



HAL
open science

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

Quentin Vicens

► **To cite this version:**

Quentin Vicens. Structures cristallographiques de complexes entre des fragments d'acides ribonucléiques comportant le site A ribosomique et des antibiotiques de la famille des aminoglycosides. Médicaments. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2002. Français. NNT: . tel-00003572

HAL Id: tel-00003572

<https://theses.hal.science/tel-00003572>

Submitted on 17 Oct 2003

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Doctorat

Discipline : Sciences du Vivant

Quentin VICENS

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

Soutenu le jeudi 19 décembre 2002

Jury :

Pr Bernard EHRESMANN

Dr Jean-Pierre GUILLOTEAU

Dr Alberto D. PODJARNY

Pr Marina V. RODNINA

Pr Eric WESTHOF

Président et examinateur

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Directeur de thèse

Remerciements

Eric Westhof Benoit Masquida
Pascal Auffinger Maman & Papa Agolent
Marina Rodnina
Alberto Podjarny petite Jane Boris Franconi
ANDREAS WERNER LDC JACOB
Gabrielle Issler Aurelie Lescoute CNRS
Jean-Pierre Guilloteau Anysia
Titoune Papi & Mamie
Philippe Wolff PHILIPPE DUMAS
Eric Ennifar Alexandre Specht Patrice Guerné Fabrice Jossinet
Alexandrine Specht
Alexandrine Specht ARC Bernard Ehresmann
UPR 9002 Valérie Goldschmidt
Marcelle & Fern Nükhet Cavusoglu Erik Böttger
Mikol ESRF Valérie Fritsch
Lukasz Bielecki
IBMC Michel Zerbib Adeline Voelklin
Christian Massire Frank Walter Aventis
Matthieu Koepf Stefan Vörlter Mérie Lehnert
Marty Serra Isabelle Martin

Table des matières

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	11
I. Origines et propriétés des antibiotiques	11
A. Historique des maladies infectieuses et de leurs traitements	11
B. Les antibiotiques : une découverte scientifique majeure du XX ^e siècle	12
C. Classification générale des antibiotiques	14
II. Les aminoglycosides : généralités	17
A. Classification des aminoglycosides	17
B. Caractéristiques	20
1) Spectre d'action	20
2) Le site A comme cible cellulaire	21
3) Mode d'action	21
C. Les traitements aux aminoglycosides : le revers de la médaille	23
1) Effets secondaires toxiques	23
2) Phénomènes de résistance	25
III. Etudes structurales et fonctionnelles de complexes site A/amino-glycosides	30
A. Caractérisation biochimique	30
1) Concentrations minimales d'inhibition	30
2) Cartographie aux sondes chimiques	31
3) Constantes de dissociation	32
B. Etudes par résonance magnétique nucléaire	34
C. Etudes par cristallographie aux rayons X	37
D. Confrontation des résultats des différentes études structurales	42
IV. Etudes structurales d'autres complexes	45
V. Revue des interactions ARN/amino-glycosides	47
VI. Présentation des résultats de ce travail de thèse	61
CHAPITRE 2 : STRUCTURES CRISTALLOGRAPHIQUES DE TROIS COMPLEXES SITE A/AMINOGLYCOSIDES	63
I. Les étapes depuis la conception jusqu'à la diffraction	63
A. Conception des oligoribonucléotides	63
B. Synthèses chimiques et purifications	67
1) Résultats	67
2) Problèmes de déprotection	71
3) Problèmes de purifications par HPLC	74
C. Recherche de conditions de renaturation	76
1) Résultats des antibiogrammes	76
2) Résultats des expériences de fusion	77
3) Résultats des expériences par PAGE	79
D. Cristallisation et premiers essais de diffraction	80
1) Cristallogénèse du fragment F3	80
2) Cristallogénèse des fragments F3 et A1	81
3) Cristallogénèse du fragment A3	82
4) Optimisation des conditions de cristallisation	89
5) Expériences de micro- et macro-ensemencement	93
E. Cristallisation de différents complexes	94
1) Cristallisation de complexes contenant la tobramycine	94
2) Cristallisation de complexes contenant la généticine	95

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

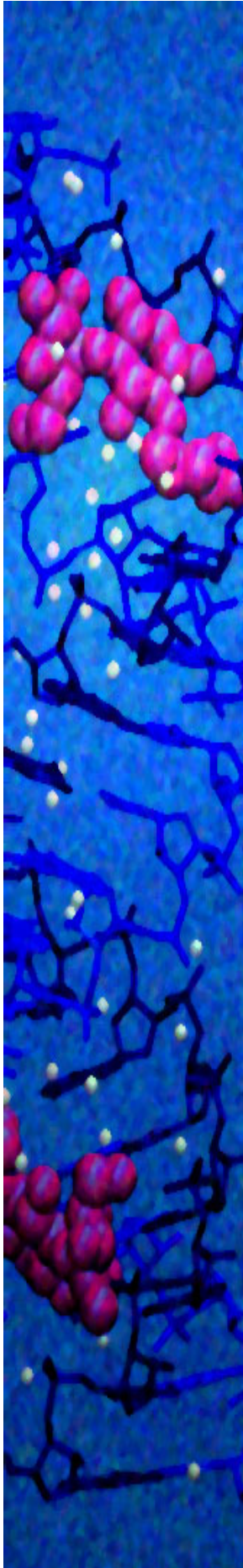
Abréviations

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

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

*La nature représente une succession de miracles.
L'homme ne peut pas l'améliorer ; il ne peut que la modifier.*

Peter Benchley



Chapitre 1

Introduction

I. Origines et propriétés des antibiotiques

A. Historique des maladies infectieuses et de leurs traitements

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

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

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

B. Les antibiotiques : une découverte scientifique majeure du XX^e siècle

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

Déjà en 1889, Jean-Antoine Villemin avait proposé le terme « antibiote » pour désigner tout « principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie » (source : « Cours de bactériologie générale » ; www.microbes-edu.org). En 1908, le Prix Nobel de médecine fut attribué à Paul Ehrlich pour sa mise au point du « salvarsan », composé contenant de l'arsenic qui tue les spirochètes responsables de la syphilis. Vingt ans plus tard, Sir Alexander Fleming remarqua qu'une moisissure de type *Penicillium* était capable d'inhiber la croissance des staphylocoques. A la fin des années 1930, Domagk et Tréfouël démontrèrent l'action d'un sulfamide sur certaines souches de streptocoques. Pendant la Seconde guerre mondiale, les chercheurs Ernst Boris Chain et Sir Howard Walter Florey poursuivirent les travaux de Fleming et isolèrent la « pénicilline » puis déterminèrent sa formule chimique. Les premiers médicaments à base de pénicilline furent fabriqués industriellement aux Etats-Unis dès 1942 et



Figure 1.1 : Timbre de commémoration de la découverte de la pénicilline.

(La Poste – 24/09/2001 © COSMOS / SPL / DEEP LIGHT PRODUCTION / J. BURGESS)

permirent de sauver plusieurs millions de vies humaines (Figure 1.1). Ce fut la porte ouverte à la recherche de principes actifs chez d'autres organismes (moisissures de fruits, bactéries filamenteuses vivant dans le sol, ...) permettant d'enrayer l'essentiel des infections bactériennes connues. En 1941, le terme « antibiotique » fut proposé par Selman Waksman pour désigner « toute substance chimique produite par un micro-organisme capable d'inhiber le développement et de détruire d'autres micro-organismes en solution diluée » (Denis, *et al.* 2001). Au cours des décennies suivantes, l'arsenal anti-bactérien n'a cessé de s'enrichir de nouveaux antibiotiques. La streptomycine fut isolée à partir de *Streptomyces griseus* (1943), le chloramphénicol à partir de *Streptomyces venezuelaela* (1947), la chlortétracycline à partir de *Streptomyces aureofaciens* (1948), l'érythromycine à partir de *Streptomyces erythreus* (1952), etc. Depuis les années 1950-60, de multiples dérivés semi-synthétiques d'antibiotiques naturels (par exemple la fluoroquinolone), rendus plus actifs par ajout de divers substituants, et des antibiotiques entièrement synthétiques (par exemple l'azithromycine) sont commercialisés par les entreprises pharmaceutiques. Ils s'agit toutefois uniquement de molécules appartenant à des classes d'antibiotiques déjà connues. En effet, au cours des trente dernières années, les connaissances scientifiques n'ont permis la découverte que d'une seule nouvelle famille d'antibiotiques non-naturels, celle des oxazolidinones (Slee, *et al.* 1987 ; Swaney, *et al.*

1998). Aujourd'hui, les traitements anti-bactériens à base d'antibiotiques, appelés « antibiothérapies », sont largement prescrits. En 1997, la commercialisation des antibiotiques représentait un marché mondial de 16 milliards d'euros (Carbon et Bax 1998). En France, près de 60 millions de prescriptions de traitements antibiotiques sont délivrées en ville chaque année (source : « Economie de la santé » ; www.medcost.fr). En provoquant une importante diminution du taux de mortalité, la découverte des antibiotiques a profondément bouleversé la médecine moderne.

C. Classification générale des antibiotiques

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

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

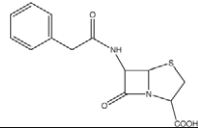
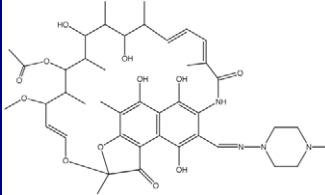
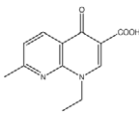
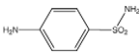
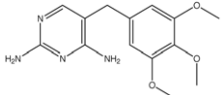
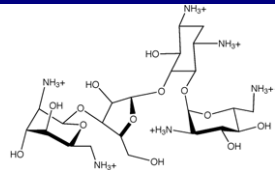
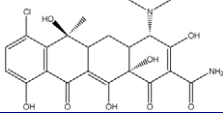
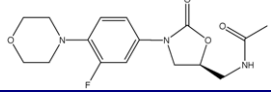
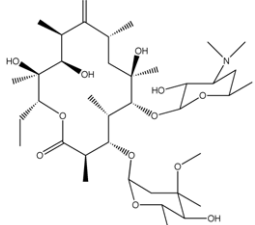
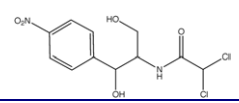
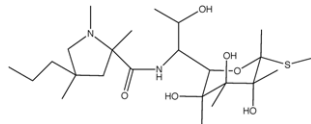
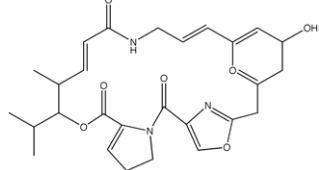
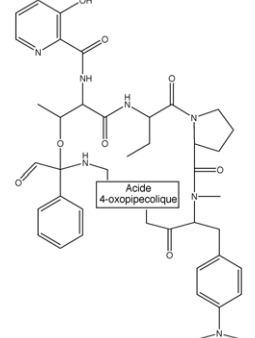
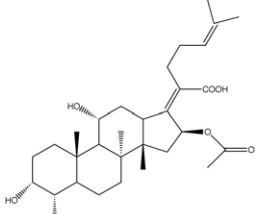
Mode d'action	Classe d'antibiotiques	Exemple	Origine	Nature chimique	Modalité d'action	Spectre d'action
Attaque de la paroi	β -lactamine	Pénicilline G	<i>Penicillium notatum</i>		Inhibition des transpeptidases	Gram +
	Glycopeptide	Vancomycine	<i>Streptomyces orientalis</i>	Sucres et acides aminés fixés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

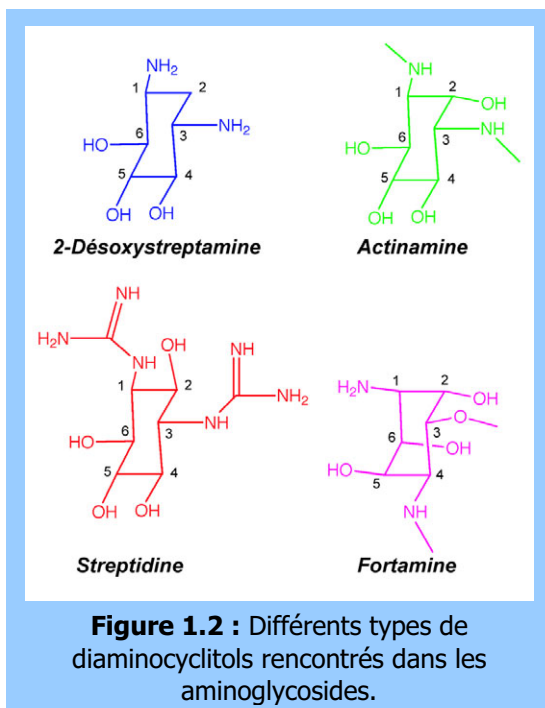
Tableau 1.2 : Les différentes classes d'antibiotiques interférant avec la synthèse des protéines.

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

II. Les aminoglycosides : généralités

A. Classification des aminoglycosides

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



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

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

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

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

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

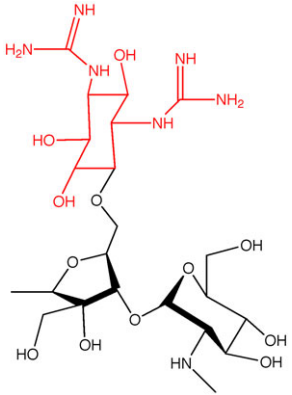
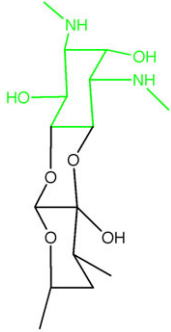
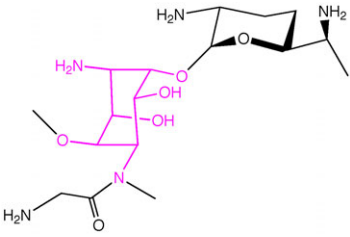
Tableau 1.3 : Aminoglycosides contenant le cycle 2-DOS.

Le cycle 2-DOS est coloré en bleu. La partie néamine est encadrée par des pointillés.

Substitution glycosidique	Exemple	Origine	Nature chimique
4-	Apramycine	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	
5-	Hygromycine B	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	
4,5-	Néomycine Paromomycine	<i>Streptomyces fradiae</i> <i>Streptomyces rimosus</i>	<p>Néamine ($R=NH_3^+$)</p> <p>Ribostamycine (néamine+cycle III)</p> <p>Néomycine ($R=NH_3^+$)</p> <p>Paromomycine ($R=OH$)</p>
4,6-	Kanamycine Tobramycine	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> <i>Streptomyces tenebrarius</i>	<p>Kanamycine A ($R_1=OH; R_2=OH$)</p> <p>Kanamycine B ($R_1=NH_3^+; R_2=OH$)</p> <p>Tobramycine ($R_1=NH_3^+; R_2=H$)</p>
	Gentamicine C1a Généticine	<i>Micromonospora purpurea</i> <i>Micromonospora rhodorangea</i>	<p>Gentamicine C1a ($R_1=H; R_2=H; R_3=H; R_4=NH_3^+$)</p> <p>Généticine ($R_1=OH; R_2=OH; R_3=CH_3; R_4=OH$)</p>

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

Le code utilisé pour colorer les diaminocyclitols est celui de la Figure 1.2.

Diaminocyclitol	Substitution glycosidique	Exemple	Origine	Nature chimique
Streptidine	4-	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	
Actinamine	4,5-	Spectinomycine	<i>Streptomyces spectabilis</i>	
Fortamine	6-	Fortimicine A	<i>Micromonospora olivoasterospora</i>	

B. Caractéristiques

1) Spectre d'action

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

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

2) Le site A comme cible cellulaire

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

3) Mode d'action

Les aminoglycosides sont responsables de plusieurs dysfonctionnements irréversibles liés à leur fixation au site A, qui s'enchaînent pour conduire à la mort de la bactérie (Mingeot-Leclercq, *et al.* 1999 ; Wright, *et al.* 1998). Un petit nombre d'aminoglycosides (sous forme cationique au pH physiologique) traverse passivement la paroi des bactéries et se lie par interactions électrostatiques aux lipides de la membrane plasmique des bactéries. Ces aminoglycosides traversent ensuite la membrane plasmique par un mécanisme dépendant de l'énergie fournie par le potentiel transmembranaire, et qui impliquerait une protéine-transporteur (Wright, *et al.* 1998). Au sein de la bactérie, la spécificité des aminoglycosides pour le site A représente la clé de leur action antibiotique. Des études cinétiques (Pape, *et al.* 2000 ; Rodnina et Wintermeyer 2001) et cristallographiques (Carter, *et al.* 2000 ; Ogle, *et al.* 2001) ont montré que les aminoglycosides se liant au site A stabilisent une conformation locale particulière de la sous-unité 30S. Cette stabilisation fausse le mécanisme de lecture de l'ARNm à traduire (mécanisme de décodage), favorisant ainsi l'incorporation d'acides aminés erronés dans les protéines en cours de synthèse (Davies et Davis 1968 ; Davies, *et al.* 1965). Par conséquent, la fixation d'un aminoglycoside au site A provoque une accumulation de protéines incorrectement

traduites dans la bactérie (Davis 1987). Certaines de ces protéines vont endommager la membrane plasmique : elles sont incorporées à cette membrane et forment des pores qui favorisent une entrée non-contrôlée et irréversible d'ions et d'aminoglycosides dans la bactérie (Davis 1987 ; Davis, *et al.* 1986). Rapidement, les compositions ioniques intracellulaires sont perturbées et l'augmentation du nombre de molécules d'aminoglycosides dans la cellule provoque l'inhibition de tous les ribosomes, empêchant la poursuite de toute synthèse de protéines, ce qui conduit à la mort de l'agent infectieux.

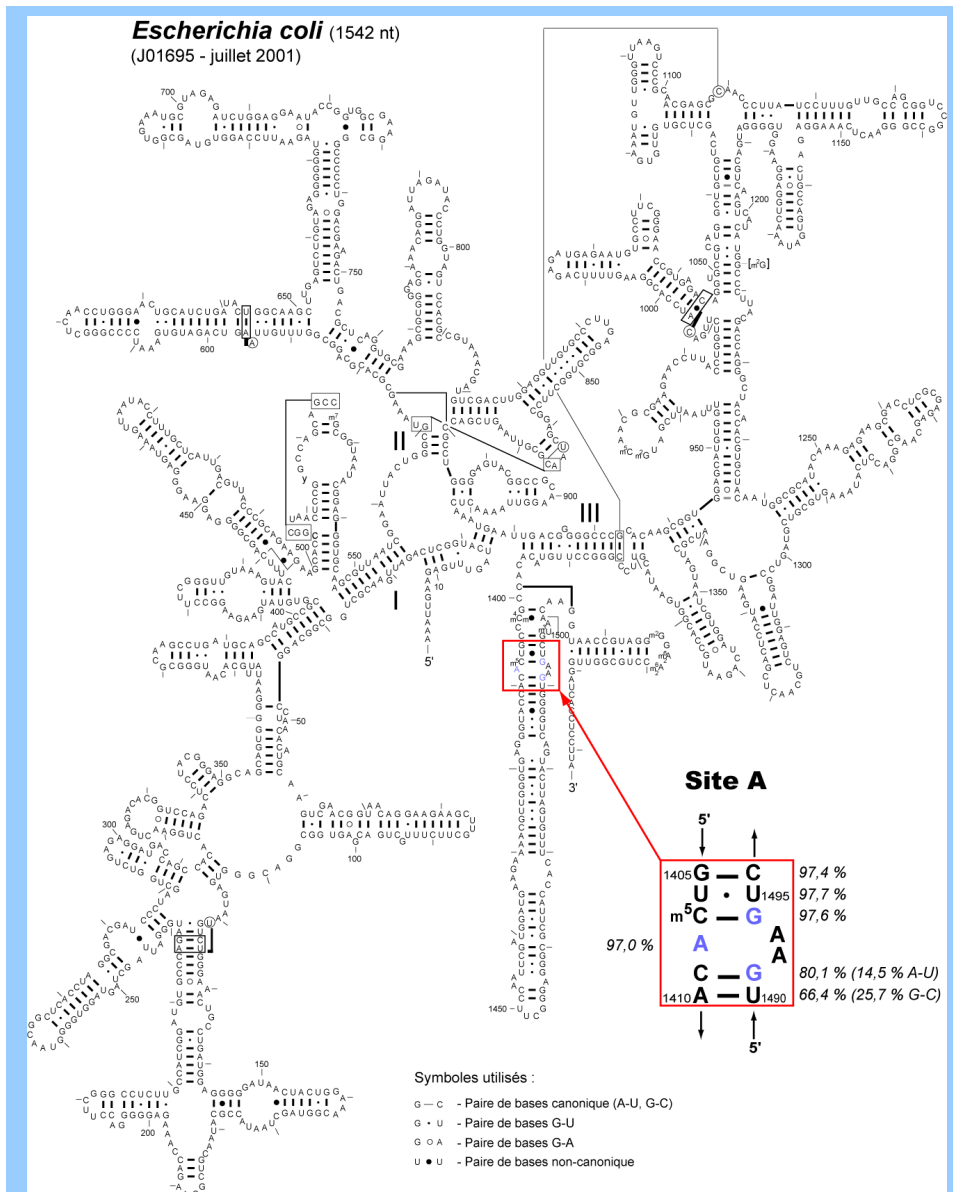


Figure 1.3 : Localisation du site A au sein de la structure secondaire de l'ARN 16S d'*Escherichia coli*.

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

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

1) Effets secondaires toxiques

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

(a) Nephrotoxicité

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

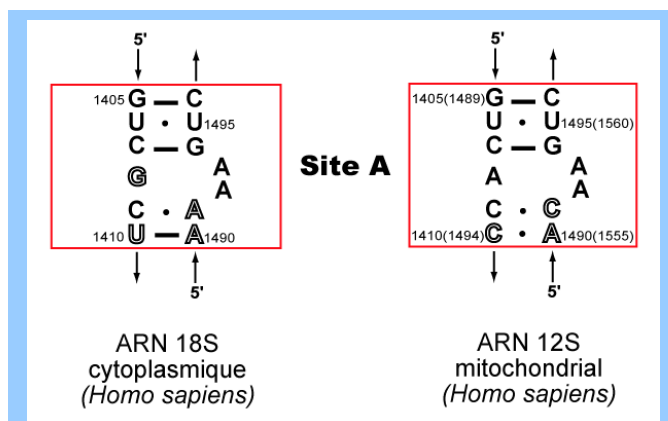


Figure 1.4 : Séquences des sites A cytoplasmique et mitochondrial chez l'homme.

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

la membrane plasmique (Chung, *et al.* 1985). Ils forment des agrégats et inhibent l'activité de certaines phospholipases, ce qui perturbe l'intégrité de la membrane (Mingeot-Leclercq et Tulkens 1999). Cette toxicité se manifeste par des signes d'altération des lysosomes dans l'urine et par l'excrétion d'enzymes des membranes cellulaires et de protéines ordinairement réabsorbées

par les tubules rénaux. D'autres mécanismes impliquent la formation de radicaux libres par des complexes entre des aminoglycosides du type 4,6-2-DOS et des ions métalliques (Ali 1995 ; Forge et Schacht 2000 ; Jezowska-Bojczuk, *et al.* 1998 ; Priuska, *et al.* 1998). La liaison au site A des ribosomes cytoplasmiques (Bar-Nun, *et al.* 1983 ; Lynch et Puglisi 2001a) et des ribosomes des organelles (microsomes et mitochondries) (Ali 1995 ; Kurtz 1974) (Figure 1.4) a aussi été identifiée comme source de toxicité. Les moyens qui permettent de diminuer les effets néphrotoxiques des aminoglycosides consistent à administrer les aminoglycosides en une seule dose quotidienne au lieu de trois, et à modifier chimiquement les aminoglycosides de manière à défavoriser leur interaction avec les phospholipides (Mingeot-Leclercq et Tulkens 1999 ; Mingeot-Leclercq, *et al.* 1991).

(b) Ototoxicité

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

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

2) Phénomènes de résistance

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

(a) Mécanismes de résistance aux aminoglycosides

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

- Réduction de l'assimilation intracellulaire

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

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

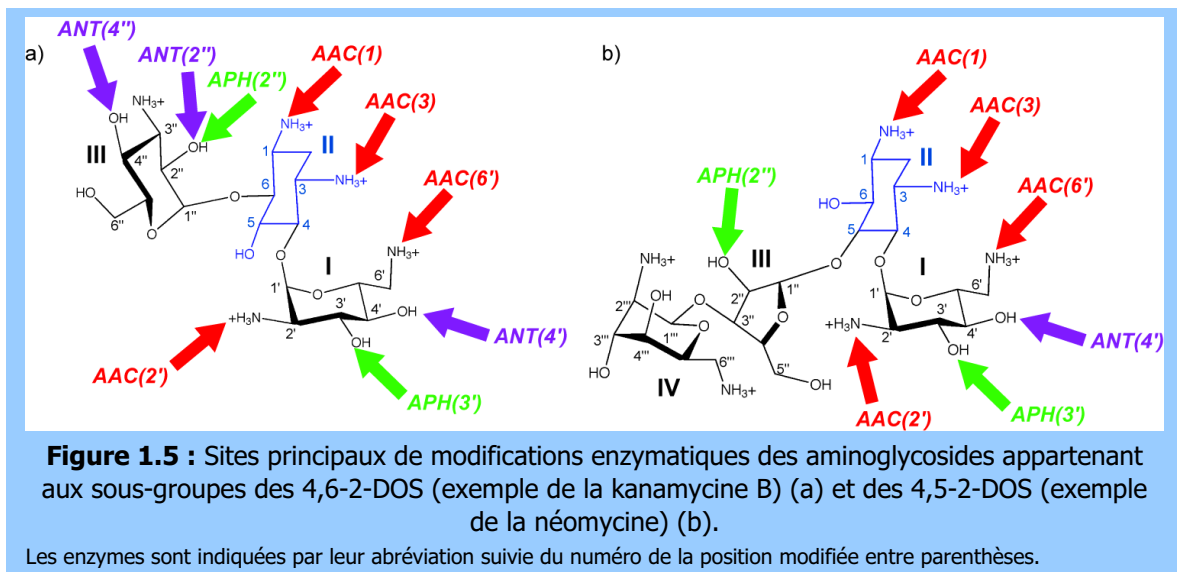
- **Camouflage du site A**

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

- **Inactivation de l'aminoglycoside par modification enzymatique**

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

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



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

(b) Stratégies pour freiner les mécanismes de résistance

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

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

Les avancées de la biologie moléculaire et de l'automatisation de la synthèse chimique (Wijkmans et Beckett 2002) ont permis la recherche par chimie combinatoire de nouveaux dérivés d'aminoglycosides basés sur le cycle 2-DOS et sur la néamine (Greenberg, *et al.* 1999 ; Marcaurelle et Seeberger 2002 ; Sucheck et Shue 2001). Des entreprises pharmaceutiques ont lancé plusieurs programmes de recherche de nouveaux agents anti-

infectieux plus efficaces et moins sujets aux mécanismes de résistances (Böddeker, *et al.* 2002 ; Bürli, *et al.* 2002 ; Desnottes 1998 ; Letavic, *et al.* 2002 ; Sciotti, *et al.* 2002). A la fin de l'année 2000, 19 nouveaux antibiotiques étaient en développement dans plusieurs entreprises (Coates, *et al.* 2002 ; Fisher-Wilson 2002). Enfin, dans la recherche de nouveaux types d'agents anti-infectieux, des voies autres que celles de l'antibiothérapie (utilisation de peptides antimicrobiens provenant d'insectes, de bactériophages, vaccinations, ...) sont aussi explorées (Schuch, *et al.* 2002 ; Tan, *et al.* 2000).

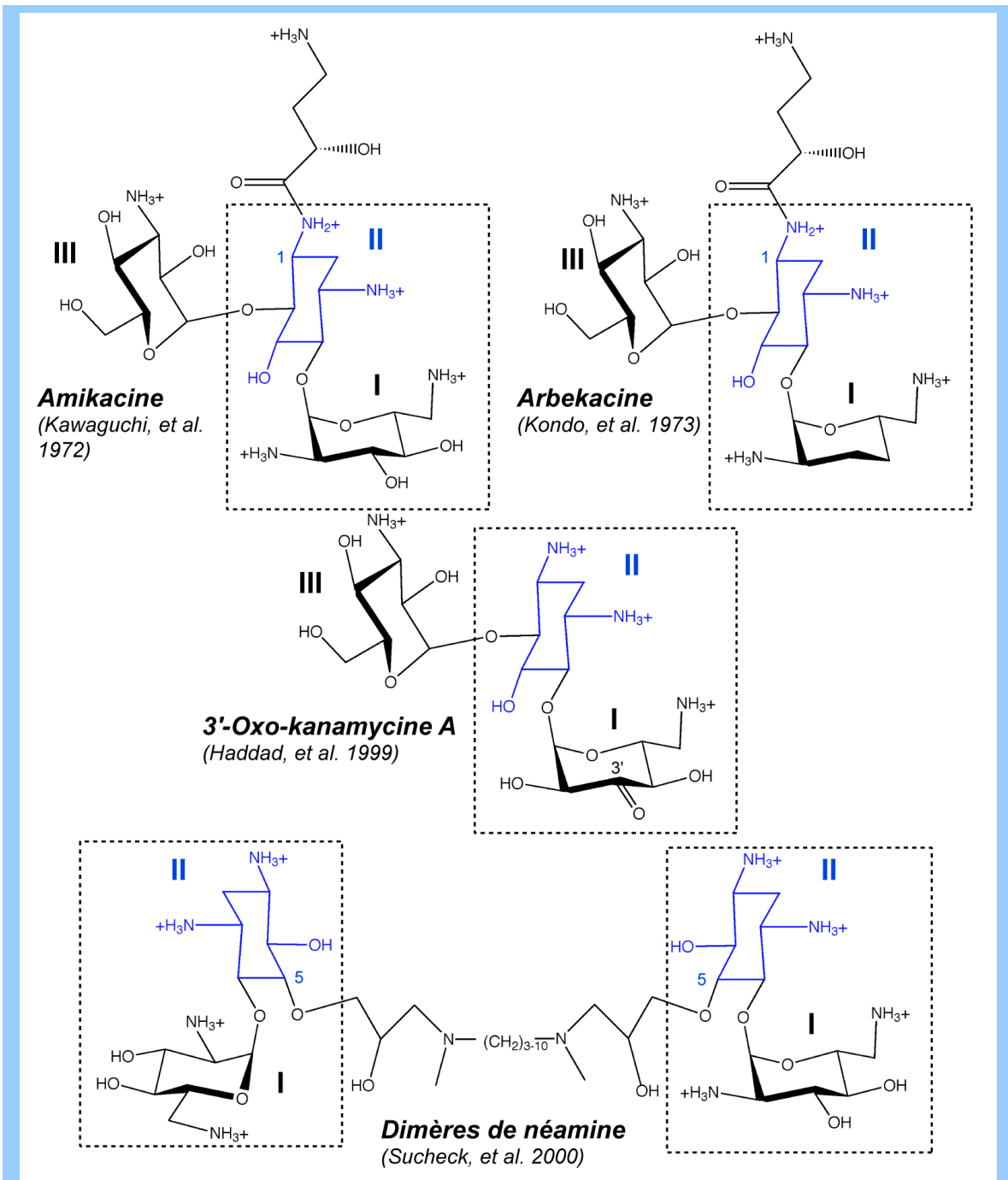


Figure 1.6 : Structures de quelques aminoglycosides de nouvelle génération.

Dans chaque antibiotique, le cycle 2-DOS est coloré en bleu et la partie néamine est encadrée par des pointillés.

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

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

A. Caractérisation biochimique

1) Concentrations minimales d'inhibition

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

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

Réfé- rence	Apra- mycine	Néamine	Néomy- cine	Paromo- mycine	Kanamy- cine A	Tobra- mycine	Genta- micine C	Généticine
1	-	12,5	8	8	4	1	1	-
2	10	40	5	10	10	2,5	2,5	-
3	-	-	32	-	16	4	32	-
4	5	20	5	5	2,5	1,25	1,25	2,5
5	10	-	10	10	5	2,5	5	5

1 : Garrod et O'Grady (1968) ; Price et Godfrey (1974)

2 : De Stasio *et al.* (1989)

3 : Prammananan *et al.* (1998)

4 : Recht *et al.* (1999)

5 : Recht *et al.* (2001)

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

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

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

Mutation exprimée	Apra- mycine	Néamine	Néo- mycine	Paromo- mycine	Kana- mycine A	Tobra- mycine	Genta- micine C	Généticine
U1406A ⁴	2,5	-	5	5	640	160	320	640
A1408G ³	>1280	>1280	640	20	1280	160	160	2,5
A1408G ²	-	-	>1024	-	>1024	>1024	>256	-
C1409U ¹	20	80	5	10	20	2,5	2,5	-
G1491U ¹	640	160	160	320	160	40	40	-
G1491C ¹	320	160	80	320	160	20	20	-

1 : De Stasio *et al.* (1989)

2 : Prammananan *et al.* (1998)

3 : Recht *et al.* (1999)

4 : Recht *et al.* (2001)

2) Cartographie aux sondes chimiques

Quelques années après les publications des résultats de cartographies aux sondes chimiques qui avaient dévoilé le site de fixation des aminoglycosides contenant un cycle 2-DOS sur l'ARNr 16S (Moazed et Noller 1987 ; Woodcock, *et al.* 1991), parurent des résultats obtenus avec une technique similaire pour un oligoribonucléotide analogue de l'extrémité 3' de l'ARN 16S ne contenant que 49 nucléotides (sans les modifications des nucléotides naturels) (Purohit et Stern 1994) (Figure 1.7). Deux ans plus tard, deux groupes

publiaient indépendamment le même ensemble de cartographies, mais pour un oligoribonucléotide de 27 nucléotides (ASR-27) (Miyaguchi, *et al.* 1996 ; Recht, *et al.* 1996) (Figure 1.7). Ces résultats révélèrent deux importantes caractéristiques : (i) les oligoribonucléotides contiennent les nucléotides du site A suffisants pour l'interaction avec les aminoglycosides, (ii) les aminoglycosides interagissent de la même manière avec le site A au sein du ribosome et dans un contexte d'oligoribonucléotide. Ces particularités ont permis une étude approfondie (mesures de constantes de dissociation, RMN, calculs théoriques, ...) du mode d'interaction des aminoglycosides avec le site A incorporé dans l'oligoribonucléotide ASR-27.

