1, pH 6.5; (**D**) the graph illustrates the imino proton exchange rates determined by 1D CLEANEX-PM experiments (see Supporting Information for details).

Table 2. pK_a values of nucleobases and deaza derivatives[a]

	A•H$^+$ (N1)	c^3A•H$^+$ (N1)	c^7A•H$^+$ (N1)	U (N3)
pK_a	3.7	6.8	5.3	9.2
	G (N1)	c^3G (N1)[b]	c^7G (N1)	C•H$^+$ (N3)
pK_a	9.5	12.3	10.3	4.1

[a]Values are summarized from references 7 and 51. Atom position of protonation/deprotonation are provided in brackets.
[b]For an independent NMR-based pK_a determination of c^3G see Supplementary Figure S22.

1D Phase-Modulated CLEAN Chemical EXchange Spectroscopy (CLEANEX-PM) NMR experiments (Figure 3D, and Supplementary Figure S18) (53–55). Interestingly, the largest exchange rate $k_{(H2O\ ex.)}$ of 1.68 s^{-1} was observed for

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

the A-U base pair next to the c^3G–C modification. Also for the c^3G–C base pair itself the rate $k_{(H2O\ ex.)}$ was increased compared to the unmodified duplex (1.11 s^{-1} versus 0.76 s^{-1}), while the G–C base pair two positions away almost the same exchange rates $k_{(H2O\ ex.)}$ for modified and unmodified duplexes were observed (0.72 s^{-1} versus 0.62 s^{-1}). This is consistent with a local structural perturbation induced by the 3-deazapurine hotspot.

Crystal structures of a c^3A containing RNA

To further shed light on 3-deazapurine containing base pairs in RNA we put efforts into a high resolution X-ray crystallographic analysis. We utilized the 27 nt fragment of the *E. coli* 23S rRNA sarcin–ricin loop (SRL) which is a robust and well-behaved crystallization scaffold (56,57). For the incorporation of c^3A, we deemed nucleotide A2670 appropriate, which forms a Watson–Crick base pair with C2650 in the regular A-form double helical region. Crystallization trials with c^3A-modified SRL RNA indeed provided crystals that diffracted to subatomic resolution (Supplementary Table S3). X-ray structure determination showed that the c^3A nucleobase is well-defined in the electron density maps for the c^3A-modified RNA (Figure 4). Superimpositions of the c^3A-modified RNA structure with the unmodified RNA showed a root-mean-square deviation (rmsd) of 0.12 Å (within the errors on coordinates of 0.13 Å). Overall, the structure revealed that the 3-deazanucleobase does not significantly affect the base pair geometry and the SRL RNA fold. However, what is different is the local hydration network in the minor groove of the c^3A–U base pair (Figure 4A). While three ordered water molecules are found in the minor groove for the unmodified base pair, four are observed for the modified base pair. An obvious distinction is that the N3 atom of A2670 is hydrogen-bonded to one of the water molecules (2.8 Å distance) while for the c^3A2670/U2650 base pair, a continuous hydrogen-bonded water chain spans from the 2′-OH of c^3A2670 to the 2′-OH of U2650 without involving the c^3A nucleobase; the closest water is in 3.3 Å-distance from its C3 atom (Figure 4D, Supplementary Figure S19). Although these structural differences in the hydration pattern appear minor in the static X-ray structure, they may contribute to increased base pair opening dynamics as reflected in the imino proton NMR spectrum of the c^3A modified SRL RNA by significant signal broadening (Supplementary Figure S20). The destabilizing effect of the c^3A modification in the SRL RNA hairpin is further reflected in the UV-melting profiles measured under diverse conditions (Supplementary Figure S21).

Towards a rationale for the destabilization by c^3G and c^3A

For all four modifications—c^3G, c^7G and c^3A, c^7A—the base pair geometry and hydrogen bonding pattern to C and A respectively, are the same as encountered for the native Watson–Crick G–C and A–U base pairs. Therefore, other factors such as altered nucleobase dipole moments that can affect nucleobase stacking (58), or altered pK_a values of the modified nucleobases (7,59–61), as well as altered hydration of minor groove (3-deazapurines) and major groove (7-deazapurine) are of potential origin for these differences in thermal stabilities and thermodynamic parameters (30).

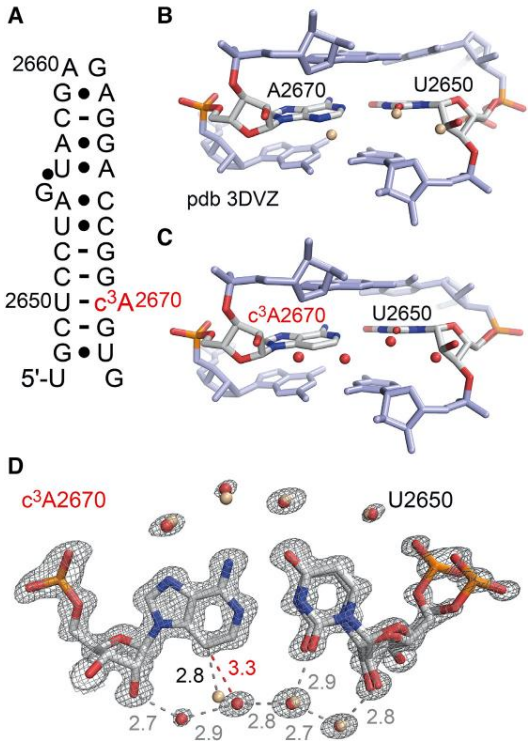


Figure 4. X-ray structure of 3-deazaadenosine modified RNA at atomic resolution. (**A**) Secondary structure of the *E. coli* Sarcin-ricin stem-loop (SRL) RNA used for crystallization. The c^3A nucleotide is labeled in red. (**B**) Side view on the U2650/A2670 base pair in the unmodified duplex with ordered water molecules in the minor groove highlighted in beige color (PDB ID 3DVZ). (**C**) Side view on the U2650/c^3A2670 base pair with ordered water molecules in the minor groove highlighted in red color (PDB ID 7L3R). (**D**) $2F_{obs} - F_{calc}$ electron density map contoured at 1.5 σ level showing the U2650/c^3A2670 base pair. Water molecules are shown as red spheres (PDB ID 7L3R) and are superposed to the water molecules observed in the unmodified RNA (PDB ID 3DVZ). Numbers are distances in Angström (Å). We note that the alternative conformations of U2650 (and C2649, G2648) are also observed in the unmodified SRL RNA scaffold (PDB ID 3DVZ).

It has been proposed that the pK_a of a nucleobase is one significant factor that contributes to base-pairing strength (7,58–60). Table 2 summarizes the pK_a values of the nucleobases investigated in this study, and the following trend becomes obvious: The pK_a decreases in the order of A•H^+ < c^7A•H^+ < c^3A•H^+, and the same is true for G < c^7G < c^3G. This trend is consistent with the notion that 7-deazapurines are less destabilizing than 3-deazapurines compared to A and G in standard Watson-Crick pairs in RNA double helices (Table 1). We furthermore note that c^3A with a pK_a of 6.8 is partially protonated at physiological pH values around 7.0 which may affect base pairing in addition.

Another aspect that was documented earlier is that natural Watson–Crick base pairs A–U and C–G are characterized by a pK_a gap between the H-donor (U, G; N3-H, N1-

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

H) and the H-acceptor (A, C; N1, N3) of ΔpK_a 5.5 and 5.4, respectively, which appears optimal for efficient base pairing (7,58). This gap becomes significantly altered for isosteric c^7A–U (ΔpK_a 3.9), c^3A–U (ΔpK_a 2.4), c^7G–C (ΔpK_a 6.2) and c^3G–C (ΔpK_a 8.2) deazapurine base pairs.

Clearly, caution has to be taken because many more factors in addition to the pK_a of the heterocycles (as listed above) contribute to macroscopically observed double helix stabilities. This might be the reason why concepts for predicting hydrogen-bond strengths from acid–base molecular properties (e.g. proton affinity/pK_a equalization, pK_a slide rule, etc.) cannot be directly applied to nucleic acid base pairing strengths, although being promising for an integrated theoretical and experimental approach to solve this long-standing problem in the future (62).

Finally, we point at the hydration of RNA grooves which is distinct between 3-deazapurines (c^3G and c^3A) affecting the minor groove, and 7-deazapurines (c^7G and c^7A) affecting the major groove. In particular, the first solved crystal structure of a c^3A modified RNA and the comparison to the unmodified counterpart reveal that the characteristic water molecule that always docks on the purine N3 atom and often spans further to the ribose 2′-OH in native RNA double helices (63,64), is lacking in the 3-deaza-modified counterparts. The altered hydration pattern is a clear structural distinction that should be taken into account when searching for the concurrent causes of the decrease in stability.

Role of deazapurines in RNA atomic mutagenesis studies

Deazapurine modified RNAs have been frequently applied in biochemical mutagenesis studies of ribozymes to verify or falsify mechanistic proposals for the chemical reactions they catalyze (65,66). Several examples are found in the literature where atomic mutagenesis experiments led to an in-depth understanding of the chemical mechanism, revealing the functionally crucial imino groups of purines that participate in general acid-base catalysis of small nucleolytic ribozymes for phosphodiester cleavage (14–16). For instance, this concerns the twister ribozyme where proton transfer from the (protonated) N3 of the conserved adenine (A6) at the cleavage site to the 5′-O leaving group had been postulated to contribute to reaction catalysis (i.e. δ-catalysis; for explanation of α, ß, γ, δ-catalysis see reference 67). Indeed, replacement of this adenine by c^3A or c^1c^3A rendered the twister ribozyme inactive (14,67). A follow-up NMR spectroscopic analysis revealed a pK_a shift of the very adenine N3 from 3.7 to 5.1 (14). As a second example, the pistol ribozyme is pointed out. At first, distance analysis and interpretation of the three-dimensional structure of this ribozyme implicated the N3 of a conserved purine (A32 or G32, respectively) as a possible candidate for general acid–base catalysis, being involved in leaving group stabilization (δ-catalysis). However, upon replacement of this purine by c^3A, the ribozyme retained full activity. Later, it was found that the 2′-OH of this purine nucleoside plays a crucial role, and not the N3 (15).

Additionally, deaza-nucleobase substitutions have identified crucial metal binding sites that are responsible for structuring of riboswitch aptamers and ribozyme active sites (13,67), as well as have disclosed key coordination sites of hydrated Mg^{2+} ions that critically participate in proton transfer to release the 5′-*O* leaving group in the course of phosphodiester cleavage (15,16,68,69). Recent prominent examples refer to the NAD^+ class-I riboswitch (68) and the pistol ribozyme (15,16). In pistol RNA, a highly conserved guanine (G33) interacts with a Mg^{2+} cation through innersphere coordination with its N7 atom. Replacement of this guanine by c^7G renders the ribozyme inactive (15). Together with distance analysis of pistol ribozyme crystal structures, this suggests that a water molecule of the hydrated Mg^{2+} ion assists in stabilizing the 5′-O leaving group during the course of the reaction (15,16). In the NAD^+ class-I riboswitch, a highly conserved adenine (A10) exhibits N7-innersphere coordination to a Mg^{2+} cation that additionally coordinates to the oxygen atom of a sequence-distant phosphate backbone unit and thus molds a critical part of the binding pocket. Replacement of this adenine by c^7A abolishes binding to NAD^+ (68).

With respect to the ribosome, atomic mutagenesis involving 3-deazaadenine in the ribosomal peptidyl transferase center (PTC) demonstrated that an initial suspect (N3 of A2451) did not actively participate in proton transfer to catalyze peptide bond formation, but instead, the 2′-OH of the very adenosine assists in positioning of the substrate (19; see also reference 17,18,20,70).

For atomic mutagenesis experiments using deazanucleobases, a profound knowledge of the intrinsic properties of these heterocycles in an RNA context is imperative to avoid misinterpretations. Functional assays to evaluate ribozyme or riboswitch activity in response to a specific purine-deazapurine replacement are usually designed to impair a potential H-bond or innersphere coordination to a divalent metal ion, as suggested by the observed distances in the three-dimensional structure. Provided such an interaction is crucial for activity, it can thus be easily identified and the mechanistic interpretation becomes straightforward. Importantly, in all of the examples mentioned above, the purine/deazapurine finds itself in an exposed and unpaired position. Clearly, in the light of our present study, functional assays that would involve atomic mutagenesis with 3-deazanucleobases in double helical regions would encounter severe limitations because of thermodynamic destabilization of the stem containing the modification. This aspect is, however, less critical for atomic mutagenesis using 7-deazanucleobases which do not or only minimally destabilize double helices.

CONCLUDING REMARKS

In this study, we synthesized and comprehensively analyzed the properties of 3-deazaguanine and 3-deazaadenine modified RNA. When these nucleobases are embedded in a double helical environment we found that they can decrease the stability of base pairing. Interestingly, the effects were much more pronounced for 3-deazapurines compared to the isomeric 7-deazapurines. Moreover, destabilization is more severe in short stems interfering with double helix nucleation, while a more modest decrease is observed if located in the center of an extended double helix. We furthermore found that the imino proton exchange for deazapurine-modified Watson Crick base pairs is significantly higher compared

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

to their native counterparts and simultaneously induces enhanced opening of the very neighbor base pair. These perturbations in local structural dynamics provide a rationale for the observed reduced base pairing strength. Additionally, we solved the X-ray structure of a c^3A modified RNA to visualize the hydration pattern of the minor groove. The structure points out that the hydrophobic minor grove face of c^3A impairs hydration because the water molecule that is usually hydrogen bonded to the N3 atom becomes extruded from the 3-deaza-modified base pair. Taken together, our comparative study sheds light on Watson–Crick base pairing of 3- and 7-deazapurines and thus represents a first important step towards a comprehensive understanding of the intrinsic properties of these RNA modifications that are critical for their proper application in atomic mutagenesis experiments of biologically relevant RNA.

DATA AVAILABILITY

Atomic coordinates and structure factors for the reported crystal structures have been deposited with the Protein Data bank under accession numbers 7L3R.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jonas Kottersteger for synthetic contributions, Sarah Heel for assistance in FT-ICR mass spectrometry, and Daniel Fellner (Innsbruck) for technical support.

FUNDING

Austrian Science Fund FWF [P31691, F8011-B to R.M., P32773 to C.K., P30087 to K.B.]; Austrian Research Promotion Agency FFG [West Austrian BioNMR 858017]. Funding for open access charge: Austrian Science Fund FWF.
Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Polacek,N. (2013) Atomic mutagenesis of the ribosome: towards a molecular understanding of translation. *Chimia – Int. J. Chem.*, **67**, 322–326.
2. Hoernes,T.P, Clementi,N., Juen,M.A., Shi,X., Faserl,K., Willi,J., Gasser,C., Kreutz,C., Joseph,S., Lindner,H. *et al.* (2018) Atomic mutagenesis of stop codon nucleotides reveals the chemical prerequisites for release factor-mediated peptide release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **115**, E382–E389.
3. Hu,T., Suter,S.R., Mumbleau,M.M. and Beal,P.A. (2018) TLR8 activation and inhibition by guanosine analogs in RNA: Importance of functional groups and chain length. *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 77–83.
4. Forconi,M., Benz-Moy,T., Gleitsman,K.R., Ruben,E., Metz,C. and Herschlag,D. (2012) Exploring purine N7 interactions via atomic mutagenesis: the group I ribozyme as a case study. *RNA*, **18**, 1222–1229.
5. Seela,F., Debelak,H., Usman,N., Burgin,A. and Beigelman,L. (1998) 1-Deazaadenosine: synthesis and activity of base-modified hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1010–1018.
6. Kapinos,L.E., Operschall,B.P., Larsen,E. and Sigel,H. (2011) Understanding the acid-base properties of adenosine: the intrinsic basicities of N1, N3 and N7. *Chem. Eur. J.*, **17**, 8156–8164.
7. Krishnamurthy,R. (2012) Role of pKa of nucleobases in the origins of chemical evolution. *Acc. Chem. Res.*, **45**, 2035–2044.
8. Acharya,P., Cheruku,P., Chatterjee,S., Acharya,S. and Chattopadhyaya,J. (2004) Measurement of nucleobase pKa values in model mononucleotides shows RNA−RNA duplexes to be more stable than DNA−DNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2862–2869.
9. Bande,O., Braddick,D., Agnello,S., Jang,M., Pezo,V., Schepers,G., Rozenski,J., Lescrinier,E., Marlière,P. and Herdewijn,P. (2016) Base pairing involving artificial bases in vitro and in vivo. *Chem. Sci.*, **7**, 995–1010.
10. Fuchs,E., Falschlunger,C., Micura,R. and Breuker,K. (2019) The effect of adenine protonation on RNA phosphodiester backbone bond cleavage elucidated by deaza-nucleobase modifications and mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 7223–7234.
11. Spitale,R.C., Volpini,R., Heller,M.G., Krucinska,J., Cristalli,G. and Wedekind,J.E. (2009) Identification of an imino group indispensable for cleavage by a small ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6093–6095.
12. Spitale,R.C., Volpini,R., Mungillo,M.V., Krucinska,J., Cristalli,G. and Wedekind,J.E. (2009) Single-atom imino substitutions at A9 and A10 reveal distinct effects on the fold and function of the hairpin ribozyme catalytic core. *Biochemistry*, **48**, 7777–7779.
13. Zheng,L., Falschlunger,C., Huang,K., Mairhofer,E., Yuan,S., Wang,J., Patel,D.J., Micura,R. and Ren,A. (2019) Hatchet ribozyme structure and implications for cleavage mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **116**, 10783–10791.
14. Košutić,M., Neuner,S., Ren,A., Flür,S., Wunderlich,C., Mairhofer,E., Vušurović,N., Seikowski,J., Breuker,K., Höbartner,C. *et al.* (2015) A mini-twister variant and impact of residues/cations on the phosphodiester cleavage of this ribozyme class. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 15128–15133.
15. Neuner,S., Falschlunger,C., Fuchs,E., Himmelstoss,M., Ren,A., Patel,D.J. and Micura,R. (2017) Atom-specific mutagenesis reveals structural and catalytic roles for an active-site adenosine and hydrated Mg^{2+} in pistol ribozymes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 15954–15958.
16. Teplova,M., Falschlunger,C., Krasheninina,O., Egger,M., Ren,A., Patel,D.J. and Micura,R. (2020) Crucial roles of two hydrated Mg^{2+} ions in reaction catalysis of the pistol ribozyme. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 2837–2843.
17. Erlacher,M.D., Lang,K., Shankaran,N., Wotzel,B., Hüttenhofer,A., Micura,R., Mankin,A.S. and Polacek,N. (2005) Chemical engineering of the peptidyl transferase center reveals an important role of the 2′-hydroxyl group of A2451. *Nucleic. Acids. Res.*, **33**, 1618–1627.
18. Erlacher,M.D., Lang,K., Wotzel,B., Rieder,R., Micura,R. and Polacek,N. (2006) Efficient ribosomal peptidyl transfer critically relies on the presence of the ribose 2′-OH at A2451 of 23S rRNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 4453–4459.
19. Lang,K., Erlacher,M., Wilson,D.N., Micura,R. and Polacek,N. (2008) The role of 23S ribosomal RNA residue A2451 in peptide bond synthesis revealed by atomic mutagenesis. *Chem. Biol.*, **15**, 485–492.
20. Polikanov,Y.S., Steitz,T.A. and Innis,C.A. (2014) A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide-bond formation on the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 787–793.
21. Das,S.R. and Piccirilli,J.A. (2005) General acid catalysis by the hepatitis delta virus ribozyme. *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 45–52.
22. Seela,F., Debalak,H., Andrews,L. and Beigelman,L. (2003) Synthesis and enzymic hydrolysis of oligoribonucleotides incorporating 3-deazaguanosine: the importance of the nitrogen-3 atom of single conserved guanosine residues on the catalytic activity of the hammerhead ribozyme. *Helv. Chim. Acta*, **86**, 2726–2740.
23. Mairhofer,E., Flemmich,L., Kreutz,C. and Micura,R. (2019) Access to 3-deazaguanosine building blocks for RNA solid-phase synthesis involving Hartwig-Buchwald C-N cross-coupling. *Org. Lett.*, **21**, 3900–3903.
24. Perlíková,P. and Hocek,M. (2017) Pyrrolo[2, 3-d]pyrimidine (7-deazapurine) as a privileged scaffold in design of antitumor and antiviral nucleosides. *Medicinal Res. Rev.*, **37**, 1429–1460.
25. Richardson,K.E. and Znosko,B.M. (2016) Nearest-neighbor parameters for 7-deaza-adenosine·uridine base pairs in RNA duplexes. *RNA*, **22**, 934–942.
26. Ingale,S.A., Leonard,P. and Seela,F. (2018) Glycosylation of pyrrolo[2,3-d]pyrimidines with 1-*O*-acetyl-2, 3, 5-tri-*O*-benzoyl-β-d-ribofuranose: substituents and protecting groups