3) Constantes de dissociation

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

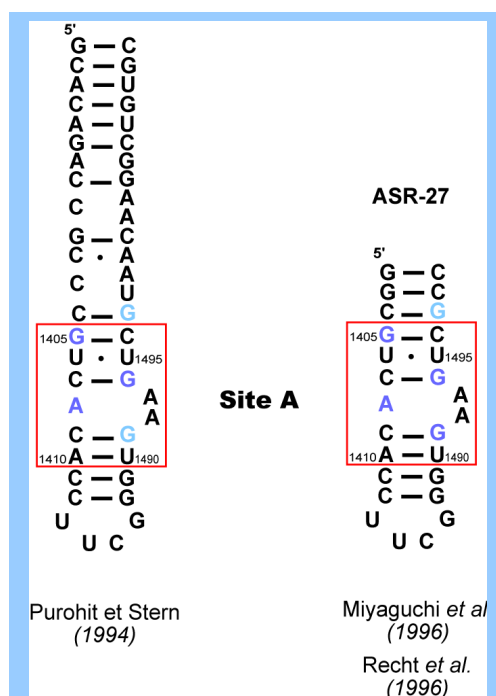


Figure 1.7 : Analogues de l'extrémité 3' de l'ARN 16S d'*Escherichia coli* contenant le site A.

Les protections aux sondes chimiques sont indiquées en bleu foncé (forte) et bleu clair (faible).

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

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

Quelles que soient les techniques employées, des K_D de l'ordre du micromolaire ont été mesurées pour tous les aminoglycosides testés (Tableau 1.7). Des K_D de 1-2 μM sont obtenus pour la plupart des aminoglycosides appartenant aux familles de l'apramycine et des 4,5- et 4,6-2-DOS, sauf pour la néomycine ($K_D \approx 0,1 \mu\text{M}$) et la néamine ($K_D \approx 10 \mu\text{M}$).

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

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

Référence	Séquence	Apramycine	Néamine	Néomycine	Paromomycine	Kanamycine*	Tobramycine	Gentamicine B	Généticine
1	sauvage	-	-	-	0,2	-	-	-	-
2	sauvage	6,3	7,8	0,02	0,2	18	1,5	1,7	-
	U1406A	9,3	5,5	0,01	0,03	28	2,1	9,9	-
	U1495A	13	31	0,4	2,7	33	4,1	12	-
3	sauvage	2	-	-	0,1	2	2	-	-
	A1408G	0,5	-	-	0,7	2	2	-	-
	C1409U	2	-	-	1,1	>20	>20	-	-
	C1491U	2	-	-	2	2	2	-	-
	Site A <i>H. sapiens</i>	0,5	-	-	>20	1,6	1,4	-	-
4	sauvage	-	-	0,05	1,7	1,3	1,4	-	-
	A1408G	-	-	1,1	2	6	7,5	-	-
	Site A <i>H. sapiens</i>	-	-	0,3	2,2	1,4	1,6	-	-

1 : Recht *et al.* (1996)

2 : Wong *et al.* (1998)

3 : Griffey *et al.* (1999)

4 : Hyun Ryu *et al.* (2001)

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

B. Etudes par résonance magnétique nucléaire

Les premières observations au niveau atomique du site A (inséré dans l'oligoribonucléotide-modèle ASR-27), seul et complexé à deux aminoglycosides, ont été obtenus par un laboratoire américain (Fourmy, *et al.* 1996 ; Fourmy, *et al.* 1998a ; Fourmy, *et al.* 1998b ; Yoshizawa, *et al.* 1998). Les structures publiées permettent de définir le site de fixation d'un dérivé 4,5-2-DOS, la paromomycine (Fourmy, *et al.* 1996), et d'un dérivé 4,6-2-DOS, la gentamicine C1a (Yoshizawa, *et al.* 1998) au niveau du site A (Figure 1.8). Chaque antibiotique se fixe dans le sillon profond du site A, au niveau d'une poche formée par l'extrusion de la base A1492 hors de l'hélice d'ARN et par la paire de bases non-canonique A1408•A1493 (écart RMS supérieur à 3 Å entre les adénines 1492 et 1493 au sein du site A libre et fixé à un aminoglycoside) (Figure 1.9). Les antibiotiques sont maintenus par des liaisons hydrogène entre les groupements fonctionnels des cycles I à III et les nucléotides 1405 à 1409 et 1491 à 1495. Dans les deux complexes, la partie néamine (cycles I et II)

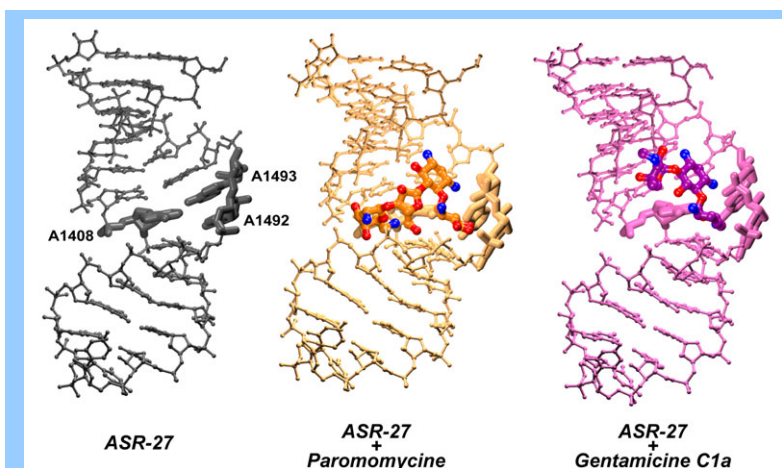


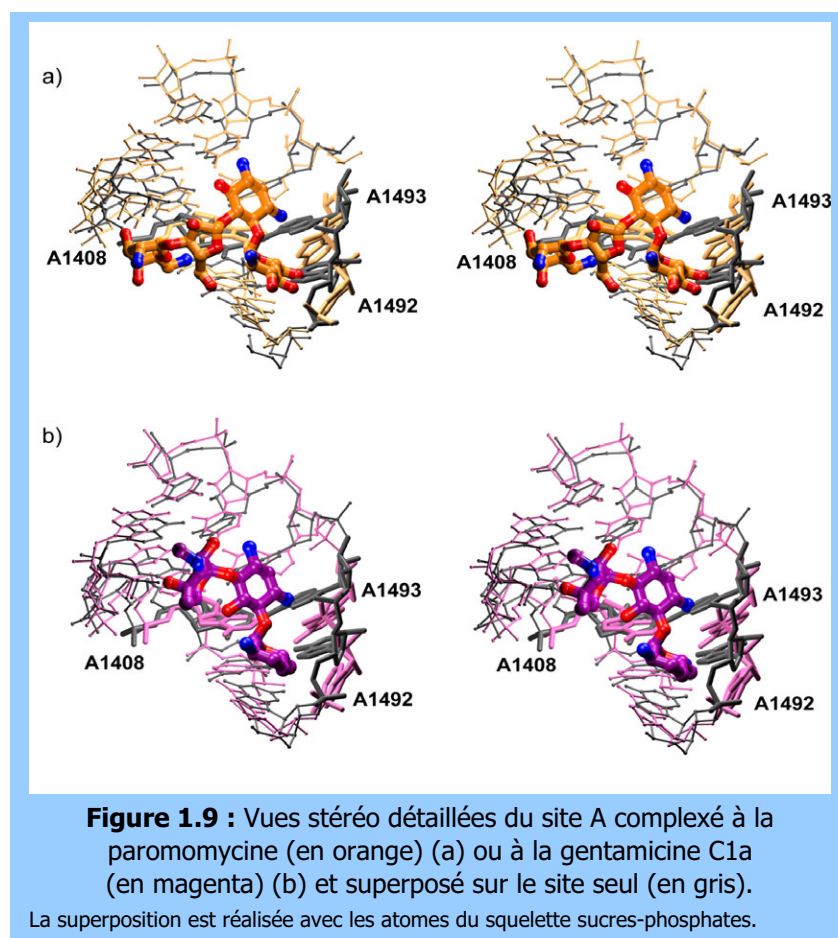
Figure 1.8 : Structures résolues par RMN du modèle ASR-27 seul (gauche), et complexé à la paromomycine (milieu) ou à la gentamicine C1a (droite).

Les adénines 1408, 1492 et 1493 sont indiquées en gras.
(Numéros d'identification respectifs dans la PDB : 1A3M, 1PBR et 1BYJ).

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

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

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



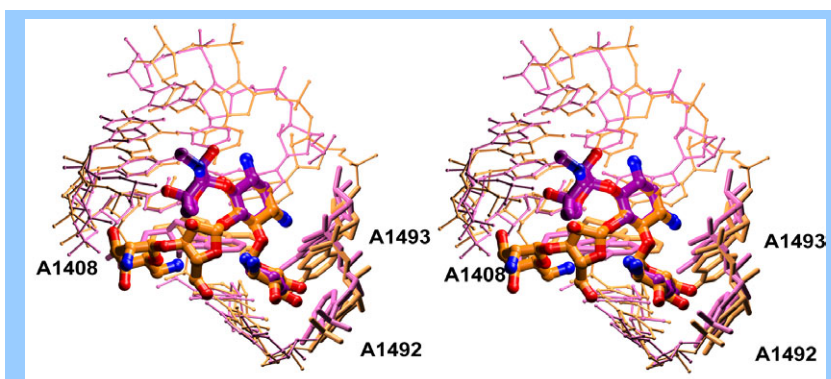


Figure 1.10 : Vue stéréo détaillée du site A complexé à la paromomycine (en orange) et à la gentamicine C1a (en magenta). La superposition est réalisée avec les atomes de la néamine.

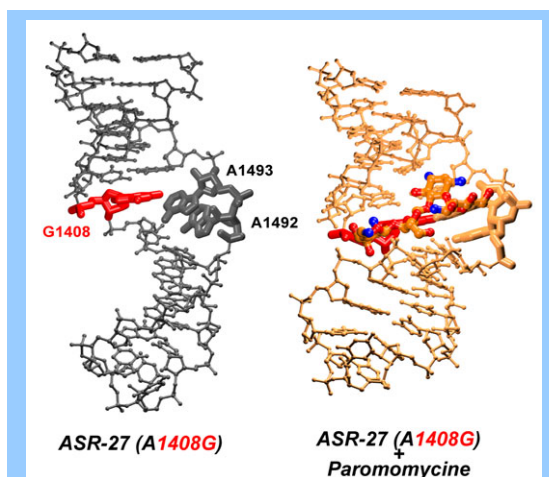


Figure 1.11 : Structures résolues par RMN du modèle ASR-27 muté seul (gauche) et complexé à la paromomycine (droite).

La guanine 1408 et les adénines 1492 et 1493 sont indiquées en gras.
(Numéros d'identification respectifs dans la PDB : 1FYO et 1FYP).

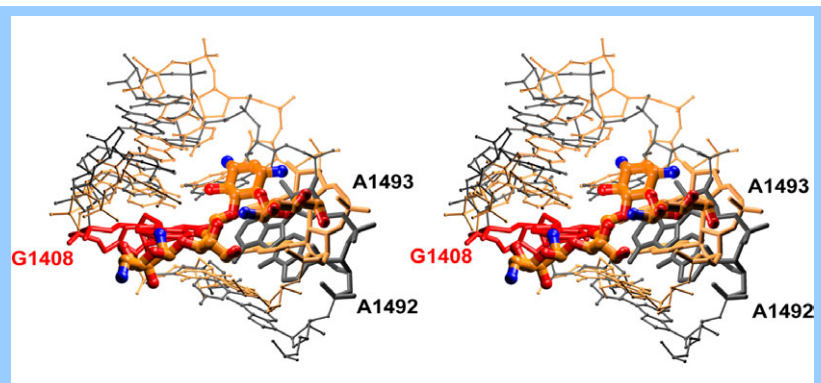


Figure 1.12 : Vue stéréo détaillée du site A muté complexé à la paromomycine (en orange) superposé sur le site seul (en gris). La superposition est réalisée avec les atomes du squelette sucres-phosphates.

C. Etudes par cristallographie aux rayons X

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

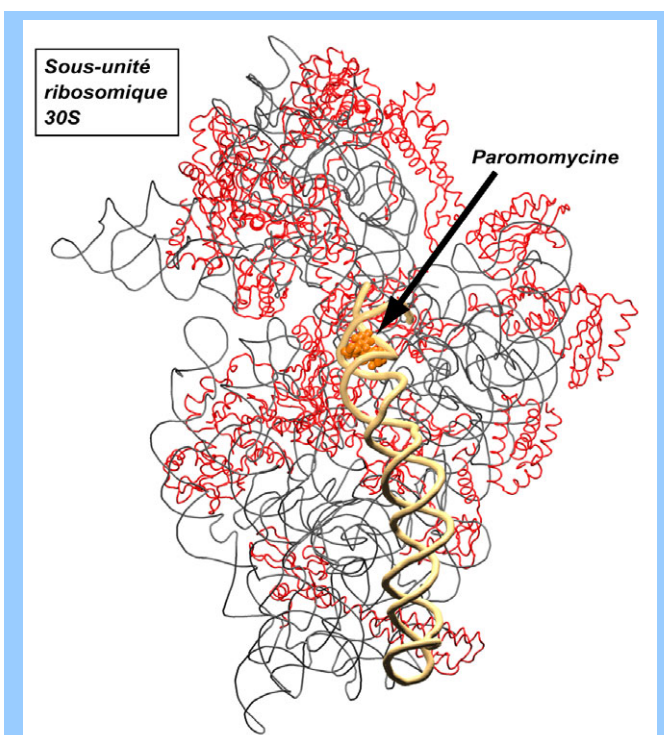


Figure 1.13 : Structure cristallographique de la sous-unité ribosomique 30S (vue de la face interne) complexée à la paromomycine.

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

La paromomycine se lie au sillon profond du site A situé à une extrémité de l'hélice 44, la plus longue de toute la sous-unité et située sur la face en contact avec la sous-unité 50S dans le ribosome complet (Figure 1.13). La conformation de la partie néamine de la paromomycine liée au site A est similaire à celle observée par RMN (écart RMS de 0,2 Å entre les atomes des cycles I et II). Cependant, les conformations et les orientations des cycles III et IV sont différentes (Figure 1.14). De plus, dans la structure cristallographique, le cycle I de la paromomycine est

intercalé comme une base dans l'hélice d'ARN. Il s'empile sur la guanine 1491 et forme deux liaisons hydrogène avec les sites Watson-Crick de l'adénine 1408. Cette intercalation a pour conséquence de forcer

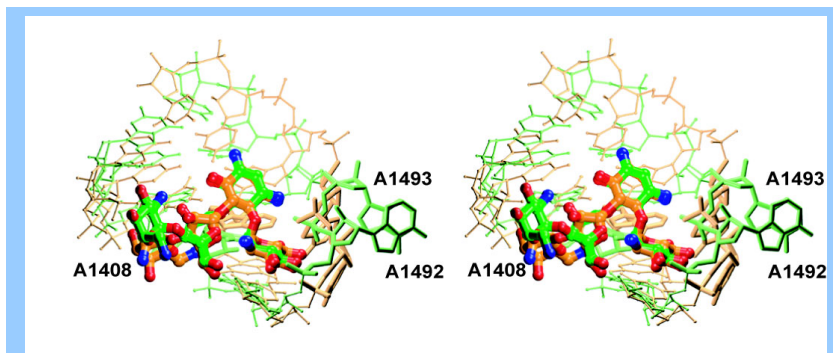


Figure 1.14 : Vue stéréo détaillée du site A complexé à la paromomycine résolu par RMN (en orange) et par cristallographie (en vert).

La superposition est réalisée avec les atomes de la néamine.

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

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

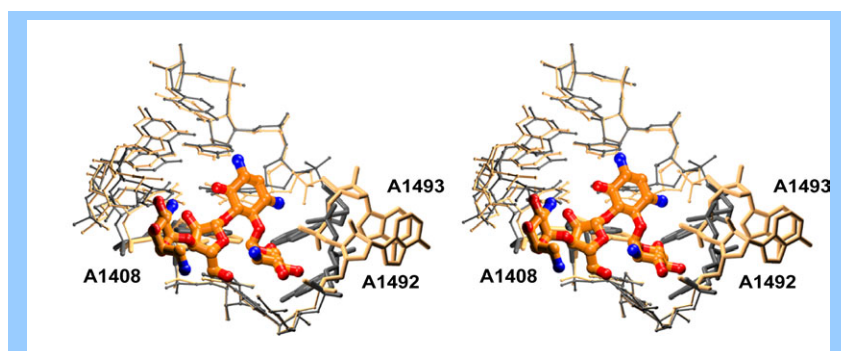


Figure 1.15 : Vue stéréo détaillée de la structure du site A au sein de la sous-unité 30S complexé à la paromomycine (en orange) superposée à la structure du site A seul (en gris).

La superposition est réalisée avec les atomes du squelette sucres-phosphates.

niques et d'une paire « wobble », entre les trois nucléotides constituant un codon sur l'ARNm et les trois nucléotides complémentaires dans l'anticodon de l'ARNt correspondant (méca-

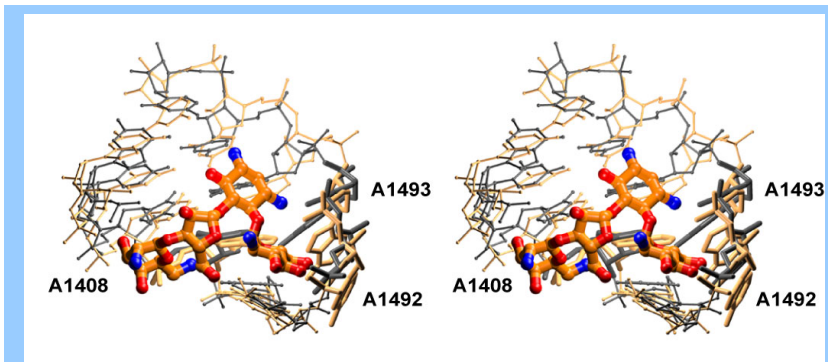


Figure 1.16 : Vue stéréo détaillée de la structure du site A complexé à la paromomycine résolue par RMN (en orange) superposée à la structure du site A seul au sein de la sous-unité 30S (en gris).

La superposition est réalisée avec les atomes du squelette sucres-phosphates.

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

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

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

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

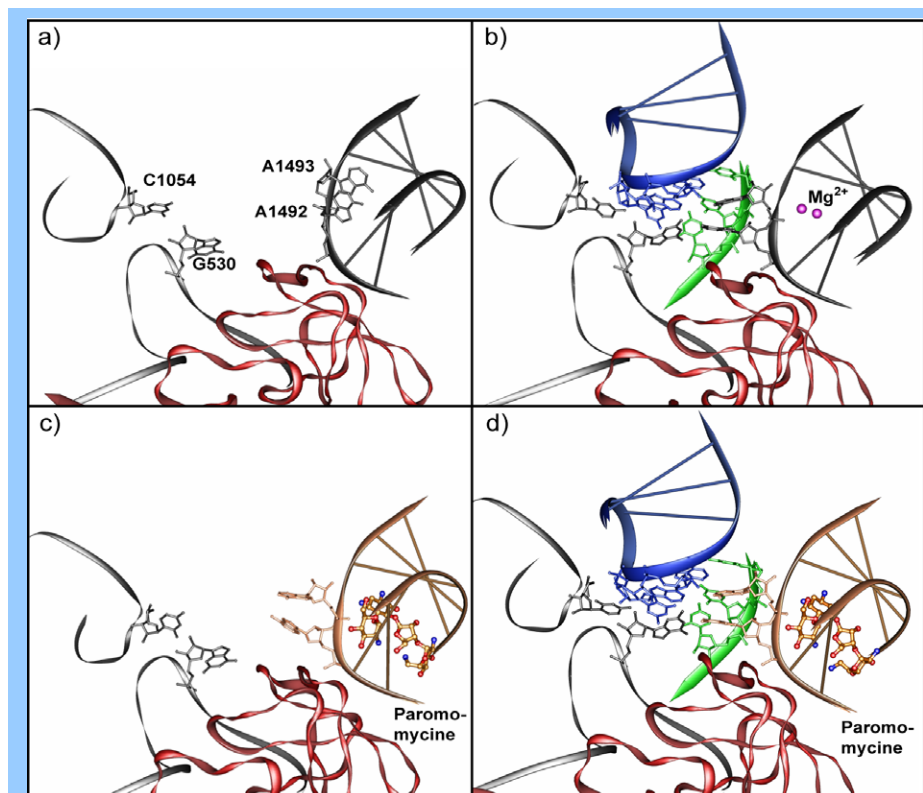


Figure 1.17 : Quatre états distincts du site A révélés par quatre structures cristallographiques différentes.

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

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

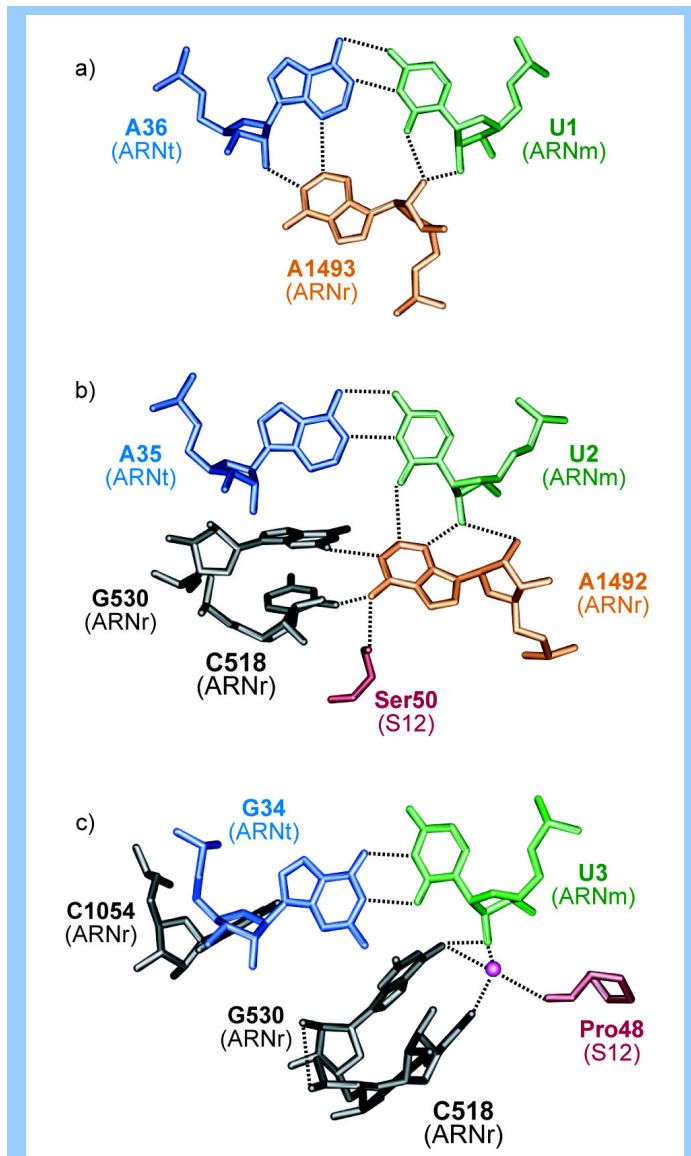


Figure 1.18 : Vues détaillées du mode de reconnaissance de la mini-hélice codon/anticodon par les résidus de la sous-unité ribosomique 30S.

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

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

D. Confrontation des résultats des différentes études structurales

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

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

La moitié des interactions décrites dans les structures RMN ne sont pas observées dans les structures cristallographiques (voir Publication n°1 pour une comparaison détaillée). De plus, les structures RMN comprennent de nombreux contacts physiquement improbables (par exemple : distance de 2,8 Å (inférieure à la somme des rayons de van der Waals) entre les deux oxygènes des carbonyles en position 4 des uraciles constituant la paire

U1406•U1495, au lieu de 3,1 Å dans la structure de la sous-unité 30S complexée à la paromomycine). Des liaisons hydrogène décrites dans les structures RMN sont formées entre des partenaires distants de plus de 3,5 Å (par exemple : distance moyenne de 4,0 Å entre l'atome O2'' de la gentamicine C1a et l'atome O4 de U1406). De plus, la conformation de l'ARN autour de la paromomycine dans la structure RMN est globalement similaire à celle de l'ARN non-complexé au sein de la sous-unité 30S (§ III.C.).

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

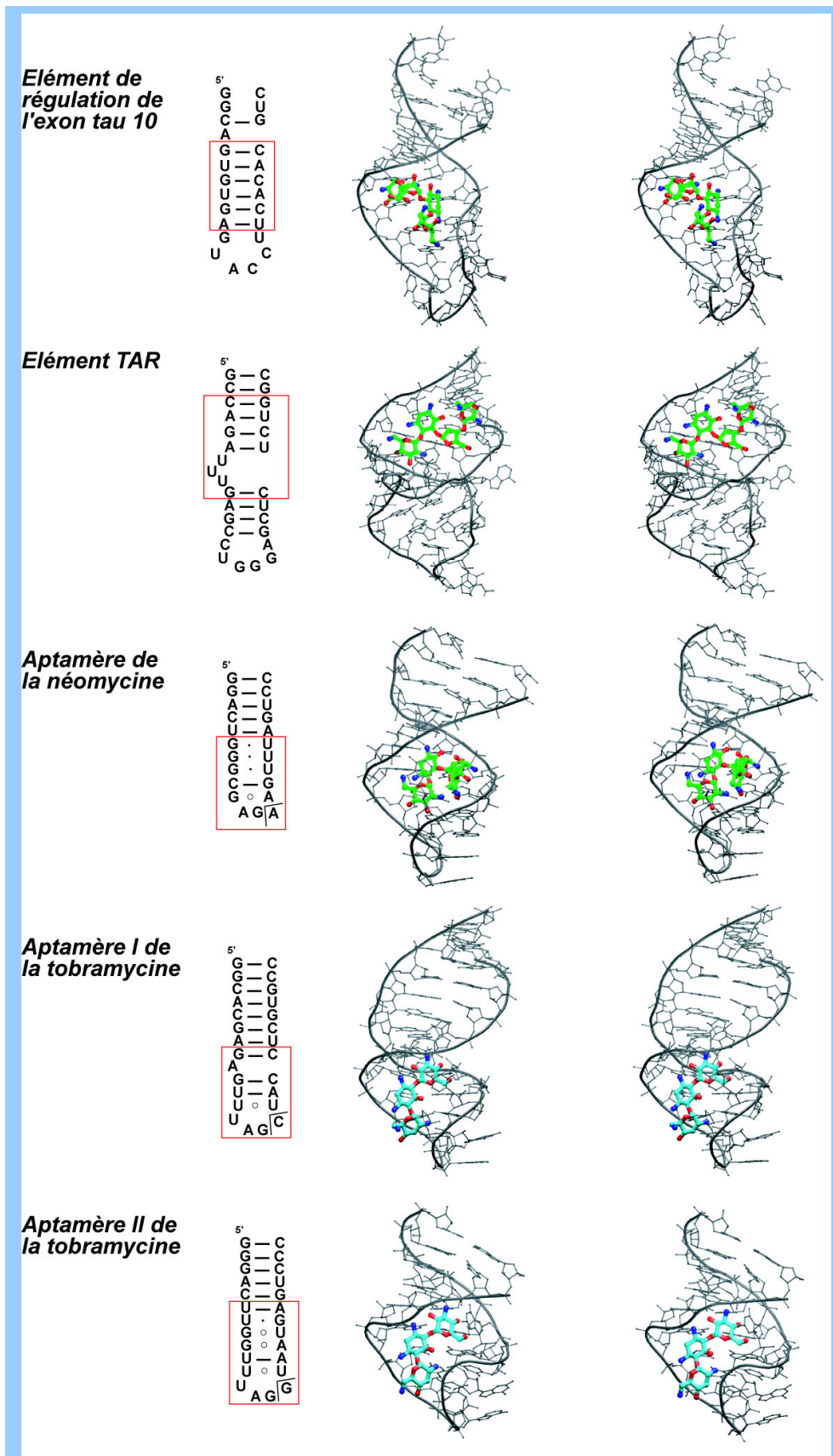


Figure 1.19 : Vues stéréo des structures résolues par RMN d'aminoglycosides liés à différentes tiges-boucles d'ARN.

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

IV. Etudes structurales d'autres complexes

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

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

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

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

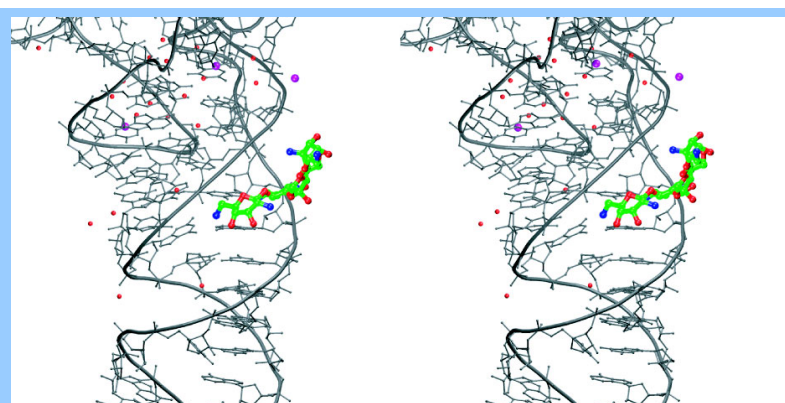


Figure 1.20 : Vue stéréo de la structure de l'ARNt^{Phe} complexé à la néomycine.

Les molécules d'eau sont indiquées en rouge, les ions magnésium en magenta. (Numéro d'identification dans la PDB : 1I9V).

tordues, alors que seulement quatre liaisons hydrogène sont observées entre la néomycine et l'ARNt, dont une vers un oxygène O2', une vers un oxygène de groupement phosphate et une avec un angle non favorable. Les facteurs d'agitation thermique sont de 65 Å² en moyenne pour la néomycine et de 48 Å² pour l'ARN. Il est probable que cette structure reflète une liaison non-spécifique de la néomycine à l'ARNt^{Phe}.

V. Revue des interactions ARN/aminoglycosides

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

¹ **Walter, F., Vicens, Q. and E. Westhof** (1999). Aminoglycoside-RNA interactions. *Curr Op Chem Biol*, 3:694-704.

² Les références citées dans la revue mais non mentionnées dans le corps de la thèse ne sont pas reprises en fin de manuscrit.

694

Aminoglycoside–RNA interactions

Frank Walter, Quentin Vicens and Eric Westhof*

The structural and physico-chemical parameters promoting the binding of aminoglycosides to RNAs are becoming clear. The strength of the interaction is dominated by electrostatics, with the positively charged aminoglycosides displacing metal ions. Although aminoglycosides inhibit most known ribozymes, aminoglycosides or polyamines are able to catalyze specific RNA cleavage in the absence of metal ions.

Addresses

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, UPR 9002,
15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg, France
*e-mail: westhof@ibmc.u-strasbg.fr

Current Opinion in Chemical Biology 1999, 3:694–704

1367-5931/99/\$ – see front matter © 1999 Elsevier Science Ltd.
All rights reserved.

Abbreviations

A-site	acceptor site
HDV	hepatitis delta virus
K_d	dissociation constant
K_i	inhibition constant
TAR	transactivating response element

Introduction

The potential of RNA as a new drug target has recently come to the fore [1–3], with the recognition that RNA molecules can adopt complex three-dimensional structures that, as with proteins, enable the design of specific ligands. Another reason for the present interest comes from the fact that many pathogenic agents, such as retroviruses, encode their genetic information in RNA strands. Aminoglycoside antibiotics (Figure 1) have long been used as very efficient drugs against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and against mycobacterial infections [4]. These molecules, however, impair hearing and kidney functions at high doses and resistant strains are appearing at an increasing rate [5]. Thus, the need for new and more specific compounds has emerged. To enable the development of new antibiotics, it is necessary to understand at the molecular level the interactions between aminoglycosides and RNA, often considered as a model system. Interactions between RNAs and aminoglycosides have been reviewed in the past (see [1,6–9]). We center this review on papers published in the past two years.

Figure 1 legend

The antibiotics of the aminoglycoside family result from modifications of neamine, a two-ring system comprising 2-deoxystreptamine (ring II) glycosylated at the 4-position by a six-membered aminosugar (ring I) of the glycopyranoside series. Further modifications of ring II with various aminosugars at the 5-position lead to (a) the neomycin family, and at the six-position to (b) the gentamicin and (c) the kanamycin families. Amino groups of the aminoglycosides protonated at pH 7.0 are shown with pK_a values, where known. The rings are flexible by torsional rotations about the glycosidic bonds; rotations of ring I about ring II are more hindered than those of ring II about ring I [7]. Aminoglycosides

Binding of aminoglycosides to natural RNAs Ribosomal RNA

NMR experiments revealed the first atomic insights into complexes between aminoglycosides of the neomycin family (Figure 1a) and a 27 nucleotide stem-loop fragment incorporating the acceptor site (A-site) of 16S rRNA (dissociation constant [K_d] = 0.2 μ M) [10,11^{**},12^{**}]. It appears that both rings I and II of the aminoglycoside are important for its binding to an A·A mismatch adjacent to a bulging adenine. These two rings (though possessing different side groups) are oriented in the same way even in the complexes, with the additional rings (ring III for ribostamycin and rings III and IV for neomycin or paromomycin) contributing to an increase in the affinity of the binding of the antibiotic to the A-site.

The gentamicin group of aminoglycosides (Figure 1b) has also been studied [13^{**}]. These antibiotics, like the kanamycin family (Figure 1c), contain both rings I and II, but with two hydroxyl groups missing on ring I, and a different ring III linkage to that of the neomycin family. The gentamicin binds to the A-site with a K_d = 2 μ M. Rings I and II occupy the same positions in the RNA pocket as the aminoglycosides of the neomycin family (Figure 2) formed by the three adenines (root mean square deviations for rings I and II are 1.28 Å and 0.41 Å, respectively). Because of the difference of the linkage, ring III of gentamicin interacts with the upper part of the RNA stem, whereas in the case of the paromomycin, rings III and IV line the deep groove in the lower part of the stem. The results observed by NMR are in each case strongly supported by biochemical tests [14^{**}] and mutational studies [15^{**}]. It has been suggested [16^{*}] that the observed differences in specificity and binding strengths between the neomycin and kanamycin aminoglycosides [17^{*}] could be attributable to the presence of several binding modes for the smaller kanamycin systems. In support of this analysis, NMR studies [12^{**}] show that unsubstituted neamines (from the neomycin family) bind in alternative orientations. A surface plasmon resonance study indicated that the aminoglycosides lacking

are polycationic in character. The protonated amino groups can serve, in addition to specific hydrogen bonds and van der Waals contacts, as donor groups making complementary electrostatic interactions with the electronegative density created by the fold of the polyanionic RNA backbone. In addition, the hydroxyl groups, because of their water-like behavior, can replace water molecules and form hydrogen bonds with anionic phosphate oxygens and the heterocyclic atoms of the bases. Ion and water displacement should give favourable entropic contributions to the binding strength.

Figure 1

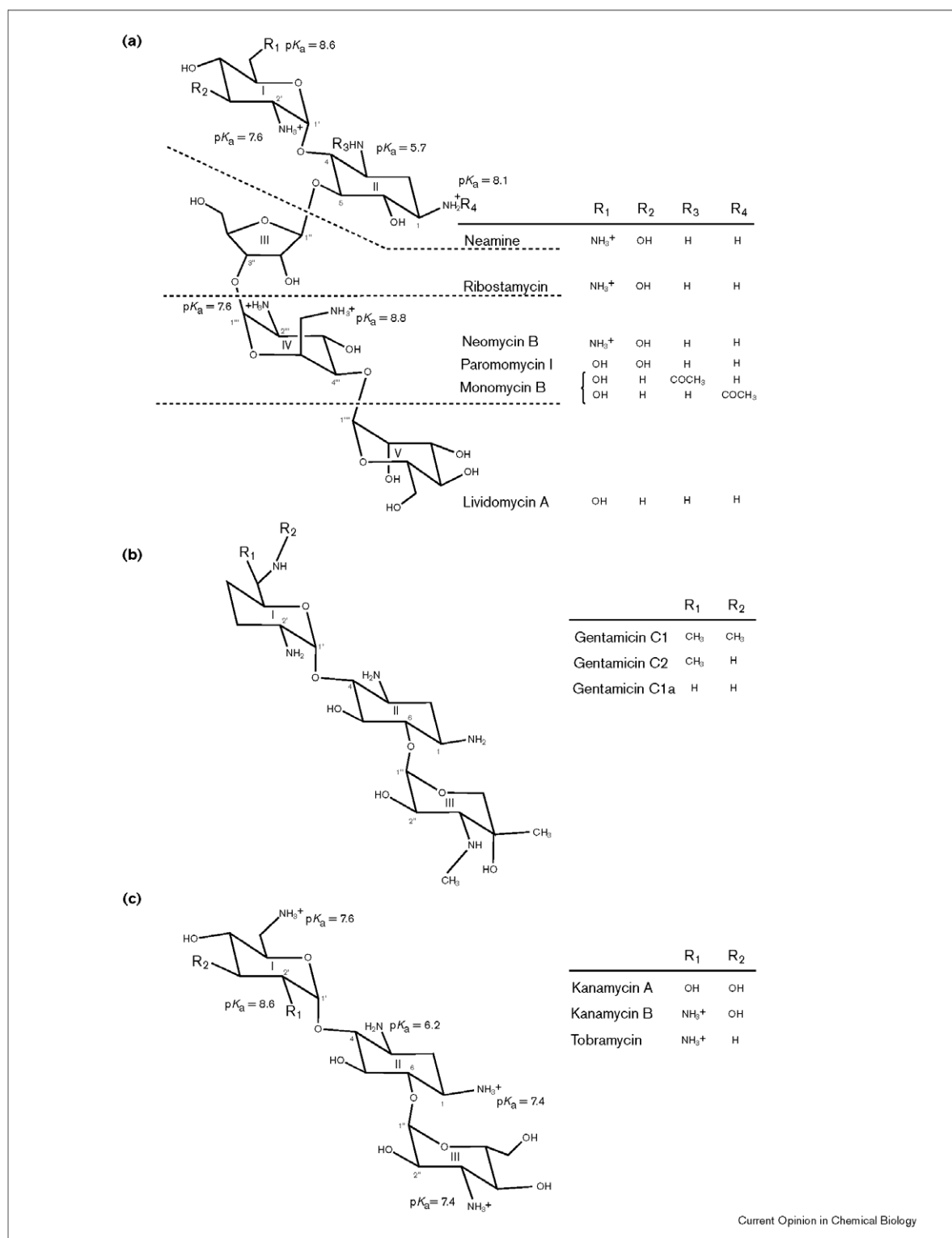
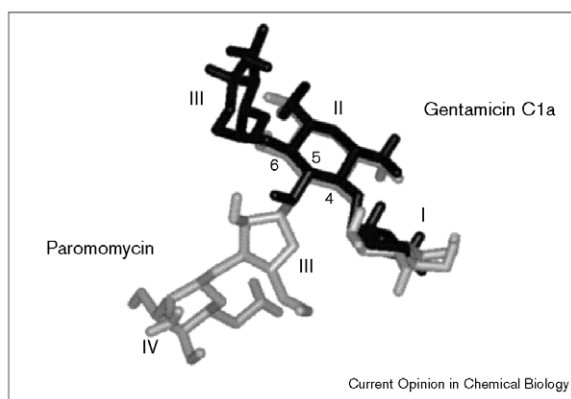


Figure 2



Superimposition of the neamine moieties of paromomycin and gentamicin C1a in their NMR-determined complexes with the ribosome A-site [10,14**]. Ring III in each of the two antibiotics occupies a different region in space. In both complexes, rings I and II of the neamine make shape-sensitive contacts to a Watson–Crick and an A–A non-Watson–Crick pair, whereas rings III and IV form shape-insensitive electrostatic interactions with negatively charged regions around the opposite sugar-phosphate backbone. The ring structures are labelled with Roman numerals, and positions on ring II are indicated.

rings III and IV of the neomycin group and the kanamycin family have weaker specificity profiles towards the A-site RNA [17*] than neomycin. Paromycin is a non-competitive inhibitor of tRNA, suggesting a simultaneous binding of the aminoglycoside and the tRNA. However, despite the binding of paromomycin in the deep groove of the A-site, a three-dimensional model of the tRNA–mRNA complex binding to the deep groove of the A-site has been proposed in agreement with all the available data [18].

Messenger RNA

The *apo*-thymidylate synthase protein directly binds to the 5′-untranslated region of its own mRNA, preventing its translation. The binding, with an affinity of 1–2 nM involves two distinct sites 200 nucleotides apart [19]. Site I folds into a stem-loop structure in which the translation initiation start codon AUG is part of the terminal-end loop. The continuity of the double-helical stem is disrupted by two internal bubbles.

Aminoglycosides bind to site I with affinities of 1 μM for neomycin B and ~2 μM for tobramycin with a 1:1 stoichiometry [20]. The aminoglycoside recognition site is the internal mismatch C·C in bubble 2; bubble 1 does not bind by itself but indirectly increases the aminoglycoside affinity for the other site. The recognition of the C·C bubble by aminoglycosides is specific as it can be transferred to another stem-loop structure based on the A-site 16S rRNA loop.

Viral RNA

Two essential elements of the HIV genome, the rev-response element and transactivating response element (TAR) RNA motifs, bind aminoglycosides [21,22]. A detailed overview is given elsewhere [7]. It is important, however, to emphasize that neomycin behaves as a non-competitive inhibitor of Tat (the cognate protein) binding to TAR; neomycin displaces the Tat protein by increasing the K_d of the peptide via an allosteric mechanism [23*].

Binding of aminoglycosides to *in vitro* selected RNA

RNA aptamers binding to aminoglycosides with high affinity (in the nanomolar range) have also been selected by *in vitro* methods. The structures of the aptamers complexed with small molecules have been extensively reviewed [8,24–26]. The NMR solution structures of two tobramycin-binding aptamers have been solved [27,28**], as well as that of the neomycin B binding aptamer [29**]. Interestingly, all aptamers have a similar architectural fold but little sequence homology (Figure 3). In each case, the neamine unit is deeply buried in a hairpin at the interface between a widened deep groove and a conserved six-residue loop from which a base loops out and covers rings I and III. The widening of the deep groove is caused by a bulge base (aptamer I against tobramycin) or by a zippered-up internal loop of three mismatches (aptamer II against tobramycin and neomycin aptamers). The 2′-amino and 6′-amino groups of ring II of neomycin and the 1 and 3 amino groups of ring I form potential hydrogen bonds with the acceptor groups of the RNA bases. Ring IV of neomycin is less well defined and protrudes around the flap base into the solvent.

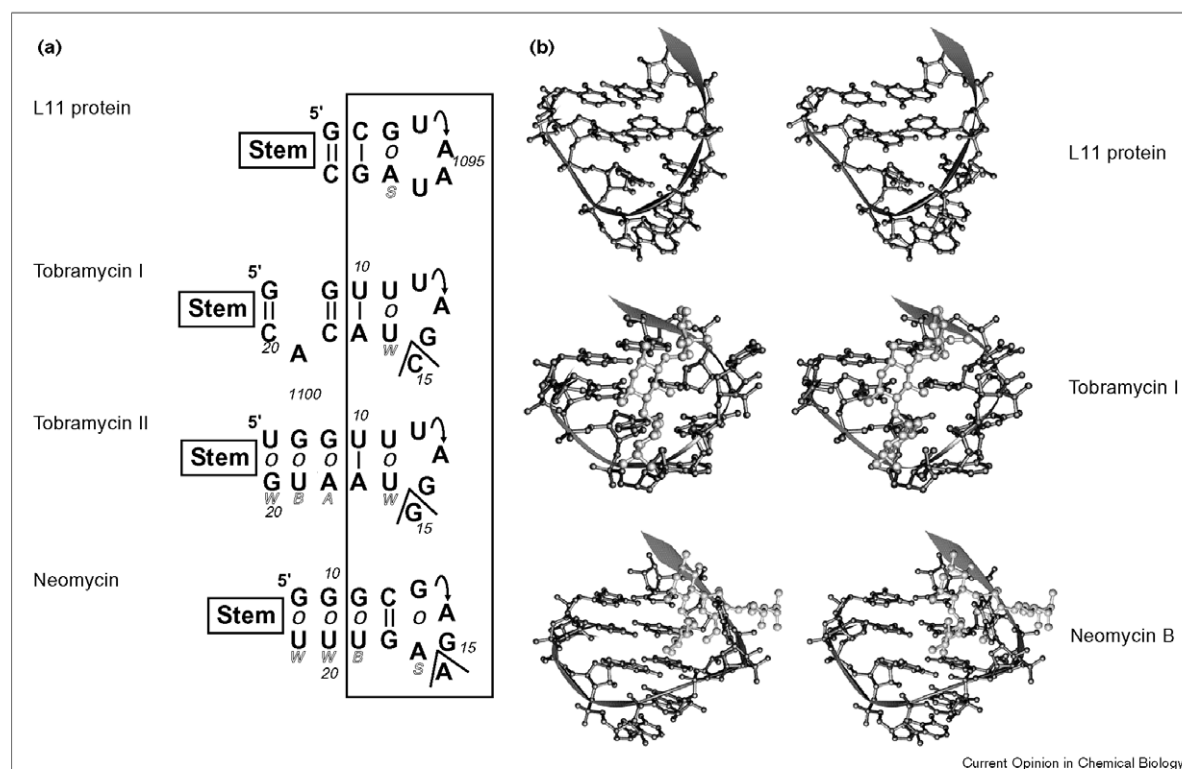
Inhibition of catalytic RNAs by aminoglycosides

Catalytic RNAs or ribozymes are RNA molecules that can catalyse chemical reactions, such as the self-cleavage or religation of the phosphor–sugar backbone linkage. They are widely found in nature providing an indispensable biological activity. Thus, in the tRNA-processing enzyme ribonuclease P, the RNA moiety has a catalytic activity, which generates the mature 5′ terminus of an array of tRNA molecules. Self-splicing introns often occur within ribosomal genes, as in *Tetrahymena* rRNA. The extensive data on the inhibition of catalysis is condensed in Table 1.

Ribonuclease P RNA

A variety of aminoglycosides have been found to interact with the RNA subunit of the ribonuclease P ribonucleoprotein [30*]. Inhibition is found in the presence or absence of ribonuclease P protein, but only at low ionic strengths (typically, 1 mM NH_4 , 10 mM spermidine and 10 mM MgCl_2 , conditions in which neomycin B exhibits the highest cleavage inhibition

Figure 3



Similarities between the (a) secondary and (b) tertiary structures of hairpins found in RNA aptamers raised against aminoglycosides and the fragment of 23S rRNA binding to protein L11. (a) Schematic representations of a conserved hexanucleotide loop of 23S rRNA (positions 1092–1099 in *E. coli*) [78–80] and of the aptamers binding to tobramycin [27,28**] and neomycin [29**], illustrating the similarities in the architectural folds (enclosed in the box). In each drawing, the arrow indicates the U-turn, typical of the anticodon structure in tRNAs, and the chevron indicates the bulging base flapping back onto the antibiotic. The nature of the non-canonical basepairs is indicated below, according to the following code: A, anti-anti G·A pair; B, bifurcated pair; S, sheared G·A pair; W, wobble-type pair. In the hexanucleotide of the 23S rRNA, the U·U contact is made by a single CH...O hydrogen bond between the O2 of the 5' uracil and C6 of the 3' uracil (distance 3.24 Å) [80]. (b) Stereo-views of the common regions of the structures boxed in (a). Top, the conserved hexanucleotide as extracted from the crystal structure of the complex between a 58 nucleotide RNA fragment and the protein L11 [80]; middle, the aptamer I of tobramycin [27]; bottom, the aptamer of

neomycin B [29**]. The aminoglycoside is shown in white ball-and-stick representation. The arrowhead on the ribbon indicates the 3'-end. In the tobramycin aptamer, the U·U pair is the second basepair from the top, whereas in the neomycin aptamer, the G·A pair is third from the top. The van der Waals contacts between the bulging residues and the aminoglycosides are apparent (e.g., the *syn* conformation of the bulging guanine in the neomycin aptamer [29**]). The protruding guanine of the sheared G·A pair in the GNRA-like loop of the neomycin aptamer pushes the antibiotic upwards. Interestingly, NMR data [78,79] indicate that the U·U pair is often broken so that the 3'-uracil is bulging, as in the aptamer I of tobramycin. It is important to note that the conserved hexanucleotide loop is part of the GTPase center of the ribosome and belongs to the binding site of thiostrepton, a cyclic antibiotic of the thiazole family [81]. Therefore, it is tempting to suggest, by analogy with the structures of the aminoglycoside family, that thiostrepton would displace the equilibrium between the closed and open form of the U·U pair toward the open conformation, thereby disrupting the tertiary contacts formed by the loop in the GTPase center [80].

with an apparent inhibition constant [K_i] of 35 μM). Again, paromomycin is a less efficient inhibitor than neomycin with a K_i of around 190 μM . In line with the latter result, kanamycin A (position 1 = OH) is not inhibitory, whereas kanamycin B (position 1 = NH_2) is. The importance of the number of protonated amino groups is further supported by an increase of inhibition at lower pHs. Increasing the concentration of MgCl_2 suppressed the inhibition caused by neomycin B. At

elevated ion concentrations (100 mM NH_4 and 100 mM MgCl_2) no cleavage inhibition is observed [30*]. An earlier study had found that the non-aminoglycoside puromycin is inhibiting under these conditions, whereas other antibiotics, including streptomycin, kasugamycin, sparsomycin and spectinomycin, had no inhibitory effect [31]. The lead(II)-induced cleavage patterns in the presence and absence of neomycin B are different and point to loop P15 as part of the

698 Biopolymers

Table 1

Inhibition effects of various aminoglycosides on autocatalytic RNA cleavage*.

Aminoglycosides	RNase P M1 RNA	<i>Tetrahymena thermophila</i> group I intron	<i>td</i> gene group I intron 1 step	<i>td</i> gene group I intron 2 step	<i>sun</i> Y group I intron	<i>Pneumocystis carinii</i> group I intron	Hammerhead ribozyme	Hairpin ribozyme	HDV genomic ribozyme	HDV antigenomic ribozyme	<i>Neurospora</i> VS ribozyme
Ribostamycin			Inactive	1000 1000 ^a			880	1000			
Neomycin B	35.0	>100.0 ^c	100.0	0.5 0.5 ^a 0.17 ^d	10.0 ^a 1.3 ^c		13.5 ^a 25.0	190	28 5.0 ^f	10.0	Enhancement
Paromomycin	190.0		1.0	100 100 ^a 0.36 ^d			1000.0	600	1000		
Lividomycin			Inactive	1000				2700			
Neamine			Inactive	200 200 ^a				4500			Enhancement
Hybrimycin C1			50.0	0.5							
Butirosin								1700			
Gentamicin C1		100 ^a >100 ^c	Inactive	2.0 1.0 ^a	100.0 ^a 20.0 ^c			1000	15.0 18.0 ^f		Enhancement
Gentamicin C2			Inactive	2.0 1.0 ^a							
Gentamicin C1a			Inactive	2.0 1.0 ^a							
Gentamicin B			Inactive	20.0 10.0 ^a							
Gentecin G418			Inactive	Inactive 1000 ^a				3000			
5- <i>epi</i> -sisomicin		10.0 ^b 50.0 ^c	20.0	0.5	1.0 ^c			0.6	5.0	5.0	
Sisomicin			1.0	50.0				500			
Dihydrosisomicin			Inactive	100							
Garamine			100	200							
2-phosphogentamicin			Inactive	Inactive							
1-acetylsisomicin			Inactive	100							
5-deoxygentamicin			50.0	0.5							
Tobramycin		>0.5 ^c	Inactive	0.5 0.5 ^a				500	20.0 ^f		Enhancement
Kanamycin A			Inactive	Inactive 5000 ^a		Inactive		1700	2000	1000	
Kanamycin B	275		Inactive	10.0 10.0 ^a				400			
Kanamycin C			Inactive	Inactive 5000 ^a Inactive ^d							
Amikacin			Inactive	Inactive				2000			
6'- <i>N</i> -ethyltobramycin			Inactive	100							
Dibekacin								500			
Apramycin			Inactive	200				450			
Kasugamycin			Inactive	Inactive							
Hygromycin B			Inactive	Inactive							
Spectinomycin			Inactive	Inactive							
Sorbistin			Inactive	Inactive							
Streptomycin			4.0			1000			326 ^f		
2-deoxystreptomine			Inactive	Inactive							
Buffer	50 mM TRIS-HCl	40 mM TRIS-HCl	50 mM TRIS-HCl	50 mM TRIS-HCl	50 mM TRIS-HCl ^{a,c} ; 80 mM Na Cacodylate ^b	50 mM TRIS-HCl	50 mM MOPS	40 mM TRIS-HCl	40 mM TRIS-HCl	40 mM TRIS-HCl	40 mM TRIS-HCl
MgCl ₂ (mM)	10	10 ^a ; 5 ^c	5	5	3 ^a ; 4 ^b ; 5 ^c	5	10	10	1; 3 ^f	1	10
pH	7.2	7.4	7.5	7.5	7.5 ^a ; 7.2 ^b	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	8.0
Additives	10 mM Spermidine, 1 mM NH ₄ Cl, 5% PEG 6000	200 mM NaCl, 0.4 mM Spermidine ^a , 2 mM Spermidine ^c , 1 μM guanosine ^c , 2.5 μM GTP	0.4 mM Spermidine, 2.5 μM GTP	0.4 mM Spermidine, 2.5 μM GTP	50 mM NH ₄ Cl, 0.4 mM Spermidine ^a , 10 μM guanosine ^b , 1 μM guanosine ^c , 2.5 μM GTP ^{a,b}	0.4 mM Spermidine, 50 μM GTP		1 mM EDTA, 1 mM EGTA	0.4 mM Spermidine	0.4 mM Spermidine	50 mM KCl
Temperature (°C)	37	37	37	37	37	37	25	37	37; 50 ^f	37	37
References [†]	K _i [30*]	^a N _i [82]; ^b [83]; ^c K _i [84]	N _i [82.85];	N _i [85]; ^a N _i [82]; ^d K _i [33*]	^a N _i [82]; ^b [83]; ^c K _i [84]	K _i [86]	N _i [41]; ^e N _i [40]	K _i [47**]	N _i [54]; ^f N _i [55]	N _i [54]	Cleavage enhancement observed [87]

*All concentrations are in μM unless otherwise stated. Superscripted letters refer to the references at the foot of the table. †References provide information on K_i and N_i where indicated. K_i is the dissociation constant for the reversible dissociation reaction of an enzyme-inhibitor complex that forms before the irreversible inactivation step in a very dilute solution; N_i represents the concentration of antibiotics required for 50% inhibition of the reaction.

aminoglycoside binding site. This conclusion is further supported by increases in K_i upon mutations in the P15 loop.

Inhibition of the self-splicing of the *td* group I intron

The self-splicing of several group I introns (for a review, see [32]) is inhibited by a variety of aminoglycosides (reviewed in [6,8]). For the *td* intron (of the thymidylate synthase gene), footprinting experiments revealed two binding sites: one in the internal loop between stems P4 and P5 and the other in the catalytic core close to the guanosine-binding site [33*]. The inhibition is non-competitive with the guanosine cofactor and depends on pH and magnesium ion concentration. Changes in the patterns of hydroxyl radical cleavage induced by Fe^{2+} (which substitute for Mg^{2+}) indicate that magnesium ions are replaced during binding of the aminoglycoside. The docking of neomycin to the core of the group I *td* intron in the three-dimensional model [34] showed that the protonated amino groups at positions 6' or 2' of ring I can displace one catalytic ion, whereas the amino group at position 1 of ring II might replace the second catalytic magnesium ion. The docking brings the 3-amino group of ring II in close proximity to the N3 position of the bulged C870 in stem P7 [33*]. The *td* intron is inhibited 300-times less by paromomycin than by neomycin. Interestingly, a cytosine→uracil mutation of the bulge in stem P7 renders the intron 500-fold more resistant to neomycin than the wild type (with an almost unchanged sensitivity towards paromomycin).

In vivo experiments indicate that neomycin B inhibits intron splicing indirectly by interfering with the translation step at the ribosomes [35*]. Interestingly, neomycin B also enhances mis-splicing *in vivo* because of the formation of an alternative hairpin structure containing a cryptic 5'-splice site (i.e. a site not normally used). The P4/P5 internal loop is one discriminating recognition site for the substrate helix containing the 5'-splice site and is one of the binding sites of neomycin B.

Small catalytic RNAs

RNA from the human pathogen hepatitis delta virus (HDV) and that from a number of small plant pathogenic viroids and virusoids, such as the *Tobacco* ringspot virus satellite RNAs, require RNA self-cleavage for the generation of the unit-sized RNA molecules following replication. The 'hammerhead' motif was identified on the positive (+) strand of the satellite RNA of the *Tobacco* ringspot virus RNA, whereas on the negative strand a different structural motif called a 'hairpin' was discovered. The structures of small ribozymes have been recently reviewed [36–39].

Hammerhead ribozyme

Among the several aminoglycosides tested, neomycin B is the strongest inhibitor of the autocatalytic activity of

the hammerhead ribozyme with an N_i (the concentration at which 50% of the ribozyme reaction is inhibited) of 1.5 μM [40]. Neomycin is in competition with magnesium ions displacing five divalent ions upon binding to the RNA [41]. The inhibition is independent of the protonation state of the amino group at position 3 of ring II, but inhibition is lowered when the amino groups with an intermediate $\text{p}K_a$ are deprotonated and inhibition decreases further above a pH of 8.0. Further experimental studies have demonstrated that the degree of inhibition correlates with the number of positive charges [42*] and with the basicity of the ammonium groups [43].

Molecular dynamics simulations showed that several solution conformations of neomycin B and tobramycin could be docked into the cleft of the hammerhead ribozyme [44*]. The intramolecular distances between the magnesium ion binding sites (around 4 Å, 8 Å and 11 Å) are complementary to the distances calculated between different amino groups of the aminoglycoside. Inhibition of the cleavage reaction proceeds by replacement of three to four magnesium ions found in the crystal structure around the cleavage site. Most of the contacts made by the amino groups are with the phosphate groups of the RNA backbone in the formally single-stranded regions with the exception of two direct hydrogen bonds to the N7 atom of the last adenine forming a Watson–Crick basepair in stem I as well as to the N4 base amino group of the following cytosine [44*]. The weaker inhibition of tobramycin compared to neomycin B [41,45] is reflected by the observation of fewer direct and water-mediated contacts with the RNA. A fluorescein-labelled hammerhead ribozyme study suggested that neomycin B binds as a dimer or binds to more than one site and induces conformational changes in the RNA [46]. A covalently linked neomycin dimer exhibited a stronger inhibition of self-cleavage compared to the unlinked molecule.

Hairpin ribozyme

A range of aminoglycosides are able to inhibit the cleavage reaction of the hairpin ribozyme in the presence of magnesium ions, but at least 10-fold less efficiently than for the hammerhead and HDV ribozymes [47**]. From the members of the neomycin family, neomycin B was the best inhibitor with an apparent K_i of 190 μM . Substitution of amino groups or removal of ring system IV, or III and IV together, results in a loss of inhibition. In the tobramycin class, kanamycin B is the strongest inhibitor (K_i of 400 μM), but the best inhibitor from any class in the case of the hairpin ribozyme is 5-*epi*-sisomycin, with a K_i in the nanomolar range (0.6 μM). The inhibition is found to be 20-fold more effective at pH 6 than at pH 8.5. The addition of aminoglycosides does not interfere with the binding of the substrate strand, but instead acts by displacement of magnesium ions.

700 Biopolymers

Surprisingly, aminoglycosides induce a site-specific cleavage in the absence of magnesium ions with rates only 13–20-fold lower than in their presence. The importance of the number of amino groups present and their protonation state is supported by the study of the pH-dependence of aminoglycoside-induced cleavage. By comparison, the hydrolysis rate of a dinucleotide (ApA) in the presence of a 30-fold higher concentration of neomycin (at 50°C and pH 8) is 9000-fold lower than cleavage in the presence of magnesium (about 100 times faster than the background rate [48]). Polyamines are also able to fold the hairpin ribozyme into its correct tertiary structure [49] and are catalytically active (in decreasing order with the number of amino groups: spermine > spermidine > NH₄⁺) with single turnover catalytic rates barely 45-fold slower than with magnesium ions [47^{**},50]. Interestingly, polyamines enhance considerably the magnesium-dependent self-cleavage of the *Neurospora* VS ribozyme [51] and promote self-cleavage of the *Coconut cadang cadang* viroid [52]. It has been shown that diamines and oligoamines are able to catalyze RNA hydrolysis [48,53].

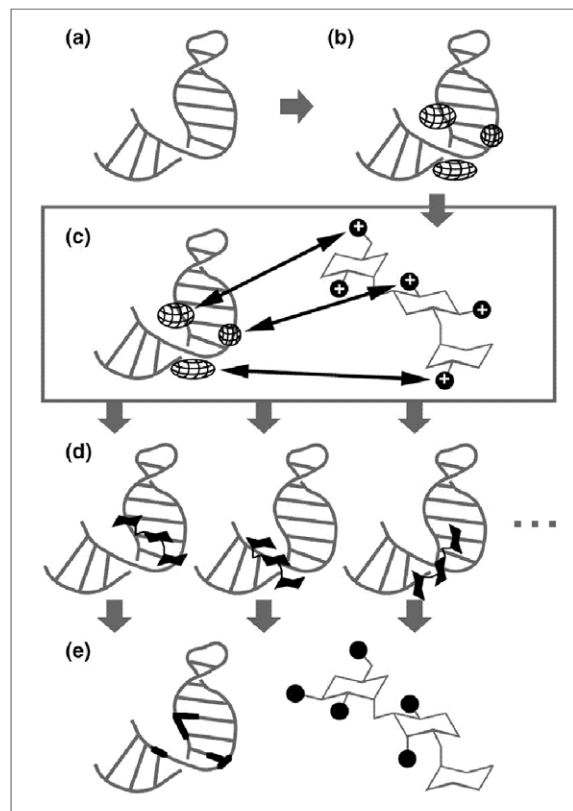
Human HDV ribozyme

Neomycin inhibits HDV self-cleavage with a K_i of 28 μM and the inhibition can be reversed by increasing magnesium ion concentration in a competitive manner [54]. Paromomycin displays a similar footprint to neomycin, but no cleavage inhibition is observed. *In vivo* experiments of HDV RNA replication in cell line or transfected cells does not show inhibitory effects with the aminoglycosides neomycin B and tobramycin [55]. It is argued by the authors that the full-length viral RNA of HDV or its complexes with proteins (or maybe polyamines) may prevent aminoglycosides from interacting.

Drug design

Compared to natural sites, the binding affinities provided by *in vitro* selected aptamers are a factor of at least 1000 higher, most probably because of a reduction in the possibilities of docking to the binding site (despite an induced-fit recognition mechanism). This fact is used to control *in vivo* gene expression by aminoglycoside-binding aptamers attached to 5'-untranslated regions [56*].

To probe the specificity of neomycin B-RNA interaction, a series of synthetic analogs have been synthesised, testing the effect of positive charges and the idose sugar (ring IV). Whereas the number of positive amino groups increased the binding affinities, even for an acyclic side chain, the idose ring adds to the specificity of the binding towards the 16S rRNA [57]. Specific efforts were made to increase the binding affinity and specificity by adding various compounds: positively charged fluorescent dyes [58–60]; RNA intercalators [61]; dimeric aminoglycosides [62,63]; or additional amino groups [42*,63]. Chemically synthesised 1,3-(2) aminol-containing molecules are found to compete with aminoglycoside-RNA interactions

Figure 4

Computer-based strategy for docking a cationic drug on a given RNA fold. (a) The electronegative pockets are predicted using Brownian dynamics simulations of cation diffusion. (b) The charged amino groups of the drug are positioned within the negative pockets. (c) The various models produced are submitted to molecular dynamics simulations. (d) The chemical groups of the RNA involved in recurring intermolecular contacts are identified. See [69] for details.

[64]. Novel small molecular RNA binders might be discovered in the future by the use of fast screening methods [65–67].

In the search for novel antiretroviral ligands, new peptidomimetic substances capable of inhibiting viral transcription by blocking the interaction between the Tat protein and its binding site on the HIV-1 RNA (TAR sequence) have been built [68]. This interaction is mediated by a basic region of the protein containing six close arginine residues. Furthermore, an artificial peptide with only one arginine is sufficient to bind to the TAR with the same affinity [69]. Some chimeras possessing the sugar skeleton of the aminoglycosides with guanidinium groups at variable positions bind the RNA with a K_d of 20–400 nM. In addition, the results showing that 1 mM of any derivative is not cytotoxic give a positive impulse to the design of efficient targeting molecules.

A strategy for docking cationic drugs to an RNA target based on Brownian and molecular dynamics simulations has been proposed [16^{*}]. The strategy (Figure 4) partitions hierarchically the interactions between the rather unspecific electrostatic and the highly shape-sensitive van der Waals contacts. Firstly, for a given three-dimensional RNA fold, the electronegative pockets created by the fold are predicted by Brownian dynamics simulations of cation diffusion [70]. Several starting models are then built by anchoring the positively charged groups of the drug into the pockets of electronegative density. Secondly, molecular dynamics calculations allow the evaluation of shape-sensitive interactions such as van der Waals' forces and hydrogen-bonding contacts. The strategy has successfully modelled known RNA–aminoglycoside complexes and allowed the deduction of TAR–aminoglycoside models. Another method [71] relies on three-dimensional structure/activity relationship computations with a docking protocol in which extensive searching of ligand conformational space is coupled with molecular dynamics simulations for optimization. The method has been applied to deduce a model for the rev-response element-RNA and neomycin.

Progress in techniques

Fluorescently labelled RNA molecules [46] or aminoglycosides [66,72^{*}] can now be used for spectroscopic analyses by polarisation or anisotropy [20,61,64,66,72^{*}] and fluorescence intensity [46,58,59]; the techniques of lifetime measurements, steady-state and stop-flow kinetics or fluorescence resonance energy transfer (FRET) should come in the future. Fluorescent-dye labelling also allows high-throughput screening of aminoglycoside or RNA libraries [66]. Electron spray ionisation–mass spectrometry (ESI-MS) has been used to measure the stoichiometry between small molecules and RNA or RNA–protein complexes [22,73]. *In vitro* biosensor [74] or surface plasmon resonance [17^{*},57,75] techniques are used for measuring real-time kinetics of RNA binding. These biophysical techniques facilitate the study of interactions of aminoglycosides to specific sites and the conformational changes induced upon binding. A tobramycin–EDTA construct has been used for detecting the binding sites of drugs and for chemical probing upon RNA interaction [45].