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

effecting the synthesis of 7-deazapurine ribonucleosides. *J. Org. Chem.*, **83**, 8589–8595.
27. Seela,F., Mersmann,K., Grasby,J.A. and Gait,M.J. (1993) 7-Deazaadenosine – oligoribonucleotide building-block synthesis and autocatalytic hydrolysis of base-modified hammerhead ribozymes. *Helv. Chim. Acta*, **76**, 1809–1820.
28. Mairhofer,E., Fuchs,E. and Micura,R. (2016) Facile synthesis of a 3-deazaadenosine phosphoramidite for RNA solid-phase synthesis. *Beilstein J. Org. Chem.*, **12**, 2556–2562.
29. Gold,B., Stone,M.P. and Marky,L.A. (2014) Looking for Waldo: a potential thermodynamic signature to DNA damage. *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1446–1454.
30. Kowal,E.A., Ganguly,M., Pallan,P.S., Marky,L.A., Gold,B., Egli,M. and Stone,M.P. (2011) Altering the electrostatic potential in the major groove: thermodynamic and structural characterization of 7-deaza-2′-deoxyadenosine:dT base pairing in DNA. *J. Phys. Chem. B.*, **115**, 13925–13934.
31. Ganguly,M., Wang,R.W., Marky,L.A. and Gold,B. (2010) Thermodynamic characterization of DNA with 3-deazaadenine and 3-methyl-3-deazaadenine substitutions: the effect of placing a hydrophobic group in the minor groove of DNA. *J. Phys. Chem. B.*, **114**, 7656–7661.
32. Lever,C., Li,X., Cosstick,R., Edel,S. and Brown,T. (1993) Thermodynamic stability and drug-binding properties of oligodeoxyribonucleotide duplexes containing 3-deazaadenine:thymine base pairs. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1743–1746.
33. Cosstick,R., Li,X., Tuli,D.K., Williams,D.M., Connolly,B.A. and Newman,P.C. (1990) Molecular recognition in the minor groove of the DNA helix. Studies on the synthesis of oligonucleotides and polynucleotides containing 3-deaza-2′-deoxyadenosine. Interaction of the oligonucleotides with the restriction endonuclease EcoRV. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4771–4778.
34. Minakawa,N., Kawano,Y., Murata,S., Inoue,N. and Matsuda,A. (2008) Oligodeoxynucleotides containing 3-bromo-3-deazaadenine and 7-bromo-7-deazaadenine 2′-deoxynucleosides as chemical probes to investigate DNA-protein interactions. *ChemBioChem*, **9**, 464–470.
35. Seela,F. and Grein,T. (1992) 7-Deaza-2′-deoxyadenosine and 3-deaza-2′-deoxyadenosine replacing dA within d(A6)-tracts: differential bending at 3′- and 5′-junctions of d(A6).d(T6) and B-DNA. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2297–2306.
36. Grein,T., Lampe,S., Mersmann,K., Rosemeyer,H., Thomas,H. and Seela,F. (1994) 3-Deazapurines and 7-deazapurines - duplex stability of oligonucleotides containing modified adenine or guanine bases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 971–976.
37. Ganguly,M., Wang,F., Kaushik,M., Stone,M.P., Marky,L.A. and Gold,B. (2007) A study of 7-deaza-2′-deoxyguanosine 2′-deoxycytidine base pairing in DNA. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6181–6195.
38. Ganguly,M., Wang,R.-W., Marky,L.A. and Gold,B. (2009) Introduction of cationic charge into DNA near the major groove edge of a guanine cytosine base pair: characterization of oligodeoxynucleotides substituted with 7-aminomethyl-7-deaza-2′-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 12068–12069.
39. Hakimelahi,G.H., Proba,Z.A. and Ogilvie,K.K. (1981) Nitrate ion as catalyst for selective silylations of nucleosides. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 4775–4778.
40. Serebryany,V. and Beigelman,L. (2002) An efficient preparation of protected ribonucleosides for phosphoramidite RNA synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 1983–1985.
41. Micura,R. (2002) Small interfering RNAs and their chemical synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2265–2269.
42. Glasner,H., Riml,C., Micura,R. and Breuker,K. (2017) Label-free, direct localization and relative quantitation of the RNA nucleobase methylations m^6A, m^5C, m^3U, and m^5U by top-down mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 8014–8025.
43. Crey-Desbiolles,C., Lhomme,J., Dumy,P. and Kotera,M. (2004) 3-Nitro-3-deaza-2′-deoxyadenosine as a versatile photocleavable 2′-deoxyadenosine mimic. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 9532–9533.
44. Maiti,M., Persoons,L., Andrei,G., Snoeck,R., Balzarini,J. and Herdewijn,P. (2013) Synthesis and anti-herpetic activity of phosphoramidate ProTides. *Chem. Med. Chem.*, **8**, 985–993.
45. Saenger,W. (1984) In: *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, Berlin.
46. Majlessi,M. and Becker,M.M. (2008) Formation of the double helix: a mutational study. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2981–2989.
47. Seio,K., Sasami,T., Ohkubo,A., Ando,K. and Sekine,M. (2007) Highly selective recognition of cytosine over uracil and adenine by a guanine analogue, 2-*N*-acetyl-3-deazaguanine, in 2′-*O*-methyl-RNA/RNA and DNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1026–1027.
48. Seio,K., Sasami,T., Tawarada,R. and Sekine,M. (2006) Synthesis of 2′-*O*-methyl-RNAs incorporating a 3-deazaguanine, and UV melting and computational studies on its hybridization properties. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4324–4334.
49. Marky,L.A. and Breslauer,K.J. (1987) Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers*, **26**, 1601–1620.
50. Petersheim,M. and Turner,D.H. (1983) Base-stacking and base-pairing contributions to helix stability: thermodynamics of double-helix formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp. *Biochemistry*, **22**, 256–263.
51. Siraiwa,S., Suzuki,A., Katoh,R. and Saito,Y. (2016) Design and synthesis of a novel fluorescent benzo[g]imidazo[4, 5-c]quinoline nucleoside for monitoring base-pair-induced protonation with cytosine: distinguishing cytosine via changes in the intensity and wavelength of fluorescence. *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 3934–3942.
52. Puffer,B., Kreutz,C., Rieder,U., Ebert,M.O., Konrat,R. and Micura,R. (2009) 5-Fluoro pyrimidines: labels to probe DNA and RNA secondary structures by 1D ^{19}F NMR spectroscopy. *Nucleic. Acids. Res.*, **37**, 7728–7740.
53. Strebitzer,E., Rangadurai,A., Plangger,R., Kremser,J., Juen,M.A., Tollinger,M., Al-Hashimi,H.M. and Kreutz,C. (2018) 5-Oxyacetic acid modification destabilizes double helical stem structures and favors anionic Watson-Crick like cmo^5U-G base pairs. *Chem. Eur. J.*, **24**, 18903–18906.
54. Hwang,T.-L., van Zijl,P.C.M. and Mori,S. (1998) Accurate Quantitation of Water-amide Proton Exchange Rates Using the Phase-Modulated CLEAN Chemical EXchange (CLEANEX-PM) Approach with a Fast-HSQC (FHSQC) Detection Scheme. *J. Biomol. NMR*, **11**, 221–226.
55. Guéron,M. and Leroy,J.L. (1995) Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange. *Methods Enzymol.*, **261**, 383–413.
56. Olieric,V., Rieder,U., Lang,K., Serganov,A., Schulze-Briese,C., Micura,R., Dumas,P. and Ennifar,E.,2009, A fast selenium derivatization strategy for crystallization and phasing of RNA structures. *RNA*, **15**, 707–715.
57. Correll,C.C., Wool,I.G. and Munishkin,A. (1999) The two faces of the Escherichia coli 23 S rRNA sarcin/ricin domain: the structure at 1.11 A resolution. *J. Mol. Biol.*, **292**, 275–287.
58. Sponer,J., Leszczynski,J. and Hobza,P. (2001) Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of DNA and RNA bases. *Biopolymers*, **61**, 3–31.
59. Krishnamurthy,R. (2009) A search for structural alternatives of RNA. *J. Mex. Chem. Soc.*, **53**, 22–33.
60. Thaplyal,P. and Bevilacqua,P.C. (2014) Experimental approaches for measuring pKa's in RNA and DNA. *Methods Enzymol.*, **549**, 189–219.
61. Acharya,P., Cheruku,P., Chatterjee,S., Acharya,S. and Chattopadhyaya,J. (2014) The measurement of nucleobase pKa of the model mononucleotides shows why RNA-RNA duplex is more stable than DNA-DNA duplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2862–2869.
62. Gilli,P., Pretto,L., Bertolasi,V. and Gilli,G. (2009) Predicting hydrogen-bond strengths from acid–base molecular properties. The pKa slide rule: toward the solution of a long-lasting problem. *Acc. Chem. Res.*, **42**, 33–44.
63. Wahl,M.C., Rao,S.T. and Sundaralingam,M. (1996) The structure of r(UUCGCG) has a 5′-UU-overhang exhibiting Hoogsteen-like trans U • U base pairs. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 24–31.
64. Adamiak,D.A., Milecki,J., Adamiak,R.W. and Rypniewski,W. (2010) The hydration and unusual hydrogen bonding in the crystal structure of an RNA duplex containing alternating CG base pairs. *New J. Chem.*, **34**, 903–909.

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

65. Micura,R. and Höbartner,C. (2020) Fundamental studies of functional nucleic acids: aptamers, riboswitches, ribozymes and DNAzymes. *Chem. Soc. Rev.*, **49**, 7331–7353.
66. Scheitl,C.P.M, Ghaem Maghami,M., Lenz,A.K. and Höbartner,C. (2020) Site-specific RNA methylation by a methyltransferase ribozyme. *Nature*, **587**, 663–667.
67. Gebetsberger,J. and Micura,R. (2017) Unwinding the twister ribozyme: from structure to mechanism. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **8**, e1402.
68. Chen,H., Egger,M., Xu,X., Flemmich,L., Krasheninina,O., Sun,A., Micura,R. and Ren,A. (2020) Structural distinctions between NAD^+ riboswitch domains 1 and 2 determine differential folding and ligand binding. *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12394–12406.
69. Fuchs,E., Falschlunger,C., Micura,R. and Breuker,K. (2019) The effect of adenine protonation on RNA phosphodiester backbone bond cleavage elucidated by deaza-nucleobase modifications and mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 7223–7234.
70. Erlacher,M.D., Chirkova,A., Voegele,P. and Polacek,N. (2011) Generation of chemically engineered ribosomes for atomic mutagenesis studies on protein biosynthesis. *Nat. Protoc.*, **6**, 580–592.
71. Kabsch,W. (2010) Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Cryst.*, **D66**, 133–144.
72. Vagin,A. and Teplyakov,A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Cryst.*, **D66**, 22–25.
73. Afonine,P.V., Grosse-Kunstleve,R.W., Echols,N., Head,J.J., Moriarty,N.W., Mustyakimov,M., Terwilliger,T.C., Urzhumtsev,A., Zwart,P.H and Adams,P.D. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Cryst.*, **D68**, 352–367.
74. Emsley,P., Lohkamp,B., Scott,W.G. and Cowtan,K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Cryst.*, **D66**, 486–501.

Downloaded from https://academic.oup.com/nar/article/49/8/4281/6226676 by IRMA Strasbourg user on 26 October 2021

Article 3

« 2′-O-Trifluoromethylated RNA – a powerful modification for RNA chemistry and NMR spectroscopy »

Maximilian Himmelstoß, Kevin Erharter, Eva Renard, Eric Ennifar, Christoph Kreutz, et Ronald Micura. *Chemical Science 11, no 41. Août 2021.*

Avec l'équipe de Ronald Micura, nous nous intéressions ici à l'étude de nouvelles modifications de l'ARN utiles pour la manipulation ciblée de l'ARN. Dans cet article, une modification permettant d'augmenter la sensibilité en RMN par marquage au trifluorométhyle, la modification ribose 2'-SCF_3, est étudiée. En effet, le développement de nouveaux groupes rapporteurs permet de faciliter l'analyse spectroscopique de la structure et de la dynamique de l'ARN et des interactions ARN-ligand. Nos collaborateurs ont synthétisé des oligonucléotides comportant un marquage au 2'-OCF_3 et nous étudions l'effet de cette modification connue pour impacter la stabilité de l'appariement des bases de l'ARN. Nous démontrons ainsi que ce nouveau marqueur a un potentiel élevé pour concurrencer les marqueurs au fluor actuellement appliqués pour la spectroscopie RMN des acides nucléiques.

J'ai contribué à cet article en produisant les cristaux du fragment de la boucle sarcine-ricine (SRL) de l'ARNr 23 S d'*E. coli* contenant un seul groupe 2'-OCF_3. Après diffraction aux rayons X, la résolution de la structure obtenue est de 0,9 Å. Ainsi, nous avons pu démontrer que cette modification s'intègre bien dans le petit sillon et n'affecte pas la structure globale de l'ARN.

Chemical Science

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

EDGE ARTICLE

View Article Online
View Journal | View Issue

Check for updates

Cite this: *Chem. Sci.*, 2020, **11**, 11322

All publication charges for this article have been paid for by the Royal Society of Chemistry

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

2′-*O*-Trifluoromethylated RNA – a powerful modification for RNA chemistry and NMR spectroscopy†‡

Maximilian Himmelstoß,[a] Kevin Erharter,[a] Eva Renard,[b] Eric Ennifar,*[b] Christoph Kreutz *[a] and Ronald Micura *[a]

New RNA modifications are needed to advance our toolbox for targeted manipulation of RNA. In particular, the development of high-performance reporter groups facilitating spectroscopic analysis of RNA structure and dynamics, and of RNA–ligand interactions has attracted considerable interest. To this end, fluorine labeling in conjunction with ^{19}F-NMR spectroscopy has emerged as a powerful strategy. Appropriate probes for RNA previously focused on single fluorine atoms attached to the 5-position of pyrimidine nucleobases or at the ribose 2′-position. To increase NMR sensitivity, trifluoromethyl labeling approaches have been developed, with the ribose 2′-SCF_3 modification being the most prominent one. A major drawback of the 2′-SCF_3 group, however, is its strong impact on RNA base pairing stability. Interestingly, RNA containing the structurally related 2′-OCF_3 modification has not yet been reported. Therefore, we set out to overcome the synthetic challenges toward 2′-OCF_3 labeled RNA and to investigate the impact of this modification. We present the syntheses of 2′-OCF_3 adenosine and cytidine phosphoramidites and their incorporation into oligoribonucleotides by solid-phase synthesis. Importantly, it turns out that the 2′-OCF_3 group has only a slight destabilizing effect when located in double helical regions which is consistent with the preferential C3′-endo conformation of the 2′-OCF_3 ribose as reflected in the ^3J (H1′–H2′) coupling constants. Furthermore, we demonstrate the exceptionally high sensitivity of the new label in ^{19}F-NMR analysis of RNA structure equilibria and of RNA–small molecule interactions. The study is complemented by a crystal structure at 0.9 Å resolution of a 27 nt hairpin RNA containing a single 2′-OCF_3 group that well integrates into the minor groove. The new label carries high potential to outcompete currently applied fluorine labels for nucleic acid NMR spectroscopy because of its significantly advanced performance.

Received 18th August 2020
Accepted 18th September 2020

DOI: 10.1039/d0sc04520a

rsc.li/chemical-science

Introduction

The attractiveness of fluorine labeling of biomolecules for ^{19}F-NMR spectroscopic applications originates from its unique properties, namely a 100% natural abundance, high NMR sensitivity, and large chemical shift dispersion.[1–9] Moreover, fluorine is bio-orthogonal, meaning that it is hardly encountered in native biomolecular systems.[10–15] Appropriate probes for ribonucleic acids have mainly focused on single fluorine atoms attached to the 5-position of pyrimidine nucleobases[16–20] or at the ribose 2′-position.[21–25] To further increase sensitivity, trifluoromethyl labeling approaches have been sought after,[26,27] one of them focuses on ribose 2′-trifluoromethylthio (2′-SCF_3) modifications.[28–30] A drawback of the 2′-SCF_3 group, however, is its strong impact on RNA thermodynamic stability when located in base-paired regions.[29] Interestingly, the structurally related 2′-*O*-trifluoromethyl (2′-OCF_3) RNA has not been reported thus far. To the best of our knowledge, only one study is available that describes the thermodynamic stabilities of a short DNA containing a single 2′-OCF_3 group that is paired to either a complementary DNA or RNA strand.[31] We expected the 2′-OCF_3 modification highly beneficial for RNA and ^{19}F-NMR spectroscopic applications to analyze structural dynamics and ligand interactions, and therefore, we set out to overcome the underlying challenges in chemical synthesis. In this work, we present synthetic routes toward 2′-OCF_3 nucleoside phosphoramidites

[a]*University of Innsbruck, Institute of Organic Chemistry, Center for Molecular Biosciences (CMBI), Innrain 80-82, 6020 Innsbruck, Austria. E-mail: ronald.micura@uibk.ac.at; christoph.kreutz@uibk.ac.at*

[b]*Université de Strasbourg, Architecture et Réactivité de l'ARN–CNRS UPR 9002, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67000 Strasbourg, France. E-mail: e.ennifar@ibmc-cnrs.unistra.fr*

† R. M. dedicates this paper to Prof. Karl Grubmayr, who has been a wonderful mentor, on the occasion of his 70th birthday.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic procedures and analysis data for the synthesis of phosphoramidite **A7**, **C7a** and **C7b**; table of 2′-OCF_3 RNAs synthesized; ^{1}H, ^{13}C and ^{19}F-NMR spectroscopic analysis of 2′-OCF_3 RNAs; table of X-ray data collection and refinement statistics; additional views and overlays of X-ray structures of 2′-OCF_3 SRL RNA and hydration patterns. See DOI: 10.1039/d0sc04520a

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

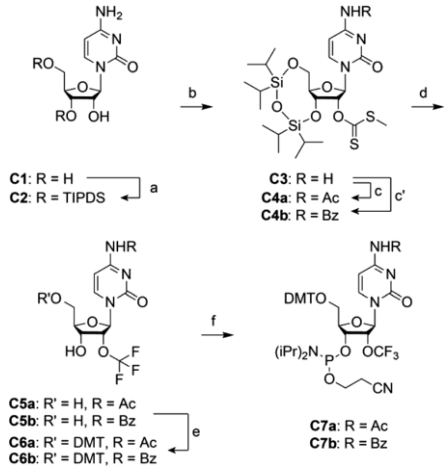
and their incorporation into oligoribonucleotides by RNA solid-phase synthesis. Furthermore, we describe the impact of the 2′-OCF_3 group on thermodynamic stability of RNA double helices which is only slightly destabilizing when located in double helical regions. This finding is consistent with a preferential C3′-endo conformation of the 2′-OCF_3 ribose in short single stranded RNA as shown by measurements and interpretation of H1′–H2′ coupling constants. Moreover, we demonstrate the exceptionally high sensitivity of the new label in ^{19}F-NMR analysis of RNA structure equilibria and of RNA–small molecule interactions. The study is complemented by crystal structures of an RNA hairpin including 2′-OCF_3 modifications.

Results and discussion

The syntheses of 2′-OCF_3 nucleoside phosphoramidites followed the previously described route of a 2′-OCF_3 adenosine derivative[31] and involved a method by Hiyama *et al.* who reported that methyl xanthates R-OC(S)SMe are converted into trifluoromethyl ethers R-OCF_3 by treatment with pyridinium poly(hydrogen fluoride) (HF/pyridine) in the presence of 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin (DBH).[32] A drawback however is the low yield of this transformation.

Synthesis of 2′-OCF_3 cytidine

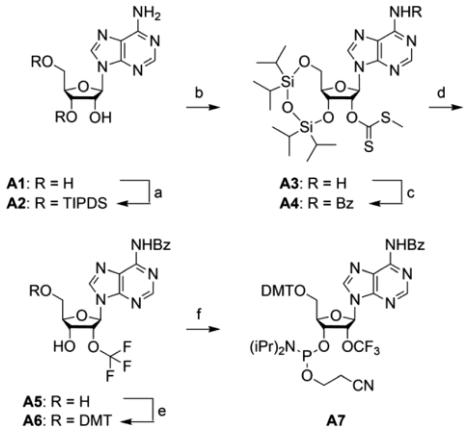
For building block **C7** (Scheme 1), we started the synthesis from cytidine **C1**, which was simultaneously protected at the 3′ and 5′ oxygen atoms with the tetraisopropyldisiloxane (TIPDS) group (Scheme 1). Compound **C2** was then treated with *tert*-BuLi, carbon disulfide and methyl iodide in tetrahydrofuran at −78 °C to yield the 2′-*O*-[(methylthio)-thiocarbonyl]cytidine derivative **C3**. After acetylation of the exocyclic NH_2 group to furnish **C4a**, the desired 2′-*O*-trifluoromethyl derivative **C5a** was obtained in low yields by treatment with pyridinium poly(-hydrogen fluoride) (HF/pyridine) in the presence of *N*-bromo-succinimide (NBS) instead of DBH as mentioned above. Finally, **C5a** was transformed into the dimethoxytritylated compound **C6a**, and conversion into the corresponding phosphoramidite **C7a** was accomplished in good yields by reaction with 2-cyanoethyl *N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidite. Starting with cytidine **C1**, our route provides **C7a** in 4% overall yield in six steps with six chromatographic purifications; in total, 0.5 g of **C7a** was obtained in the course of this study. We mention that the yields of trifluoromethylation can be increased by switching from N^4-acetyl to N^4-benzoyl protection (Scheme 1). The higher stability of the latter (compound **4b**) against hydrolysis increased the yields by 50% comparing the transformation of **4a** into **5a** with **4b** into **5b**. However, one has to be aware that N^4-benzoyl cytidine in synthetic RNA can be transaminated to some extent (<10%) when deprotection reagents containing methylamine are applied.[33,34]



Scheme 1 Synthesis of 2′-OCF_3 cytidine building block **C7**. Reaction conditions: (a) 1.1 equiv. TIPDSCl_2, in pyridine, room temperature, 5 h, 86%; (b) 1.2 equiv. ^{t}BuLi, 9.0 equiv. CS_2, 3.0 equiv. CH_3I, in THF, −75 °C to room temperature, 18 h, 77%; (c) 3.0 equiv. acetic anhydride, in pyridine, room temperature, 16 h, 90%; (c′) 1.1 equiv. benzoic anhydride, in DMF, room temperature, 16 h, 90%; (d) 5.0 equiv. NBS, in HF pyridine and CH_2Cl_2, −75 °C to 0 °C, 3 h, 11% for **C5a**, 16% for **C5b**; (e) 1.4 equiv. DMTCl, 0.4 equiv. DMAP, in pyridine, room temperature, 16 h, 76% for **C6a**, 86% for **C6b**; (f) 2.5 equiv. 2-cyanoethyl *N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidite, 7.5 equiv. iPr_2NEt, 0.5 equiv. 1-methylimidazole, in CH_2Cl_2, room temperature, 2 h, 74% for **C7a**, 92% for **C7b**.

Synthesis of 2′-OCF_3 adenosine

For building block **A7** (Scheme 2), we started the synthesis from adenosine **A1**, which was simultaneously protected at the 3′ and 5′ oxygen atoms with the TIPDS group (Scheme 2). Compound **A2** was treated with *tert*-BuLi, carbon disulfide and methyl



Scheme 2 Synthesis of 2′-OCF_3 adenosine building block **A7**. Reaction conditions: (a) 1.1 equiv. TIPDSCl_2, in pyridine, room temperature, 5 h, 95%; (b) 1.2 equiv. ^{t}BuLi, 9.0 equiv. CS_2, 3.0 equiv. CH_3I, in THF, −75 °C to room temperature, 18 h, 74%; (c) 2.5 equiv. benzoylchloride, 6 equiv. NH_3, in pyridine, room temperature, 16 h, 89%; (d) 5.0 equiv. NBS, in HF pyridine and CH_2Cl_2, −75 °C to 0 °C, 3 h, 26%; (e) 1.5 equiv. DMTCl, 0.5 equiv. DMAP, in pyridine, room temperature, 16 h, 88%; (f) 2.5 equiv. 2-cyanoethyl *N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidite, 7.5 equiv. iPr_2NEt, 0.5 equiv. 1-methylimidazole, in CH_2Cl_2, room temperature, 2 h, 82%.

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

iodide in tetrahydrofuran at −78 °C to yield the 2′-*O*-[(methylthio)-thiocarbonyl]cytidine derivative **A3**. After benzoylation of the exocyclic NH_2 group to furnish **A4**, the desired 2′-*O*-trifluoromethyl derivative **A5** was obtained by treatment with HF/pyridine in the presence of NBS. Yields were significantly higher compared to the same transformation on cytidine (**C4** into **C5**). Finally, **A5** was transformed into the dimethoxytritylated compound **A6**, and conversion into the corresponding phosphoramidite **A7** was accomplished in good yields by reaction with 2-cyanoethyl *N*,*N*-diisopropylchlorophosphoramidite. Starting with adenosine **A1**, our route provides **A7** in 12% overall yield in six steps with six chromatographic purifications; in total, 1.2 g of **A7** was obtained in the course of this study.

We mention that in an attempt to increase the yields for the 2′-*O* trifluoromethylation step, we tested silver-mediated oxidative *O*-trifluoromethylation of a 3′,5′-*O* protected adenosine derivative using $TMSCF_3$, following a published protocol,[65] but unfortunately failed. Currently, we are planning to elaborate routes for 2′-OCF_3 uridine and guanosine building blocks *via* the here described methyl xanthate intermediates. This should be feasible provided proper protection concepts for N3-H and N1-H, respectively, can be identified.

RNA solid-phase synthesis

The solid-phase synthesis of RNA with site-specific 2′-OCF_3 modifications was performed following the 2′-*O*-[(triisopropylsilyl)oxy]methyl (TOM) approach.[35,36] Coupling yields of the novel building blocks were higher than 98% according to the trityl assay. Cleavage of the oligonucleotides from the solid support and their deprotection were performed using methylamine in water/ethanol or methylamine/ammonia in water (AMA), followed by treatment with tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) in tetrahydrofuran. Salts were removed by size-exclusion chromatography, and RNAs were purified by anion-exchange chromatography under denaturating conditions (6 M urea, 80 °C; Fig. 1 and ESI Table 1‡). The molecular weights of the purified RNAs were confirmed by liquid-chromatography (LC) electrospray-ionization (ESI) mass spectrometry (MS). The sequences of 2′-OCF_3 containing RNAs synthesized in the course of this study are listed in ESI Table 1.‡

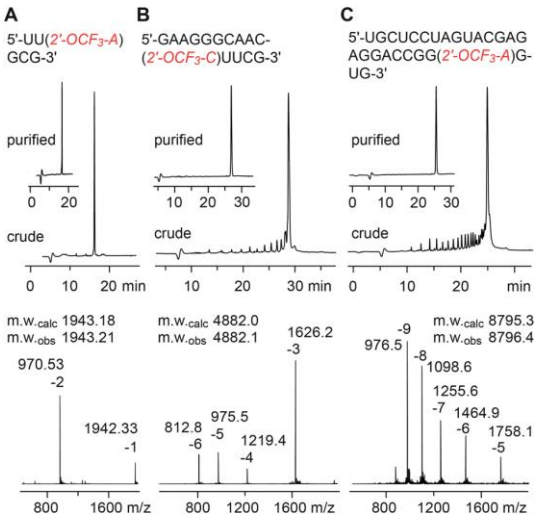


Fig. 1 Characterization of 2′-OCF_3 modified RNA. Anion-exchange HPLC traces (top) of 6 nt RNA (A), 15 nt RNA (B), and 27 nt RNA (C), and corresponding LC-ESI mass spectra (bottom). HPLC conditions: Dionex DNAPac column (4 × 250 mm), 80 °C, 1 mL min^{-1}, 0–60% buffer B in 45 min; buffer A: Tris–HCl (25 mM), urea (6 M), pH 8.0; buffer B: Tris–HCl (25 mM), urea (6 M), $NaClO_4$ (0.5 M), pH 8.0. For LC-ESI MS conditions, see the ESI.‡

Table 1 Thermodynamic parameters of 2′-OCF_3 modified RNA obtained by UV melting profile analysis (including unmodified and 2′-SCF_3 modified reference RNAs)[a]

Sequence (5′ → 3′)	T_m [°C]	ΔG°_{298} [kcal mol^{-1}]	ΔH° [kcal mol^{-1}]	ΔS° [cal mol^{-1} K^{-1}]
GGUCGACC	59.1	−14.3	−72.0	−193
GGUCG**A**CC	52.7	−12.6	−69.1	−189
GAAGG-GCAA-CCUUCG	73.3	−6.0	−46.0	−134
GA**A**GG-GCAA-CCUUCG	70.3	−5.8	−46.7	−137
GA$\underline{A^S}$GG-GCAA-CCUUCG[30]	57.4	−5.5	−57.9	−176
GAAGG-GCAA-C**C**UUCG	66.8	−4.9	−41.7	−124
GAAGG-GCAA-C$\underline{C^S}$UUCG[29]	53.3	−4.4	−50.4	−154
GAAGG-GC**A**A-CCUUCG	74.0	−8.3	−60.9	−177

[a] A 2′-OCF_3 adenosine, C 2′-OCF_3 cytidine, $\underline{A^S}$ 2′-SCF_3 adenosine,[30] $\underline{C^S}$ 2′-SCF_3 cytidine.[29] Buffer: 10 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 7.0. ΔH and ΔS values were obtained by van't Hoff analysis according to ref. 37 and 38. Errors for ΔH and ΔS, arising from non-infinite cooperativity of two-state transitions and from the assumption of a temperature-independent enthalpy, are typically 10–15%. Additional error is introduced when free energies are extrapolated far from melting transitions; errors for ΔG are typically 3–5%.

Thermodynamic stability of 2′-OCF_3 modified RNA

A single 2′-OCF_3 adenosine exhibited only moderate attenuation of RNA double helix stability if the modification was located in the Watson–Crick base-pairing region (Table 1). For instance, UV melting profile analysis[37,38] of the hairpin-forming RNA 5′-GA(2′-OCF_3-A)GG-GCAA-CCUUCG (Fig. 2A) revealed a decrease of the T_m value by 3 °C determined at micromolar RNA concentrations (T_m 70.3 °C), compared to the unmodified counterpart (T_m 73.3 °C). We remind that the same RNA but with a 2′-SCF_3 modification at the same nucleotide position caused a much stronger drop in the T_m value, namely by 14 °C (Table 1).[29] As a second example, the palindromic RNA 5′-GGUCG(2′-OCF_3-A)CC (Fig. 2B) also suffered from an average T_m value decrease of 3 °C per 2′-OCF_3-A modification (micromolar RNA concentrations), compared to the unmodified counterpart.

Next, the same hairpin was analyzed with 2′-OCF_3 at cytidine instead of adenosine, 5′-GAAGG-GCAA-C(2′-OCF_3-C)UUCG (Fig. 2C). The destabilization was reflected by a 6.5 °C lower T_m

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

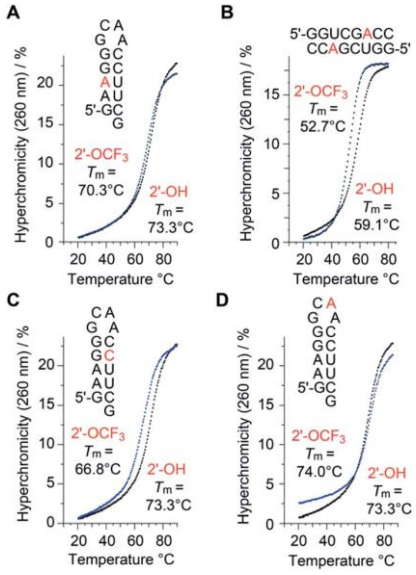


Fig. 2 Thermal stabilities of unmodified *versus* 2′-OCF_3 modified oligoribonucleotides. UV-melting profiles of hairpin and self-complementary duplex RNAs with the modification (either at adenosine or cytidine) located in the base-pairing region (A–C), and UV-melting profile of the same hairpin sequence with the modification in the GNRA loop motif (D). Conditions: c(RNA) = 12 μM; 10 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, pH 7.0. Nucleotides in red color indicate the positions for 2′-OCF_3 modification.

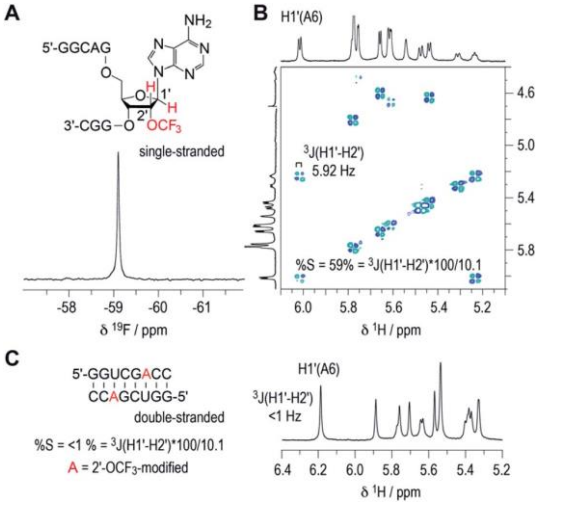


Fig. 3 ^{19}F (A) and $^{1}H/^{1}H$ DQFCOSY (B) NMR spectra of single-stranded RNA 5′-GGCAG(2′-OCF_3-A)GGC. For the 2′-OCF_3 adenosine moiety, the 3-bond scalar coupling constant of H1′ and H2′ (^3JH1′-H2′) was extracted from the corresponding crosspeak and amounted to 5.9 Hz. Assuming a pure C2′/C3′-endo equilibrium, this value is correlated to a C2′-endo (South) population of 58%.[38,40] (C) ^1H NMR spectrum of the self-complementary 8 nt RNA with 2′-OCF_3-A group (red); ^3JH1′–H2′ is smaller than 1 Hz, consistent with prevalent C3′-endo conformation in the double helix. Conditions: c(RNA) = 0.3 mM; 15 mM Na[AsO_2(CH_3)$_2$]·3H_2O, 25 mM NaCl, 3 mM NaN_3, in D_2O, pH 6.5, 296 K.

value compared to the unmodified hairpin, still significantly less compared to the 2′-SCF_3-C modification that caused a T_m reduction by 20 °C of this hairpin (Table 1).[29] We point out that the significantly larger destabilization of 2′-SCF_3 compared to the 2′-OCF_3 modified double helices is of entropic origin (Table 1).