Conclusions

Aminoglycoside antibiotics interact with a great variety of RNA molecules and any biological function involving RNA is a potential target. Because RNA molecules are highly charged, metal ions participate in RNA three-dimensional folding and provide active centers in catalytic RNA molecules. The interactions between aminoglycosides and RNA are dominated by the number and basicity of amino groups in the aminoglycoside [42^{*},76]. Experimental and theoretical data show that structural complementarity can explain specific binding

and catalysis inhibition induced by aminoglycosides: positively charged ammonium groups match the negatively charged metal-ion-binding pockets created by the electrostatic field, which is generated by the RNA fold, displacing ions [44^{*},76]. These can be structural or catalytic divalent metal ions. Therefore, aminoglycosides can promote conformational changes, prevent folding of the RNA into an active tertiary architecture or displace catalytically active ions. Polyamines, like magnesium ions, promote RNA folding and rescue destabilizing mutations. It is now clear that polyamines can also induce RNA catalysis. Thus, *in vivo* aminoglycosides (or designed drugs) will be confronted by many competitors including proteins, metal ions and polyamines, which might complicate straightforward transfer from the *in vitro* models.

An analysis of the dynamics at an RNA–protein interface led to the conclusion that interface inhibitors should contain flexible cationic groups for competition with other charges and shield the polar contacts made to the RNA from the environment [77]. Indeed, NMR studies of RNA aptamers showed that aminoglycosides bind in opened and widened deep grooves of RNA helices at the interface between non-Watson–Crick basepaired regions and hairpin loops with single base bulges serving as spacers or participating actively by encapsulating the interacting molecule. The aminoglycosides fill the available space and make several specific contacts to the RNA bases and backbone. NMR studies provided the first views into the principles and patterns of aminoglycoside recognition and discrimination at the atomic level. The solution structures open the way for rational drug design using theoretical approaches and combinatorial chemistry to improve the binding specificity and affinity of antibiotics.

Acknowledgements

We thank Dinshaw Patel for sending us the coordinates of the neomycin aptamer. Frank Walter is supported by an European Community Research Network Contract (FMRX-CT97-0154 to Eric Westhof). Quentin Vicens is a Boursier Docteur-Ingénieur CNRS/Rhône-Poulenc-Rorer. Eric Westhof thanks the Institut Universitaire de France for supporting grants.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Hermann T, Westhof E: **RNA as a drug target: chemical, modelling, and evolutionary tools.** *Curr Opin Biotechnol* 1998, **9**:66-73.
2. Pearson ND, Prescott CD: **RNA as a drug target.** *Chem Biol* 1997, **4**:409-414.
3. Chow CS, Bogdan FM: **A structural basis for RNA–ligand interactions.** *Chem Rev* 1997, **97**:1489-1513.
4. Korzybski T, Kowszyk-Gindifer Z, Kurylowicz W: *Antibiotics. Origin, Nature, and Properties.* Washington DC: American Society for Microbiology; 1978.
5. Neu HC: **The crisis in antibiotic resistance.** *Science* 1992, **257**:1064-1073.

702 Biopolymers

6. Green R, Schroeder R (Eds): **Ribosomal RNA and group I introns**. In *Molecular Biology Intelligence Unit*, vol. 38. New York: RG Landes Company and Chapman & Hall; 1996.
7. Hermann T, Westhof E: **Saccharide-RNA recognition**. *Biopolymers* 1998, **48**:155-165.
8. Wallis MG, Schroeder R: **The binding of antibiotics to RNA**. *Prog Biophys Mol Biol* 1997, **67**:141-154.
9. Wilson WD, Li K: **Targeting RNA with small molecules**. *Curr Med Chem* 1999, in press.
10. Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, Puglisi JD: **Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic**. *Science* 1996, **274**:1367-1371.
11. Fourmy D, Recht MI, Puglisi JD: **Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16S rRNA**. *J Mol Biol* 1998, **277**:347-362.
- This paper, together with [12**–15**], make a remarkable ensemble of papers describing in molecular detail the interactions between aminoglycosides and their main target on the ribosome, the A-site. In this paper a detailed comparative NMR study of the interactions of three members of the neomycin family with the A-site RNA is presented.
12. Fourmy D, Yoshizawa S, Puglisi JD: **Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16S rRNA**. *J Mol Biol* 1998, **277**:333-345.
- The comparison of the free and bound NMR solution structures of the RNA shows that two universally conserved residues are displaced in presence of the antibiotic suggesting a mechanism of action of aminoglycosides on translation.
13. Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD: **Structural origins of gentamicin antibiotic action**. *EMBO J* 1998, **17**:6437-6448.
- Gentamicin belongs to a different subclass of aminoglycosides than neomycin and also directs specific RNA interactions. The comparison with the neomycin class aminoglycosides leads to a general model for specific ribosome recognition by antibiotics.
14. Blanchard SC, Fourmy D, Eason RG, Puglisi JD: **rRNA chemical groups required for aminoglycoside binding**. *Biochemistry* 1998, **37**:7716-7724.
- Chemical groups within 16S ribosomal RNA have been identified that are required for binding of paromomycin and are consistent with genetic, biochemical and structural studies.
15. Recht MI, Douthwaite S, Dahlquist KD, Puglisi JD: **Effect of mutations in the A site of 16S rRNA on aminoglycoside antibiotic-ribosome interaction**. *J Mol Biol* 1999, **286**:33-43.
- Biochemical and NMR studies determined the sequence requirements on the ribosomal RNA for aminoglycoside interaction. The differences in antibiotic activity against prokaryotes and eukaryotes as well as structural reasons for antibiotic resistance are discussed.
16. Hermann T, Westhof E: **Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds**. *J Med Chem* 1999, **42**:1250-1261.
- In this paper, the structural electrostatic complementarity between positively charged groups and negatively charged density pockets of the RNA [44*] is exploited to help understand and describe aminoglycoside binding.
17. Wong CH, Hendrix M, Priestley ES, Greenberg WA: **Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA**. *Chem Biol* 1998, **5**:397-406.
- A very elegant and clear use of surface plasmon resonance for a fine characterization of aminoglycoside binding to model systems.
18. VanLoock MS, Easterwood TR, Harvey SC: **Major groove binding of the tRNA/mRNA complex to the 16S ribosomal RNA decoding site**. *J Mol Biol* 1999, **285**:2069-2078.
19. Voeller DM, Changchien LM, Maley GF, Maley F, Takechi T, Turner RE, Montfort WR, Allegra CJ, Chu E: **Characterization of a specific interaction between *Escherichia coli* thymidylate synthase and *Escherichia coli* thymidylate synthase mRNA**. *Nucleic Acids Res* 1995, **23**:869-875.
20. Tok JB, Cho J, Rando RR: **Aminoglycoside antibiotics are able to specifically bind the 5'-untranslated region of thymidylate synthase messenger RNA**. *Biochemistry* 1999, **38**:199-206.
21. Zapp ML, Stern S, Green MR: **Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production**. *Cell* 1993, **74**:969-978.
22. Mei H-Y, Galan AA, Halim NS, Mack DP, Moreland DW, Sanders KB, Truong HN, Czarnik AW: **Inhibition of an HIV-1 Tat-derived peptide binding to TAR RNA by aminoglycoside antibiotics**. *Bioorg Med Chem Lett* 1995, **5**:2755-2760.
23. Wang S, Huber PW, Cui M, Czarnik AW, Mei HY: **Binding of neomycin to the TAR element of HIV-1 RNA induces dissociation of Tat protein by an allosteric mechanism**. *Biochemistry* 1998, **37**:5549-5557.
- A demonstration that neomycin is able to dissociate an RNA-protein complex.
24. Patel DJ, Suri AK, Jiang F, Jiang L, Fan P, Kumar RA, Nonin S: **Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes**. *J Mol Biol* 1997, **272**:645-664.
25. Patel DJ: **Structural analysis of nucleic acid aptamers**. *Curr Opin Chem Biol* 1997, **1**:32-46.
26. Feigon J, Dieckmann T, Smith FW: **Aptamer structures from A to zeta**. *Chem Biol* 1996, **3**:611-617.
27. Jiang L, Suri AK, Fiala R, Patel DJ: **Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex**. *Chem Biol* 1997, **4**:35-50.
28. Jiang L, Patel DJ: **Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex**. *Nat Struct Biol* 1998, **5**:769-774.
- This paper describes NMR structures that reveal similarities in architectures and sequence variations for specific binding of two different aminoglycosides.
29. Jiang L, Majumdar A, Hu W, Jaishree TJ, Xu W, Patel DJ: **Saccharide-RNA recognition in the neomycin B-RNA aptamer complex**. *Structure Fold Des* 1999, **7**:817-827.
- See annotation [28**].
30. Mikkelsen NE, Brannvall M, Virtanen A, Kirsebom LA: **Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:6155-6160.
- A much awaited and very well done study on a ubiquitous and important catalytic RNA system.
31. Vioque A: **Protein synthesis inhibitors and catalytic RNA. Effect of puromycin on tRNA precursor processing by the RNA component of *Escherichia coli* RNase P**. *FEBS Lett* 1989, **246**:137-139.
32. Cech TR: **Structure and mechanism of the large catalytic RNAs; group I and group II introns and ribonuclease P**. In *The RNA World*. Edited by Gesteland RF, Atkins JF. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1993:239-270.
33. Hoch I, Berens C, Westhof E, Schroeder R: **Antibiotic inhibition of RNA catalysis: neomycin B binds to the catalytic core of the td group I intron displacing essential metal ions**. *J Mol Biol* 1998, **282**:557-569.
- Neomycin B inhibits in a non-competitive manner with the guanosine cofactor a group I intron. A mutation in a bulge close to the guanosine-binding site renders the intron less sensitive to neomycin. Two phenomena stressing the similarities in behavior between inhibition of intron splicing and translational misreading [88].
34. Michel F, Westhof E: **Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis**. *J Mol Biol* 1990, **216**:585-610.
35. Waldsich C, Semrad K, Schroeder R: **Neomycin B inhibits splicing of the td intron indirectly by interfering with translation and enhances missplicing in vivo**. *RNA* 1998, **4**:1653-1663.
- A clear demonstration that aminoglycosides display different effects on ribozymes *in vitro* and *in vivo*. A warning to bring together with [17*].
36. Eckstein F, Lilley DMJ (Eds): **Catalytic RNA**. In *Nucleic Acids and Molecular Biology*, vol 10. Berlin: Springer-Verlag; 1996.
37. Birikh KR, Heaton PA, Eckstein F: **The structure, function and application of the hammerhead ribozyme**. *Eur J Biochem* 1997, **245**:1-16.
38. Walter NG, Burke JM: **The hairpin ribozyme: structure, assembly and catalysis**. *Curr Opin Chem Biol* 1998, **2**:24-30. [Published erratum appears in *Curr Opin Chem Biol* 1998, **2**:303.]
39. Lilley DM: **Structure, folding and catalysis of the small nucleolytic ribozymes**. *Curr Opin Struct Biol* 1999, **9**:330-338.
40. Stage TK, Hertel KJ, Uhlenbeck OC: **Inhibition of the hammerhead ribozyme by neomycin**. *RNA* 1995, **1**:95-101.
41. Clouet d'Orval B, Stage TK, Uhlenbeck OC: **Neomycin inhibition of the hammerhead ribozyme involves ionic interactions**. *Biochemistry* 1995, **34**:11186-11190.

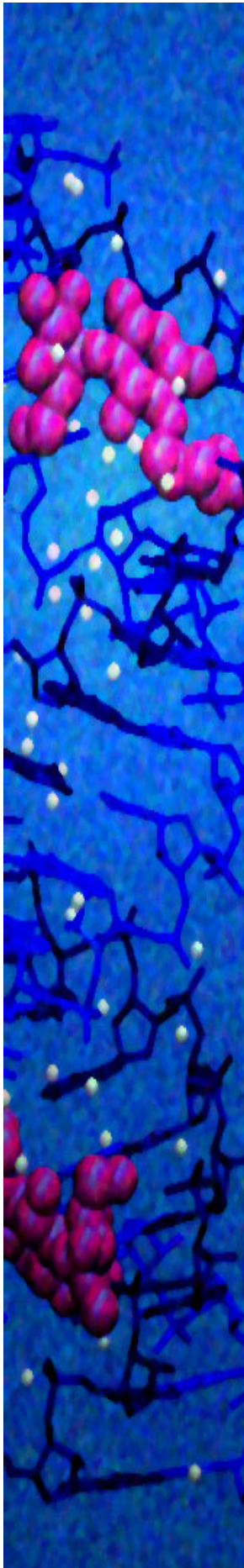
42. Wang H, Tor Y: **RNA-aminoglycoside interactions: design, synthesis and binding of "amino-aminoglycosides" to RNA.** *Angew Chem Int Ed* 1998, **37**:109-111.
Chemical modifications of aminoglycosides led to the demonstration that the basicity of the amino groups influence ribozyme binding and inhibition.
43. Wang H, Tor Y: **Electrostatic interactions in RNA aminoglycosides binding.** *J Am Chem Soc* 1997, **119**:8734-8735.
44. Hermann T, Westhof E: **Aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme: a general model for the interaction of cationic antibiotics with RNA.** *J Mol Biol* 1998, **276**:903-912.
The first general model for understanding the binding of cationic antibiotics to RNA.
45. Wang H, Tor Y: **Tobramycin-EDTA conjugate: a noninnocent affinity-cleaving reagent.** *Bioorg Med Chem Lett* 1998, **8**:3665-3670.
46. Llano-Sotelo B, Chow CS: **RNA-aminoglycoside antibiotic interactions: fluorescence detection of binding and conformational change.** *Bioorg Med Chem Lett* 1999, **9**:213-216.
47. Eamshaw DJ, Gait MJ: **Hairpin ribozyme cleavage catalyzed by aminoglycoside antibiotics and the polyamine spermine in the absence of metal ions.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:5551-5561.
A remarkable and extensive study on the hairpin ribozyme which contains the conclusion that polyamines are able to catalyze specific cleavage of RNA.
48. Komiyama M, Inokawa T: **Selective hydrolysis of tRNA by ethylenediamine bound to a DNA oligomer.** *J Biochem Tokyo* 1994, **116**:719-720.
49. Walter F, Murchie AI, Thomson JB, Lilley DM: **Structure and activity of the hairpin ribozyme in its natural junction conformation: effect of metal ions.** *Biochemistry* 1998, **37**:14195-14203.
50. Sekiguchi A, Komatsu Y, Koizumi M, Ohtsuka E: **Mutagenesis and self-ligation of the self-cleavage domain of the satellite RNA minus strand of Tobacco ringspot virus and its binding to polyamines.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**:6833-6838.
51. Olive JE, Collins RA: **Spermine switches a *Neurospora* VS ribozyme from slow *cis* cleavage to fast *trans* cleavage.** *Biochemistry* 1998, **37**:6476-6484.
52. Liu YH, Symons RH: **Specific RNA self-cleavage in *Coconut cadang cadang* viroid: potential for a role in rolling circle replication.** *RNA* 1998, **4**:418-429.
53. Kuzuya A, Azuma Y, Inokawa T, Yoshinari K, Komiyama M: **Sequence-selective RNA scission by oligoamine-DNA conjugates (1).** *Nucleic Acids Symp Ser* 1997, **37**:209-210.
54. Rogers J, Chang AH, von Ahsen U, Schroeder R, Davies J: **Inhibition of the self-cleavage reaction of the human hepatitis delta virus ribozyme by antibiotics.** *J Mol Biol* 1996, **259**:916-925.
55. Chia J-S, Wu H-L, Wang H-W, Chen D-S, Chen P-J: **Inhibition of hepatitis delta virus genomic ribozyme self-cleavage by aminoglycosides.** *J Biomed Sci* 1997, **4**:208-216.
56. Werstuck G, Green MR: **Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions.** *Science* 1998, **282**:296-298.
The use of chemical modifications on aminoglycosides for deciphering their modes of binding is reported.
57. Alper PB, Hendrix M, Sears P, Wong C-H: **Probing the specificity of aminoglycoside-ribosomal RNA interactions with designed synthetic analogs.** *J Am Chem Soc* 1998, **120**:1965-1978.
58. Wang Y, Rando RR: **Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA.** *Chem Biol* 1995, **2**:281-290.
59. Wang Y, Killian J, Hamasaki K, Rando RR: **RNA molecules that specifically and stoichiometrically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities.** *Biochemistry* 1996, **35**:12338-12346.
60. Wang Y, Hamasaki K, Rando RR: **Specificity of aminoglycoside binding to RNA constructs derived from the 16S rRNA decoding region and the HIV-RRE activator region.** *Biochemistry* 1997, **36**:768-779.
61. Tok JB-H, Cho JH, Rando RR: **Aminoglycoside hybrids as potent RNA antagonists.** *Tetrahedron* 1999, **55**:5741-5758.
62. Wang H, Tor Y: **Dimeric aminoglycosides: design, synthesis and RNA binding.** *Bioorg Med Chem* 1997, **7**:1951-1956.
63. Michael K, Tor Y: **Designing novel RNA binders.** *Chem Eur J* 1998, **4**:2091-2098.
64. Tok JB-H, Rando RR: **Simple aminols as aminoglycoside surrogates.** *J Am Chem Soc* 1998, **120**:8279-8280.
65. Mei HY, Mack DP, Galan AA, Halim NS, Heldsinger A, Loo JA, Moreland DW, Sannes-Lowery KA, Sharmeen L, Truong HN, Czarnik AW: **Discovery of selective, small-molecule inhibitors of RNA complexes – I. The Tat protein/TAR RNA complexes required for HIV-1 transcription.** *Bioorg Med Chem* 1997, **5**:1173-1184.
66. Hamasaki K, Rando RR: **A high-throughput fluorescence screen to monitor the specific binding of antagonists to RNA targets.** *Anal Biochem* 1998, **261**:183-190.
67. Griffey RH, Greig MJ, An HY, Sasmor H, Manalili S: **Targeted site-specific gas-phase cleavage of oligoribonucleotides. Application in mass spectrometry-based identification of ligand binding sites.** *J Am Chem Soc* 1999, **121**:474-475.
68. Litovchick A, Evdokimov AG, Lapidot A: **Arginine-aminoglycoside conjugates that bind to HIV transactivation responsive element RNA *in vitro*.** *FEBS Lett* 1999, **445**:73-79.
69. Calnan BJ, Tidor B, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD: **Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork.** *Science* 1991, **252**:1167-1171. [Published erratum appears in *Science* 1992, **255**:665.]
70. Hermann T, Westhof E: **Exploration of metal ion binding sites in RNA folds by Brownian dynamics simulations.** *Structure* 1998, **6**:1303-1314.
71. Leclerc F, Cedergren R: **Modeling RNA-ligand interactions: the Rev-binding element RNA-aminoglycoside complex.** *J Med Chem* 1998, **41**:175-182.
72. Hamasaki K, Killian J, Cho J, Rando RR: **Minimal RNA constructs that specifically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities.** *Biochemistry* 1998, **37**:656-663.
Three inhibitors bind with different characteristics to the same target RNA.
73. Mei HY, Cui M, Heldsinger A, Lemrow SM, Loo JA, Sannes-Lowery KA, Sharmeen L, Czarnik AW: **Inhibitors of protein-RNA complexation that target the RNA: specific recognition of human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA by small organic molecules.** *Biochemistry* 1998, **37**:14204-14212.
74. Van Ryk DI, Venkatesan S: **Real-time kinetics of HIV-1 Rev-Rev response element interactions. Definition of minimal binding sites on RNA and protein and stoichiometric analysis.** *J Biol Chem* 1999, **274**:17452-17463.
75. Hendrix M, Priestley ES, Joyce GF, Wong C-H: **Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance.** *J Am Chem Soc* 1997, **119**:3641-3648.
76. Tor Y, Hermann T, Westhof E: **Deciphering RNA recognition: aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme.** *Chem Biol* 1998, **5**:R277-R283.
77. Hermann T, Westhof E: **Simulations of the dynamics at an RNA-protein interface.** *Nat Struct Biol* 1999, **6**:540-544.
78. Huang SG, Wang YX, Draper DE: **Structure of a hexanucleotide RNA hairpin loop conserved in ribosomal RNAs.** *J Mol Biol* 1996, **258**:308-321.
79. Fountain MA, Serra MJ, Krugh TR, Turner DH: **Structural features of a six-nucleotide RNA hairpin loop found in ribosomal RNA.** *Biochemistry* 1996, **35**:6539-6548.
80. Conn GL, Draper DE, Lattman EE, Gittis AG: **Crystal structure of a conserved ribosomal protein-RNA complex.** *Science* 1999, **284**:1171-1174.
81. Rosendahl G, Douthwaite S: **The antibiotics micrococin and thiostrepton interact directly with 23S rRNA nucleotides 1067A and 1095A.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:357-363.
82. von Ahsen U, Davies J, Schroeder R: **Antibiotic inhibition of group I ribozyme function.** *Nature* 1991, **353**:368-370.
83. von Ahsen U, Noller HF: **Footprinting the sites of interaction of antibiotics with catalytic group I intron RNA.** *Science* 1993, **260**:1500-1503.
84. von Ahsen U, Davies J, Schroeder R: **Non-competitive inhibition of group I intron RNA self-splicing by aminoglycoside antibiotics.** *J Mol Biol* 1992, **226**:935-941.

704 Biopolymers

85. Davies J, von Ahsen U, Schroeder R: **Antibiotics and the RNA world: a role for low-molecular-weight effectors in biochemical evolution.** In *The RNA World*. Edited by Gesteland RF, Atkins JF. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1993:185-104.
86. Liu Y, Tidwell RR, Leibowitz MJ: **Inhibition of *in vitro* splicing of a group I intron of *Pneumocystis carinii*.** *J Eukaryot Microbiol* 1994, **41**:31-38.
87. Olive JE, De Abreu DM, Rastogi T, Andersen AA, Mittermaier AK, Beattie TL, Collins RA: **Enhancement of *Neurospora* VS ribozyme cleavage by tuberactinomycin antibiotics.** *EMBO J* 1995, **14**:3247-3251.
88. Schroeder R, Streicher B, Wank H: **Splice-site selection and decoding: are they related?** *Science* 1993, **260**:1443-1444.

VI. Présentation des résultats de ce travail de thèse

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



Chapitre 2

Structures cristallographiques de trois complexes site A / aminoglycosides

I. De la conception à la diffraction

A. Conception des oligoribonucléotides

D'après les résultats biochimiques (Miyaguchi, *et al.* 1996 ; Purohit et Stern 1994 ; Recht, *et al.* 1996) et la structure du complexe avec la paromomycine résolue par RMN (Fourmy, *et al.* 1996), les nucléotides 1405 à 1410 et 1490 à 1496 sont suffisants pour l'interaction avec les aminoglycosides. Cependant, le modèle ASR-27 étudié par RMN n'est pas un bon candidat pour des études par cristallographie aux rayons X. En effet, ASR-27 est composé d'un seul oligoribonucléotide qui doit se replier en une tige-boucle coiffée d'une tétra-boucle 5'-UUCG pour constituer le site A. Les tétra-boucles de séquences consensus 5'-GNRA, 5'-UNCG ou 5'-CUUG (N=A, C, G ou U ; R=A ou G) sont caractérisées par une exceptionnelle stabilité thermodynamique (Molinaro et Tinoco 1995 ; Tuerk, *et al.* 1988), de sorte qu'elles sont fréquemment rencontrées dans les molécules d'ARN naturelles (Batey, *et al.* 1999 ; Moore 1999 ; Woese, *et al.* 1990). De nombreuses tentatives ont été opérées

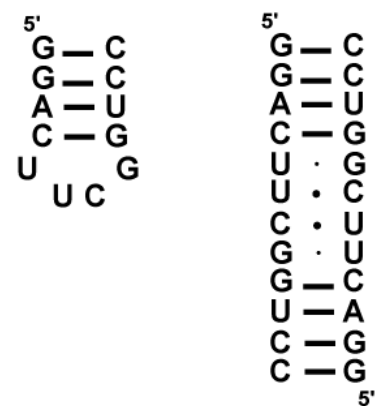


Figure 2.1 : Structure secondaire attendue pour une tétraboucle (gauche) et celle de l'oligoribonucléotide obtenue dans le cristal (droite).
(D'après Holbrook, *et al.* 1991).

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

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

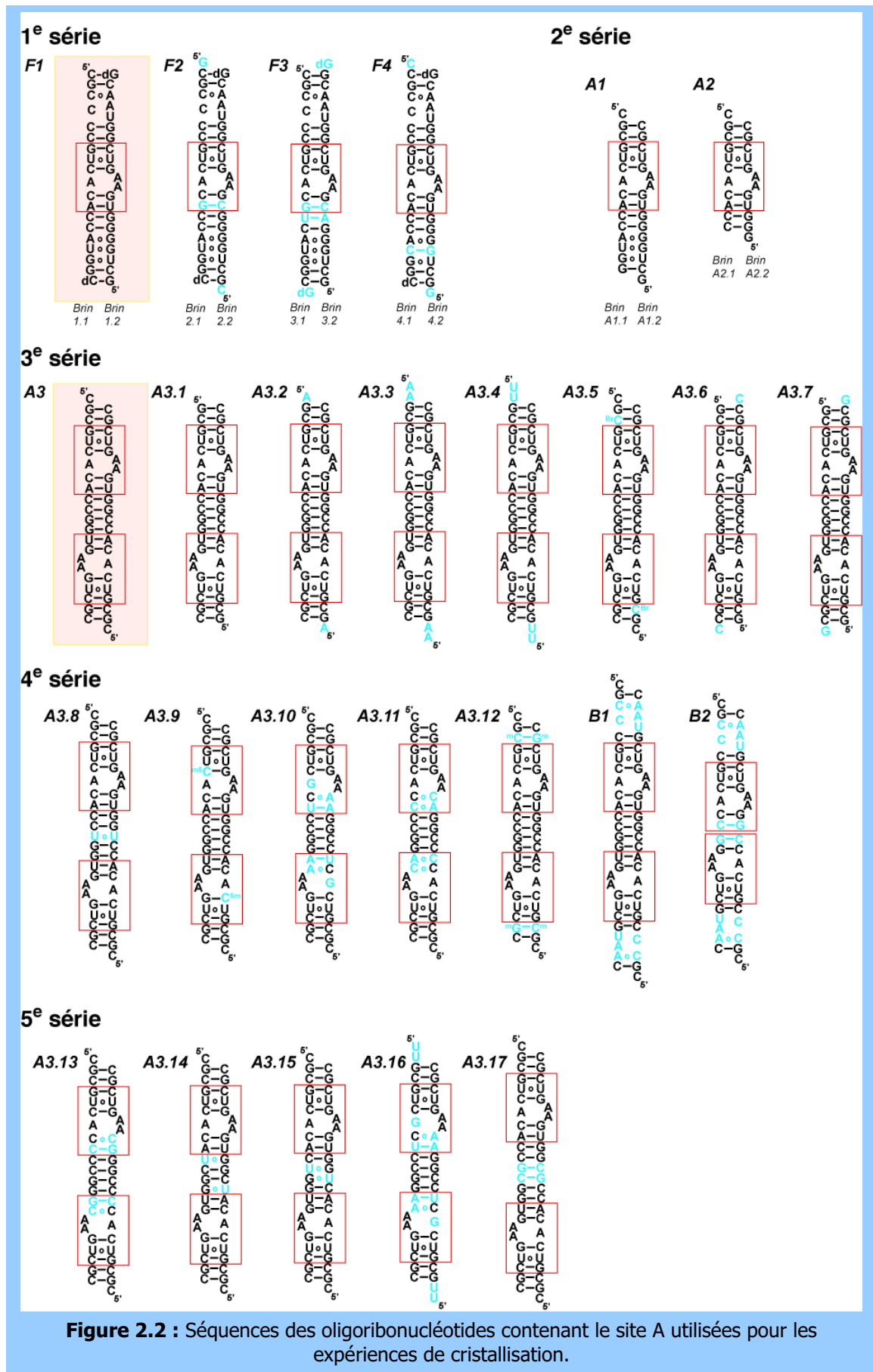
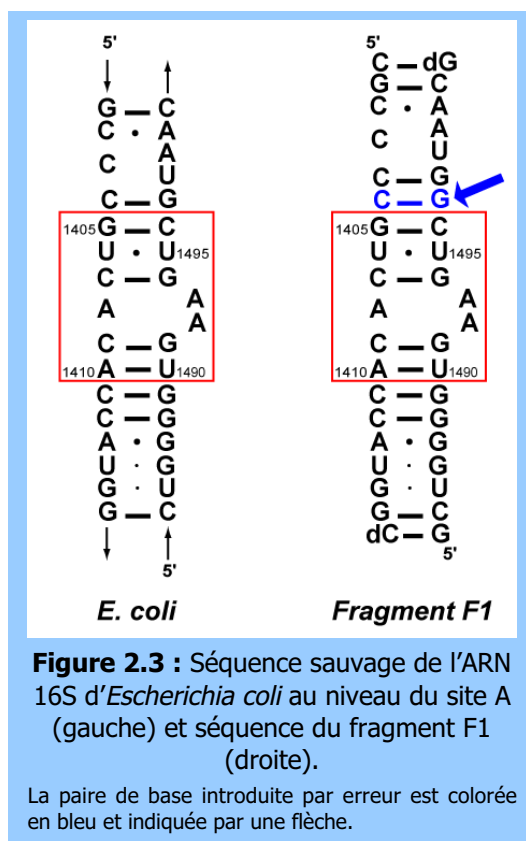


Figure 2.2 : Séquences des oligoribonucléotides contenant le site A utilisées pour les expériences de cristallisation.

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



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

A partir de la série n°3, les fragments sont formés de deux brins identiques qui s'apparient pour constituer deux sites A. Ils sont longs de 21 à 28 nucléotides et comprennent uniquement les nucléotides du site A séparés par des paires

G=C. Différentes natures d'extrémités 5' et 3' ont été testées pour la cristallisation. L'ajout du brome en position 5 d'une cytosine (fragment A3.5) a été effectuée dans un souci de réaliser des essais de remplacement isomorphe et de diffusion anormale. Ce sont les fragments A3 et A3.4 de la série n°3 qui ont conduit à l'obtention de cristaux en présence de divers aminoglycosides.

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

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

B. Synthèses chimiques et purifications

1) Résultats

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

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

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

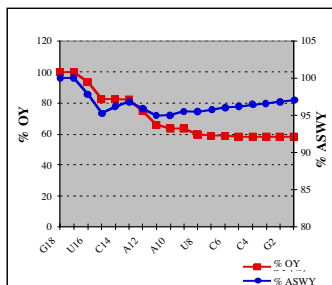
Nom du brin	Longueur (nt)	OY (%)	Quantité avant purification (mg)	Chromatogramme analytique	Méthode de purification	Quantité après purification (mg)	Quantité purifiée après 2° déprotection (mg)
1.1#1	19	58	3,20	Synthèse correcte	HPLC	0,64	1,00
1.1#2	19	54,9	2,00	Synthèse correcte	HPLC		
1.1#3	19	? ^a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

^a rendement non-affiché par le moniteur

Tableau 2.2 : Exemples de suivis de synthèses de qualité correcte (brin 1.1#1 en haut) et de mauvaise qualité (brin 3.2#3 en bas).

Les rendements finaux sont calculés après le couplage du dernier nucléotide (en caractères gras et en italique).

nt	ASWY (%)	OY (%)
dC19		
G18	100,0	100,0
G17	100,0	100,0
U16	97,8	93,5
A15	95,3	82,4
C14	96,2	82,4
C13	96,8	82,0
A12	95,9	74,7
C11	94,9	65,7
A10	95,0	63,3
C9	95,5	63,3
U8	95,4	59,6
G7	95,7	58,8
C6	96,0	58,8
C5	96,2	58,0
C4	96,4	58,0
C3	96,6	58,0
G2	96,8	58,0
<i>C1</i>	<i>97,0</i>	<i>58,0</i>



nt	ASWY (%)	OY (%)
dG 22		
G21	100,0	100,0
C20	99,5	99,1
A19	81,9	54,9
A18	81,3	43,7
U17	84,7	43,7
G16	86,2	40,9
G15	88,0	40,9
C14	89,4	40,9
U13	90,6	40,9
G12	91,5	40,9
A11	91,8	39,1
A10	90,5	30,2
G9	91,2	30,2
C8	91,8	30,2
A7	91,6	27,0
G6	91,5	24,2
G5	92,0	24,2
G4	92,4	24,2
U3	92,8	24,2
C2	93,1	24,2
<i>G1</i>	<i>93,5</i>	<i>24,2</i>

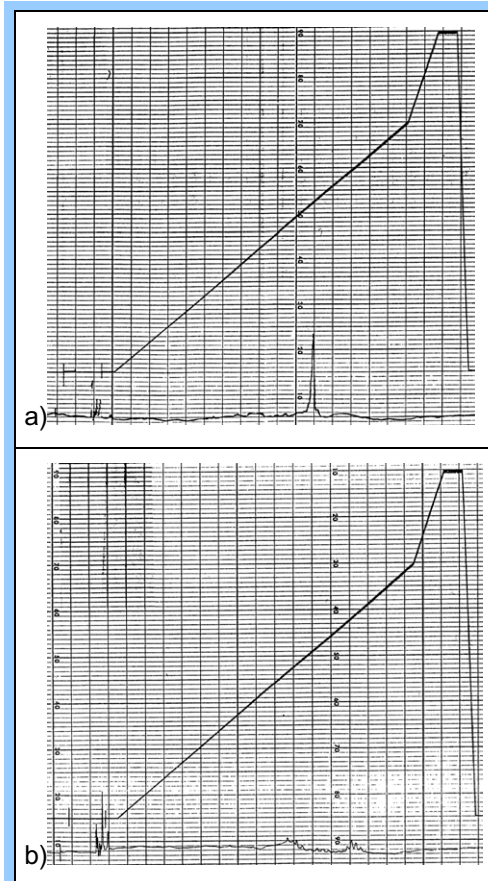
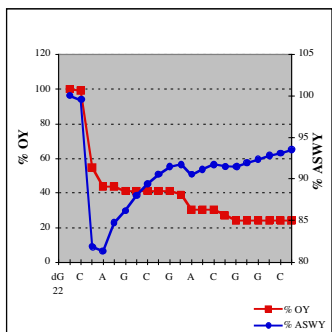


Figure 2.4 : Chromatogrammes analytiques d’une synthèse correcte (brin 1.1#3 en a) et d’une synthèse de mauvaise qualité (brin 3.2#3 en b).