Notably, when the 2′-OCF_3 group resides in a single-stranded region, the impact on thermodynamic stability is minor, and in the case of the extra-stable GNRA loop motif even modestly stabilizing, reflected by an increase of the T_m value and a favorable ΔG value for 5′-GAAGG-GC(2′-OCF_3-A)A-CCUUCG (Fig. 2D and Table 1). The stabilization is rationalized by the fact that unmodified adenosine in GCAA loops preferentially adopts the C3′-endo ribose pucker (70%).[39–41] The C3′-endo conformation in this loop becomes locked when the 2′-OCF_3 group is attached, as verified by NMR spectroscopic analysis (ESI Fig. 1A‡). The very same hairpin was also used to demonstrate the impressive ^{19}F NMR spectroscopic sensitivity of the 2′-OCF_3 label compared to a 2′-F label (ESI Fig. 1B and C‡).

Taken together, our original expectation that the 2′-OCF_3 modification compared to 2′-SCF_3 is more potent for a broad scope of applications because of being less destabilizing and retaining the high sensitivity, turned out to be correct (Fig. 2, Table 1 and ESI Fig. 1‡).

2′-OCF_3 ribose conformation

The inherent preference of a modified nucleoside to adopt either C2′-endo or C3′-endo conformation is crucial for its impact on thermodynamic base pairing stability.[42–45] To analyze the ribose conformation of a 2′-OCF_3 nucleoside in detail, we synthesized a short, single-stranded RNA, 5′-GGCAG(2′-OCF_3-A)GGC, and determined the ^3J (H1′–H2′) coupling constant from a 2D $^1H,^1H$ double quantum filtered COSY spectrum (DQFCOSY). The coupling constant amounted to 5.9 Hz, which translates into a population of about 60% of C2′-endo ribose conformation in the single strand (Fig. 3A and B; for ^1H–^{13}C HSQC spectrum see ESI Fig. 2‡). We then recorded the ^1H NMR spectrum of a self-complementary, fully base-paired 8 nt RNA duplex with 2′-OCF_3-A modification (Fig. 3C). The ^3JH1′–H2′ was clearly smaller than 1 Hz, consistent with the requirement to adopt C3′-endo conformation in an RNA double helix to avoid steric clash. Notably, for the previously investigated 2′-SCF_3 adenosine and -cytidine, the ^3J (H1′–H2′) coupling constants amount to 9.7 and 10.4 Hz,[29,30] respectively, provided they reside in a single-stranded short RNA. This in turn stands for a population of almost 100% of C2′-endo conformation. The strong C2′-endo preference of 2′-SCF_3 modified nucleosides likely provides a rationale for the significantly higher thermodynamic destabilization if they are encountered in base paired regions.[29,30] Further support for this hypothesis stems from the analysis of 5′-GGCAG(2′-F-A)GGC. For the 2′-F labeled nucleoside, the ^3J (H1′–H2′) coupling constant was less than 1 Hz (ESI Fig. 3A‡) which corresponds to a population of almost 100% C3′-endo conformation in the single strand. This 'pre-folding' is a rationale for the slight stabilization when 2′-F becomes located in a double helix.[25]

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

X-ray structures of 2′-OCF_3 containing RNA

We set out for the X-ray analysis of a 2′-OCF_3 modified RNA (Fig. 4). To this end, we used the 27 nt fragment of *E. coli* 23 S rRNA sarcin-ricin loop (SRL) region. This sequence is known to be a robust and well-behaved crystallization scaffold that can accommodate small modifications.[46,47] For the installation of 2′-OCF_3, we deemed nucleotide A2670 appropriate which forms a Watson–Crick base pair with U2650 in the regular A-form double helical region of this RNA, as well as nucleotide C2667 which forms a water-mediated mismatch with U2653. The latter RNA crystallized in the same tetragonal crystal form as the unmodified RNA[46] and also diffracted to atomic resolution (0.9 Å). A new monoclinic crystal form was obtained with 2′-OCF_3 A2670-modified SRL RNA (relative to former SRL RNA crystal forms), containing three molecules per asymmetric unit and diffracting to 2.4 Å resolution (ESI Table 2‡). The 2′-OCF_3 modification did not affect the overall structure (r.m.s.d. ~0.4 Å for 2′-OCF_3–C2667 compared to the unmodified structure; PDB ID 3DVZ), including sugar puckers of modified positions (ESI Fig. 4‡). As previously observed for the 2′-SCF_3–C2667 modification,[29] a fluorine atom of the 2′-OCF_3 group closely approached the oxygen atom of its cytosine nucleobase (O2). It is tempting to assume that the short distance observed (2.9 Å) is indicative of a halogen bond, however, fluorine (as opposed to chlorine, bromine, or iodine) usually retains a strongly electronegative electrostatic potential in biomolecules.[63,64] Nevertheless, we note that the trifluoromethyl modification additionally comes also close the O4′ of the next G2668 residue (O–F distance is 3.2 Å, ESI Fig. 5‡) which further fuels speculations on possible stabilizing interactions.

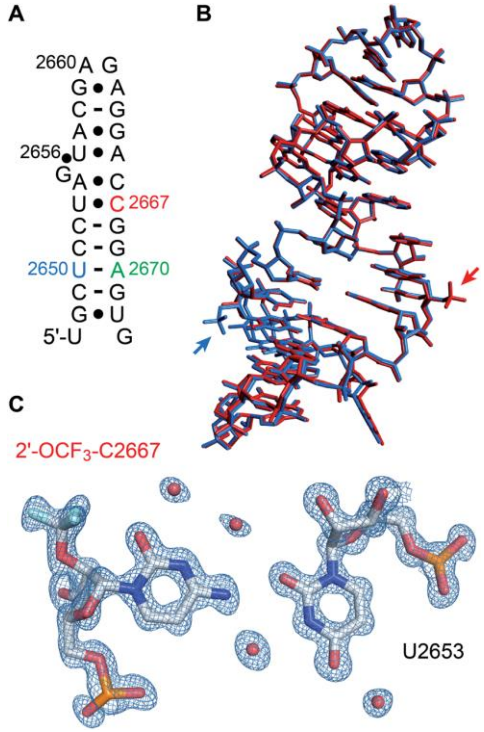


Fig. 4 X-ray structure of 2′-OCF_3 modified RNA at atomic resolution. (A) Secondary structure of the *E. coli* Sarcin-ricin stem-loop (SRL) RNA used for crystallization. The 2′-OCF_3 modified cytidine is labeled in red. Adenosine in green highlights the second 2′-OCF_3 modified RNA solved in this study (see ESI Fig. 4 and 5‡) and uridine in blue refers to a previously solved 2′-SCF_3 modified SRL RNA for reason of comparison.[29] (B) Superimposition of the 2′-OCF_3–C2667 modified RNA (PDB ID 6ZYB red) and 2′-SCF_3–U2650 modified RNA (PDB ID 4NHX, blue). Trifluoromethyl modifications are visible outside the RNA stem loop (on the center-right for OCF_3 and in the bottom-left for SCF_3). (C) $2F_{obs} - F_{calc}$ electron density map contoured at 1.5 σ level showing the U2653/2′-OCF_3-C2667 base pair. Water molecules are shown as red spheres (PDB ID 6ZYB).

2′-OCF_3 NMR analysis of structure-ambivalent RNA

The biological function of RNA is determined by the secondary and tertiary structure, defining the RNA fold.[48] The folding path usually proceeds *via* intermediates that represent local minima in the RNA folding free energy landscape. When these intermediates are separated by large energy barriers they constitute folding traps and, therefore, the timescale of the folding process may take up to minutes and longer. One of the most prominent examples is a single RNA sequence of 150 nucleotides in length that co-exists in two stable folds harboring distinct ribozyme activities.[49] Even for shorter RNA, structure ambivalence is encountered, *e.g.* hairpin-duplex equilibria of palindromic RNAs or the occurrence of competing secondary structures of the same RNA.[50,51] The latter plays a crucial role in bacterial gene regulation by so-called riboswitches which are located in the untranslated leader regions of nascent mRNA where terminator stem *versus* antiterminator formation during transcription signals ON or OFF.[52]

Fig. 5 illustrates a short bistable RNA that competes between two defined secondary structures. The CF_3 label is attached at the adenosine in sequence position 3 and hence resides in the double helical stem of one fold while it is found in the single stranded overhang of the alternative fold (Fig. 5A and ESI Fig. 6‡). At room temperature (and also at slightly increased temperatures), the two folds are in slow exchange with respect to the NMR time scale. Two distinct ^{19}F resonances are obtained (Fig. 5A and B) and assigned by comparison to a short reference hairpin that matches one substructure and adopts a single fold only (Fig. 5A). Interestingly, the line-widths of the two ^{19}F resonances arising from the 2′-OCF_3 group in the two folding states exhibit a large difference. The half-height line-width is 7 Hz for the 'single strand'–^{19}F resonance while it is increased by a factor of almost three for the 'double helix'–^{19}F resonance (20 Hz). Likely, the rotation of the 2′-OCF_3 group in the base-paired stem is sterically hindered leading to signal broadening due to exchange on the µs to ms time scale.

The sensitive 2′-OCF_3 label was also used to analyze the underlying kinetics of refolding for the bistable RNA. For that purpose, we used ^{19}F longitudinal exchange NMR spectroscopy.[53–55] As expected we found two ^{19}F correlation peaks (fold A and fold B) in the ^{19}F NOESY exchange spectrum of the RNA (with a single 2′-OCF_3 labeled adenosine) for which exchange

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

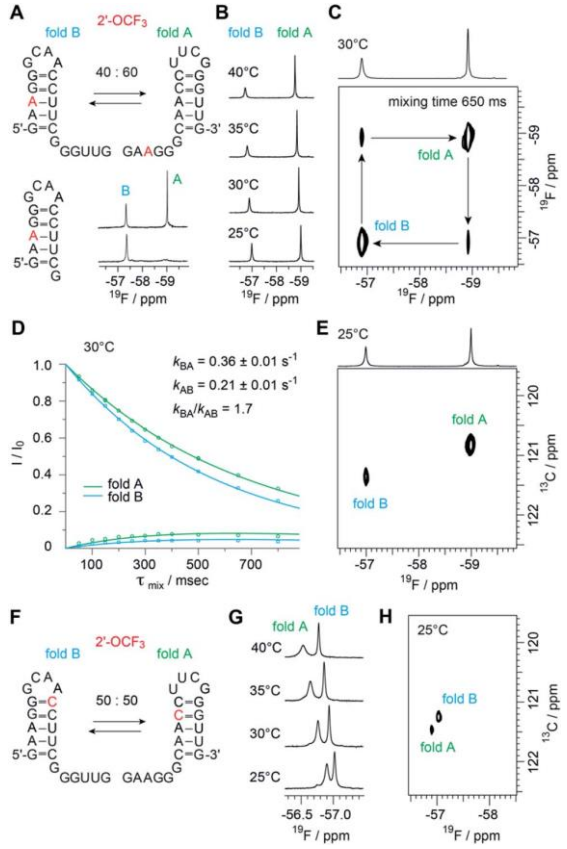


Fig. 5 Structure probing of a bistable RNA with a single 2′-OCF_3 label. (A) Secondary structure of full-length (top left) and reference RNA (bottom left), both with the 2′-OCF_3 labeled A3, and ^{19}F-NMR (470 MHz) spectra (bottom right). Conditions: c(RNA) = 0.3 mM, 15 mM sodium cacodylate, 25 mM NaCl, pH 6.5, H_2O/D_2O = 9 : 1, 298 K; (B) temperature-dependent series of ^{19}F-NMR (564 MHz) spectra. (C) ^{19}F/^{19}F-EXSY (564 MHz) spectrum (650 ms mixing time, same conditions as in (A)). The crosspeaks between the ^{19}F resonances assigned to the two folds originate from a chemical exchange process between the two folds at the millisecond time scale. (D) Exchange peaks build-up and R_1 decay curves of the exchange experiment for residue A3 for the forward and backward folding event. Exchange rates are indicated, the following longitudinal relaxation rates were obtained: $R_{1A} = 1.01 \pm 0.11\ s^{-1}$, $R_{1B} = 1.56 \pm 0.18\ s^{-1}$. The experiments were run at mixing times ranging from 50 ms to 800 ms at 303 K. Dots are the experimental data, fits are shown as solid lines. Error rates were determined by Monte Carlo analysis with peak intensities randomly modulated according to noise levels exchange spectra. (E) ^{19}F–^{13}C HSQC spectrum of the RNA shown in panel A. (F) Same RNA but with 2′-OCF_3 label at C10. (G) Temperature-dependent series of ^{19}F-NMR spectra. (H) ^{19}F–^{13}C HSQC spectrum of the RNA shown in panel F.

peaks could be identified (Fig. 5C). The forward and backward folding rates of the secondary structure equilibrium were determined at 30 °C (Fig. 5D). We found a forward rate constant k_{BA} of 0.36 ± 0.01 s^{-1} and a rate constant k_{AB} for the folding process from state A to state B of 0.21 ± 0.01 s^{-1}, giving a good agreement with the equilibrium constant obtained from peak integration ($K_{AB}^{Int,30°C} = 1.9$ and $K_{AB}^{30°C} = k_{BA}/k_{AB} = 1.7$). Using our ^{19}F labeling approach, we were thus able to characterize the refolding kinetics of the bistable RNA under near physiological conditions.

Furthermore, to analyze the impact of the labeling position we synthesized the same bistable RNA but with 2′-OCF_3 at C10. As expected, we observed two distinct ^{19}F NMR resonances for the two folds in slow exchange, albeit the chemical shift difference was smaller, consistent with the label located in double helical regions in both folds (Fig. 5F). The equilibrium position (50 : 50) (Fig. 5G and ESI Fig. 7‡) was only slightly shifted compared the 2′-OCF_3 A3 labeled counterpart (40 : 60) and confirmed the flexibility for 2′-OCF_3 positioning despite of being a non-isosteric label. At this point, we also mention that the native (unmodified) RNA exists in a 50 : 50 equilibrium as was determined earlier.[23]

With respect to increasing temperatures, the ^{19}F NMR resonances shifted to lower magnetic field. This shift was more pronounced for the 2′-OCF_3–C labeled RNA (Fig. 5G) compared to the 2′-OCF_3–A labeled RNA (Fig. 5B), which might be due to fraying of the loop closing base pair of which 2′-OCF_3–C is part of (Fig. 5F, fold B).

Finally, we characterized both RNAs by recording ^{19}F–^{13}C HMQC spectra (Fig. 5E and H). We were able to obtain high quality natural abundance ^{19}F ^{13}C correlation spectra for rather dilute samples (*ca.* 150 μM each fold) overnight. By adding the carbon dimension, better spectral dispersion is obtained, which in principle would allow to apply ^{13}C ZZ exchange spectroscopy in 2′-O$^{13}CF_3$ labeled systems. It will be further highly interesting to explore the TROSY properties of the 2′-O$^{13}CF_3$ methyl group in RNA by combining ^{19}F and ^{13}C stable isotope labeling. In a recent work by Sykes and co-workers no favorable TROSY effect in proteins was found using 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetone as labeling reagents. The absence of the TROSY effect was attributed to the dominating CSA relaxation mechanism in the alpha CF_3 group suggesting that gains from CF_3-HMQC experiments should be only observable at low magnetic fields.[62] Nevertheless, it remains to be clarified if the 2′-O$^{13}CF_3$ shows a more beneficial TROSY effect due to the different chemical environment.

2′-OCF_3 NMR analysis of RNA-ligand binding

The new 2′-OCF_3–label is highly practical for NMR studies of RNA–ligand interactions. In Fig. 6, a comparison of the 7-aminomethyl-7-deazaguanine ($preQ_1$) sensing class-I riboswitches from *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*Tte*) (Fig. 6A) and *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) is illustrated (Fig. 6B).[56–58] These RNAs adopt the same overall fold but differ in sequence and ligand affinity, the latter by about an order of magnitude (K_d(*Tte*) ~20 nM *versus* K_d(*Fn*) ~260 nmol).[57,58] Moreover, for the *Tte* riboswitch, crystal structures at high resolution exist of both, the free and the $preQ_1$-bound RNA,[57] and therefore a solid foundation to explore the underlying conformational adaptions during ligand-induced folding is available.

At the left side of Fig. 6A, a secondary structure folding model for the $preQ_1$ riboswitch is shown. The two RNAs with

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

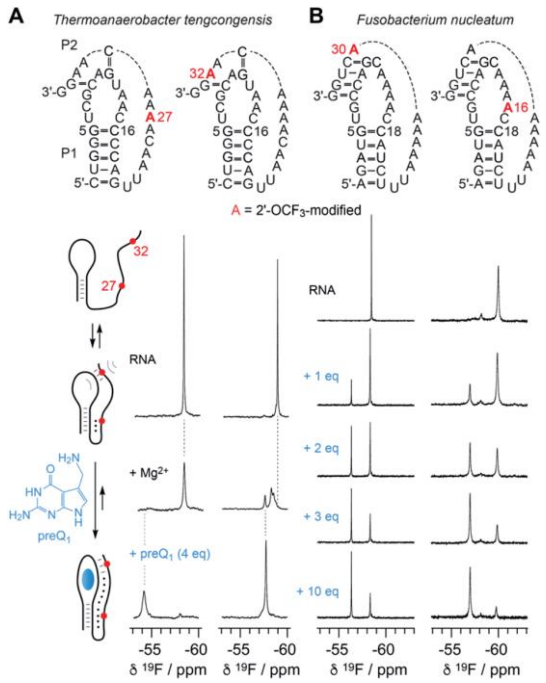


Fig. 6 NMR spectroscopic analysis of RNA-ligand binding. (A) Secondary structure of *Thermoanaerobacter tengcongensis* $preQ_1$-I riboswitch with 2′-OCF_3 position indicated in red (top); schematic folding model (left) of aptamer-assisted RNA pseudoknot formation, and stabilization through binding of the small molecule 7-aminomethyl-7-deazaguanine ($preQ_1$) indicated in blue; ^{19}F NMR (564 MHz) spectra of RNA in response to Mg^{2+} and $preQ_1$ addition (right). Conditions: c(RNA) = 0.14 mM, 15 mM sodium cacodylate, 25 mM NaCl, pH 6.5, 297 K; additions: $c(Mg^{2+}) = 2.0$ mM; followed by c($preQ_1$) equivalents as indicated. (B) Secondary structure of *Fusobacterium nucleatum* $preQ_1$-I riboswitch with two distinct 2′-OCF_3 positions in red (top). ^{19}F NMR (564 MHz) spectra of RNA in response to $preQ_1$ titrations (right). Conditions: c(RNA) = 0.3 mM, 25 mM sodium cacodylate, pH 6.5, 298 K; additions: $c(Mg^{2+}) = 2.0$ mM; followed by c($preQ_1$) equivalents as indicated.

a single 2′-OCF_3 label at either position 27 or 32 give a single ^{19}F resonance in the absence of Mg^{2+} (Fig. 6A, spectra at top) which is consistent with a stem-loop fold and a conformationally flexible 3′-tail. In the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and a 3-fold excess of $preQ_1$ ligand, both RNAs again provide a single – albeit broadened – resonance that is significantly shifted to low-field (Fig. 6A, spectra at bottom). This is consistent with a defined conformation of the $preQ_1$–bound state. When only Mg^{2+} (and no $preQ_1$) is added, the RNA becomes partially preorganized into a pseudoknot. Interestingly, the label at position 32 indicates heterogeneities within (or close to) the loop–tail interaction, reflected by the occurrence of three, partly overlapping ^{19}F-resonances (Fig. 6A, spectrum at middle right). This suggests three distinct conformations in slow exchange, one of them closely resembling the ligand-bound state according to chemical shift comparison. We note that the observation of three states is consistent with a previous NMR study where the formation of individual (^{15}N-labeled) base pairs of the same riboswitch system was tracked.[59] We furthermore believe that two of the three folding states likely correspond to the conformational distinction seen in high-resolution crystal structures of free *versus* $preQ_1$-bound *Tte* RNA. In the ligand-free pseudoknot form, A14 takes the position of the $preQ_1$ ligand and is stacked between the two base pairs of G11–C30 and G5–C16.[57,59] This observation can be rationalized by a conformational rearrangement from a solvent-exposed base C15 to a flipped-in conformation of C15 that becomes the Watson–Crick pairing partner of $preQ_1$ in the ligand-bound pseudoknot RNA.[60]

Fig. 6B depicts NMR spectra of the titration of the *Fn* $preQ_1$ riboswitch which binds $preQ_1$ 13-fold weaker compared to the *Tte* counterpart. Furthermore, the loop size of the *Fn* RNA contains two additional nucleotides and the pseudoknot interaction allows formation of a continuous 4 bp double helix.[61] We placed the 2′-OCF_3 labels in different positions, one in the tail to sense pseudoknot formation, and the other one in the loop next to the cytosine that can form a Watson–Crick base pair with $preQ_1$. Both labels allow to monitor the binding process. By increasing the concentration of $preQ_1$ stepwise, an increasing fraction of the $preQ_1$-RNA complex is observed, reflected in a second ^{19}F resonance that is shifted to lower field. In contrast to the *Tte* RNA, the *Fn* riboswitch shows a significant population of unbound RNA, even at a ten-fold excess of ligand over RNA. Furthermore, a folding intermediate is also indicated by the appearance of a third resonance for the 2′-OCF_3 A16 labeled RNA, although existing in a minor population only. Another interesting feature is that the line width of the ^{19}F resonance of the label next to the pseudoknot double helix (A30) is rather small and the OCF_3 group seems to be hardly hindered in rotational freedom compared to the other three labeling positions in the two riboswitch systems.

Conclusions

Over the last decades, several ^{19}F labels for nucleic acids NMR spectroscopy have been introduced, among them are single fluorine labels (such as pyrimidine 5-F,[16–20] ribose 2′-F,[21–25] and 4′-F,[3]), trifluoromethyl labels (such as pyrimidine 5-CF_3,[26] 4′-*C*-[(4-trifluoromethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl] ribose,[27] 2′-SCF_3,[28–30] and very recently 8-CF_3 guanine,[66]), and a nine-fluorine-atom label (in form of 5-[4,4,4-trifluoro-3,3-bis(trifluoromethyl)but-1-ynyl] 2′-deoxyuridine).[4] Comparing them, the first subgroup is superior with respect to steric demands but suffers from low sensitivity and the need for proton decoupling;[21–25] the opposite is true for the nine-fluorine-atom label which is highly sensitive but sterically demanding.[4] Therefore, trifluoromethyl labels appear to be a good compromise.[26–30] The pyrimidine 5-CF_3 group, however, has been described to be chemically unstable during deprotection of synthetic nucleic acids, resulting in low yields and length limitation.[26] Differently, the 2′-SCF_3 group – although synthetically well accessible – strongly affects thermodynamic base pairing strength which is a drawback for applications that aim at the elucidation of folding pathways.[28–30] All critical aspects

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

and requirements are very well satisfied by the new 2′-OCF_3 label as shown in this study; it therefore has potential to advance to the most broadly applicable fluorine label in NMR spectroscopy of nucleic acids. The 2′-OCF_3 group possesses pronounced sensitivity and exhibits large chemical shift dispersion so that it is possible to distinguish distinct base sequences in double helical regions. Moreover, the ribose 2′ position guarantees principal synthetic accessibility to all of the four nucleosides. Additionally, the size of the OCF_3 label matches the naturally occurring and widespread 2′-OCH_3 group. For the investigation of naturally occurring 2′-OCH_3 modification patterns in biologically meaningful settings, the 2′-OCF_3 group will be an ideal candidate.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank Ulrike Rieder (Innsbruck) for initial ^{19}F-NMR measurements of the *Fn* preQ$_1$ riboswitch, Martin Tollinger (Innsbruck) for advice in data fitting, and Vincent Olieric for help during data collection at SLS, Villigen. This work was supported by the Austrian Science Fund FWF (P27947, P31691, F8011-B to R. M; P32773 to C. K.), the Austrian Research Promotion Agency FFG [West Austrian BioNMR 858017], and the Wiener Wissenschafts-, Forschungs-und Technologiefonds (WWTF LS17-003).

Notes and references

1 S. Cobb and C. Murphy, *J. Fluorine Chem.*, 2009, **130**, 132.
2 F. Guo, Q. Li and C. Zhou, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 9552.
3 Q. Li, J. Chen, M. Trajkovski, Y. Zhou, C. Fan, K. Lu, P. Tang, X. Su, J. Plavec, Z. Xi and C. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 4739.
4 A. Kiviniemi and P. Virta, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8560.
5 F. Sochor, R. Silvers, D. Müller, C. Richter, B. Fürtig and H. Schwalbe, *J. Biomol. NMR*, 2016, **64**, 63.
6 R. Moumné, M. Pasco, E. Prost, T. Lecourt, L. Micouin and C. Tisné, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 13111.
7 W. Huang, G. Varani and G. P. Drobny, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 17643.
8 L. Liu, I. J. Byeon, I. Bahar and A. M. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 4229.
9 D. Graber, H. Moroder and R. Micura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 17230.
10 M. Egli and M. Manoharan, *Acc. Chem. Res.*, 2019, **52**, 1036.
11 P. Wadhwani, E. Strandberg, N. Heidenreich, J. Bürck, S. Fanghanel and A. S. Ulrich, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 6512.
12 H. L. Bao, T. Ishizuka, T. Sakamoto, K. Fujimoto, T. Uechi, N. Kenmochi and Y. Xu, *Nucleic Acids Res.*, 2017, **45**, 5501.
13 S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow and V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 320.
14 C. Li, G.-F. Wang, Y. Wang, R. Creager-Allen, E. A. Lutz, H. Scronce, K. M. Slade, R. A. S. Ruf, R. A. Mehl and G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 321.
15 E. Malek-Adamian, D. C. Guenther, S. Matsuda, S. Martínez-Montero, I. Zlatev, J. Harp, M. Burai Patrascu, D. J. Foster, J. Fakhoury, L. Perkins, N. Moitessier, R. M. Manoharan, N. Taneja, A. Bisbe, K. Charisse, M. Maier, K. G. Rajeev, M. Egli, M. Manoharan and M. Damha, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 14542.
16 M. Hennig, L. G. Scott, E. Sperling, W. Bermel and J. R. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 14911.
17 B. Puffer, C. Kreutz, U. Rieder, M. O. Ebert, R. Konrat and R. Micura, *Nucleic Acids Res.*, 2009, **37**, 7728.
18 M. Hennig, M. L. Munzarova, W. Bermel, L. G. Scott, V. Sklenar and J. R. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 5851.
19 L. G. Scott and M. Hennig, *Methods Enzymol.*, 2016, **566**, 59.
20 M. Olejniczak, Z. Gdaniec, A. Fischer, T. Grabarkiewicz, L. Bielecki and R. W. Adamiak, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 4241.
21 B. Luy and J. P. Merino, *J. Biomol. NMR*, 2001, **20**, 39.
22 B. Reif, V. Wittmann, H. Schwalbe, C. Griesinger, K. Wörner, K. Jahn-Hofmann, J. W. Engels and W. Bermel, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 1952.
23 C. Kreutz, H. Kählig, R. Konrat and R. Micura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 11558.
24 C. Kreutz, C. H. Kählig, R. Konrat and R. Micura, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 3450.
25 A. Patra, M. Paolillo, K. Charisse, M. Manoharan, E. Rozners and M. Egli, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 11863.
26 L. Granqvist and P. Virta, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 3529.
27 W. H. Gmeiner, R. T. Pon and J. W. Lown, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 3602.
28 K. Fauster, C. Kreutz and R. Micura, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 13080.
29 M. Košutić, L. Jud, C. Da Veiga, M. Frener, K. Fauster, C. Kreutz, E. Ennifar and R. Micura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 6656.
30 L. Jud, M. Košutić, V. Schwarz, M. Hartl, C. Kreutz, K. Bister and R. Micura, *Chem.–Eur. J.*, 2015, **21**, 10400.
31 N. Nishizono, Y. Sumita, Y. Ueno and A. Matsuda, *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**, 5067.
32 M. Kuroboshi, K. Suzuki and T. Hiyama, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 4173.
33 R. A. Johnsson, J. J. Bogojeski and M. J. Damha, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**, 2146.
34 M. P. Reddy, N. B. Hanna and F. Farooqui, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 4311.
35 S. Pitsch, P. A. Weiss, J. Jenny, A. Stutz and X. Wu, *Helv. Chim. Acta*, 2001, **84**, 3773.
36 F. Wachowius and C. Höbartner, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 469.
37 L. A. Marky and K. J. Breslauer, *Biopolymers*, 1987, **26**, 1601.
38 M. Petersheim and D. H. Turner, *Biochemistry*, 1983, **22**, 256.
39 F. M. Jucker, H. A. Heus, P. F. Yip, E. H. Moors and A. Pardi, *J. Mol. Biol.*, 1996, **264**, 968.

Open Access Article. Published on 24 September 2020. Downloaded on 10/26/2021 12:42:58 PM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

40 J. E. Johnson and C. G. Hoogstraten, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 16757.
41 A. J. DePaul, E. J. Thompson, S. S. Patel, K. Haldeman and E. J. Sorin, *Nucleic Acids Res.*, 2010, **38**, 4856.
42 L. Li and J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 2858.
43 J. Plavec, W. Tong and J. Chattopadhyaya, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9734.
44 A. I. Haziri and C. J. Leumann, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 5861.
45 C. Altona and M. J. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 2333.
46 V. Olieric, U. Rieder, K. Lang, A. Serganov, C. Schulze-Briese, R. Micura, P. Dumas and E. Ennifar, *RNA*, 2009, **15**, 707.
47 C. C. Correll, I. G. Wool and A. Munishkin, *J. Mol. Biol.*, 1999, **292**, 275.
48 P. Brion and E. Westhof, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1997, **26**, 113.
49 E. A. Schultes and D. P. Bartel, *Science*, 2000, **289**, 448.
50 R. Micura, C. Höbartner and C., *ChemBioChem*, 2003, **4**, 984.
51 C. Höbartner and R. Micura, *J. Mol. Biol.*, 2003, **325**, 421.
52 W. C. Winkler and R. R. Breaker, *Chembiochem*, 2003, **4**, 1024.
53 K. Kloiber, R. Spitzer, M. Tollinger, R. Konrat and C. Kreutz, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 4340.
54 C. H. Wunderlich, R. Spitzer, T. Santner, K. Fauster, M. Tollinger and C. Kreutz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 7558.
55 R. Spitzer, K. Kloiber, M. Tollinger and C. Kreutz, *Chembiochem*, 2011, **12**, 2007.
56 A. Roth, W. C. Winkler, E. E. Regulski, B. W. Lee, J. Lim, I. Jona, J. E. Barrick, A. Ritwik, J. N. Kim, R. Welz, D. Iwata-Reuyl and R. R. Breaker, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007, **14**, 308.
57 J. L. Jenkins, J. Krucinska, R. M. McCarty, V. Bandarian and J. E. Wedekind, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 24626.
58 U. Rieder, C. Kreutz and R. Micura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 10804.
59 S. Neuner, T. Santner, C. Kreutz and R. Micura, *Chem.–Eur. J.*, 2015, **21**, 11634.
60 T. Santner, U. Rieder, C. Kreutz and R. Micura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 11928.
61 U. Rieder, K. Lang, C. Kreutz, N. Polacek and R. Micura, *Chembiochem*, 2009, **10**, 1141.
62 B. A. Klein and B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR*, 2019, **73**, 519.
63 P. Auffinger, F. A. Hays, E. Westhof and P. S. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 16789.
64 D. Bulfield and S. M. Huber, *Chem. - Eur. J.*, 2016, **22**, 14434.
65 J.-B. Liu, X.-H. Xu and F.-L. Qing, *Org. Lett.*, 2015, **17**, 5048.
66 H.-L. Bao, T. Masuzawa, T. Oyoshi and Y. Xu, *Nucleic Acids Res.*, 2020, **48**, 7041.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2020

BIBLIOGRAPHIE

A

Ackermann, G., Rodloff, A.C., 2003. Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647)—the first ketolide. J Antimicrob Chemother 51, 497–511. https://doi.org/10.1093/jac/dkg123

Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol 8, 251–259. https://doi.org/10.1038/nrmicro2312

Almaghrabi, R., Clancy, C.J., Doi, Y., Hao, B., Chen, L., Shields, R.K., Press, E.G., Iovine, N.M., Townsend, B.M., Wagener, M.M., Kreiswirth, B., Nguyen, M.H., 2014. Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Strains Exhibit Diversity in Aminoglycoside-Modifying Enzymes, Which Exert Differing Effects on Plazomicin and Other Agents. Antimicrob Agents Chemother 58, 4443–4451. https://doi.org/10.1128/AAC.00099-14

Anand, N., Davis, B.D., 1960. Effect of Streptomycin on Escherichia Coli: Damage by Streptomycin to the Cell Membrane of Escherichia coli. Nature 185, 22–23. https://doi.org/10.1038/185022a0

Andremont, A., Gerbaud, G., Courvalin, P., 1986. Plasmid-mediated high-level resistance to erythromycin in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 29, 515–518.

Arenz, S., Ramu, H., Gupta, P., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., Wilson, D.N., 2014. Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide. Nature Communications 5. https://doi.org/10.1038/ncomms4501

Arenz, S., Wilson, D.N., 2016a. Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a025361. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025361

Arenz, S., Wilson, D.N., 2016b. Blast from the Past: Reassessing Forgotten Translation Inhibitors, Antibiotic Selectivity, and Resistance Mechanisms to Aid Drug Development. Molecular Cell 61, 3–14. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.019

Asai, T., Condon, C., Voulgaris, J., Zaporojets, D., Shen, B., Al-Omar, M., Squires, C., Squires, C.L., 1999a. Construction and Initial Characterization of Escherichia coli Strains with Few or No Intact Chromosomal rRNA Operons. J. Bacteriol. 181, 3803–3809. https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3803-3809.1999

Asai, T., Zaporojets, D., Squires, C., Squires, C.L., 1999b. An Escherichia coli strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: Complete exchange of rRNA genes between bacteria. PNAS 96, 1971–1976. https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1971

Audfray, A., Malvern, 2015. Introduction to Microcalorimetry 49.

Avent, M.L., Rogers, B.A., Cheng, A.C., Paterson, D.L., 2011. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. Internal Medicine Journal 41, 441–449. https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2011.02452.x

B

Bambeke, F.V., Verhaegen, J., Tulkens, P.M., 2001. Érythromycine, autres macrolides et kétolides : usages cliniques actuels et perspectives. M ISE AU POINT 14.

Barthélémy, P., Autissier, D., Gerbaud, G., Courvalin, P., 1984. Enzymic hydrolysis of erythromycin by a strain of Escherichia coli. A new mechanism of resistance. J Antibiot (Tokyo) 37, 1692–1696. https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1692

Becker, B., Cooper, M.A., 2013. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. ACS Chem. Biol. 8, 105–115. https://doi.org/10.1021/cb3005116

Beckert, B., Leroy, E.C., Sothiselvam, S., Bock, L.V., Svetlov, M.S., Graf, M., Arenz, S., Abdelshahid, M., Seip, B., Grubmüller, H., Mankin, A.S., Innis, C.A., Vázquez-Laslop, N., Wilson, D.N., 2021. Structural and mechanistic basis for translation inhibition by macrolide and ketolide antibiotics. Nat Commun 12, 4466. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24674-9

Bentley, R., Bennett, J.W., 2003. What is an antibiotic? Revisited. Adv Appl Microbiol 52, 303–331. https://doi.org/10.1016/s0065-2164(03)01012-8

Bérdy, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. J Antibiot 58, 1–26. https://doi.org/10.1038/ja.2005.1

Bereiter, R., Himmelstoß, M., Renard, E., Mairhofer, E., Egger, M., Breuker, K., Kreutz, C., Ennifar, E., Micura, R., 2021. Impact of 3-deazapurine nucleobases on RNA properties. Nucleic Acids Res 49, 4281–4293. https://doi.org/10.1093/nar/gkab256

Berk, V., Zhang, W., Pai, R.D., Cate, J.H.D., 2006. Structural basis for mRNA and tRNA positioning on the ribosome. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 15830–15834. https://doi.org/10.1073/pnas.0607541103

Beyer, P., Cueni, T.B., Knox, J., Riedl, F., 2020. A research and development fund for new treatments for bacterial infections. Bulletin of the World Health Organization 98, 822-822A. https://doi.org/10.2471/BLT.20.282004

Bilgin, N., Richter, A.A., Ehrenberg, M., Dahlberg, A.E., Kurland, C.G., 1990. Ribosomal RNA and protein mutants resistant to spectinomycin. EMBO J 9, 735–739.