La longueur d’onde utilisée est 260 nm (sensibilité=0,19 UA₂₆₀ en a et 0,15 UA₂₆₀ en b).
Echelle des temps en abscisses : 1 largeur de carreau=3 min.

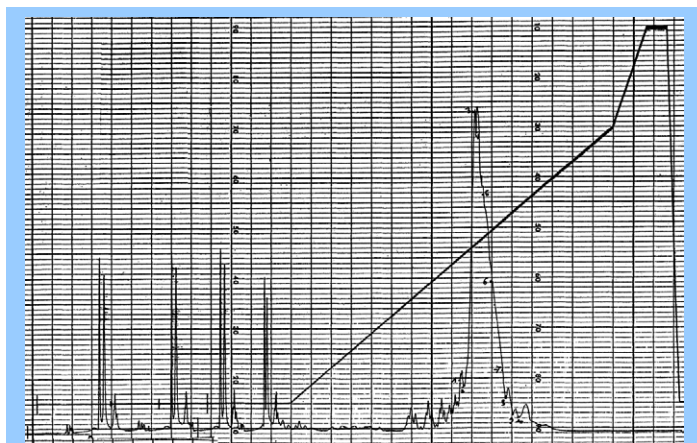


Figure 2.5 : Chromatogramme préparatif obtenu pour le brin 1.1#3.

Les pics observés avant le démarrage du gradient correspondent aux injections.

La longueur d'onde utilisée est 295 nm (sensibilité=2,0 UA₂₉₅).

Echelle des temps en abscisses : 1 largeur de carreau=3 min.

(Figure 2.5) ou par PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide) préparative en conditions dénaturantes. En effet, lorsque le chromatogramme ne montre pas de pic distinct, il s'avère plus judicieux de purifier les oligoribonucléotides correspondants par PAGE. Au cours de la purification par HPLC, les fractions sont récupérées à partir du pied du pic correspondant à l'oligoribonucléotide attendu. Une analyse par PAGE montre que les fractions récupérées entre la pointe et la demi-hauteur du pic sont en général pures (Figure 2.6). Cependant, de l'ARN est également retrouvé dans certaines fractions précédentes, qui sont rassemblées avant d'être purifiées à nouveau. Les fractions qui contiennent uniquement l'oligoribonucléotide désiré sont rassemblées puis dessalées avant d'être concentrées pour former les solutions-stocks de chaque oligoribonucléotide dans l'eau. Les synthèses purifiées par PAGE sont directement concentrées, sans vérification de la pureté.

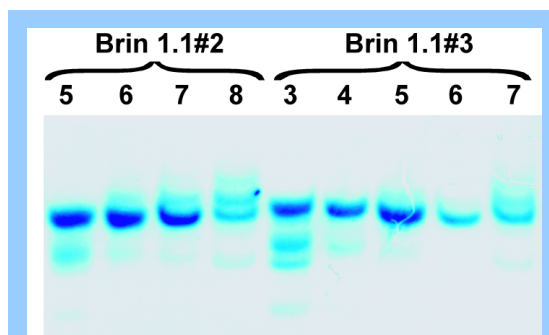


Figure 2.6 : PAGE analytique des fractions récupérées après la purification des oligoribonucléotides 1.1#2 et 1.1#3.

Les numéros des fractions sont indiqués en haut de chaque piste. Les fractions 6 pour l'oligoribonucléotide 1.1#2 et 5 et 6 pour l'oligoribonucléotide 1.1#3 ont été utilisées pour les expériences de cristallisation.

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

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

2) Problèmes de déprotection

La déprotection du groupement TBDMS fixé sur l'oxygène 2' des ARN synthétisés dépend de la longueur de l'ARN (Gasparutto, *et al.* 1992), de sa séquence, et surtout du degré d'humidité de la solution de déprotection (TBAF 1 M/THF). Celui-ci varie selon les flacons employés. S'il est supérieur à 5%, la déprotection ne sera pas efficace (Hogrefe, *et al.* 1993). De plus, il existe une concentration et un temps de déprotection optimaux pour chaque fragment (Murray, *et al.* 1994). Les oligoribonucléotides 1.2#1, 2.1#2, 2.2#1, 3.2#2, 3.2#3 et 4.2#5 correspondent à des fragments mal déprotégés (Tableau 2.1). En effet, il s'agit de synthèses à rendement correct (sauf 3.2#2 et 3.2#3) qui présentent un profil de mauvaise synthèse en chromatographie analytique (Figure 2.7). De plus, sur PAGE analytique, la bande correspondant au fragment attendu n'apparaît pas (Figure 2.7). Etant données les conditions dénaturantes employées (température élevée au cours des purifications et haute concentration en urée) et le fait que cela soit observé pour des synthèses de brins différents, il ne s'agit pas de conformations différentes du même ARN. La seconde déprotection est effectuée en présence de 1 ml de solution TBAF 1 M/THF, au lieu de 1,5 ml (pendant 24h à l'obscurité) (Figure 2.7). Pour les synthèses de qualité correcte purifiées par HPLC, les fractions récupérées après le fragment de taille attendue sont rassemblées et également déprotégées une seconde fois. (Tableau 2.2).

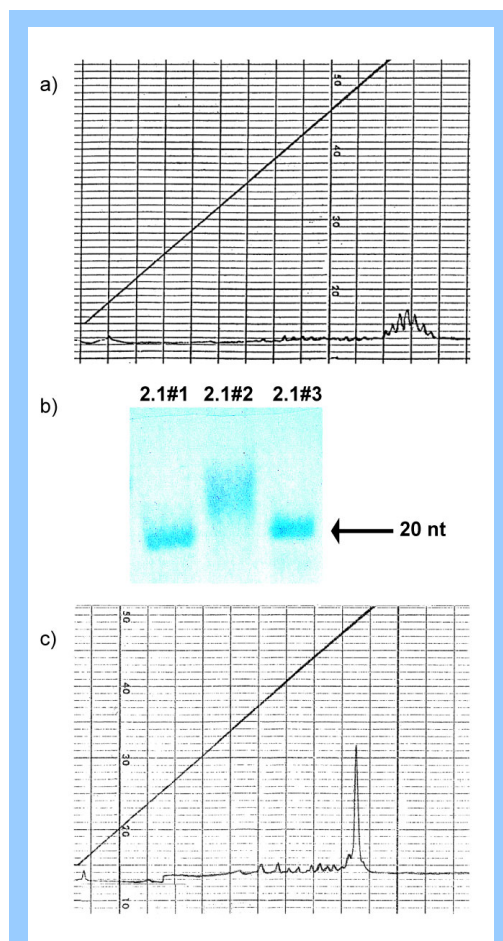
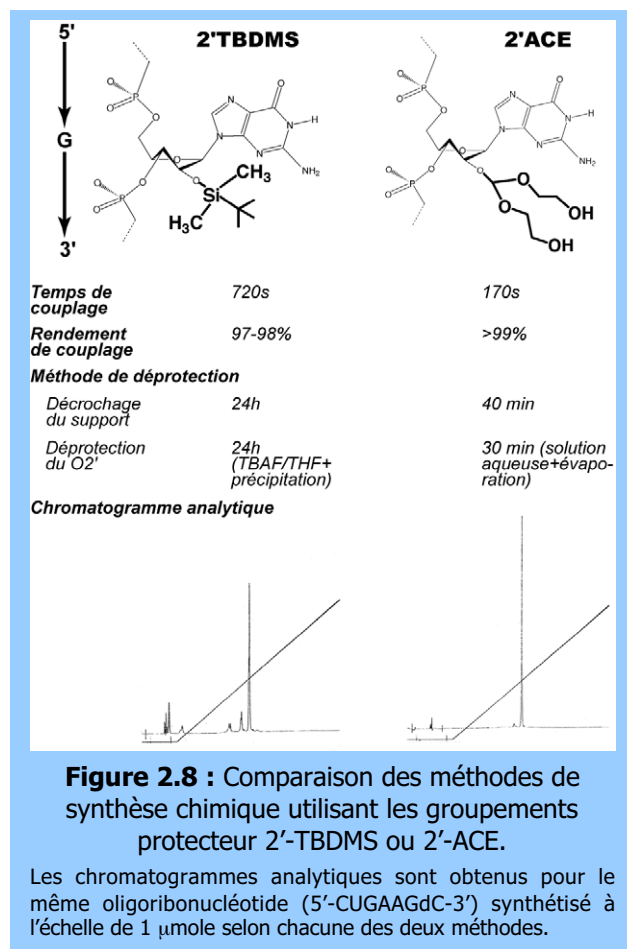


Figure 2.7 : Chromatogramme (a) et PAGE (b) analytiques obtenus pour le brin 2.1#2 après la 1^e déprotection. Chromatogramme analytique obtenu après la 2^e déprotection (c).

La longueur d'onde utilisée est 260 nm (sensibilité=0,15 UA₂₆₀ en a et 0,05 UA₂₆₀ en c). Echelle des temps en abscisses : 1 largeur de carreau=3 min.



D'autres protocoles de déprotection, utilisant du trihydrofluorure de triéthylamine (Westman et Strömberg 1994) ou une solution 0,01 M d'acide chlorhydrique à pH=2,0 (Kawahara, *et al.* 1995), ont été testés. Entre temps, la société américaine Dharmacon Research Inc. a développé une méthode de synthèse chimique sur support solide qui utilise des synthons possédant des groupements protecteurs différents de ceux utilisés au laboratoire (Scaringe, *et al.* 1998). En particulier, les oxygènes 2' des oligoribonucléotides synthétisés sont protégés par un groupement 2'-bis-(acétoxyethoxy)-méthyle éther (2'-ACE). Le temps de couplage d'un nucléotide est court, le rendement de synthèse est élevé et la méthode de déprotection est rapide et efficace (Figure 2.8). Cependant, les synthons nécessaires à la fabrication de ces oligoribonucléotides n'étant pas commercialisés, les oligoribonucléotides ont été obtenus directement synthétisés auprès de la société. Plusieurs tests comparatifs ont été effectués pour des oligoribonucléotides de différentes tailles. Des expériences en spectrométrie de masse MALDI-TOF effectuées sur certaines séquences mal déprotégées ont révélé la présence d'un groupement résiduel de 54 g/mol après la déprotection au TBAF/THF (Figure 2.9). Ce groupement, attribué à une fonction cyanoéthyle ou tertibutyle, n'est jamais retrouvé dans les oligoribonucléotides obtenus auprès de Dharmacon Research Inc. (Figure 2.9).

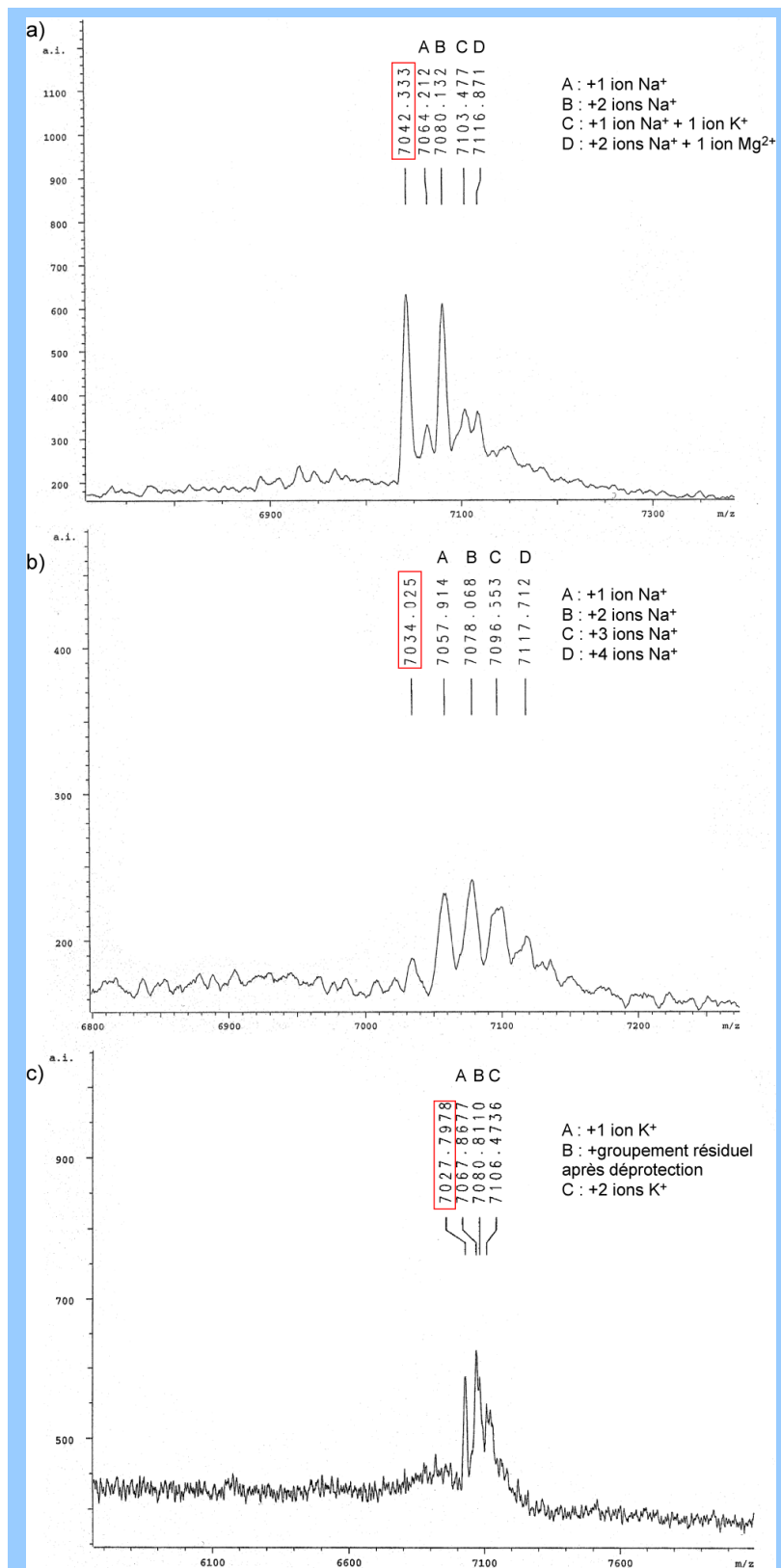


Figure 2.9 : Spectres MALDI-TOF d’une synthèse par Dharmacon Research Inc. (a), d’une synthèse correcte (b) et d’une synthèse mal déprotégée (c) effectuées au laboratoire.

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

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

Tableau 2.3 : Quantités finales d'oligoribonucléotides obtenues après purification.

Nom du brin	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	4.1	4.2	A1.1	A1.2	A2.1	A2.2
Quantité finale récupérée (mg)	1,2	0,4	0,4	0,5	1,2	0,4	1,3	0	0,3	0,4	1,0	0,3

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

3) Problèmes de purifications par HPLC

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

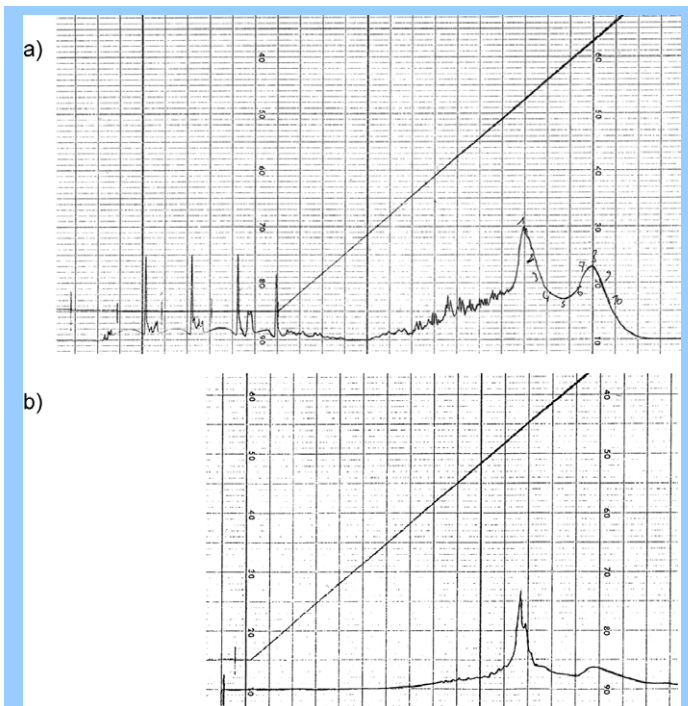


Figure 2.10 : Chromatogramme préparatif de l'oligonucléotide 4.2#4 (a) et chromatogramme du gradient à vide réalisé juste après la purification (b). Les longueurs d'onde utilisées sont 295 nm (sensibilité=2,0 UA₂₉₅) en (a) et 260 nm (sensibilité=0,2 UA₂₆₀) en (b). Echelle des temps en abscisses : 1 largeur de carreau=3 min.

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

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

Des problèmes de séparation ont rapidement surgi. Ni l'augmentation de la température pendant les chromatographies préparatives, ni le démontage du système et le nettoyage des pièces, ni le passage de tampons à pH très basique (NaOH 25 mM ; pH=12,5), ni même le reconditionnement de la résine échangeuse d'anions (passage d'une solution 50 mM NH₄Cl / 20% MeOH) n'ont permis d'y remédier. L'étanchéité de la valve d'injection, l'usure des pompes, ainsi que le vieillissement de la colonne seront mis en cause. La colonne fut remplacée par une colonne identique et la chaîne HPLC Waters® remplacée par une chaîne HPLC Dionex® informatisée, avant la purification des oligoribonucléotides des autres séries (Figure 2.11). Les oligo-

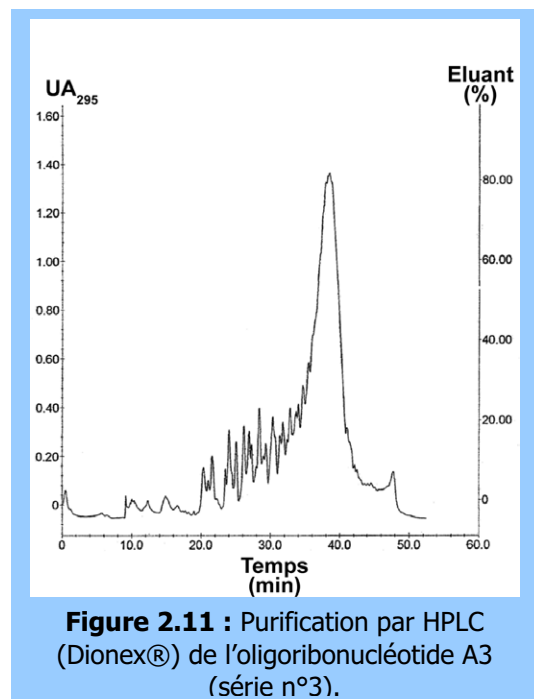


Figure 2.11 : Purification par HPLC (Dionex®) de l'oligonucléotide A3 (série n°3).

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

C. Recherche de conditions de renaturation

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

1) Résultats des antibiogrammes

La technique de l'antibiogramme a été employée afin de vérifier que la néomycine n'est pas altérée au cours des processus de renaturation d'ARN. Des volumes identiques de différentes solutions de 0,6 mM de néomycine sont déposés au centre d'une boîte de Petri contenant un tapis de bactéries *Escherichia coli* (souche DH5 α). Au bout d'une nuit à 37°C, on observe une inhibition de croissance des bactéries autour des dépôts de néomycine matérialisée par un halo. Un dépôt est effectué avec une solution de néomycine

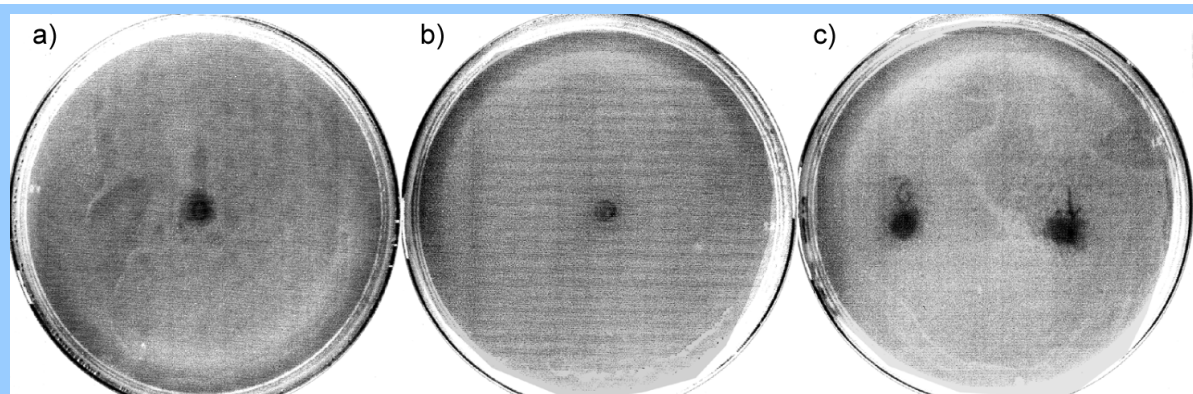


Figure 2.12 : Antibiogrammes obtenus avec une dilution de la solution-stock de néomycine à 0,6 mM (a), une solution de renaturation (ARN/néomycine) (b), une solution de renaturation (néomycine seule) (c) (deux dépôts ont été effectués dans la condition c).

provenant directement du stock. Un deuxième dépôt est effectué avec une solution de renaturation (0,6 mM fragment F3/0,6 mM néomycine/0,1 mM MgCl₂/50 mM Na cacodylate pH 6,0) préalablement portée progressivement à 95°C en 30 min, maintenue à 95°C pendant 5 min puis refroidie lentement jusqu'à température ambiante pendant 2h. Un troisième dépôt est effectué avec une solution similaire mais ne comportant pas d'ARN. La néomycine ne semble pas affectée par les hautes températures utilisées pour la renaturation (Figure 2.12). Chauffée ou non, elle est aussi efficace pour inhiber la croissance des bactéries. Cependant, l'inhibition est moins prononcée en présence de l'ARN. Dans ce cas, soit la néomycine est dégradée, soit son interaction avec l'ARN l'empêche d'être active.

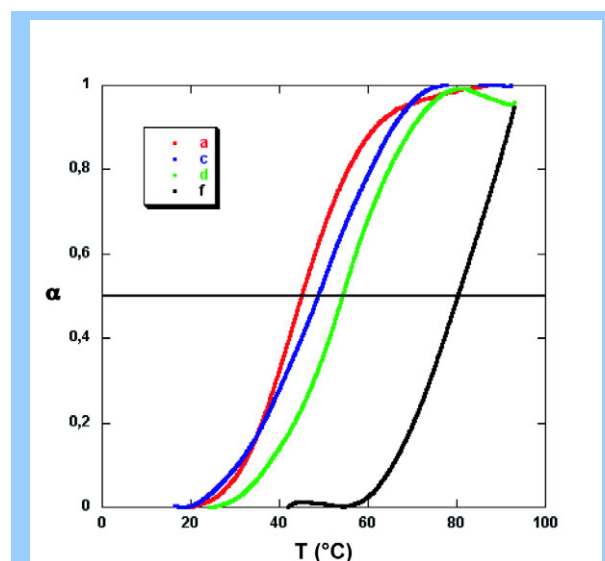
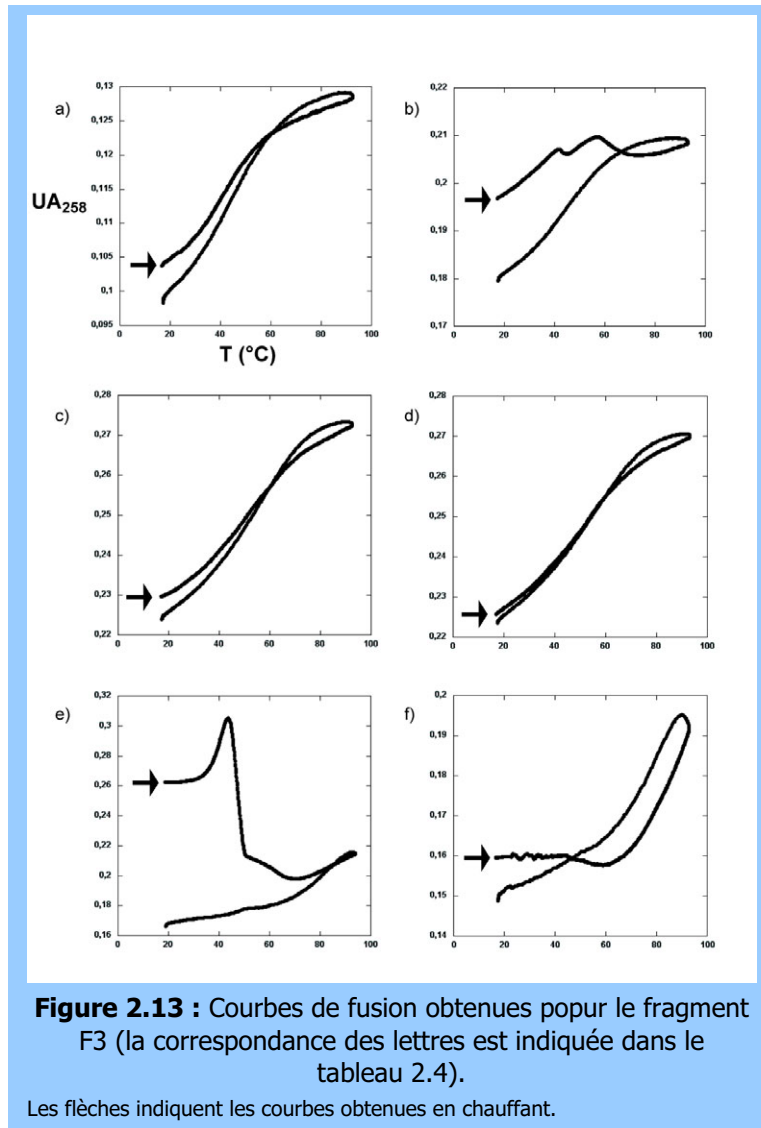
2) Résultats des expériences de fusion

Des expériences de dénaturation thermique ont été effectuées par mesure de l' A_{258} de solutions contenant environ 0,4 μ M de fragment F3 en présence de diverses concentrations de MgCl₂ (0,1 mM-15 mM) et de néomycine (0,1 μ M-3,0 mM), dans une solution tampon contenant 5 mM de NaCl et 50 mM de cacodylate de sodium à pH=6,0. Une augmentation de la concentration en MgCl₂ ne semble pas provoquer une stabilisation du fragment (Tableau 2.4 ; Figure 2.13). Un phénomène d'hystérèse est observé : le profil obtenu en chauffant n'est pas superposable à celui obtenu en refroidissant l'échantillon. L'écart augmente proportionnellement à la concentration en magnésium, signe d'une dégradation de l'ARN.

Tableau 2.4 : Valeurs des températures de fusion et exemples de profils obtenus pour le fragment F3.

MgCl ₂ (mM)	Néomycine (mM)	T _m (°C)	Profil
-	-	44	a
0,1	-	hystérèse	b
0,1	1,0 x 10 ⁻⁴	51	c
0,1	4,0 x 10 ⁻⁴	54	d
0,1	0,75	83	e (1 ^{er} profil), f (2 ^e profil)
5,0	-	hystérèse	
15,0	-	hystérèse	
15,0	1,5	hystérèse	
15,0	3,0	hystérèse	

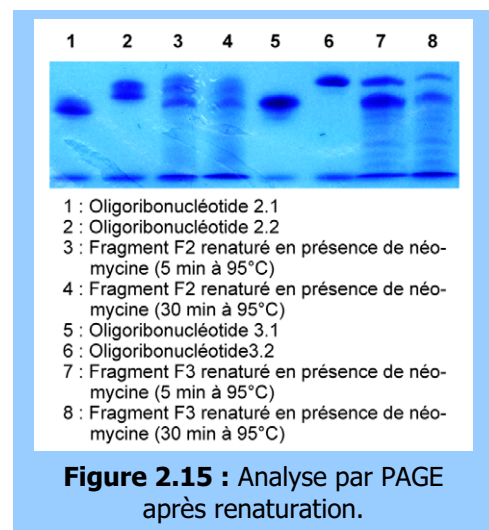
Le fragment est par contre progressivement stabilisé par des concentrations croissantes en néomycine (Tableau 2.4 ; Figure 2.14). Ainsi, il semble prometteur d'effectuer les tests de cristallogénèse en présence d'un excès de néomycine par rapport au fragment d'ARN (rapports stoechiométriques 5:1 ou 10:1).



3) Résultats des expériences par PAGE

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

En conclusion de ces études, il apparaît que le complexe ARN/néomycine est fragile en solution. L'ARN se dégrade lorsqu'il est chauffé en présence de néomycine. La néomycine est moins efficace après avoir été chauffée en présence de l'ARN, ce qui peut suggérer qu'elle se dégrade elle-aussi. C'est pourquoi il apparaît plus judicieux de chauffer l'ARN à une température inférieure à 95°C et de n'ajouter l'aminoglycoside qu'à une température de 37°C, dans un rapport stoechiométrique néomycine/ARN (5:1) par exemple. Aucune dégradation n'est observée pour des échantillons portés à 45°C pendant 3 min puis à 22°C pendant 10 minutes avant ajout de la néomycine. Des expériences de retard sur gel ont aussi été effectuées avec 10 μ M de fragment A1 en présence de 10 et 100 μ M de néomycine (45s à 90°C, puis 2 min à 4°C, puis 8 min à 27°C) dans une solution tampon contenant 3 mM $MgCl_2$. Un déplacement de bande a été observé entre les simples et doubles brins, mais pas entre les doubles brins en présence ou non de néomycine (non représenté).



D. Cristallisation et premiers essais de diffraction

1) Cristallogénèse du fragment F3

Au cours d'un stage antérieur au Diplôme d'Etudes Approfondies effectué au laboratoire, une matrice de 24 conditions de cristallisation rassemblant les paramètres importants pour la cristallisation des ARN avait été établie à partir d'une analyse bibliographique (Masquida et Westhof 1999). Une matrice similaire a été appliquée à la cristallisation du fragment F3 en présence de néomycine par diffusion de vapeur en goutte suspendue (Tableau 2.5). Cette matrice comprend quatre agents cristallisants, chacun testé à deux concentrations différentes, ainsi que des ions mono- (NaCl) et divalents (MgCl₂). La solution est tamponnée par 50 mM de cacodylate de sodium à un pH légèrement acide (pH=6,0). Trois solutions de renaturation ont été préparées à température ambiante, contenant : 1,5 mM brin 3.1/1,5 mM brin 3.2/0,1 mM MgCl₂/0,75, 1,5 ou 3 mM de sulfate de néomycine, testant ainsi trois rapports néomycine/fragment F3 (1:2, 1:1 et 2:1), tout en évitant une concentration élevée en magnésium qui pourrait inhiber la fixation de l'aminoglycoside au site A (Famulok et Hüttenhofer 1996).

Des précipités ont été obtenus pour les conditions B6 (immédiatement), B3 à B6 (après un jour), puis pour toute la rangée (après 4 jours). Aucune évolution des gouttes n'a été observée pour les autres conditions (gouttes claires), sauf pour la condition D2 : une espèce apparemment cristalline de dimension légèrement inférieure à 100 µm est apparue au bout de 4 jours. Des essais de diffraction n'ont pas permis de déterminer la nature de ce cristal.

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

Chaque condition comprend 5 mM NaCl et 0,1 mM MgCl₂ (Néo=néomycine). Les volumes des gouttes sont de 1,2 µl (solution du complexe F3/néomycine)+1,2 µl (solution de cristallisation) pour des concentrations en néomycine de 0,75 et 1,5 mM et de 1 µl+1 µl dans les autres cas. Les réservoirs ont pour volume 500 µl. Les conditions en MPD sont effectuées avec 60% MPD dans le réservoir. La température de cristallisation est 22°C. La condition ayant donné un cristal est indiquée en gras.