Birnbaum, J., Kahan, F.M., Kropp, H., MacDonald, J.S., 1985. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. Am J Med 78, 3–21. https://doi.org/10.1016/0002-9343(85)90097-x

Bley, C., van der Linden, M., Reinert, R.R., 2011. mef(A) is the predominant macrolide resistance determinant in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes in Germany. International Journal of Antimicrobial Agents 37, 425–431. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.019

Bochud-Gabellon, I., Regamey, C., 1988. Teicoplanin, a new antibiotic effective against gram-positive bacterial infections of the skin and soft tissues. Dermatologica 176, 29–38. https://doi.org/10.1159/000248666

Borovinskaya, Maria A, Pai, R.D., Zhang, W., Schuwirth, B.S., Holton, J.M., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., Cate, J.H.D., 2007. Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. Nat Struct Mol Biol 14, 727–732. https://doi.org/10.1038/nsmb1271

Borovinskaya, Maria A., Shoji, S., Holton, J.M., Fredrick, K., Cate, J.H.D., 2007. A Steric Block in Translation Caused by the Antibiotic Spectinomycin. ACS Chem. Biol. 2, 545–552. https://doi.org/10.1021/cb700100n

Böttger, E.C., Prammananan, T., Kidan, Y., Sander, P., Springer, B., 2001. Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics [WWW Document]. https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve062

Brazil, O.V., Corrado, A.P., 1957. The curariform action of streptomycin. J Pharmacol Exp Ther 120, 452–459.

Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V., 2000. The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. Cell 103, 1143–1154. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00216-6

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F., 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 75, 4801–4805.

Brosius, J., Ullrich, A., Raker, M.A., Gray, A., Dull, T.J., Gutell, R.R., Noller, H.F., 1981. Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the rrnB ribosomal RNA operon of E. coli. Plasmid 6, 112–118. https://doi.org/10.1016/0147-619X(81)90058-5

Bryan, L.E., Van Den Elzen, H.M., 1977. Effects of Membrane-Energy Mutations and Cations on Streptomycin and Gentamicin Accumulation by Bacteria: a Model for Entry of Streptomycin and Gentamicin in Susceptible and Resistant Bacteria. Antimicrob Agents Chemother 12, 163–177. https://doi.org/10.1128/AAC.12.2.163

Bulkley, D., Innis, C.A., Blaha, G., Steitz, T.A., 2010. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 17158–17163. https://doi.org/10.1073/pnas.1008685107

Bush, K., 2018. Past and Present Perspectives on β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 62, e01076-18. https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18

C

Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V., 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. Nature 407, 340–348. https://doi.org/10.1038/35030019

Castanheira, M., Woosley, L., Doyle, T., Serio, A., Krause, K., Flamm, R., 2017. Aminoglycoside-Resistance Genes Among 2014–2015 US Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates and Activity of Plazomicin against Characterized Isolates 1.

Cate, J.H., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Earnest, T.N., Noller, H.F., 1999. X-ray Crystal Structures of 70S Ribosome Functional Complexes 285, 11.

Charney, J., Fisher, W.P., Curran, C., Machlowitz, R.A., Tytell, A.A., 1953. Streptogramin, a new antibiotic. Antibiot Chemother (Northfield) 3, 1283–1286.

Chin, K., Shean, C.S., Gottesman, M.E., 1993. Resistance of lambda cI translation to antibiotics that inhibit translation initiation. Journal of Bacteriology 175, 7471. https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7471-7473.1993

Chinali, G., Moureau, P., Cocito, C.G., 1984. The action of virginiamycin M on the acceptor, donor, and catalytic sites of peptidyltransferase. Journal of Biological Chemistry 259, 9563–9568. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42737-2

Chopra, I., 1998. Over-expression of target genes as a mechanism of antibiotic resistance in bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 41, 584–588. https://doi.org/10.1093/jac/41.6.584

Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiol Mol Biol Rev 65, 232–260. https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001

Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2011. reflection-paper-use-macrolides-lincosamides-streptogramins-mls-food-producing-animals-european_en-0.pdf [WWW Document]. URL https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-macrolides-lincosamides-streptogramins-mls-food-producing-animals-european_en-0.pdf (accessed 8.17.21).

Controulis, J., Rebstock, C., Crooks, M., 1949. Chlorauiphenicol (Chloromycetin).1 V. Synthesis 71, 6.

D

Dassonville-Klimpt, A., Sonnet, P., 2020. Advances in 'Trojan horse' strategies in antibiotic delivery systems. Future Medicinal Chemistry fmc-2020-0065. https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0065

Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev 74, 417–433. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10

Davies, J.E., 2006. Aminoglycosides: Ancient and Modern 4.

Davis, A.R., Gohara, D.W., Yap, M.-N.F., 2014. Sequence selectivity of macrolide-induced translational attenuation. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 15379–15384. https://doi.org/10.1073/pnas.1410356111

Davis, B.D., 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol Rev 51, 341–350.

Davis, B.D., Chen, L.L., Tai, P.C., 1986. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 6164–6168.

De Oliveira, D.M.P., Forde, B.M., Kidd, T.J., Harris, P.N.A., Schembri, M.A., Beatson, S.A., Paterson, D.L., Walker, M.J., 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clin Microbiol Rev 33, e00181-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19

Demeshkina, N., Jenner, L., Westhof, E., Yusupov, M., Yusupova, G., 2012. A new understanding of the decoding principle on the ribosome. Nature 484, 256–259. https://doi.org/10.1038/nature10913

Dinos, G.P., 2017. The macrolide antibiotic renaissance. British Journal of Pharmacology 174, 2967–2983. https://doi.org/10.1111/bph.13936

Doi, Y., Wachino, J., Arakawa, Y., 2016. Aminoglycoside Resistance. Infect Dis Clin North Am 30, 523–537. https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011

Donadio, S., Staver, M., McAlpine, J., Swanson, S., Katz, L., 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. Science 252, 675–679. https://doi.org/10.1126/science.2024119

Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., Wilson, D.N., 2012. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 16900–16905. https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109

Douthwaite, S., Voldborg, B., Hansen, L.H., Rosendahl, G., Vester, B., 1995. Recognition determinants for proteins and antibiotics within 23S rRNA. Biochem. Cell Biol. 73, 1179–1185. https://doi.org/10.1139/o95-127

Drews, J., 2000. Drug Discovery: A Historical Perspective. Science 287, 1960–1964. https://doi.org/10.1126/science.287.5460.1960

Drusano, G.L., Ambrose, P.G., Bhavnani, S.M., Bertino, J.S., Nafziger, A.N., Louie, A., 2007. Back to the Future: Using Aminoglycosides Again and How to Dose Them Optimally. Clinical Infectious Diseases 45, 753–760. https://doi.org/10.1086/520991

Duchesne, E., 1897. Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

Dunkle, J.A., Wang, L., Feldman, M.B., Pulk, A., Chen, V.B., Kapral, G.J., Noeske, J., Richardson, J.S., Blanchard, S.C., Doudna Cate, J.H., 2011. Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. Science 332, 981–984. https://doi.org/10.1126/science.1202692

Dunkle, J.A., Xiong, L., Mankin, A.S., Cate, J.H.D., 2010. Structures of the Escherichia coli ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. PNAS 107, 17152–17157. https://doi.org/10.1073/pnas.1007988107

Duscha, S., Boukari, H., Shcherbakov, D., Salian, S., Silva, S., Kendall, A., Kato, T., Akbergenov, R., Perez-Fernandez, D., Bernet, B., Vaddi, S., Thommes, P., Schacht, J., Crich, D., Vasella, A., Böttger, E.C., 2014. Identification and Evaluation of Improved 4′-O-(Alkyl) 4,5-Disubstituted 2-Deoxystreptamines as Next-Generation Aminoglycoside Antibiotics. mBio 5, e01827-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01827-14

E

Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M., Joslyn, D.A., Burkholder, P.R., 1947. Chloromycetin, a New Antibiotic From a Soil Actinomycete. Science 106, 417–417. https://doi.org/10.1126/science.106.2757.417

Ennifar, E., 2006. Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 RNA with aminoglycosides: from crystal to cell. Nucleic Acids Research 34, 2328–2339. https://doi.org/10.1093/nar/gkl317

Ennifar, E., Dumas, P., 2006. Polymorphism of Bulged-out Residues in HIV-1 RNA DIS Kissing Complex and Structure Comparison with Solution Studies. Journal of Molecular Biology 356, 771–782. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.022

Ennifar, E., Paillart, J.-C., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Dumas, P., Walter, P., 2003. HIV-1 RNA Dimerization Initiation Site Is Structurally Similar to the Ribosomal A Site and Binds Aminoglycoside Antibiotics. Journal of Biological Chemistry 278, 2723–2730. https://doi.org/10.1074/jbc.M205726200

Eyal, Z., Matzov, D., Krupkin, M., Paukner, S., Riedl, R., Rozenberg, H., Zimmerman, E., Bashan, A., Yonath, A., 2016. A novel pleuromutilin antibacterial compound, its binding mode and selectivity mechanism. Sci Rep 6, 39004. https://doi.org/10.1038/srep39004

F

Fair, R.J., Tor, Y., 2014. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. Perspect Medicin Chem 6, 25–64. https://doi.org/10.4137/PMC.S14459

Feldman, M.B., Terry, D.S., Altman, R.B., Blanchard, S.C., 2010. Aminoglycoside activity observed on single pre-translocation ribosome complexes. Nat Chem Biol 6, 54–62. https://doi.org/10.1038/nchembio.274

Fernandes, P., 2006. Antibacterial discovery and development—the failure of success? Nature Biotechnology 24, 1497–1503. https://doi.org/10.1038/nbt1206-1497

Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Wilson, D.N., Rodnina, M.V., Mankin, A.S., 2017. An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome. Nat Struct Mol Biol 24, 752–757. https://doi.org/10.1038/nsmb.3439

Ford, C.W., Hamel, J.C., Stapert, D., Moerman, J.K., Hutchinson, D.K., Barbachyn, M.R., Zurenko, G.E., 1997. Oxazolidinones: New antibacterial agents. Trends in Microbiology 5, 196–200. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01032-9

Forge, A., Schacht, J., 2000. Aminoglycoside Antibiotics. Audiol Neurootol 20.

Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C., Puglisi, J.D., 1996. Structure of the A Site of Escherichia coli 16S Ribosomal RNA Complexed with an Aminoglycoside Antibiotic. Science 274, 1367–1371. https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1367

Fourmy, D., Yoshizawa, S., Puglisi, J.D., 1998. Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 s rRNA. Journal of Molecular Biology 277, 333–345. https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1551

Francois, B., 2005. Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. Nucleic Acids Research 33, 5677–5690. https://doi.org/10.1093/nar/gki862

Fyfe, C., Grossman, T.H., Kerstein, K., Sutcliffe, J., 2016. Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a025395. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025395

G

Gagnon, M.G., Roy, R.N., Lomakin, I.B., Florin, T., Mankin, A.S., Steitz, T.A., 2016. Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition. Nucleic Acids Res 44, 2439–2450. https://doi.org/10.1093/nar/gkw018

Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T., 2003. Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae Due to 16S rRNA Methylation. Antimicrob Agents Chemother 47, 2565–2571. https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003

Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, M.V., Yusupova, G., Yusupov, M., 2014. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. Nature 513, 517–522. https://doi.org/10.1038/nature13737

Garza-Ramos, G., Xiong, L., Zhong, P., Mankin, A., 2001. Binding Site of Macrolide Antibiotics on the Ribosome: New Resistance Mutation Identifies a Specific Interaction of Ketolides with rRNA. J Bacteriol 183, 6898–6907. https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6898-6907.2001

Gilbert, S.D., Stoddard, C.D., Wise, S.J., Batey, R.T., 2006. Thermodynamic and Kinetic Characterization of Ligand Binding to the Purine Riboswitch Aptamer Domain. Journal of Molecular Biology 359, 754–768. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.003

Golkar, T., Zieliński, M., Berghuis, A.M., 2018. Look and Outlook on Enzyme-Mediated Macrolide Resistance. Frontiers in Microbiology 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01942

Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldán, L., Pons, M.J., Ruiz, J., 2017. Macrolide resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* : Focus on azithromycin. Critical Reviews in Microbiology 43, 1–30. https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261

Gordillo, M.E., Singh, K.V., Murray, B.E., 1993. In vitro activity of azithromycin against bacterial enteric pathogens. Antimicrob Agents Chemother 37, 1203–1205.

Goulooze, S.C., Cohen, A.F., Rissmann, R., 2015. Bedaquiline. Br J Clin Pharmacol 80, 182–184. https://doi.org/10.1111/bcp.12613

Gromadski, K.B., Rodnina, M.V., 2004. Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. Nat Struct Mol Biol 11, 316–322. https://doi.org/10.1038/nsmb742

Gross, S., Nguyen, F., Bierschenk, M., Sohmen, D., Menzel, T., Antes, I., Wilson, D.N., Bach, T., 2013. Amythiamicin D and Related Thiopeptides as Inhibitors of the Bacterial Elongation Factor EF-Tu: Modification of the Amino Acid at Carbon Atom C2 of Ring C Dramatically Influences Activity [WWW Document]. https://doi.org/10.1002/cmdc.201300323

Guan, M.-X., 2011. Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. Mitochondrion 11, 237–245. https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.10.006

H

Hansen, J.L., Ippolito, J.A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P.B., Steitz, T.A., 2002. The Structures of Four Macrolide Antibiotics Bound to the Large Ribosomal Subunit. Molecular Cell 12.

Hansen, J.L., Moore, P.B., Steitz, T.A., 2003. Structures of Five Antibiotics Bound at the Peptidyl Transferase Center of the Large Ribosomal Subunit. Journal of Molecular Biology 330, 1061–1075. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00668-5

Harms, J.M., Schlünzen, F., Fucini, P., Bartels, H., Yonath, A., 2004. Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalfopristin and quinupristin. BMC Biology 10.

Hermann, T., Westhof, E., 1998. Aminoglycoside Binding to the Hammerhead Ribozyme: A General Model for the Interaction of Cationic Antibiotics with RNA 10.

Hicks, L.A., Taylor, T.H., Hunkler, R.J., 2013. U.S. Outpatient Antibiotic Prescribing, 2010. N Engl J Med 368, 1461–1462. https://doi.org/10.1056/NEJMc1212055

Hill, C.D., Counts, G.W., Turck, M., 1981. In vitro comparison of dibekacin and gentamicin activities. Antimicrob Agents Chemother 19, 190–192.

Himmelstoß, M., Erharter, K., Renard, E., Ennifar, E., Kreutz, C., Micura, R., 2020. 2′-O-Trifluoromethylated RNA – a powerful modification for RNA chemistry and NMR spectroscopy. Chem Sci 11, 11322–11330. https://doi.org/10.1039/d0sc04520a

Hinz, A., Lee, S., Jacoby, K., Manoil, C., 2011. Membrane Proteases and Aminoglycoside Antibiotic Resistance ▽. J Bacteriol 193, 4790–4797. https://doi.org/10.1128/JB.05133-11

Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., Takeuchi, F., Morimoto, Y., Katayama, Y., Matsuo, M., Kuwahara-Arai, K., Hishinuma, T., Baba, T., 2013. Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus. Infect Chemother 45, 117–136. https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.2.117

Hobbie, S., Bruell, C., Kalapala, S., Akshay, S., Schmidt, S., Pfister, P., Bottger, E., 2006. A genetic model to investigate drug–target interactions at the ribosomal decoding site. Biochimie 88, 1033–1043. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.04.008

Hobbie, S.N., Akshay, S., Kalapala, S.K., Bruell, C.M., Shcherbakov, D., Bottger, E.C., 2008. Genetic analysis of interactions with eukaryotic rRNA identify the mitoribosome as target in aminoglycoside ototoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 20888–20893. https://doi.org/10.1073/pnas.0811258106

Hooper, D.C., 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. The Lancet Infectious Diseases 2, 530–538. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00369-9

Hopwood, D.A., 1997. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. Chem. Rev. 97, 2465–2498. https://doi.org/10.1021/cr960034i

Hutchin, T.P., Cortopassi, G.A., 2000. Mitochondrial defects and hearing loss: CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 57, 1927–1937. https://doi.org/10.1007/PL00000673

Hutchings, M.I., Truman, A.W., Wilkinson, B., 2019. Antibiotics: past, present and future. Current Opinion in Microbiology 51, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008

I

Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., Weissman, J.S., 2009. Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. Science 324, 218–223. https://doi.org/10.1126/science.1168978

Ishikawa, M., García-Mateo, N., Čusak, A., López-Hernández, I., Fernández-Martínez, M., Müller, M., Rüttiger, L., Singer, W., Löwenheim, H., Kosec, G., Fujs, Š., Martínez-Martínez, L., Schimmang, T., Petković, H., Knipper, M., Durán-Alonso, M.B., 2019. Lower ototoxicity and absence of hidden hearing loss point to gentamicin C1a and apramycin as promising antibiotics for clinical use. Sci Rep 9, 2410. https://doi.org/10.1038/s41598-019-38634-3

J

Jenner, L., Starosta, A.L., Terry, D.S., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S.C., Wilson, D.N., Yusupova, G., 2013. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. PNAS 110, 3812–3816. https://doi.org/10.1073/pnas.1216691110

Jones, W.F., Nichols, R.L., Finland, M., 1956. Development of Resistance and Cross-Resistance in vitro to Erythromycin, Carbomycin, Spiramycin, Oleandomycin and Streptogramin. Experimental Biology and Medicine 93, 388–393. https://doi.org/10.3181/00379727-93-22766

Jospe-Kaufman, M., Siomin, L., Fridman, M., 2020. The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. Bioorg Med Chem Lett 30, 127218. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127218

K

Kannan, K., Kanabar, P., Schryer, D., Florin, T., Oh, E., Bahroos, N., Tenson, T., Weissman, J.S., Mankin, A.S., 2014. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. Proc Natl Acad Sci USA 111, 15958–15963. https://doi.org/10.1073/pnas.1417334111

Kannan, K., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2012. Selective Protein Synthesis by Ribosomes with a Drug-Obstructed Exit Tunnel. Cell 151, 508–520. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.018

Karimi, R., Ehrenberg, M., 1996. Dissociation rates of peptidyl-tRNA from the P-site of E.coli ribosomes. EMBO J 15, 1149–1154.