	A	B	C	D
1	MPD 15% Néo 0,75 mM	PEG 400 10% Néo 0,75 mM	SLi 1,6 M Néo 0,75 mM	SA 1,5 M Néo 0,75 mM
2	MPD 15% Néo 1,5 mM	PEG 400 10% Néo 1,5 mM	SLi 1,6 M Néo 1,5 mM	SA 1,5 M Néo 1,5 mM
3	MPD 15% Néo 3,0 mM	PEG 400 10% Néo 3,0 mM	SLi 1,6 M Néo 3,0 mM	SA 1,5 M Néo 3,0 mM
4	MPD 30% Néo 0,75 mM	PEG 400 20% Néo 0,75 mM	SLi 1,9 M Néo 0,75 mM	SA 2,0 M Néo 0,75 mM
5	MPD 30% Néo 1,5 mM	PEG 400 20% Néo 1,5 mM	SLi 1,9 M Néo 1,5 mM	SA 2,0 M Néo 1,5 mM
6	MPD 30% Néo 3,0 mM	PEG 400 20% Néo 3,0 mM	SLi 1,9 M Néo 3,0 mM	SA 2,0 M Néo 3,0 mM

2) Cristallogénèse des fragments F3 et A1

Les premiers essais de cristallisation exposés ci-dessus ont encouragé les études de renaturation décrites au paragraphe I.C. Suite aux résultats de ces études, les essais de cristallisation suivants ont été effectués avec les fragments F1, F3 et A1. Une solution contenant 1 mM de chaque fragment et 0,1-2,0 mM $MgCl_2$ est chauffée à 45°C pendant 3 min puis laissée à 22°C pendant 10 min avant ajout de sulfate de néomycine. L'ajout de néomycine au fragment F1 dans un rapport néomycine/ARN (5:1) provoque une précipitation. Une précipitation similaire est observée lors de l'ajout de néomycine aux fragments F3 et A1 dans des rapports respectifs de 2,2:1 et 1:1, mais cette précipitation est éliminée après une légère dilution et un chauffage à 37°C pendant quelques minutes. Une matrice de conditions en kit, la matrice Natrix© (Hampton Research®), est finalement réalisée à 22°C en entier avec le fragment A1 (0,8 mM ARN/0,8 mM néomycine) et de manière clairsemée (uniquement les conditions ne contenant pas de solvant organique) avec le fragment F3 (0,9 mM ARN/1,9 mM néomycine). Cette matrice rassemble 48 conditions ayant déjà donné des cristaux pour des complexes ARN/protéine ou ARN/ligand (Tableau 2.6). Outre les variations de types et de concentrations en agents cristallisants et en additifs, cette matrice propose un criblage du pH, de 5,6 à 8,5. Cette approche est intéressante dans l'étude d'un complexe ARN/antibiotique dépendant fortement du nombre de groupements aminés protonés. Des précipités ont été observés immédiatement ou au bout d'une semaine dans la majorité des conditions, exceptées les conditions n°8, 11, 21, 30, 34, 35 et 40. Les conditions n°11, 30 et 40 contiennent du sulfate d'ammonium ou de lithium, et se rapprochent ainsi de la condition ayant produit un cristal lors des premiers essais (§I.D.1.).

Tableau 2.6 : Matrice de 48 conditions Natrix®.

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

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

Sel	Tampon	Agent cristallisant
1. 0.01 M Magnesium Chloride	1. 0.05 M MES pH 5.6	1. 2.0 M Lithium Sulfate monohydrate
2. 0.01 M Magnesium Acetate	2. 0.05 M MES pH 5.6	2. 2.5 M Ammonium Sulfate
3. 0.1 M Magnesium acetate	3. 0.05 M MES pH 5.6	3. 20% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
4. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Sulfate	4. 0.05 M MES pH 5.6	4. 10% v/v Polyethylene Glycol 400
5. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	5. 0.05 M MES pH 5.6	5. 5% w/v Polyethylene Glycol 8000
6. 0.1 M Ammonium Sulfate, 0.01 M Mg Chloride	6. 0.05 M MES pH 5.6	6. 20% w/v Polyethylene Glycol 8000
7. 0.02 M Magnesium Chloride	7. 0.05 M MES pH 6.0	7. 15% v/v iso-Propanol
8. 0.1 M Ammonium Acetate, 0.005 M Mg Sulfate	8. 0.05 M MES pH 6.0	8. 0.6 M Sodium Chloride
9. 0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	9. 0.05 M MES pH 6.0	9. 10% v/v Polyethylene Glycol 400
10. 0.005 M Magnesium Sulfate	10. 0.05 M MES pH 6.0	10. 5% w/v Polyethylene Glycol 4000
11. 0.01 M Magnesium Chloride	11. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	11. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
12. 0.01 M Magnesium Sulfate	12. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	12. 1.8 M Lithium Sulfate monohydrate
13. 0.015 M Magnesium Acetate	13. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	13. 1.7 M Ammonium Sulfate
14. 0.1 M Potassium Chloride, 0.025 M Mg Chloride	14. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	14. 15% v/v iso-Propanol
15. 0.04 M Magnesium Chloride	15. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	15. 5% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
16. 0.04 M Magnesium Acetate	16. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	16. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
17. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	17. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.0	17. 10% w/v Polyethylene Glycol 4000
18. 0.01 M Magnesium Chloride	18. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18. 1.3 M Lithium Sulfate monohydrate
19. 0.01 M Magnesium Sulfate	19. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	19. 2.0 M Ammonium Sulfate
20. 0.1 M Ammonium Acetate, 0.015 M Mg Acetate	20. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	20. 10% v/v iso-Propanol
21. 0.2 M Potassium Chloride, 0.005 M Mg Chloride	21. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21. 10% w/v 1,6 Hexanediol
22. 0.08 M Magnesium Acetate	22. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	22. 15% v/v Polyethylene Glycol 400
23. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	23. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	23. 10% w/v Polyethylene Glycol 4000
24. 0.2 M Ammonium Acetate, 0.01 M Ca Chloride	24. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	24. 10% w/v Polyethylene Glycol 4000
25. 0.08 M Magnesium Acetate	25. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	25. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
26. 0.2 M Potassium Chloride, 0.1 M Mg Acetate	26. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	26. 10% w/v Polyethylene Glycol 8000
27. 0.2 M Ammonium Acetate, 0.02 M Mg Acetate	27. 0.05 M Sodium Cacodylate pH 6.5	27. 30% w/v Polyethylene Glycol 8000
28. 0.05 M Magnesium Sulfate Aq.	28. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	28. 1.6 M Lithium Sulfate monohydrate
29. 0.01 M Magnesium Chloride	29. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	29. 4.0 M Lithium Chloride anhydrous
30. 0.01 M Magnesium Chloride	30. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	30. 1.6 M Ammonium Sulfate
31. 0.005 M Magnesium Chloride	31. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	31. 25% v/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
32. 0.2 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	32. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	32. 20% w/v 1,6 Hexanediol
33. 0.2 M Ammonium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	33. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	33. 30% w/v 1,6 Hexanediol
34. 0.1 M Potassium Chloride, 0.005 M Mg Sulfate Aq.	34. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	34. 15% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
35. 0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	35. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	35. 5% v/v Polyethylene Glycol 400
36. 0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	36. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	36. 10% v/v Polyethylene Glycol 400
37. 0.2 M Potassium Chloride, 0.025 M Mg Sulfate Aq.	37. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	37. 20% v/v Polyethylene Glycol 200
38. 0.2 M Ammonium Acetate, 0.15 M Mg Acetate	38. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	38. 5% w/v Polyethylene Glycol 4000
39. 0.1 M Ammonium Acetate, 0.02 M Mg Chloride	39. 0.05 M HEPES - Na pH 7.0	39. 5% w/v Polyethylene Glycol 8000
40. 0.01 M Magnesium Chloride	40. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	40. 1.6 M Ammonium Sulfate
41. 0.1 M Potassium Chloride, 0.015 M Mg Chloride	41. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	41. 10% v/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550
42. 0.01 M Magnesium Chloride	42. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	42. 5% v/v iso-Propanol
43. 0.05 M Ammonium Acetate, 0.01 M Mg Chloride	43. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	43. 10% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
44. 0.2 M Potassium Chloride, 0.05 M Mg Chloride	44. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 7.5	44. 10% w/v Polyethylene Glycol 4000
45. 0.025 M Magnesium Sulfate Aq.	45. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	45. 1.8 M Ammonium Sulfate
46. 0.005 M Magnesium Sulfate Aq.	46. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	46. 35% w/v 1,6 Hexanediol
47. 0.1 M Potassium Chloride, 0.01 M Mg Chloride	47. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	47. 30% v/v Polyethylene Glycol 400
48. 0.2 M Ammonium Chloride, 0.01 M Ca Chloride	48. 0.05 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000

3) Cristallogénèse du fragment A3

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

Après purification par HPLC, l'obtention de 1 mg de fragment A3, appartenant à la série n°3 (synthèse exécutée au laboratoire), a permis d'effectuer une série de nouveaux essais de cristallogénèse directement inspirés par les conditions de cristallisations des molécules d'ARN (Masquida et Westhof 1999), comme précédemment, mais aussi par celles

ayant permis la cristallisation de molécules d'ADN complexées à des petites molécules organiques. Au commencement de cette étude, l'essentiel des informations structurales de complexes entre des oligoribonucléotides (le plus souvent des aptamères) et des petites molécules (en plus des aminoglycosides) telles que l'AMP (Jiang, *et al.* 1996 ; Lin et Patel 1997), l'arginine et la citrulline (Yang, *et al.* 1996), la FMN (Fan, *et al.* 1996), l'ATP (Dieckmann, *et al.* 1996), la théophylline (Zimmermann, *et al.* 1997), provenait d'études par RMN. Seulement quelques structures cristallographiques de petites molécules liées à une molécule d'ARN étaient connues : celles d'un agent mutagène intercalant, la proflavine, liée à différents dimères de nucléotides (Shieh, *et al.* 1982 ; Swaminathan, *et al.* 1982), et celles d'agents antibactériens, antiviraux et antitumoraux tels la nétrropsine et la distamycine A liés à l'ARN^{Phe} (Rubin et Sundaralingam 1984). Cependant, la chimie de synthèse de l'ADN ne souffrant pas des problèmes liés à la protection du groupement O2' des molécules d'ARN, son développement avait permis dès les années 1970 un essor des études cristallographiques de petites molécules interagissant avec des oligodésoxyribonucléotides (Berman et Young 1981 ; Neidle et Berman 1983 ; Neidle, *et al.* 1987). Plusieurs structures cristallographiques avaient ainsi pu être obtenues pour des ligands interagissant dans le petit sillon par des groupements chargés positivement (souvent des groupements guanidinium) : la nétrropsine (Kopka, *et al.* 1985a ; Kopka, *et al.* 1985b), la distamycine A (Chen, *et al.* 1994 ; Kopka, *et al.* 1985b), la triostine A (Wang, *et al.* 1984 ; Wang, *et al.* 1986), la daunomycine (Wang, *et al.* 1987), l'agent Hoechst 33258 (Pjura, *et al.* 1987 ; Quintana, *et al.* 1991), le fluorochrome DAPI (Larsen, *et al.* 1989).

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

Tableau 2.7 : Compilation des compositions des solutions utilisées pour les résolutions cristallographiques de structures de complexes ADN ou ARN/ligands antérieures à 1998.

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

Toutes ces expériences de cristallisation ont été effectuées en diffusion de vapeur, sauf celle du complexe contenant l'ARNt^{Phe}, réalisée par cristallisation en batch.

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

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

Tableau 2.9 : Matrice construite à partir des conditions d'études structurales de complexes ADN- et ARN/ligands et appliquée à la cristallisation du complexe fragment A3/paromomycine.

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

	1	2	3	4	5	6
A	5% MPD 2 mM Par	10% MPD 2 mM Par	15% MPD 2 mM Par	20% MPD 2 mM Par	25% MPD 2 mM Par	30% MPD 2 mM Par
B	5% MPD 4 mM Par	10% MPD 4 mM Par	15% MPD 4 mM Par	20% MPD 4 mM Par	25% MPD 4 mM Par	30% MPD 4 mM Par
C	5% MPD 2 mM Par	10% MPD 2 mM Par	15% MPD 2 mM Par	20% MPD 2 mM Par	25% MPD 2 mM Par	30% MPD 2 mM Par
D	5% MPD 4 mM Par	10% MPD 4 mM Par	15% MPD 4 mM Par	20% MPD 4 mM Par	25% MPD 4 mM Par	30% MPD 4 mM Par

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

- préparation d'une solution contenant 1 mM fragment d'ARN/25 mM NaCl/10 mM MgSO₄/100 mM Na cacodylate (pH=5,6 ou 6,4),
- chauffage de cette solution à 85°C pendant 2 min,
- refroidissement lent (2h) jusqu'à 37°C,
- ajout de paromomycine au lieu de néomycine (la paromomycine possède un groupement ammonium de moins que la néomycine), dans un rapport ARN/paromomycine de 1:1 ou 1:2, préalablement dissoute dans une solution contenant 50 mM Na cacodylate de même pH (pH=5,6 ou 6,4)/25 mM NaCl/0-10 mM MgSO₄,
- incubation pendant 5 min à 37°C,
- refroidissement lent (3h) jusqu'à 22°C.

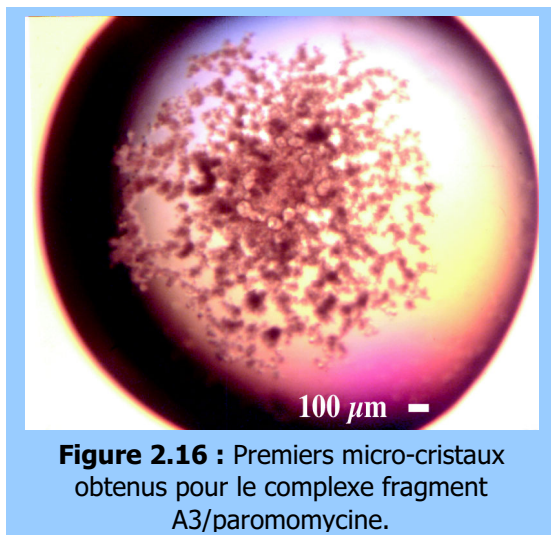


Figure 2.16 : Premiers micro-cristaux obtenus pour le complexe fragment A3/paromomycine.

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

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

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

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

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

	1	2	3	4	5	6
A	5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>60% MPD</i>	2,5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>60% MPD</i>	3,5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>60% MPD</i>	5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>idem</i>	5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>30% MPD</i>	2,5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>30% MPD</i>
B	5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>60% MPD</i>	10% MPD 2 mM Par 100 mM KCl <i>60% MPD</i>	15% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 1 mM spermine <i>60% MPD</i>	2,5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 1 mM spermine <i>60% MPD</i>	4% MPD 2 mM Par 100 mM KCl 1 mM spermine <i>60% MPD</i>	5% MPD 2 mM Par 100 mM KCl 1 mM spermine <i>60% MPD</i>
C	3% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>30% MPD</i>	5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>30% MPD</i>	10% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl <i>30% MPD</i>	3% MPD 2 mM Par 100 mM KCl <i>30% MPD</i>	5% MPD 2 mM Par 100 mM KCl <i>30% MPD</i>	10% MPD 2 mM Par 100 mM KCl <i>30% MPD</i>
D	3% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 1 mM spermine <i>30% MPD</i>	5% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 1 mM spermine <i>30% MPD</i>	10% MPD 2 mM Par 100 mM NaCl 1 mM spermine <i>30% MPD</i>	3% MPD 2 mM Par 100 mM KCl 1 mM spermine <i>30% MPD</i>	5% MPD 2 mM Par 100 mM KCl 1 mM spermine <i>30% MPD</i>	10% MPD 2 mM Par 100 mM KCl 1 mM spermine <i>30% MPD</i>

(b) Fragment A3 commandé et purifié par PAGE

L'obtention de fragments résultant de synthèse de meilleure qualité commandé chez Dharmacon Research Inc., suivie d'une purification par PAGE a permis l'apparition d'oursins ou d'étoiles puis de plaquettes (souvent empilées ou en bouquets, typiques de la cristallisation d'ARN (Holbrook, *et al.* 2001) en présence de solutions de cristallisation contenant 2 mM de paromomycine/1,5-5% MPD/1-2% glycérol/100-250 mM NaCl/0-10 mM MgSO₄/50 mM Na cacodylate pH 6,4, contre 500 μ l de 40-60% MPD dans le

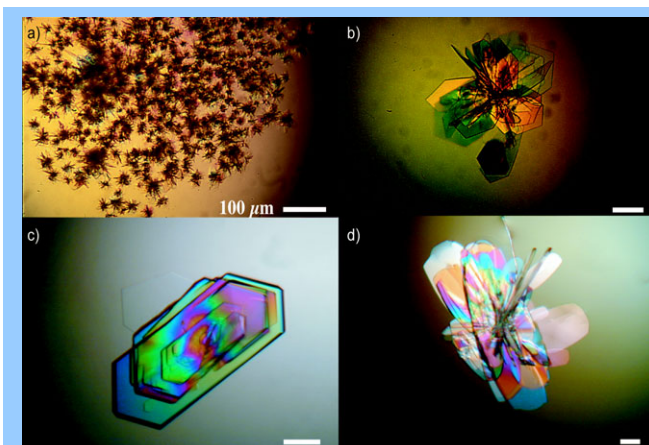


Figure 2.17 : Plaquettes de différentes tailles et différentes directions de croissance, obtenues pour le complexe fragment A3/paromomycine à partir de l'oligonucléotide commercial (a-c) ou synthétisé au laboratoire (d).

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

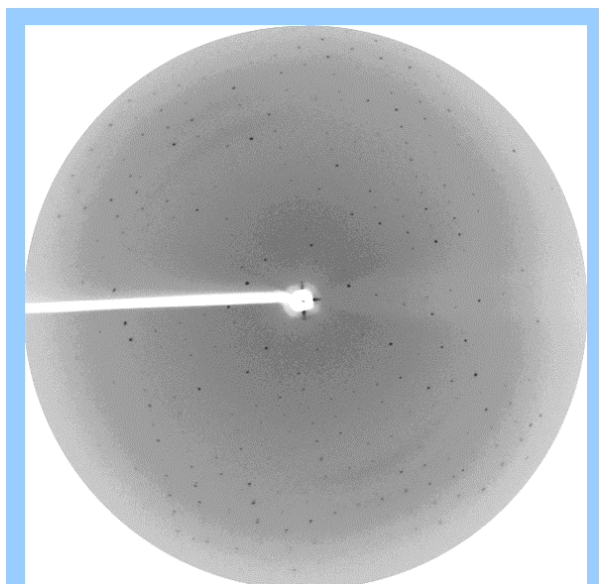


Figure 2.18 : Premier cliché de diffraction obtenu pour un complexe fragment A3/paromomycine.

La résolution en bord de disque est de 3,0 Å.

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

D'autres essais de diffraction ont été effectués à l'aide du diffractomètre Enraf Nonius disponible au laboratoire. Des clichés ont été enregistrés pour des expositions de 40 min/image, avec une oscillation de $0,5^\circ$ ou 1° , pour différents angles φ ($0, 90^\circ$). 50° d'espace à $0,5^\circ$ d'oscillation ont été enregistrés, mais les taches étant de faible intensité (environ deux fois le bruit de fond), le programme DENZO (Otwinowski et Minor 1996) n'est pas capable d'indexer et donc de traiter le jeu de données. D'autres essais ont été entrepris avec des temps d'exposition de 1 h, mais sans succès. Un test de spectrométrie MALDI-TOF effectué avec un cristal lavé

Des plaquettes et des morceaux de plaquettes provenant de bouquets ont été cryo-congelés dans des solutions de même composition que celles ayant servi à la cristallisation, mais contenant 40-60% MPD et 0 ou 10% glycérol. Ces cristaux ont été testés à l'ESRF (Grenoble) sur la ligne BM30 ($\lambda=0,9743$ Å). Une exposition de 10s/image, avec une oscillation de 1° , pour un angle $\varphi=90^\circ$ a permis l'obtention d'un cliché de diffraction avec 3,0 Å comme limite de résolution (Figure 2.18). L'analyse de ce

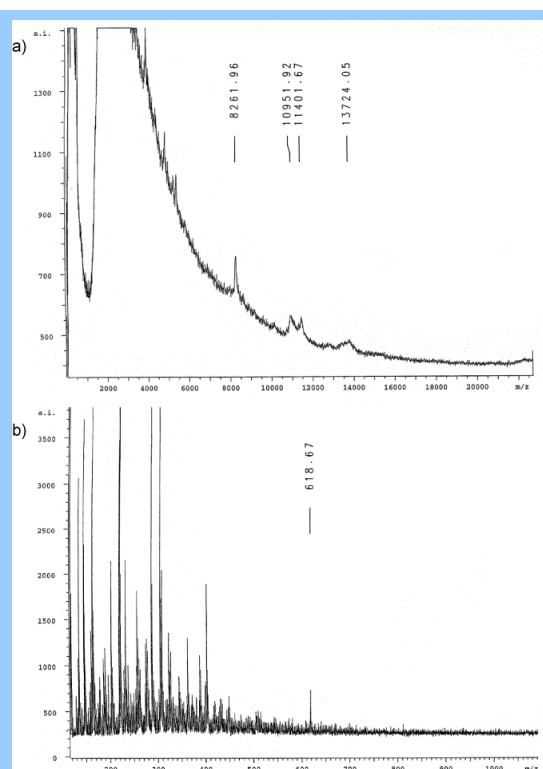


Figure 2.19 : Spectres MALDI-TOF effectués sur un cristal de complexe A3/paromomycine lavé puis dissous dans l'eau.

Du fait de la présence de peu de matériel et d'une importante proportion de sels, le rapport signal/bruit est faible. Certains pics observés correspondent au brin A3 liant deux molécules de paromomycine (PM=8262,5 g/mol), à la paromomycine toute seule (PM=615,6 g/mol), mais aucun pic n'est observé pour le complexe intact fragment A3/paromomycine (PM=15293,8 g/mol). Le calibrant utilisé est le cytochrome C.

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

4) Optimisation des conditions de cristallisation

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

(a) Diminution de la vitesse de croissance cristalline

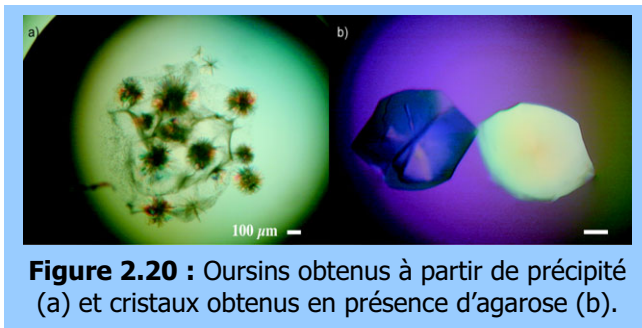


Figure 2.20 : Oursins obtenus à partir de précipité (a) et cristaux obtenus en présence d'agarose (b).

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

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

(b) Plan factoriel incomplet

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

Tableau 2.11 : Niveaux des facteurs sélectionnés pour le plan factoriel incomplet.

Niveaux / Facteurs	- α	-1	0	+1	+ α
[A3] (mM)	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
[MPD] (%)	1,5	2,5	3,5	4,5	6,0
[MPD rés.] (%)	20	30	40	50	60
[glycerol] (%)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
[NaCl] (mM)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25

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

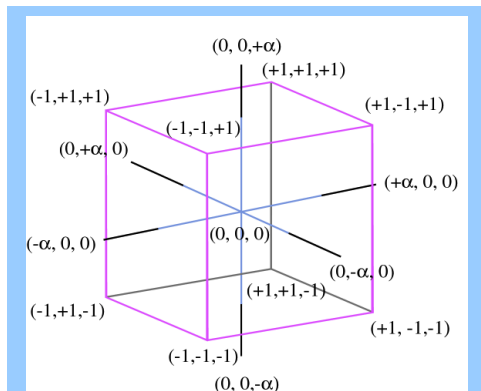


Figure 2.21 : Espace des conditions explorées par un plan incomplet centré, avec trois facteurs testés sur cinq niveaux (16 combinaisons).

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

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

(c) Plan simplex

Ces valeurs ont été utilisées comme point de départ d'optimisation par une autre approche, le plan simplex (Prater, *et al.* 1999), basée cette fois sur la variation de trois variables : les concentrations en MPD dans la solution de cristallisation et dans le réservoir, ainsi que le volume de la goutte. Ensuite, des combinaisons entre ces trois variables, équidistantes au point de départ C_0 , ont été définies. Dans le cas de 3 variables, l'espace des conditions couvert forme un tétraèdre (Figure 2.22) de sommets C_0 , C_1 , C_2 , C_3 . Une fois que les essais de cristallisation ont été effectués, on remplace la condition ayant donné le plus mauvais résultat (ici C_1) par la condition symétrique par rapport à l'hypersurface formée dans ce cas par les trois autres sommets du tétraèdre (C_4). Il s'agit alors de comparer aux autres le résultat donné par cette nouvelle condition, en éliminant à nouveau la plus mauvaise condition (C_3), en la remplaçant par son symétrique (C_5), et ainsi de suite. Il est possible de changer la taille de la variation dès que l'on s'approche d'un

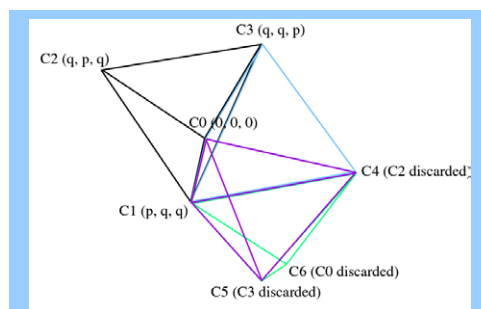
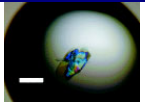
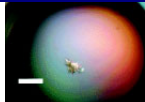
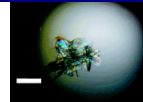
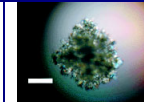
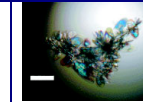
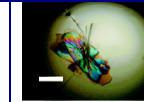
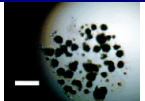
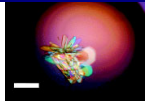
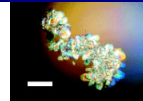
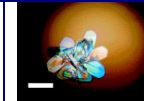
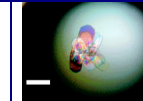
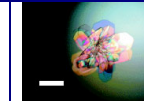


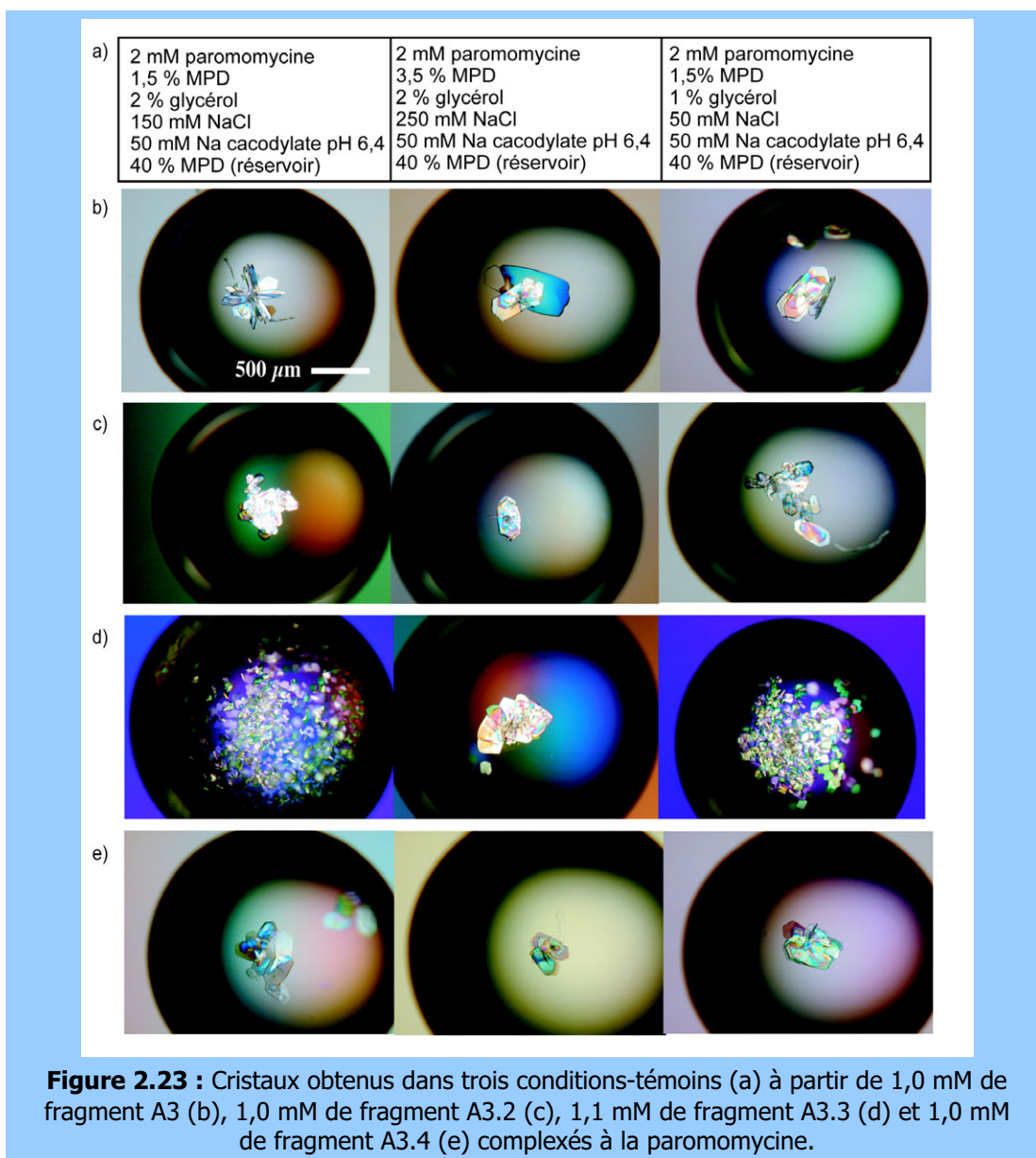
Figure 2.22 : Espace des conditions explorées par un plan simplex, avec quatre combinaisons testées au départ.

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

Tableau 2.12 : Matrice et résultats du plan simplex.

Les concentrations constantes dans la solution de cristallisation sont 50 mM Na cacodylate (pH=6,4)/150 mM NaCl/1% glycérol. Le trait blanc indique une longueur de 200 µm.

Combinaisons	C0 (0,0,0)	C1 (p,q,q)	C2 (q,p,q)	C3 (q,q,p)	C4→C0	C4→C1
[MPD](%)	1,5	0,56	1,26	1,26	0,56	2,13
[MPD rés.](%)	50,0	53,5	64,2	53,5	64,2	58,3
Volume (µl)	1+1	1,47+1,47	1,47+1,47	2,89+2,89	2,89+2,89	2,10+2,10
Résultat						
Score	+++	-	++	+	+	++++
Combinaisons	C4→C2	C5→C3	C6→C0	C6→C2	C6→C4	C6→C5
[MPD](%)	0,95	1,75	1,66	1,96	1,58	1,04
[MPD rés.](%)	40,6	57,6	65,0	49,3	55,9	52,4
Volume (µl)	2,10+2,10	0,79+0,79	1,12+1,12	0,93+0,93	0,66+0,66	1,47+1,47
Résultat						
Score	--	+++	+	+++	+++	+++



(d) Cristallisation de fragments de séquences différentes

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

Trois conditions donnant des plaquettes en présence de A3 (Figure 2.23a,b) ont été sélectionnées et appliquées à des concentrations de 1,0 et 1,1 mM de trois autres fragments différent du fragment A3 par leurs extrémités (fragments A3.2-A3.4 ; Figure 2.2). Des plaquettes de formes, de tailles, et d'agencements variés ont été obtenues en 3 jours (Figure 2.23c-e). Ces résultats ont montré que l'extrémité est importante pour la cristallisation, mais que sa nature ne joue pas particulièrement sur l'empilement cristallin. Des essais de cristallisation d'un fragment similaire au fragment A3 mais comportant une Br⁵C en position 2 de la séquence (fragment A3.5 ; Figure 2.2) ont été entrepris mais n'ont pas permis l'obtention de cristaux.

5) Expériences de micro- et macro-ensemencement

Des expériences d'ensemencement ont été effectuées avec le fragment A3. Des gouttes en état métastable (1,0 mM ARN/2,0 mM de paromomycine/3,5% MPD/2,0% glycérol/150 mM NaCl/5,0 mM MgSO₄/50 mM Na cacodylate pH 6,4) de volumes 1,0 µl+1,0 µl et 2,0 µl+2,0 µl ont été posées à 37°C contre des réservoirs contenant 500 µl de 30-40% MPD. Après équilibration pendant deux jours, une goutte a été ensemencée

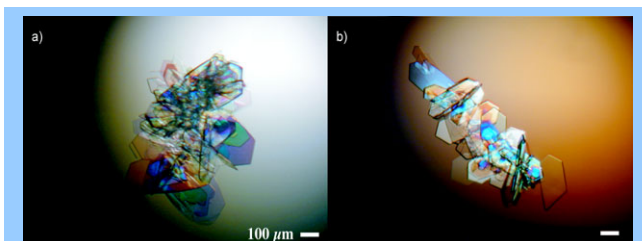
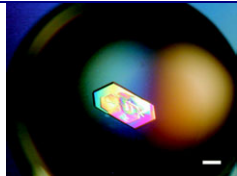
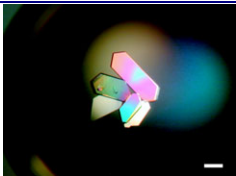
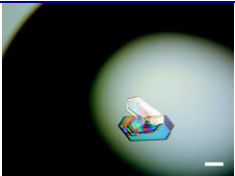
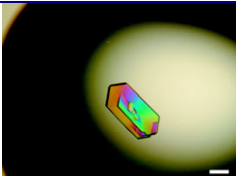


Figure 2.24 : Plaquettes obtenues par macro- (a) et micro-ensemencement (b).

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

Tableau 2.13 : Composition des quatre conditions-témoins.

Chaque goutte est formée de 1 μ l (solution de renaturation : 1,0 mM ARN/2,0 mM aminoglycoside/75 mM Na cacodylate (pH=6,4)/25 mM NaCl/10 mM MgSO₄) + 1 μ l (solution de cristallisation). Le trait blanc indique une longueur de 200 μ m.

	Condition n°1	Condition n°2	Condition n°3	Condition n°4
Solution de cristallisation	2 mM Par 1,5% MPD 2,0% Glycérol 150 mM NaCl 50 mM Na cacodylate (pH=6,4)	2 mM Par 2,5% MPD 2,0% Glycérol 250 mM NaCl 50 mM Na cacodylate (pH=6,4)	2 mM Par 1,5% MPD 1,5% Glycérol 150 mM KCl 50 mM Na cacodylate (pH=6,4)	2 mM Par 3,5% MPD 2,0% Glycérol 250 mM KCl 50 mM Na cacodylate (pH=6,4)
Réservoir	40% MPD	40% MPD	40% MPD	40% MPD
Résultat				

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

E. Cristallisation de différents complexes

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

1) Cristallisation de complexes contenant la tobramycine

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

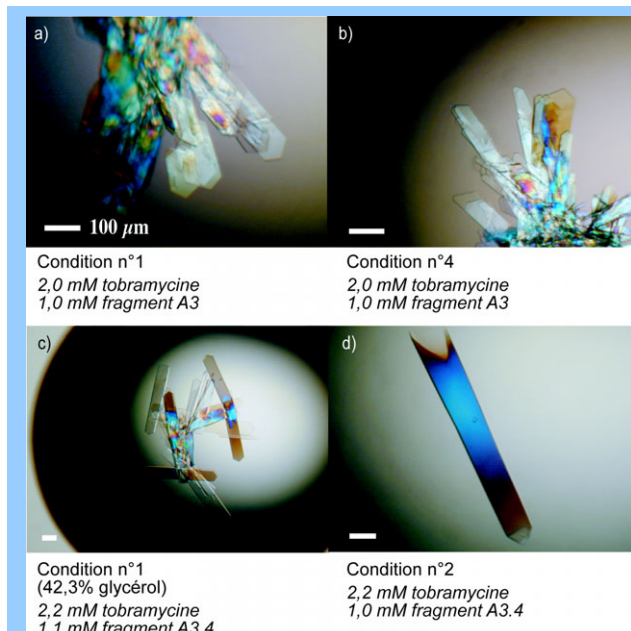
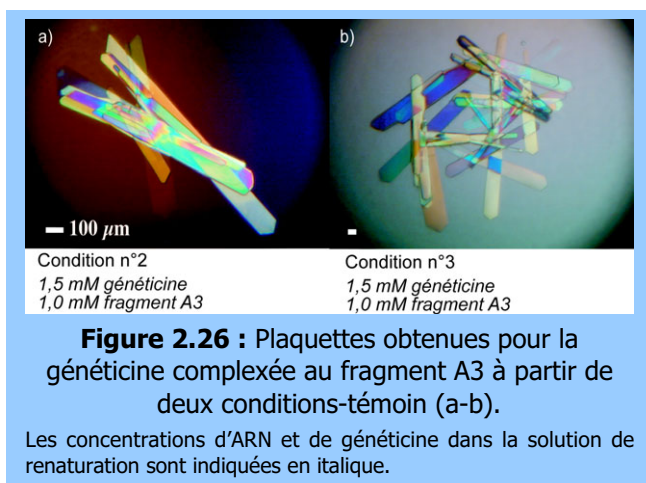


Figure 2.25 : Plaquettes obtenues pour la tobramycine complexée au fragment A3 à partir de deux conditions-témoin (a-b) et au fragment A3.4 à partir de conditions voisines (c-d).

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

quets en présence du fragment A3 et de tobramycine au lieu de paromomycine (Figure 2.25a-b). Des plaquettes de meilleure qualité sont obtenues en présence du fragment A3.4 et de tobramycine (Figure 2.25c-d). Un jeu de données complet a été enregistré fin février 2001 pour le complexe fragment A3.4/tobramycine. La résolution est de 2,55 Å.

2) Cristallisation de complexes contenant la généticine

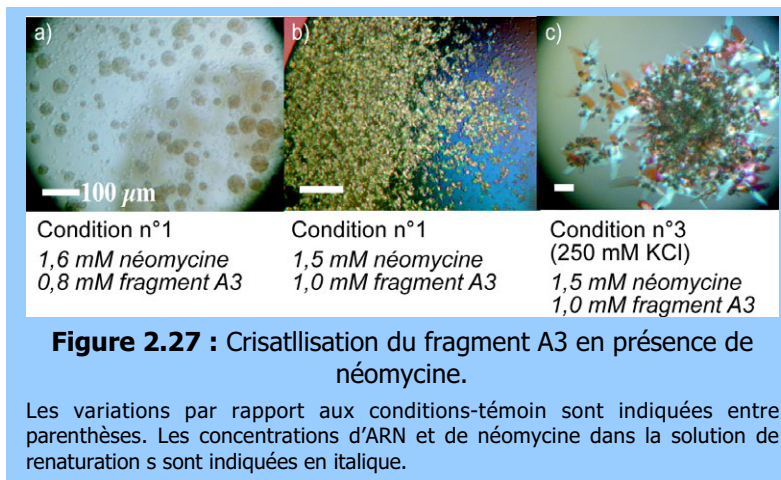


Des cristaux, se présentant toujours sous forme de plaquettes arrangées en bouquets, ont été obtenus pour des complexes formés entre le fragment A3 et la généticine (Figure 2.26). Deux enregistrements de jeux de données ont été effectués en novembre 2001 et mars 2002 pour ce complexe. La résolution est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

3) Cristallisation de complexes contenant différents aminoglycosides

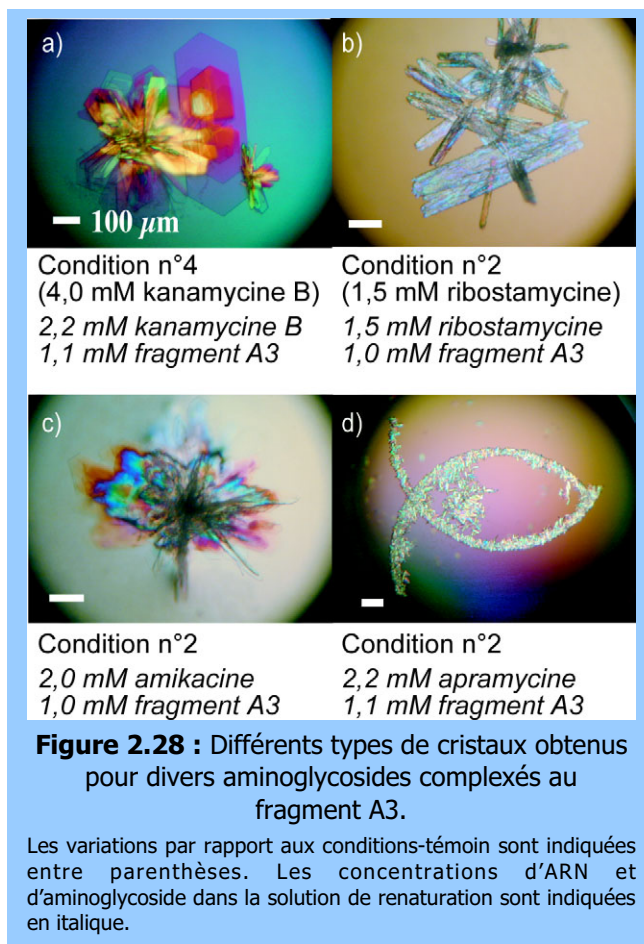
(a) Néomycine

Cet aminoglycoside a été utilisé dès les premières expériences de renaturation et de cristallisation en présence du fragment A3. Les précipités systématiquement observés dès l'ajout de l'antibiotique lors de la renaturation ne sont pas obtenus avec le protocole de renaturation adopté pour la paromomycine. Lors des essais de cristallisation, des précipités en forme de « boules brunes » ont été observés pour les conditions donnant des cristaux en forme de plaquettes avec la paromomycine (Figure 2.27a). Des tests de renaturation à différents pH (6,6-6,8), à des concentrations plus élevées en sels monovalents



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

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



(b) Divers 2-DOS aminoglycosides

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

(c) Hygromycine B

Cet aminoglycoside possède une structure différente des autres 2-DOS-aminoglycosides, ce qui lui confère la propriété de se lier différemment au site A (Chapitre 1). Les fragments B1 et B2 (Figure 2.2) ont été conçus sur le modèle du fragment A3 afin d'incorporer des nucléotides supplémentaires, nécessaires à l'interaction avec l'hygromycine B.

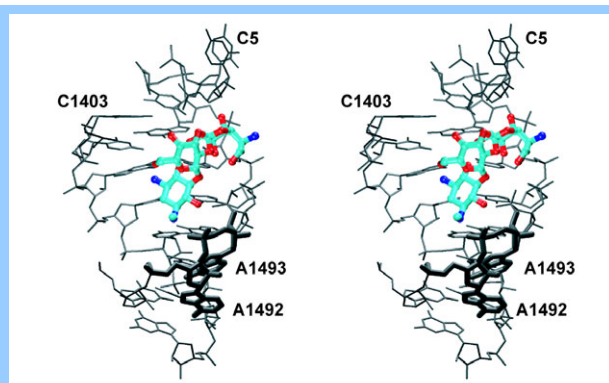


Figure 1.29 : Structure tridimensionnelle du site de fixation de l'hygromycine B dans la sous-unité 30S.

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

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

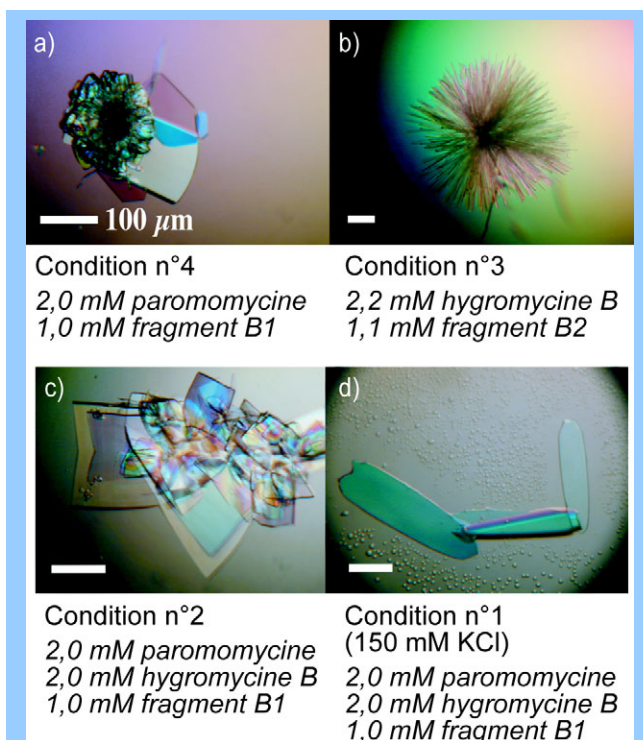


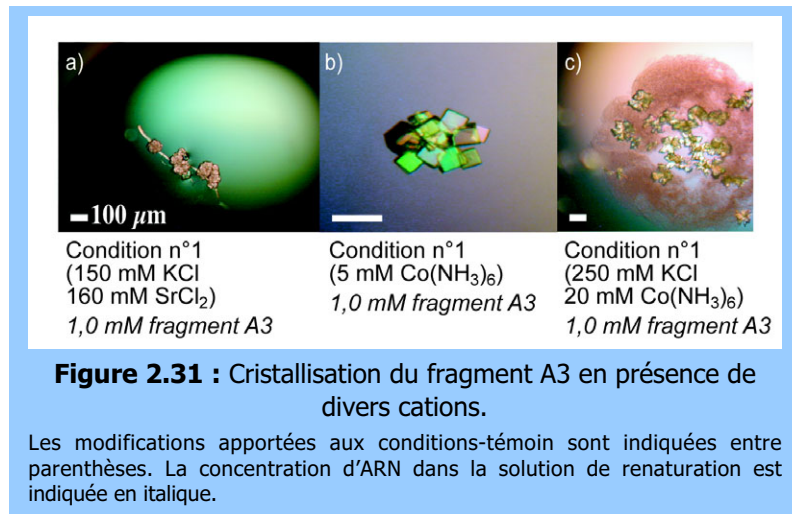
Figure 2.30 : Cristaux obtenus pour l'hygromycine B et/ou la paromomycine complexés aux fragments B1 et B2.

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

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

4) Cristallisation en présence de cations, sans inhibiteur

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



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

Des essais en présence de 25-100 mM MgSO₄ ne permettent pas l'obtention de cristaux. Des agrégats ont été obtenus pour des concentrations de 120-160 mM SrCl₂ (Figure 2.31a). Des précipités, des cristaux en forme d'étoiles et des plaquettes carrées non-reproductibles ont été obtenus pour le fragment A3 en absence d'inhibiteur, pour des concentrations de 5-20 mM [Co(NH₃)₆].3Cl (Figure 2.31b-c). Des essais de diffraction à l'ESRF ont indiqué une résolution de 6,0 Å. Une optimisation des conditions de cristallisation est poursuivie par Boris François au laboratoire (ajout de divers cations à différentes concentrations).

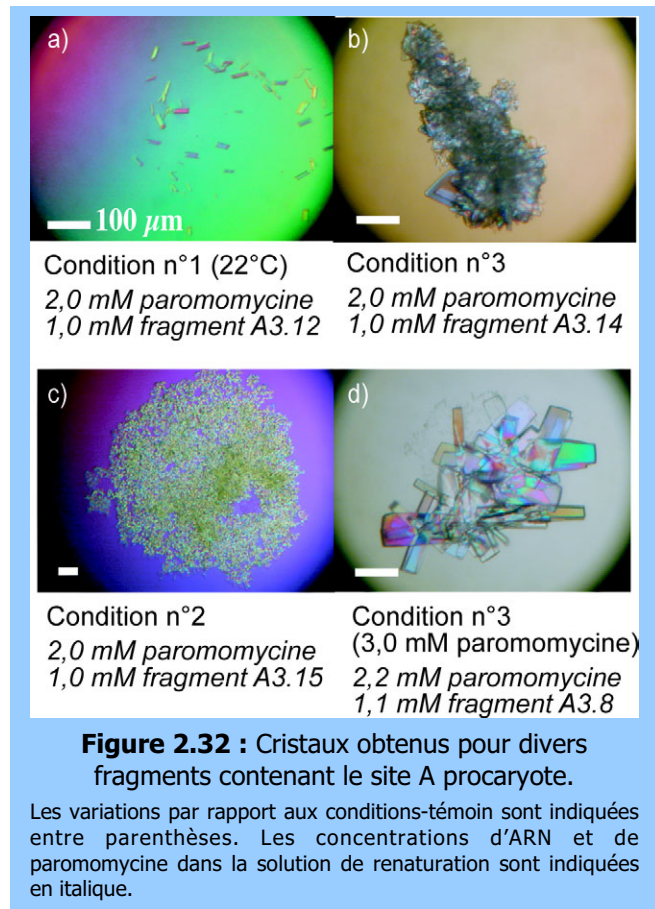
5) Cristallisation d'autres fragments

(a) Site A sauvage

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

(b) Fragments divers contenant le site A procaryote

Différents fragments d'ARN comprenant le site A ont été conçus en vue de plusieurs études structurales utilisant le système de cristallisation offert par le fragment A3 et la paromomycine. Le fragment A3.12 (Figure 2.2) a été construit afin d'incorporer des bases méthylées en position 2' du ribose. Cette modification permet une stabilisation de doubles hélices d'ARN (Auffinger et Westhof 2001). D'autre part, une structure cristallographique du complexe fragment A3.12/paromomycine permettrait une analyse comparative de l'organisation des molécules d'eau autour du fragment d'ARN contenant le site A. Des cristaux ont été obtenus à 20°C au bout de 3 jours, mais ils disparaissent rapidement (Figure 2.32a).



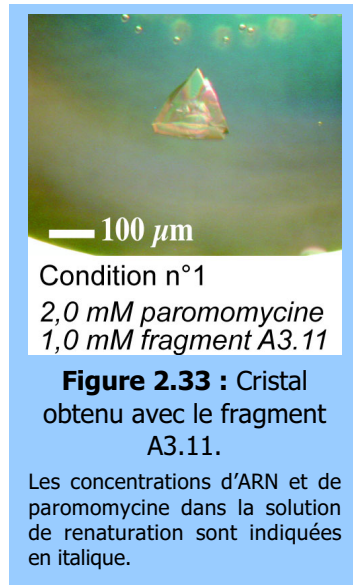
Dans chaque site A, les deux adénines en extrusion sont impliquées dans des interactions vers des paires G=C de molécules symétriques (Publication n°1). Nous avons conçu des fragments (A3.14 et A3.15) permettant d'observer la reconnaissance entre ces adénines et des paires de bases G•U. Des micro-cristaux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

Des fragments ont aussi été conçus afin d'augmenter le nombre de tours d'hélices entre les deux sites A, modifiant ainsi les orientations des paires d'adénines en saillie l'une par rapport à l'autre. Le fragment A3.8, contenant une paire de bases U•U supplémentaire entre les paires G=C centrales du fragment (Figure 2.2), conduit à l'obtention de plaquettes agencées en bouquet mais aussi de baguettes à section carrée (Figure 2.32d). Ces cristaux ont la même résolution que ceux obtenus avec le fragment A3 (2,50 Å). Dans certaines conditions, le fragment A3.8 cristallise alors que le fragment A3 ne cristallise pas. Le

fragment A3.8 est ainsi régulièrement utilisé pour tester la cristallisation d'autres antibiotiques, en parallèle au fragment A3. Un autre fragment (A3.17), comprenant cette fois deux paires G=C alternées au centre du fragment (Figure 2.2), a été conçu. Il se révèle prometteur pour la cristallisation en présence d'apramycine (travaux de Boris François).

(c) Site A eucaryote

Afin de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance moléculaire, il a semblé intéressant d'entreprendre des essais de cristallisation de chacun des sites A eucaryotes cytoplasmique et mitochondrial (sauvage et portant la mutation A1555G). Des essais de cristallisation ont été démarrés pour les fragments A3.10-A3.13 en présence de paromomycine et de tobramycine. Seules des séparations de phases ont été obtenues avec le fragment A3.10. Des essais sont en cours avec le fragment A3.16 (qui contient aussi le site A eucaryotique cytoplasmique mais possède des extrémités différentes). Des cristaux différant de plaquettes ont été obtenus pour des complexes entre le fragment A3.11 et la paromomycine (Figure 2.33). Les cristaux obtenus diffractent à une résolution de 3 Å mais sont poly-cristallins. Les premiers essais de cristallisation du fragment A3.13 ont conduit à l'obtention de séparation de phases et de sphérulites en présence de paromomycine.



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

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

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

² Les références citées dans la publication mais non mentionnées dans le corps de la thèse ne sont pas reprises en fin de manuscrit.

Crystal Structure of Paromomycin Docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A Site

Quentin Vicens¹ and Eric Westhof^{1,2}

¹Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
du CNRS

Modélisation et simulations des Acides Nucléiques,
UPR 9002

15 rue René Descartes
Strasbourg Cedex 67084
France

Summary

Background: Aminoglycoside antibiotics interfere with translation in both gram-positive and gram-negative bacteria by binding to the tRNA decoding A site of the 16S ribosomal RNA.

Results: Crystals of complexes between oligoribonucleotides incorporating the sequence of the ribosomal A site of *Escherichia coli* and the aminoglycoside paromomycin have been solved at 2.5 Å resolution. Each RNA fragment contains two A sites inserted between Watson-Crick pairs. The paromomycin molecules interact in an enlarged deep groove created by two bulging and one unpaired adenines. In both sites, hydroxyl and ammonium side chains of the antibiotic form 13 direct hydrogen bonds to bases and backbone atoms of the A site. In the best-defined site, 8 water molecules mediate 12 other hydrogen bonds between the RNA and the antibiotics. Ring I of paromomycin stacks over base G¹⁴⁹¹ and forms pseudo-Watson-Crick contacts with A¹⁴⁰⁸. Both the hydroxyl group and one ammonium group of ring II form direct and water-mediated hydrogen bonds to the U¹⁴⁹⁵oU¹⁴⁰⁶ pair. The bulging conformation of the two adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ is stabilized by hydrogen bonds between phosphate oxygens and atoms of rings I and II. The hydrophilic sites of the bulging A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ contact the shallow groove of G=C pairs in a symmetrical complex.

Conclusions: Water molecules participate in the binding specificity by exploiting the antibiotic hydration shell and the typical RNA water hydration patterns. The observed contacts rationalize the protection, mutation, and resistance data. The crystal packing mimics the intermolecular contacts induced by aminoglycoside binding in the ribosome.

Introduction

RNA molecules can adopt highly structured and intricate three-dimensional folds [1-4]. Some of these complex structural motifs constitute therapeutic targets [5, 6]. Among the different classes of compounds known to

bind to RNA, aminoglycosides (Figure 1) have attracted great attention since their discovery 50 years ago [7, 8]. They still constitute critical weapons in the continual fight against bacterial infections [9]. The ribosome is thought to be the primary target of aminoglycosides that have been shown to footprint to the aminoacyl decoding site (A site) of the ribosomal 16S RNA [10]. Most importantly, it has been shown that when the A site motif is inserted in different RNA fragments, the A site presents the same footprint in the presence of antibiotics as it does when it is within the full 16S rRNA [11-14]. In a recent series of NMR structures, Puglisi and coworkers identified key interactions in the binding of aminoglycosides to an *Escherichia coli* A site fragment model [15-18]. Very recently, a crystallographic structure of a complex between the bacterial ribosomal 30S subunit and an aminoglycoside has been obtained at 3.05 Å resolution [19]. Here, we report the detailed structure of an RNA fragment containing two minimal A sites complexed with two paromomycin molecules solved by X-ray crystallography at 2.5 Å resolution. The close contacts between the paromomycin functional groups and both the RNA and its hydration shell enlighten our understanding of the micromolar binding specificity of aminoglycosides to the prokaryotic A site.

Results and Discussion

Overall Description of the Complex

The structure of an 18 bp helix containing two minimal A sites (13 nucleotides) complexed with two paromomycin molecules was solved to 2.5 Å resolution (Table 1; Figure 2). The two A sites are separated by four G=C pairs. Paromomycin binding occurs in an enlarged deep groove consisting of four base pairs and two bulging adenines; this binding occurs without major distortion of the double helix (Figure 2b). The electron density for each antibiotic is well defined, but one of the two sites (site 1) is better ordered (Figure 3a). The other site (site 2) displays some lack of connectivity along the RNA backbone at 0.9 σ . The root-mean-square deviation (rmsd) between the two sites is 0.8 Å (Table 2). Crystal packing involves hydrogen bonds between the two bulging adenines and the shallow groove of two G=C pairs belonging to a neighboring molecule. The bulging adenines are not perfectly parallel but form a wedge (Figures 3a and 3b). The temperature B factors range from 21 to 95 Å² for the complex; the highest values (70–95 Å²) correspond to the terminal base pairs where the 5' cytosine is too disordered to be observed in the density map. Interestingly, the lowest thermal factors in the complex (21–40 Å²) are observed for rings I, II, and III of paromomycin and for the central G=C pairs. Here, for clarity, we will focus our description on site 1 using the *E. coli* numbering (see inset in Figure 2a).

²Correspondence: e.westhof@ibmc.u-strasbg.fr

Key words: aminoglycoside; crystal structure; ribosomal RNA

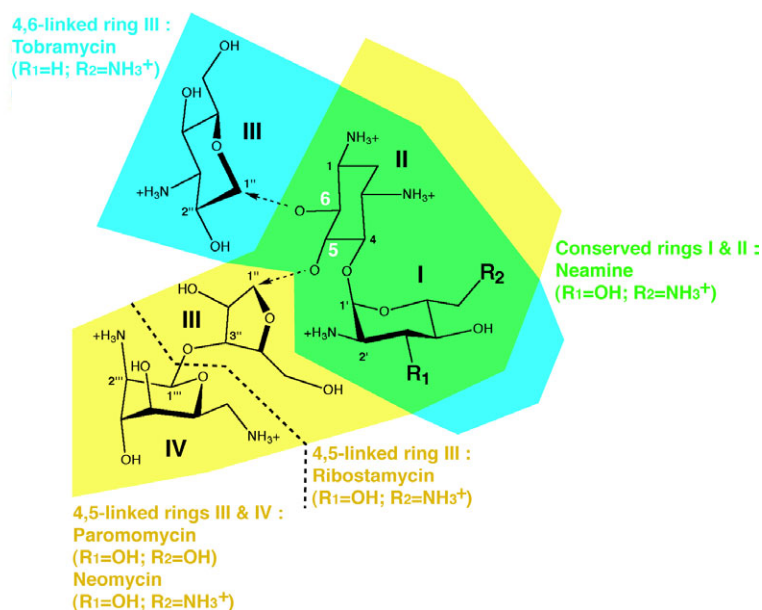
Structure
648

Figure 1. Chemical Structures of Antibiotics Belonging to the Aminoglycoside Family

The aminoglycosides contain the neamine core (green), a two-ring system comprising 2-deoxystreptamine (ring II) glycosylated at position 4 by a six-membered aminosugar (ring I) of the glycopyranoside series. Ribostamycin, neomycin B, and paromomycin result from addition of supplementary sugars at position 5 (yellow), while tobramycin results from addition of an aminosugar at position 6 (blue). The aminoglycosides are shown as polycationic antibiotics with (for paromomycin) the conformation observed in the present structure.

The Interactions between Paromomycin and the A Site

The antibiotic is anchored in the deep groove of the RNA by direct and water-bridged hydrogen bonds (Figures 3b and 4a). While exhibiting sometimes high propeller-twist values (2–3 times higher than for standard base pairs), every base pair except two UoU pairs is of the standard Watson-Crick type (Figures 4b–4f). The two adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ (which fully bulge out of the helix) and the UoU pairs are responsible for a slight bending of the double helical axis (Figure 3). Despite its nonplanarity, ring I of paromomycin stacks upon the following G¹⁴⁹¹ (Figure 4f) and is contacted by A¹⁴⁰⁸ via its Watson-Crick edge (Figure 4e). Furthermore, ring I donates two intramolecular hydrogen bonds to hydroxyl groups O4¹¹ and O5¹¹ of ring III (Table 2; Figure 4a); these bonds probably help to maintain the conformation of the paromomycin

molecule within the A site. Rings I and II interact with the sugars and the phosphates of the two bulging adenines by making both direct (three contacts involving O3', O4', and N3) and water-mediated hydrogen bonds (three contacts involving N2' and O6') (Table 2; Figures 3 and 4a).

Ring II interacts with the deep-groove hydration shell of the G¹⁴⁰⁵=C¹⁴⁹⁶ pair located in the upper part of the A site (Figure 4b). One of the most interesting contacts occurs with the hydroxyl group O6 of paromomycin: it forms a single hydrogen bond to a water molecule that is itself bound to the O4 atoms of the U¹⁴⁹⁵oU¹⁴⁰⁶ pair and to the O6 atom of G¹⁴⁰⁵ (Figure 4c). In the U¹⁴⁹⁵oU¹⁴⁰⁶ pair, the uracils are shifted from a symmetrical to a bifurcated pair with the glycosidic bond of U¹⁴⁰⁶ at 90° from that of U¹⁴⁹⁵ (Figure 4c). A similar pair has been observed at positions 32–38 in *E. coli* tRNA^{Gln} complexed

Table 1. Data Collection and Structure Determination

Crystallographic Data	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell parameters (Å)	a = 33.0, b = 45.9, c = 95.3
Wavelength (Å)	0.934
Resolution range used for refinement (Å) ^a	10–2.5 (2.59–2.50)
Number of unique reflections used in refinement	5,278
Redundancy	9.7
Average I/σ ^a	24.4 (6.4)
Completeness (%) ^a	95.0 (97.4)
R _{sym} (%) ^{a,b}	5.5 (23.0)
Rmsd for bonds (Å)	0.011
Rmsd for angles (°)	1.6
Average B factor (Å ²)	52.7
R factor (%) ^c	20.6
R _{free} (%) ^d	24.7

^a Values for last shell are given between parentheses.

^b $R_{sym} = \frac{\sum ||I - \langle I \rangle|}{\sum \langle I \rangle}$, where I is the measured intensity of each reflection and $\langle I \rangle$ is the intensity averaged from multiple observations of symmetry-related reflections.

^c R factor = $\frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$

^d R factor calculated using 7.5% of the reflections omitted from the refinement.

Complex between Paromomycin and Bacterial A Site
649

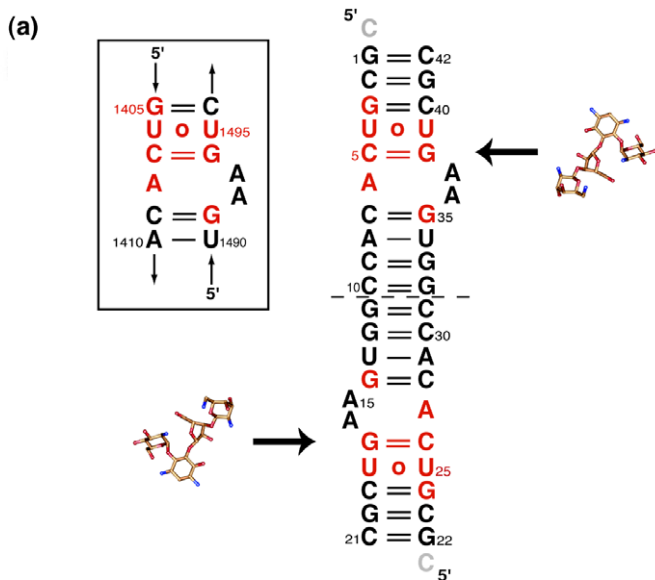
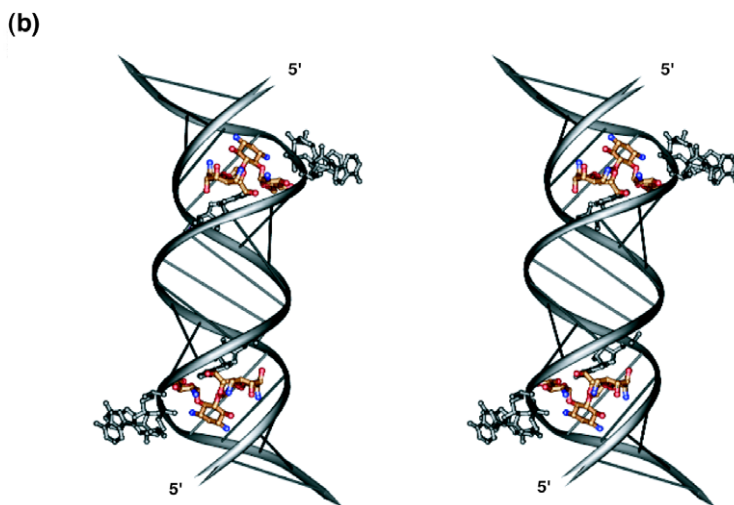


Figure 2. Overall View of the Crystallized Complex

(a) Secondary structure of the duplex. Base pairs are symbolized with "=" (3 hydrogen bonds) or "-" (2 hydrogen bonds) for Watson-Crick pairs and "o" for non-Watson-Crick pairs. The dashed line separates the two similar A site models (sites 1 and 2). Interacting paromomycin molecules that adopted the conformation observed in the crystal are drawn as ball-and-sticks colored by atom types. Nucleotides in red are contacted directly by the paromomycin molecules. The unobserved cytosine on the 5' end is shaded. The inset on the left gives the corresponding *E. coli* numbering for the common A site elements (13 nucleotides).

(b) Ribbon stereo view showing the three-dimensional structure of the duplex. The two complexed paromomycin, the four bulging adenines (15, 16, 36, and 37), and the two adenines (6 and 27) contacting ring I of the two paromomycin molecules are drawn as ball-and-sticks. This and other figures (2b and 3-7) were prepared with Drawna [60].



to its cognate synthetase [20] and in the structure of the spliceosomal U2B'-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 RNA [21]. In the latter structure, the ammonium group of a lysine side chain replaces the water molecule observed in the deep groove of the U¹⁴⁹⁵oU¹⁴⁹⁶ pair. The pairing is akin to the bifurcated GoU pair [22, 23] observed in the bacterial loop E structure [24], where a water molecule links the N3 of the U to the substituent at position 2 (N2 in the GoU pair and O2 in the UoU pair).

Besides the intramolecular interaction with ring I, ring III bridges the two RNA strands together: O2'' accepts one hydrogen bond from N4 of C¹⁴⁰⁷ (Figure 4d), and O5''' points its hydrogen atom to N7 of G¹⁴⁹¹ (Figure 4f). Ring IV constitutes the less-ordered part of the antibiotic but contributes to the overall binding of the other rings by making hydrogen bonds to the phosphate oxygen atoms of G¹⁴⁰⁵ (Table 2; Figures 3b and 4a). Neither the ammonium N6''' nor the bridging oxygen atom between the cycles are observed to form any hydrogen bonds.