Kaul, M., Barbieri, C.M., Pilch, D.S., 2005. Defining the Basis for the Specificity of Aminoglycoside-rRNA Recognition: A Comparative Study of Drug Binding to the A Sites of Escherichia coli and Human rRNA. Journal of Molecular Biology 346, 119–134. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.041

Kaul, M., Barbieri, C.M., Pilch, D.S., 2004. Fluorescence-Based Approach for Detecting and Characterizing Antibiotic-Induced Conformational Changes in Ribosomal RNA: Comparing Aminoglycoside Binding to Prokaryotic and Eukaryotic Ribosomal RNA Sequences. J. Am. Chem. Soc. 126, 3447–3453. https://doi.org/10.1021/ja030568i

Keeling, K.M., Bedwell, D.M., 2005. Pharmacological Suppression of Premature Stop Mutations that Cause Genetic Diseases. Current Pharmacogenomics 3, 259–269.

Kerem, E., 2004. Pharmacologic therapy for stop mutations: how much CFTR activity is enough? Current Opinion in Pulmonary Medicine 10, 547–552. https://doi.org/10.1097/01.mcp.0000141247.22078.46

Kim, I., Liu, C.W., Puglisi, J.D., 2006. Specific Recognition of HIV TAR RNA by the dsRNA Binding Domains (dsRBD1–dsRBD2) of PKR. Journal of Molecular Biology 358, 430–442. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.099

Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., Collins, J.J., 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger aminoglycoside-mediated oxidative stress and cell death. Cell 135, 679–690. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.038

Kondo, J., François, B., Urzhumtsev, A., Westhof, E., 2006a. Crystal Structure of theHomo sapiens Cytoplasmic Ribosomal Decoding Site Complexed with Apramycin. Angewandte Chemie International Edition 45, 3310–3314. https://doi.org/10.1002/anie.200600354

Kondo, J., Hainrichson, M., Nudelman, I., Shallom-Shezifi, D., Barbieri, C.M., Pilch, D.S., Westhof, E., Baasov, T., 2007. Differential Selectivity of Natural and Synthetic Aminoglycosides towards the Eukaryotic and Prokaryotic Decoding A Sites. ChemBioChem 8, 1700–1709. https://doi.org/10.1002/cbic.200700271

Kondo, J., Urzhumtsev, A., Westhof, E., 2006b. Two conformational states in the crystal structure of the Homo sapiens cytoplasmic ribosomal decoding A site. Nucleic Acids Res 34, 676–685. https://doi.org/10.1093/nar/gkj467

Kondo, J., Westhof, E., 2008. The bacterial and mitochondrial ribosomal A-site molecular switches possess different conformational substates. Nucleic Acids Res 36, 2654–2666. https://doi.org/10.1093/nar/gkn112

Krainer, G., Keller, S., 2015. Single-experiment displacement assay for quantifying high-affinity binding by isothermal titration calorimetry. Methods, Biocalorimetry 76, 116–123. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.034

Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016. Aminoglycosides: An Overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 6, a027029. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029

Krimmer, S.G., Klebe, G., 2015. Thermodynamics of protein–ligand interactions as a reference for computational analysis: how to assess accuracy, reliability and relevance of experimental data. Journal of Computer-Aided Molecular Design 29, 867–883. https://doi.org/10.1007/s10822-015-9867-y

Krokidis, M., Bougas, A., Stavropoulou, M., Kalpaxis, D., Dinos, G.P., 2016. The slow dissociation rate of K-1602 contributes to the enhanced inhibitory activity of this novel alkyl–aryl-bearing fluoroketolide. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 31, 276–282. https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1018246

L

Ladbury, J.E., Chowdhry, B.Z., 1996. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. Chemistry & Biology 3, 791–801. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90063-0

Lafont, V., Armstrong, A.A., Ohtaka, H., Kiso, Y., Amzel, L.M., Freire, E., 2007. Compensating Enthalpic and Entropic Changes Hinder Binding Affinity Optimization. Chemical Biology & Drug Design 69, 413–422. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00519.x

Leach, K.L., Brickner, S.J., Noe, M.C., Miller, P.F., 2011. Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent: Linezolid, antibacterial agent. Annals of the New York Academy of Sciences 1222, 49–54. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05962.x

Lehar, S.M., Pillow, T., Xu, M., Staben, L., Kajihara, K.K., Vandlen, R., DePalatis, L., Raab, H., Hazenbos, W.L., Hiroshi Morisaki, J., Kim, J., Park, S., Darwish, M., Lee, B.-C., Hernandez, H., Loyet, K.M., Lupardus, P.,

Fong, R., Yan, D., Chalouni, C., Luis, E., Khalfin, Y., Plise, E., Cheong, J., Lyssikatos, J.P., Strandh, M., Koefoed, K., Andersen, P.S., Flygare, J.A., Wah Tan, M., Brown, E.J., Mariathasan, S., 2015. Novel antibody–antibiotic conjugate eliminates intracellular S. aureus. Nature 527, 323–328. https://doi.org/10.1038/nature16057

Lescoute, A., Westhof, E., 2006. The A-minor motifs in the decoding recognition process. Biochimie 88, 993–999. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.018

Lesher, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.Hays., Brundage, R.Pauline., 1962. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. J. Med. Chem. 5, 1063–1065. https://doi.org/10.1021/jm01240a021

Lesley, S.A., Brow, M.A., Burgess, R.R., 1991. Use of in vitro protein synthesis from polymerase chain reaction-generated templates to study interaction of Escherichia coli transcription factors with core RNA polymerase and for epitope mapping of monoclonal antibodies. Journal of Biological Chemistry 266, 2632–2638. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52291-2

Li, S., Cheng, X., Zhou, Y., Xi, Z., 2011. Sparsomycin-Linezolid Conjugates Can Promote Ribosomal Translocation. ChemBioChem 12, 2801–2806. https://doi.org/10.1002/cbic.201100508

Li, X.-Z., Plésiat, P., Nikaido, H., 2015. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. Clin Microbiol Rev 28, 337–418. https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14

Lin, J., Zhou, D., Steitz, T.A., Polikanov, Y.S., Gagnon, M.G., 2018. Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. Annual Review of Biochemistry 87, 451–478. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011942

Liu, M., Douthwaite, S., 2002. Activity of the Ketolide Telithromycin Is Refractory to Erm Monomethylation of Bacterial rRNA. Antimicrob Agents Chemother 46, 1629–1633. https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1629-1633.2002

Lodmell, J.S., 1997. A Conformational Switch in Escherichia coli 16S Ribosomal RNA During Decoding of Messenger RNA. Science 277, 1262–1267. https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1262

López-Alonso, J.P., Fabbretti, A., Kaminishi, T., Iturrioz, I., Brandi, L., Gil-Carton, D., Gualerzi, C.O., Fucini, P., Connell, S.R., 2017. Structure of a 30S pre-initiation complex stalled by GE81112 reveals structural parallels in bacterial and eukaryotic protein synthesis initiation pathways. Nucleic Acids Research 45, 2179–2187. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1251

Lopez-Novoa, Quiros, Vicente, Morales, Lopez-Hernandez, 2011. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. https://doi.org/10.1038/ki.2010.337

Lovmar, M., Nilsson, K., Vimberg, V., Tenson, T., Nervall, M., Ehrenberg, M., 2006. The Molecular Mechanism of Peptide-mediated Erythromycin Resistance. Journal of Biological Chemistry 281, 6742–6750. https://doi.org/10.1074/jbc.M511918200

M

Madbouly, N., Azmy, A., Salama, A., El-Amir, A., 2021. The nephroprotective properties of taurine-amikacin treatment in rats are mediated through HSP25 and TLR-4 regulation. J Antibiot 74, 580–592. https://doi.org/10.1038/s41429-021-00441-2

Magnet, S., Blanchard, J.S., 2005. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. Chem. Rev. 105, 477–498. https://doi.org/10.1021/cr0301088

Mankin, A.S., 2008. MACROLIDE MYTHS. Curr Opin Microbiol 11, 10.1016/j.mib.2008.08.003. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.08.003

Mariathasan, S., Tan, M.-W., 2017. Antibody–Antibiotic Conjugates: A Novel Therapeutic Platform against Bacterial Infections. Trends in Molecular Medicine 23, 135–149. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.12.008

Marks, J., Kannan, K., Roncase, E.J., Klepacki, D., Kefi, A., Orelle, C., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2016. Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center. Proc Natl Acad Sci USA 113, 12150–12155. https://doi.org/10.1073/pnas.1613055113

Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., Alvarez-Ortega, C., 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. FEMS Microbiology Reviews 33, 430–449. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x

Matsushita, T., Sati, G.C., Kondasinghe, N., Pirrone, M.G., Kato, T., Waduge, P., Kumar, H.S., Sanchon, A.C., Dobosz-Bartoszek, M., Shcherbakov, D., Juhas, M., Hobbie, S.N., Schrepfer, T., Chow, C.S., Polikanov, Y.S., Schacht, J., Vasella, A., Böttger, E.C., Crich, D., 2019. Design, Multigram Synthesis, and in Vitro and in Vivo Evaluation of Propylamycin: A Semisynthetic 4,5-Deoxystreptamine Class Aminoglycoside for the Treatment of Drug-Resistant Enterobacteriaceae and Other Gram-Negative Pathogens. Journal of the American Chemical Society 141, 5051–5061. https://doi.org/10.1021/jacs.9b01693

Matt, T., Ng, C.L., Lang, K., Sha, S.-H., Akbergenov, R., Shcherbakov, D., Meyer, M., Duscha, S., Xie, J., Dubbaka, S.R., Perez-Fernandez, D., Vasella, A., Ramakrishnan, V., Schacht, J., Bottger, E.C., 2012. Dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4-monosubstituted 2-deoxystreptamine apramycin. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 10984–10989. https://doi.org/10.1073/pnas.1204073109

Mccormick, M.H., Mcguire, J.M., Pittenger, G.E., Pittenger, R.C., Stark, W.M., 1955. Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. Antibiot Annu 3, 606–611.

McEwen, S.A., Collignon, P.J., 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. Microbiol Spectr 6. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017

McGUIRE, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E.H., Powell, H.M., Smith, J.W., 1952. Ilotycin, a new antibiotic. Antibiot Chemother (Northfield) 2, 281–283.

McKay, G A, J Roestamadji, S Mobashery, et G D Wright, 1996. Recognition of aminoglycoside antibiotics by enterococcal-staphylococcal aminoglycoside 3'-phosphotransferase type IIIa: role of substrate amino groups. » Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40, no 11 (novembre 1996): 2648-50.

McManus, M.C., 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. American Journal of Health-System Pharmacy 54, 1420–1433. https://doi.org/10.1093/ajhp/54.12.1420

McWilliam, S.J., Antoine, D.J., Smyth, R.L., Pirmohamed, M., 2017. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children. Pediatr Nephrol 32, 2015–2025. https://doi.org/10.1007/s00467-016-3533-z

Menninger, J.R., 1985. Functional consequences of binding macrolides to ribosomes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 16, 23–34. https://doi.org/10.1093/jac/16.suppl_A.23

Menninger, J.R., Otto, D.P., 1982. Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. Antimicrob Agents Chemother 21, 811–818.

Mikulecky, P.J., Kaw, M.K., Brescia, C.C., Takach, J.C., Sledjeski, D.D., Feig, A.L., 2004. Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. Nat Struct Mol Biol 11, 1206–1214. https://doi.org/10.1038/nsmb858

Milón, P., Rodnina, M.V., 2012. Kinetic control of translation initiation in bacteria. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 47, 334–348. https://doi.org/10.3109/10409238.2012.678284

Mingeot-Leclercq, M.-P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: Activity and Resistance. Antimicrob Agents Chemother 43, 727–737.

Mohr, K.I., 2016. History of Antibiotics Research, in: Stadler, M., Dersch, P. (Eds.), How to Overcome the Antibiotic Crisis. Springer International Publishing, Cham, pp. 237–272. https://doi.org/10.1007/82_2016_499

Morar, M., Pengelly, K., Koteva, K., Wright, G.D., 2012. Mechanism and Diversity of the Erythromycin Esterase Family of Enzymes. Biochemistry 51, 1740–1751. https://doi.org/10.1021/bi201790u

Morita, Y., Tomida, J., Kawamura, Y., 2012. MexXY multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa. Front Microbiol 3, 408. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00408

Müller, M., Weigand, J.E., Weichenrieder, O., Suess, B., 2006. Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. Nucleic Acids Res 34, 2607–2617. https://doi.org/10.1093/nar/gkl347

N

Nagai, J., Tanaka, H., Nakanishi, N., Murakami, T., Takano, M., 2001. Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. American Journal of Physiology-Renal Physiology 281, F337–F344. https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.2.F337

Negash, K.H., Norris, J.K.S., Hodgkinson, J.T., 2019. Siderophore–Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs? Molecules 24, 3314. https://doi.org/10.3390/molecules24183314

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years ⊥. J. Nat. Prod. 70, 461–477. https://doi.org/10.1021/np068054v

Nieves, I., Hally, C., Viappiani, C., Agut, M., Nonell, S., 2020. A porphycene-gentamicin conjugate for enhanced photodynamic inactivation of bacteria. Bioorganic Chemistry 97, 103661. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103661

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A., 2000. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis 289, 12.

O

Ogle, J.M., 2001. Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30S Ribosomal Subunit. Science 292, 897–902. https://doi.org/10.1126/science.1060612

Ogle, J.M., Carter, A.P., Ramakrishnan, V., 2003. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. Trends in Biochemical Sciences 28, 259–266. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00066-5

Ogle, J.M., Ramakrishnan, V., 2005. Structural Insights into Translational Fidelity. Annual Review of Biochemistry 74, 129–177. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.061903.155440

O'Hara, K., Kanda, T., Ohmiya, K., Ebisu, T., Kono, M., 1989. Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of Escherichia coli that is highly resistant to erythromycin. Antimicrob Agents Chemother 33, 1354–1357.

Ojo, K.K., Ulep, C., Van Kirk, N., Luis, H., Bernardo, M., Leitao, J., Roberts, M.C., 2004. The mef(A) Gene Predominates among Seven Macrolide Resistance Genes Identified in Gram-Negative Strains Representing

13 Genera, Isolated from Healthy Portuguese Children. Antimicrob Agents Chemother 48, 3451–3456. https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3451-3456.2004

Osterman, I.A., Khabibullina, N.F., Komarova, E.S., Kasatsky, P., Kartsev, V.G., Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A., Konevega, A.L., Sergiev, P.V., Polikanov, Y.S., 2017. Madumycin II inhibits peptide bond formation by forcing the peptidyl transferase center into an inactive state. Nucleic Acids Research 45, 7507–7514. https://doi.org/10.1093/nar/gkx413

O'Sullivan, M.E., Perez, A., Lin, R., Sajjadi, A., Ricci, A.J., Cheng, A.G., 2017. Towards the Prevention of Aminoglycoside-Related Hearing Loss. Front. Cell. Neurosci. 11. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00325

Otaka, T., Kaji, A., 1975. Release of (oligo) peptidyl-tRNA from ribosomes by erythromycin A. Proceedings of the National Academy of Sciences 72, 2649–2652. https://doi.org/10.1073/pnas.72.7.2649

P

Parker, N., Schneegurt, M., Tu, T.A.-H., Lister, P., Forster, B.M., 2016. Microbiology. OpenStax, Houston, Texas.

Parsons, T.D., Obaid, A.L., Salzberg, B.M., 1992. Aminoglycoside antibiotics block voltage-dependent calcium channels in intact vertebrate nerve terminals. Journal of General Physiology 99, 491–504. https://doi.org/10.1085/jgp.99.4.491

Paulen, A., Hoegy, Françoise., Roche, Béatrice., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., 2017. Synthesis of conjugates between oxazolidinone antibiotics and a pyochelin analogue. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27, 4867–4870. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.039

Pedersen, L.C., Benning, M.M., Holden, H.M., 1995. Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase. Biochemistry 34, 13305–13311. https://doi.org/10.1021/bi00041a005

Perez-Fernandez, D., Shcherbakov, D., Matt, T., Leong, N.C., Kudyba, I., Duscha, S., Boukari, H., Patak, R., Dubbaka, S.R., Lang, K., Meyer, M., Akbergenov, R., Freihofer, P., Vaddi, S., Thommes, P., Ramakrishnan, V., Vasella, A., Böttger, E.C., 2014. 4′-O-substitutions determine selectivity of aminoglycoside antibiotics. Nat Commun 5, 3112. https://doi.org/10.1038/ncomms4112

Piddock, L.J.V., 2006. Multidrug-resistance efflux pumps ? not just for resistance. Nat Rev Microbiol 4, 629–636. https://doi.org/10.1038/nrmicro1464

Pilch, D.S., Kaul, M., Barbieri, C.M., Kerrigan, J.E., 2003. Thermodynamics of aminoglycoside–rRNA recognition. Biopolymers 70, 58–79. https://doi.org/10.1002/bip.10411

Pioletti Marta, Schlünzen Frank, Harms Jörg, Zarivach Raz, Glühmann Marco, Avila Horacio, Bashan Anat, Bartels Heike, Auerbach Tamar, Jacobi Carsten, Hartsch Thomas, Yonath Ada, Franceschi François, 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3 [WWW Document]. https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1829

Poehlsgaard, J., Douthwaite, S., 2005. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. Nat Rev Microbiol 3, 870–881. https://doi.org/10.1038/nrmicro1265

Poldermans, B., Goosen, N., Van Knippenberg, P.H., 1979. Studies on the function of two adjacent N6,N6-dimethyladenosines near the 3′ end of 16 S ribosomal RNA of Escherichia coli. I. The effect of kasugamycin on initiation of protein synthesis. Journal of Biological Chemistry 254, 9085–9089. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)86813-8

Polikanov, Y.S., Osterman, I.A., Szal, T., Tashlitsky, V.N., Serebryakova, M.V., Kusochek, P., Bulkley, D., Malanicheva, I.A., Efimenko, T.A., Efremenkova, O.V., Konevega, A.L., Shaw, K.J., Bogdanov, A.A.,

Rodnina, M.V., Dontsova, O.A., Mankin, A.S., Steitz, T.A., Sergiev, P.V., 2014a. Amicoumacin A Inhibits Translation by Stabilizing mRNA Interaction with the Ribosome. Molecular Cell 56, 531–540. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.020

Polikanov, Y.S., Szal, T., Jiang, F., Gupta, P., Matsuda, R., Shiozuka, M., Steitz, T.A., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2014b. Negamycin Interferes with Decoding and Translocation by Simultaneous Interaction with rRNA and tRNA. Molecular Cell 56, 541–550. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.021

Poole, K., 2011. Pseudomonas Aeruginosa: Resistance to the Max. Front Microbiol 2, 65. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065

Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 56, 20–51. https://doi.org/10.1093/jac/dki171

Prezant, T.R., Agapian, J.V., Bohlman, M.C., Bu, X., Öztas, S., Qiu, W.-Q., Arnos, K.S., Cortopassi, G.A., Jaber, L., Rotter, J.I., Shohat, M., Fischel-Ghodsian, N., 1993. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. Nat Genet 4, 289–294. https://doi.org/10.1038/ng0793-289

Prokhorova, I., Altman, R.B., Djumagulov, M., Shrestha, J.P., Urzhumtsev, A., Ferguson, A., Chang, C.-W.T., Yusupov, M., Blanchard, S.C., Yusupova, G., 2017. Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. Proc Natl Acad Sci USA 114, E10899–E10908. https://doi.org/10.1073/pnas.1715501114

Punjani, A., Rubinstein, J.L., Fleet, D.J., Brubaker, M.A., 2017. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. Nat Methods 14, 290–296. https://doi.org/10.1038/nmeth.4169

Q

Qian, Y., Guan, M.-X., 2009. Interaction of Aminoglycosides with Human Mitochondrial 12S rRNA Carrying the Deafness-Associated Mutation. Antimicrob Agents Chemother 53, 4612–4618. https://doi.org/10.1128/AAC.00965-08

R

Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside Modifying Enzymes. Drug Resist Updat 13, 151–171. https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003

Ramu, H., Mankin, A., Vazquez-Laslop, N., 2009. Programmed drug-dependent ribosome stalling. Molecular Microbiology 71, 811–824. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06576.x

Ramu, H., Vázquez-Laslop, N., Klepacki, D., Dai, Q., Piccirilli, J., Micura, R., Mankin, A.S., 2011. Nascent Peptide in the Ribosome Exit Tunnel Affects Functional Properties of the A-Site of the Peptidyl Transferase Center. Molecular Cell 41, 321–330. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.031

Recht, M.I., Fourmy, D., Blanchard, S.C., Dahlquist, K.D., Puglisi, J.D., 1996. RNA Sequence Determinants for Aminoglycoside Binding to an A-site rRNA Model Oligonucleotide. Journal of Molecular Biology 262, 421–436. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0526

Recht, M.I., Douthwaite, S., Dahlquist, K.D., Puglisi, J.D., 1999. Effect of mutations in the A site of 16 S rRNA on aminoglycoside antibiotic-ribosome interaction. Journal of Molecular Biology 286, 33–43. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2446

Recht, M.I., Williamson, J.R., 2004. RNA Tertiary Structure and Cooperative Assembly of a Large Ribonucleoprotein Complex. Journal of Molecular Biology 344, 395–407. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.009

Reijnders, T.D.Y., Saris, A., Schultz, M.J., van der Poll, T., 2020. Immunomodulation by macrolides: therapeutic potential for critical care. The Lancet Respiratory Medicine 8, 619–630. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30080-1

Reinhardt, A., Neundorf, I., 2016. Design and Application of Antimicrobial Peptide Conjugates. Int J Mol Sci 17, 701. https://doi.org/10.3390/ijms17050701

Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiology Letters 245, 195–203. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034

Rodnina, M.V., 2018. Translation in Prokaryotes. Cold Spring Harb Perspect Biol 10, a032664. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032664

Rodnina, M.V., Daviter, T., Gromadski, K., Wintermeyer, W., 2002. Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. Biochimie 84, 745–754. https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01409-8

S

Sakamoto, T., Ennifar, E., Nakamura, Y., 2018. Thermodynamic study of aptamers binding to their target proteins. Biochimie 145, 91–97. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.010

Salim, N.N., Feig, A.L., 2009. Isothermal titration calorimetry of RNA. Methods, Nucleic Acid Structure 47, 198–205. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.003

Sati, G.C., Sarpe, V.A., Furukawa, T., Mondal, S., Mantovani, M., Hobbie, S.N., Vasella, A., Böttger, E.C., Crich, D., 2019. Modification at the 2′-Position of the 4,5-Series of 2-Deoxystreptamine Aminoglycoside Antibiotics To Resist Aminoglycoside Modifying Enzymes and Increase Ribosomal Target Selectivity. ACS Infectious Diseases 5, 1718–1730. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00128

Sati, G.C., Shcherbakov, D., Hobbie, S.N., Vasella, A., Böttger, E.C., Crich, D., 2017. N6′, N6′′′, and O4′ Modifications to Neomycin Affect Ribosomal Selectivity without Compromising Antibacterial Activity. ACS Infect. Dis. 3, 368–377. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00214

Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A., Hanssen, A.D., Patel, R., Osmon, D.R., 2005. The Classic: Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. Clinical Orthopaedics and Related Research® 437, 3–6. https://doi.org/10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe

Schenckbecher, E., Meyer, B., Ennifar, E., 2019. ITC Studies of Ribosome/Antibiotics Interactions, in: Ennifar, E. (Ed.), Microcalorimetry of Biological Molecules. Springer New York, New York, NY, pp. 89–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9179-2_7

Scheres, S.H.W., 2012. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. J Struct Biol 180, 519–530. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.09.006

Schmitz, C., Hilpert, J., Jacobsen, C., Boensch, C., Christensen, E.I., Luft, F.C., Willnow, T.E., 2002. Megalin Deficiency Offers Protection from Renal Aminoglycoside Accumulation. Journal of Biological Chemistry 277, 618–622. https://doi.org/10.1074/jbc.M109959200

Schuwirth, B.S., Day, J.M., Hau, C.W., Janssen, G.R., Dahlberg, A.E., Cate, J.H.D., Vila-Sanjurjo, A., 2006. Structural analysis of kasugamycin inhibition of translation. Nat Struct Mol Biol 13, 879–886. https://doi.org/10.1038/nsmb1150

Seefeldt, A.C., Graf, M., Pérébaskine, N., Nguyen, F., Arenz, S., Mardirossian, M., Scocchi, M., Wilson, D.N., 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. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1545

Sensi, P., Greco, A.M., Ballotta, R., 1959. Rifomycin. I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. Antibiot Annu 7, 262–270.

Serio, A.W., Keepers, T., Andrews, L., Krause, K.M., 2018. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. EcoSal Plus 8. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018

Sharkey, L.K.R., Edwards, T.A., O'Neill, A.J., 2016. ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. mBio 7, e01975-15. https://doi.org/10.1128/mBio.01975-15

Shi, K., Caldwell, S.J., Fong, D.H., Berghuis, A.M., 2013. Prospects for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3. https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00022

Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., Kahlmeter, G., Olsen, B., 2008. Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria into the Arctic. Emerg Infect Dis 14, 70–72. https://doi.org/10.3201/eid1401.070704

Skinner, R., Cundliffe, E., Schmidt, F.J., 1983. Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. Journal of Biological Chemistry 258, 12702–12706. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44232-3

Sothiselvam, S., Neuner, S., Rigger, L., Klepacki, D., Micura, R., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2016. Binding of Macrolide Antibiotics Leads to Ribosomal Selection against Specific Substrates Based on Their Charge and Size. Cell Reports 16, 1789–1799. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.018

Southworth, D.R., Green, R., 2003. Ribosomal translocation: sparsomycin pushes the button. Current Biology 13, R652–R654. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00574-8

Spížek, J., Řezanka, T., 2017. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. Biochemical Pharmacology, Antibiotics - Meeting the Challenges of 21st Century Health Care: Part I 133, 20–28. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.001

Steenbergen, J.N., Alder, J., Thorne, G.M., Tally, F.P., 2005. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 55, 283–288. https://doi.org/10.1093/jac/dkh546

Su, W., Kumar, V., Ding, Y., Ero, R., Serra, A., Lee, B.S.T., Wong, A.S.W., Shi, J., Sze, S.K., Yang, L., Gao, Y.-G., 2018. Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. Proc Natl Acad Sci U S A 115, 5157–5162. https://doi.org/10.1073/pnas.1803313115

Svetlov, M.S., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2017. Kinetics of drug–ribosome interactions defines the cidality of macrolide antibiotics. Proc Natl Acad Sci USA 114, 13673–13678. https://doi.org/10.1073/pnas.1717168115

Svidritskiy, E., Ling, C., Ermolenko, D.N., Korostelev, A.A., 2013. Blasticidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 12283–12288. https://doi.org/10.1073/pnas.1304922110

T

Takahashi, Y., Umemura, E., Kobayashi, Y., Murakami, S., Nawa, T., Morinaka, A., Miyake, T., Shibasaki, M., 2018. Discovery of 2-hydroxyarbekacin, a new aminoglycoside antibiotic with reduced nephrotoxicity. J Antibiot 71, 345–347. https://doi.org/10.1038/ja.2017.60

Tenson, T., Lovmar, M., Ehrenberg, M., 2003. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. Journal of Molecular Biology 330, 1005–1014. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00662-4

Thamban Chandrika, N., Garneau-Tsodikova, S., 2018. Comprehensive review of chemical strategies for the preparation of new aminoglycosides and their biological activities. Chemical Society Reviews 47, 1189–1249. https://doi.org/10.1039/C7CS00407A

Thépaut, M., Campos-Silva, R., Renard, E., Barloy-Hubler, F., Ennifar, E., Boujard, D., Gillet, R., 2021. Safe and easy in vitro evaluation of tmRNA-SmpB-mediated *trans* -translation from ESKAPE pathogenic bacteria. RNA 27, 1390–1399. https://doi.org/10.1261/rna.078773.121

Tu, D., Blaha, G., Moore, P.B., Steitz, T.A., 2005. Structures of MLSBK Antibiotics Bound to Mutated Large Ribosomal Subunits Provide a Structural Explanation for Resistance. Cell 121, 257–270. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.005

V

Vaara, M., 1993. Outer membrane permeability barrier to azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin in gram-negative enteric bacteria. Antimicrob Agents Chemother 37, 354–356.

van Veen, H.W., 2010. Last of the multidrug transporters. Nature 467, 926–927. https://doi.org/10.1038/467926a

Vannuffel, P., Cocito, C., 1996. Mechanism of Action of Streptogramins and Macrolides. Drugs 51, 20–30. https://doi.org/10.2165/00003495-199600511-00006

Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2018a. Context-Specific Action of Ribosomal Antibiotics. Annu. Rev. Microbiol. 72, 185–207. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062329

Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2018b. How Macrolide Antibiotics Work. Trends in Biochemical Sciences 43, 668–684. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011

Vazquez-Laslop, N., Thum, C., Mankin, A.S., 2008. Molecular Mechanism of Drug-Dependent Ribosome Stalling. Molecular Cell 30, 190–202. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.026

Velazquez-Campoy, A., Freire, E., 2006. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. Nature Protocols 1, 186–191. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.28

Velazquez-Campoy, A., Luque, I., Freire, E., 2001. The application of thermodynamic methods in drug design. Thermochimica Acta 380, 217–227. https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00671-2

Versporten, A., Bolokhovets, G., Ghazaryan, L., Abilova, V., Pyshnik, G., Spasojevic, T., Korinteli, I., Raka, L., Kambaralieva, B., Cizmovic, L., Carp, A., Radonjic, V., Maqsudova, N., Celik, H.D., Payerl-Pal, M., Pedersen, H.B., Sautenkova, N., Goossens, H., 2014. Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. The Lancet Infectious Diseases 14, 381–387. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70071-4

Vester, B., Douthwaite, S., 2001. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 45, 1–12. https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.1-12.2001

Vetting, M.W., S. de Carvalho, L.P., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L., Blanchard, J.S., 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. Archives of Biochemistry and Biophysics 433, 212–226. https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.003

Vicens, Q., Westhof, E., 2001. Crystal Structure of Paromomycin Docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A Site. Structure 9, 647–658. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00629-3

Vikesland, P., Garner, E., Gupta, S., Kang, S., Maile-Moskowitz, A., Zhu, N., 2019. Differential Drivers of Antimicrobial Resistance across the World. Accounts of Chemical Research 52, 916–924. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00643

Vilches, C., Hernandez, C., Mendez, C., Salas, J.A., 1992. Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, Streptomyces antibioticus. J Bacteriol 174, 161–165.

Vimberg, V., Xiong, L., Bailey, M., Tenson, T., Mankin, A., 2004. Peptide-mediated macrolide resistance reveals possible specific interactions in the nascent peptide exit tunnel. Molecular Microbiology 54, 376–385. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04290.x

von Ahsen, U., Davies, J., Schroeder, R., 1991. Antibiotic inhibition of group I ribozyme function. Nature 353, 368–370. https://doi.org/10.1038/353368a0

W

Wachino, J., Arakawa, Y., 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. Drug Resistance Updates 15, 133–148. https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.05.001

Wachino, J., Shibayama, K., Kurokawa, H., Kimura, K., Yamane, K., Suzuki, S., Shibata, N., Ike, Y., Arakawa, Y., 2007. Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA m1A1408 Methyltransferase, NpmA, Found in a Clinically Isolated Escherichia coli Strain Resistant to Structurally Diverse Aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 51, 4401–4409. https://doi.org/10.1128/AAC.00926-07

Waksman, S.A., Lechevalier, H.A., 1949. Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin- Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms' 3.

Wang, L., Pulk, A., Wasserman, M.R., Feldman, M.B., Altman, R.B., Cate, J.H.D., Blanchard, S.C., 2012. Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. Nature Structural & Molecular Biology 19, 957–963. https://doi.org/10.1038/nsmb.2360

Watson, Zoe L, Fred R Ward, Raphaël Méheust, Omer Ad, Alanna Schepartz, Jillian F Banfield, et Jamie HD Cate, 2020. Structure of the Bacterial Ribosome at 2 Å Resolution. ELife 9 (14 septembre 2020): e60482. https://doi.org/10.7554/eLife.60482

Wilhelm, J.M., Jessop, J.J., Pettitt, S.E., 2002. Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: stimulation of errors in the translation of natural messengers in extracts of cultured human cells [WWW Document]. ACS Publications. https://doi.org/10.1021/bi00600a002

Wilson, D.N., 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. Nature Reviews Microbiology 12, 35–48. https://doi.org/10.1038/nrmicro3155

Wilson, D.N., Arenz, S., Beckmann, R., 2016. Translation regulation via nascent polypeptide-mediated ribosome stalling. Curr Opin Struct Biol 37, 123–133. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.01.008

Woodcock, J., Moazed, D., Cannon, M., Davies, J., Noller, H.F., 1991. Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. EMBO J 10, 3099–3103. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07863.x

World Health Orgnization (WHO), 2019. WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf.

Wright, G., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Advanced Drug Delivery Reviews 57, 1451–1470. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002

Y

Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H., Arakawa, Y., 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in Pseudomonas aeruginosa. The Lancet 362, 1888–1893. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14959-8

Yu, H., 2021. Responsible use of negative research outcomes—accelerating the discovery and development of new antibiotics. J Antibiot 74, 543–546. https://doi.org/10.1038/s41429-021-00439-w

Z

Zhang, K., 2016. Gctf: Real-time CTF determination and correction. J Struct Biol 193, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.11.003

Zivanov, J., Nakane, T., Forsberg, B.O., Kimanius, D., Hagen, W.J., Lindahl, E., Scheres, S.H., 2018. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. eLife 7, e42166. https://doi.org/10.7554/eLife.42166

Zivanov, J., Nakane, T., Scheres, S.H.W., 2019. A Bayesian approach to beam-induced motion correction in cryo-EM single-particle analysis. IUCrJ 6, 5–17. https://doi.org/10.1107/S205225251801463X

Zuckerman, J.M., 2004. Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin, telithromycin. Infectious Disease Clinics of North America, Antibacterial Therapy and Newer Agents 18, 621–649. https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.04.010

Eva RENARD

Études biophysiques et structurales d'antibiotiques ciblant le ribosome

Résumé

La lutte contre les agents pathogènes multirésistants et le développement de nouveaux antibiotiques ont été classés comme une priorité absolue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Mais peu de nouveaux antibiotiques apparaissent en thérapie. Près de la moitié des antibiotiques commercialisés ciblent le ribosome, la machinerie essentielle au fonctionnement d'une cellule. Les macrolides et les aminoglycosides ciblent respectivement le tunnel de sortie des peptides néo-synthétisés (PET, Peptide Exit Tunnel) et le site A accepteur du ribosome. Ce projet porte sur l'étude du mécanisme d'action de ces familles d'antibiotiques ou de leurs dérivés. Il est traité avec une approche intégrative utilisant notamment des outils biophysiques et de biologie structurale. L'objectif est de contribuer de manière significative au développement de médicaments plus efficaces en améliorant la compréhension des modes d'action des antibiotiques contre les bactéries.

Mots-clés : antibiotiques, ribosome, Isothermal titration Calorimetry (ITC), biologie structurale

Summary

The fight against multidrug-resistant pathogens and the development of new antibiotics have been ranked as a top priority by the World Health Organization (WHO). But few new antibiotics appear in therapy. Almost half of the antibiotics on the market target the ribosome, the machinery essential to the functioning of a cell. Macrolides and aminoglycosides respectively target the exit tunnel of neo-synthesized peptides (PET, Peptide Exit Tunnel) and the acceptor A site of the ribosome. This project concerns the study of the mechanism of action of these families of antibiotics or their derivatives. It is treated with an integrative approach using biophysical and structural biology tools. The objective is to contribute significantly to the development of more effective drugs by improving the understanding of the modes of action of antibiotics against bacteria.

Keywords: antibiotics, ribosome, isothermal titration calorimetry (ITC), structural biology