All the direct contacts responsible for the paromomycin binding to the site 1 are also observed in site 2 of the crystallized complex (Table 2; Figure 4a). Furthermore, the water molecule linking the hydroxyl O6 of ring II to the UoU pair is observed in both sites. In summary, paromomycin contains five ammonium groups, among which only the ammonium N3 on ring II is fully dehydrated. The ammonium N3 is indeed protonated despite its lower pK_a (pK_a = 5.7; see [25]): it gives two hydrogen bonds to two anionic phosphate oxygens (O1P of A¹⁴⁹³ and O2P of G¹⁴⁹⁴) and one hydrogen bond to the N7 of G¹⁴⁹⁴ (Figure 4d). The ammonium N2', which forms the intramolecular contact between rings I and III, still has one water molecule in its coordination shell. The ammonium N1 on ring II, in contact with the UoU pair, is coordinated to two water molecules (Figure 4a). The two ammonium groups of ring IV are strongly hydrated since only N2''' forms a single direct contact to an anionic phosphate oxygen atom (and to a water molecule in site 2; Table 2). As previously suggested [26, 27], the partial

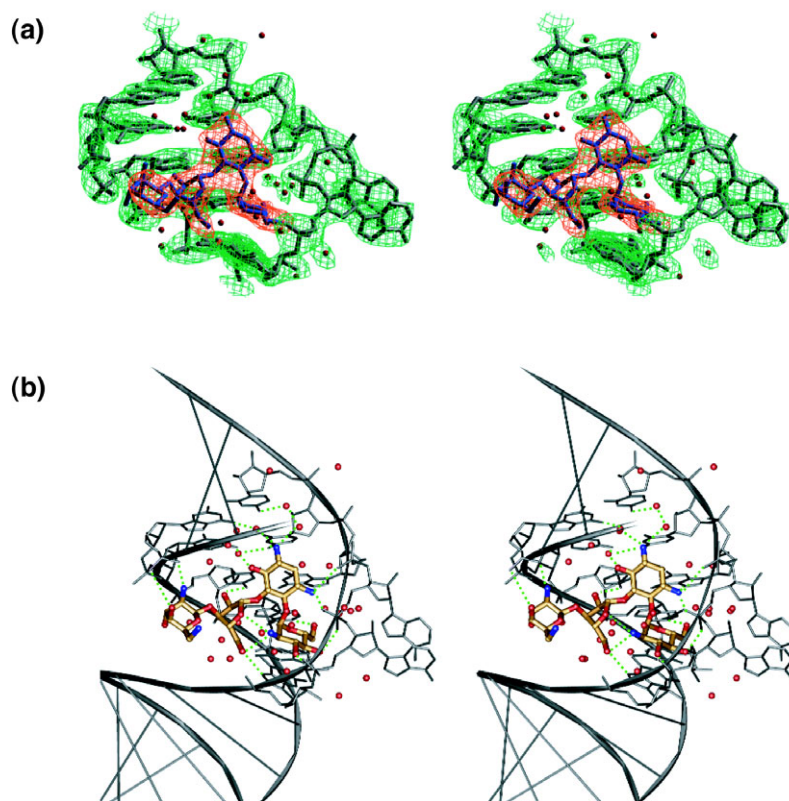
Structure
650

Figure 3. Detailed View of the A Site

(a) Stereo view of the electron density map around the A site (site 1). σ_A -weighted $3F_o - 2F_c$ maps contoured at 1.4σ are colored green for the RNA chains and the water molecules and orange for the paromomycin. Atoms of the RNA chains are shown in gray, water oxygen atoms are in red, and paromomycin atoms are in blue. This figure was made using Setor [61].

(b) Same view as in (a) but with color code as in Figure 1b. All the atoms of the A site are depicted as ball-and-sticks, with water oxygens in red. The green dashed lines indicate some of the direct and water-mediated contacts between the antibiotic and the RNA.

negative charges on the carbonyl oxygen atoms of the UoU pair, the guanines, and the phosphate oxygens enable complementary electrostatic contacts with at least three of the five ammonium groups of the paromomycin molecule.

Roles of the Water Molecules in the Recognition Process

Fifty-four water molecules are observed in the present structure. This number corresponds roughly to the average number of molecules observed at this resolution around an RNA duplex (140 in a 46 nucleotide duplex at 2.3 Å resolution [28], 50 in a 24 nucleotide duplex at 2.6 Å resolution [29], and 16 in a 32 nucleotide duplex at 2.5 Å resolution [30]). A careful examination of the density maps reveals that 46 of them are observed at a contour above 0.6σ (38 are still clearly observed at 1.0σ). Only about 8 water molecules are observed above 0.35σ , mostly around site 2 where the density is not so well defined.

In the best defined site (site 1), we clearly see 8 water molecules mediating 12 contacts between the hydrophilic groups of the paromomycin and the A site (Table 2; Figure 4a). Four of these contacts link paromomycin to phosphate oxygens on the bulged-adenine side, and five other contacts interact with the opposite strand via atoms at positions 6 and 7 of the purines (Table 2). Two water-mediated contacts occur in both sites; one links ring II to the UoU pair, and one connects ring III to the Hoogsteen side of A^{1408} . In addition, three intraparomomycin contacts are mediated by water molecules. Some of these water molecules are common to the hydration shell of the RNA. For example, the water molecules

bound to the Hoogsteen sites of G^{1405} (Figure 4b) are commonly seen around G residues [31]. Similarly, the water molecules bound to the shallow groove side of the UoU pair and of G^{1494} (Figures 4c and 4d) have been previously observed [20, 31]. Interestingly, the number of water molecules at the interface between the paromomycin and the RNA is within the range of the average number of water molecules (12) observed at the interface of RNA-protein complexes [32]. It is stressed recurrently that water is an integral part of nucleic acid structure [33]. The present structure contributes further to the notion that water is also an integral part of RNA-antibiotic interactions, and that water structure and dynamics should be considered in drug design.

Comparisons with Previous NMR and X-Ray Structures

The structure of the A site of the 30S particle in the presence of the antibiotic [19] is similar to the two sites of the present structure (rmsd below 1 Å; Table 3; Figures 5a and 5b). However, the rmsd of the X-ray structures with the NMR structure of the complex [15] are above 2.5 Å, i.e., of the same order of magnitude as those between the X-ray structures with and without antibiotic [19, 34]. The bulging adenines are observed to adopt different wedged conformations. Thus, the rmsd calculated for the bulged adenines between the two sites is approximately 2.0 Å, while that between each of the sites and the 30S particle in the presence of antibiotic is either close to 0.8 Å or close to 2 Å (Table 3). Furthermore, the rmsd between the X-ray structure of the 30S particle with IF1 [35] and the X-ray structures in the presence of the antibiotic are close to 3.8 Å. Finally, the

Complex between Paromomycin and Bacterial A Site
651

Table 2. List of the Direct and the Water Contacts between the Paromomycin and the A Site

Direct Contacts		Site 1 (Present Structure)	Site 2 (Present Structure)	30S X-Ray Structure [19]	NMR Structure [15]
X	d1.....Y ^a	d1	d1	d1	d1
N2'O4''	3.21	3.25	2.63	2.75
N2'O5''	3.12	3.33	2.92	3.94
O3'O2P(A ¹⁴⁹²)	2.90	3.13	3.10	3.18
O4'O2P(A ¹⁴⁹³)	2.54	2.84	2.54	3.80
O5'N6(A ¹⁴⁰⁹)	3.16	3.22	3.29	—
O6'N1(A ¹⁴⁰⁸)	2.53	2.57	2.69	—
N1O4(U ¹⁴⁹⁵)	2.82	2.72	2.74	3.05
N3O1P(A ¹⁴⁹³)	3.13	3.17	2.95	—
N3N7(G ¹⁴⁹⁴)	2.78	2.51	3.01	3.44
N3O2P(G ¹⁴⁹⁴)	3.12	3.17	2.64	—
C4O6(G ¹⁴⁹⁴)	3.28	3.16	3.72	—
O2''N4(C ¹⁴⁰⁷)	2.73	3.07	2.96	—
O5''N7(G ¹⁴⁹¹)	2.71	2.74	2.41	3.20
N2'''O2P(G ¹⁴⁰⁵)	2.96	3.18	—	—
O4'''O1P(G ¹⁴⁰⁵)	3.77	3.59	3.46	—
Water Bridges		Site 1 (Present Structure)		Site 2 (Present Structure)	
X	d1.....W.....d2.....Y ^a	d1	d2	d1	d2
N2'W44.....O2P(A ¹⁴⁹²)	3.47	2.57	—	—
W44.....O2P(G ¹⁴⁹¹)	—	3.24	—	—
W44.....W52	—	3.29	—	—
N2'W14.....O1P(A ¹⁴⁹³)	3.27	2.89	—	—
W14.....W26	—	3.20	—	—
O3'W44	3.51	—	—	—
O6'W32.....O2P(A ¹⁴⁹³)	2.77	3.05	—	—
W32.....W28	—	2.92	—	—
N1W13.....O6(G ¹⁴⁰⁵)	2.82	2.75	—	—
N1W20.....W12	2.68	2.71	—	—
O6W8(W54).....O4(U ¹⁴⁰⁸)	2.62	2.59	2.62	2.41
W8(W54).....O4(U ¹⁴⁹⁵)	—	2.98	—	3.17
(W54.....W7)	—	—	—	3.22
O6W13.....O6(G ¹⁴⁰⁵)	3.53	2.75	—	—
W13.....W19	—	2.87	—	—
O6W19.....O6(G ¹⁴⁰⁷)	3.21	3.19	—	—
W19.....N7(G ¹⁴⁰⁷)	—	2.81	—	—
W19.....W13	—	2.87	—	—
C2''W9(W2).....N6(A ¹⁴⁰⁹)	3.26	2.56	3.34	3.48
W9(W2).....N7(A ¹⁴⁰⁸)	—	3.08	—	3.29
W9(W2).....W51	—	2.73	—	—
O2''(W7.....N2''')	—	—	3.14	3.37
O3'''W15.....W47	3.49	3.78	—	—

^a X stands for a paromomycin atom and Y for a paromomycin atom, an RNA atom, or a water molecule. The bridging water molecule is represented by W. The water molecules observed in site 2 are indicated between parentheses.

List of the contacts within a distance of 2.5–4 Å observed between the paromomycin and the A site in the different NMR [15] and crystallographic structures (present work, [19]). Distances are given in Å when a hydrogen bond is observed. A dash means the contact does not occur.

effect of antibiotic binding leads to structures with rmsd beyond 6 Å compared to the X-ray structure without antibiotic.

The NMR study [15] correctly identified most of the contacts (Table 2). The contacts involving two ammonium groups of ring II as well as the intramolecular hydrogen bond between the ammonium N2' of ring I and the oxygen atom O4'' of ring III were already observed. These contacts as well as additional contacts involving hydroxyl groups are also partially seen in the X-ray studies [19]. However, nine of the direct contacts observed by NMR between rings I and II and the RNA are not observed in the present structure. These differences stem from the very different conformations adopted by A¹⁴⁹², A¹⁴⁹³, and ring IV in the NMR and X-ray structures.

This is apparent from the rmsd calculated on the antibiotics alone in the molecules superposed with only the base pairs of the site (without the adenines); the rmsd are beyond 3.0 Å (Table 2).

In addition to the absence of water molecules, none of the previous NMR or X-ray structures mentioned the direct interactions between ring I and A¹⁴⁰⁸. These key interactions are nevertheless responsible for the greater part of the aminoglycoside specificity toward the prokaryotic A site (see discussion in the next section).

Comparisons with the Probing and Resistance Data

Chemical probing experiments on complete ribosomal RNA and on A site models have shown that atoms

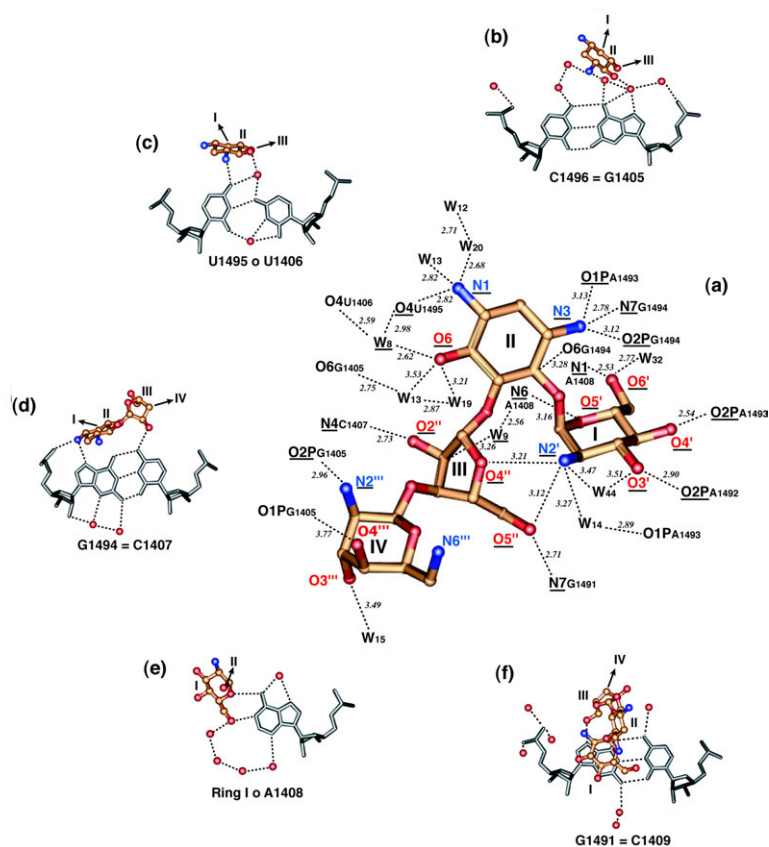
Structure
652

Figure 4. Description and Analysis of the Contacts between Paromomycin and the RNA Fragment

(a) Structure adopted by the paromomycin molecule inside the A site of the duplex (site 1). Colors correspond to atom types as in Figure 1a. Ring numbers (I–IV), oxygen (red), and nitrogen (blue) names are specified. The RNA atoms involved in these contacts are indicated with the *E. coli* numbering. “W” stands for the oxygen of a water molecule. Hydrogen bonds are represented by dashed lines and accompanied by each corresponding distance in italic. The underlined atoms represent the contacts that were also observed in site 2.

(b–f) Atomic details around each base pair in interaction with the paromomycin within the A site (nomenclature as in Figure 1a; colors as in Figure 2b) as viewed down the helical axis. Hydrogen bonds are represented by black dashed lines. The *E. coli* numbering and the ring numbers are also indicated. Arrows point to the atoms connected to the other parts of the antibiotic. Each base pair is observed to be globally orthogonal to the ring interacting with it except for A¹⁴⁰⁸, which is parallel to ring I.

N7(G¹⁴⁰⁵), N1 and N7(A¹⁴⁰⁸), N7(G¹⁴⁹¹), N7(G¹⁴⁹⁴), N1, and the phosphate oxygens of A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ are protected from chemical attack upon the binding of paromomycin and similar aminoglycosides [10, 11, 13]. Indeed, in the crystal structure, N1(A¹⁴⁰⁸) and N7(G¹⁴⁹⁴) as well as the phosphate oxygens of A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ form direct hydrogen bonds with the invariant neamine part of the aminoglycoside (rings I and II). The binding of hydroxyl O5' to N7(G¹⁴⁹¹) explains the better affinity and specificity exhibited by the three- and four-ring aminoglycosides of the paromomycin subclass toward the A site [17]. The contact with ring I is particularly interesting since in neomycin, gentamicin, and kanamycin the hydroxyl O6' of paromomycin is replaced by an ammonium group still able to form the same hydrogen bond to A¹⁴⁰⁸. The ammonium groups in ring II that bind to N7(G¹⁴⁹⁴) and O4(U¹⁴⁹⁵) are invariant in this whole family of 4,5- and 4,6-linked aminoglycosides (Figure 1), thus explaining the loss of tight binding that occurs when one of these bases is mutated. Besides, at the level of the bifurcated UoU pair, only the mutation U1495A, which therefore involves the residue in direct contact with the antibiotic, results in loss of tight binding [13]. A strong interference induced by methylation at N1 of A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³, reported recently to disrupt paromomycin binding [14], cannot be explained by the present structure. Methylation introduces a positive charge on the adenines that could reduce electrostatic binding and/or change the conformation of the naked RNA so that binding propensity is disfavored.

The higher resolution structure presented in this paper enables an understanding of the role of A¹⁴⁰⁸ as a determinant for the binding specificity of antibiotics containing an aminosugar as ring I. For example, an A1408G mutation (as in eukaryotic rRNA) would deprive ring I of a specific and strong anchoring point by preventing the formation of the pseudo-*trans* Watson-Crick pair between ring I and residue 1408, thus accounting for the lower activity of paromomycin on such mutants [36]. Methylation at N1 of A¹⁴⁰⁸ confers strong resistance to ribostamycin, neamine, and kanamycin but a weak resistance to neomycin and paromomycin [37]. The first three compounds are shorter and thus would almost exclusively rely on the direct contacts with A¹⁴⁰⁸ for binding, while the highly derivatized aminoglycosides could display some alternative and weaker binding modes.

The naturally occurring 5-methylation of C¹⁴⁰⁷ does not introduce any change in the aminoglycoside binding mode [10, 38]. Indeed, a methyl group at that position would occupy a pocket not involved in close interactions between the RNA and the antibiotic (Figure 4d). Superimposition of rings I and II present in both the 4,5-linked (neomycin, paromomycin) and 4,6-linked (tobramycin, gentamicin, kanamycin) aminoglycosides shows that similar interactions can form between rings I and II and the RNA. However, the difference in the linkage makes the third ring interact directly with N7 of G¹⁴⁰⁵ through the ammonium N3' (Figure 6). This could explain the origin of the resistance only to 4,6-linked aminoglycosides exhibited by bacteria possessing a methyl at posi-

Complex between Paromomycin and Bacterial A Site
653

Table 3. Root-Mean-Square Deviations (Rmsd) Calculated between A Site Models

	30S X-Ray Structure without Antibiotic [34]	30S X-Ray Structure with Paromomycin [19]	30S X-Ray Structure with IF1 Factor [35]	NMR Structure [15]	Site 1 (Present Work)	Site 2 (Present Work)
30S X-ray structure without antibiotic [34]		2.6	2.8	1.4	2.3	2.7
		—	—	—	—	—
30S X-ray structure with paromomycin [19]	0.6		1.9	2.7	0.9	0.7
	6.4		—	2.8	1.0	0.8
	—					
30S X-ray structure with IF1 factor [35]	1.0	1.1		3.0	2.0	2.0
	6.8	3.8		—	—	—
	—	—				
NMR structure [15]	1.2	1.1	1.8		2.2	2.6
	1.8	6.5	6.8		2.4	2.7
	—	3.1	—			
Site 1	1.0	0.8	1.5	1.0		0.8
	5.4	2.0	3.7	5.2		0.8
	—	1.1	—	3.2		
Site 2	0.9	0.7	1.4	1.0	0.4	
	6.4	0.8	3.8	6.4	2.0	
	—	1.3	—	3.2	0.4	

Root-mean-square deviations (rmsd) calculated (in Å) between A site models of the available crystallographic and NMR structures, and the two sites present in this structure (using residues 1405–1409 on the 5' side and residues 1491–1496 on the 3' side, with or without the paromomycin molecule). A dash means the rmsd has not been calculated. All the rmsd are calculated using the software Lsqman [59].

Upper triangle of the table: rmsd after superimposition using every atom of all the residues either without antibiotic (first line) or with antibiotic (second line, in bold).

Lower triangle of the table: rmsd after superimposition of the sugar and phosphate atoms of all the residues except adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ (first line). The rmsd between the two adenines (second line, in bold) and the rmsd between paromomycin residues (third line, in bold italic) are calculated in that superimposition framework.

tion N7 of G¹⁴⁰⁵ [37]. It is noteworthy that methylation on N7 introduces a positive charge that creates an additional repulsion with the ammonium group N3".

Bacteria have developed another strategy to resist to aminoglycosides: enzymes specifically inactivate functional groups on the aminoglycosides. It appears that the so-modified functional groups are indeed all responsible for direct contacts with the RNA. Enzymes such as

acetyl- and phosphotransferases inactivate ammonium N1, N3, N2', N6', and hydroxyl 3' and 5" of the ribostamycin part [39], each time depriving the antibiotic of a direct contact with the targeted A site.

A Particular Motif Involved in Packing Interactions

Packing interactions involve two modes of intermolecular contacts. Duplexes are stacked head-to-tail with a

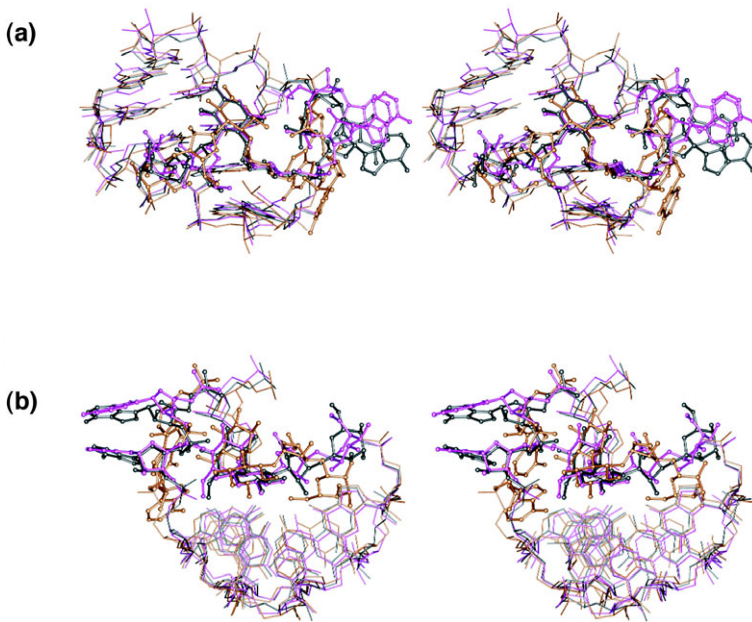


Figure 5. Superimposition of the Different Structures Containing the Paromomycin Docked into the A Site.

(a) View of the A site as in Figure 3. Superimposition of the X-ray structure of the 30S particle (magenta) and of the NMR structure (gold) complexed to paromomycin over site 1 of the present structure (gray). The superimposition has been calculated using the software Lsqman [59] only with consideration of the sugar and phosphate atoms of all the residues (1405–1409 on the 5' side and 1491–1496 on the 3' side) except adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³.

(b) View down the helical axis with the same color code.

The corresponding rmsd are given in Table 3 (lower triangle).

Structure
654

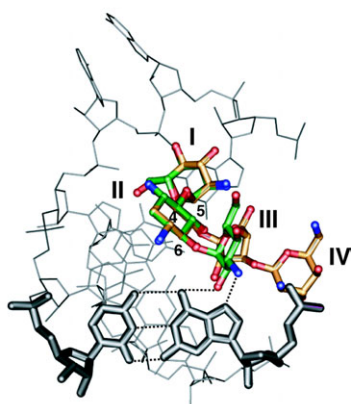


Figure 6. Superimposition of Tobramycin Modeled on Paromomycin in the A Site

View toward the A site (site 1) along the helical axis following the color code of Figure 1b. The base pair C¹⁴⁹⁶–G¹⁴⁹⁵ is shown in front with thicker sticks. Rings I and II of tobramycin (with carbon atoms in green) are superposed over rings I and II of paromomycin. The tobramycin coordinates were obtained from [62].

large pseudotwist angle (88°), and the bulged adenines of each site make similar but not identical contacts with symmetry-related molecules (Figure 7a). The bulging adenines of sites 1 and 2 bind to the shallow groove of two stacked G=C pairs belonging to symmetry-related molecules (Figure 7b). Each set of bulged adenines forms a recurrent recognition motif [40, 41], i.e., the tandem type II/type I interactions. This motif was first predicted [42] and then observed in the hammerhead ribozyme [43] and, in several occurrences, in the recent structures of the ribosomal 50S and 30S particles [4, 19]. The two adenines of site 1 (A³⁶ and A³⁷) form a set of tandem type II/type I interactions with the G³²=C¹⁰ and G³³=C⁹ pairs of a symmetry-related molecule (Figure 7c). The two adenines of site 2 (A¹⁵ and A¹⁶) form equivalent consecutive type II/type I interactions with the G¹¹=C³¹ and G¹²=C³⁰ pairs of another symmetry-related molecule (Figure 7d). However, while A³⁶ and A³⁷ are almost parallel to the two G=C pairs they contact, A¹⁵ and A¹⁶ approach their facing G=C pairs with an angle close to 45° (Figure 7d). A necklace of water molecules helps the accommodation of the longer distances between the corresponding hydrogen bond partners of A¹⁶ and G¹²=C³⁰ in site 2. The base C⁴⁰ of a third symmetry-related molecule contacts a Hoogsteen site of A³⁶ (Figure 7c), while the corresponding C⁴⁰ of a fourth symmetry-related molecule is too far away to interact with A¹⁵ in site 2 (Figure 7d). Crystal packing is based almost exclusively on the interactions formed by the bulging adenines which may thus constitute the driving force for crystallization and explain why no crystals could be obtained in the absence of paromomycin.

A Model for the Role of the Bulging Adenines in the Decoding Mechanism

The binding of an aminoglycoside molecule to the decoding A site increases the misincorporation of near-cognate amino acids during translation [44]. In the presence of tRNA and mRNA, the N1 sites of the bulging

adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ are protected from DMS-induced methylation [10, 45]. These observations with others [14, 19, 46, 47] have led to the suggestion that those adenines are involved in the decoding mechanism via their hydrophilic base and sugar atoms. Thus, the two adenines have been implicated in the interaction with the 2' hydroxyls of the mRNA [47], and it has been further shown that a conformational switch similar to that provoked by cognate tRNA selection [48] occurs upon antibiotic binding. Carter and coworkers [19] were the first to propose that the two adenines flip out in order to contact both the tRNA and the mRNA via hydrogen bonds involving the N1 atoms of the adenines and the functional groups present in the shallow groove of the codon-anticodon helix.

The present X-ray structure shows how paromomycin promotes and stabilizes the bulging of the two adenines (Figure 7). The bulging out of A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ forces the phosphate oxygens of residues 1492–1494 to turn inside the pocket to make four direct hydrogen bonds toward rings I and II of paromomycin. The Watson-Crick sites of A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ are then able to bind another region using an RNA recognition motif as suggested [19, 49]. The observed crystal packing offers a mode of recognition between the bulging adenines and the base pairs within a helix. In three cases out of four (Figure 7), atoms N1, N3, and O2' of the bulging adenines are implicated. An important aspect displayed by the structure is that the recognition mode is not stringent, since in site 2 the contacts are not direct but mediated by a string of water molecules. More than two months after submission of this work, two crystal structures of 30S particles in complex with mRNA and cognate tRNA in the A site, in the presence or absence of paromomycin, have been solved at 3.1–3.3 Å resolution [49]. In these structures, A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ bulge out so that each adenine can form a set of tandem type II/type I interactions with A³⁵-U² and A³⁶-U¹, the first two base pairs of a codon-anticodon minihelix. In the present structure, the bulged adenines of each minimal A site (sites 1 and 2) are involved in homologous interactions (Figures 7b–7d). Indeed, in the present structure, the bulged adenines of each site contact the shallow groove of two G=C pairs instead of A-U pairs. This observation confirms the suggestions of the authors [49] that a C=G or G=C pair at the first position of the anticodon-codon helix would form an additional hydrogen bond from the N2 of the guanine to the N3 of A¹⁴⁹³. Furthermore, in the type II contact, the purine of the Watson-Crick base pair (G³² in the present structure or A³⁵ in the 30S particle) attracts on the Hoogsteen side other interacting partners (water molecules and C⁴⁰ in the present structure; G⁵⁰, C⁵¹⁸, and the hydroxyl group of a serine in the 30S particle). The interactions observed in the present structure and in the 30S particle [19, 49] are in agreement and are, therefore, at variance with previous proposals for the decoding mechanism [46, 47]. The comparisons between the crystallographic results obtained on the 30S particle with cognate tRNA binding to mRNA [49] and those of the present structure lead us to conclude that the observed crystal packing reflects the relevant biological system. However, some minor contribution to conformational variability of the adenines is probably due to packing constraints, since the

Complex between Paromomycin and Bacterial A Site
655

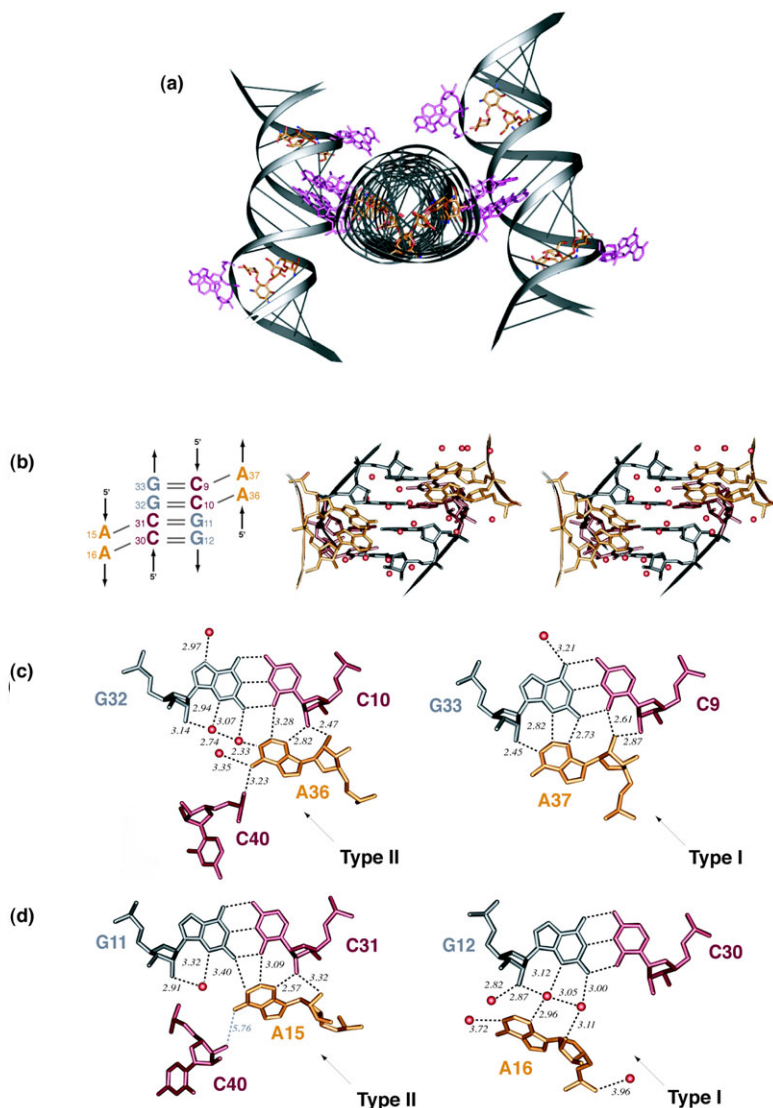


Figure 7. Crystal Packing Interactions

(a) This view shows three duplexes down their helical axes and their interaction with two symmetry-related duplexes via the bulged adenines. It shows how the bulged adenines always point in the same directions within a pseudocontinuous helix, as each pair of bulged adenines interacts with G=C pairs of symmetrical duplexes forming an angle.

(b) Three-dimensional structure of the packing interactions observed in the crystal at the central Watson-Crick domain of the duplex (the inset on the left indicates the numbering on a pseudo-secondary structure). The view is perpendicular to the helix axis, down the pseudo-two-fold symmetry axis, and toward the shallow groove. The nucleotides are colored according to the base type (guanine is gray, cytosine is dark red, and adenine is gold), red spheres indicate water molecule positions, and ribbons (sketched as arrows in the inset) join the phosphate atoms of each separate chain.

(c) Close-up of the interactions (type I and type II) between each adenine and its counterpart G=C pair in site 1. The hydrogen bonds are represented by black dashed lines. Hydrogen bond distances are indicated in italic.

(d) Close-up of the interactions (type I and type II) between each adenine and its counterpart G=C pair in site 2 (view as in Figure 7c). Adenines occupying equivalent positions in sites 1 and 2 are displayed similarly. The longer distance between A¹⁵ and C⁴⁰ is shown as a shaded dashed line.

two sets of bulging adenines present in the asymmetric unit make slightly different intermolecular contacts.

It is interesting that, in the crystal structure of the 30S particle in complex with mRNA and cognate tRNA [49], two magnesium ions (having occupations other than 1.0) bind to the A site and, by forming contacts homologous to those made by the ammonium group N3 of ring II to O1P(A¹⁴⁹³), N7(G¹⁴⁹⁴), and O2P(G¹⁴⁹⁴), stabilize the bulging conformation of the two adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³. Thus, as previously suggested [26, 27], the ammonium groups of the aminoglycosides displace magnesium ions by binding to sites occupied by the magnesium ions in the uncomplexed molecule.

Our study illustrates how properly selected RNA motifs are able to assemble and form binding pockets with properties similar to those present in the original molecules from which the RNA motifs are derived. Further, the present structure constitutes another example of how crystal packing exploits RNA-RNA self-assembly motifs occurring in naturally folded RNA molecules. However, it is still rather difficult to predict a priori the most appropriate self-assembly motif and the relative geometries among the unit cell molecules for crystal engineering.

Biological Implications

Targeting RNA has become one promising way of fighting bacterial and viral infections. Aminoglycoside antibiotics are compounds that inhibit bacterial growth by binding to specific sites on the ribosome. We have designed an RNA fragment containing twice the eubacterial ribosomal A site that cocrystallized with two paromomycin molecules. The structure of the complex reveals new, intimate contacts between the aminoglycoside and its binding pocket in the deep groove of an RNA molecule. An analysis of these interactions helps us to understand the aminoglycoside specificity toward the prokaryotic A site and allows us to derive patterns of recognition between aminoglycosides and RNA molecules. First, recognition occurs between the puckered paromomycin ring I and A¹⁴⁰⁸ via direct hydrogen bonds. Second, the antibiotic exploits its own hydration shell and the typical RNA water hydration patterns in order to bind specifically to its target. Finally, the binding modes of the bulging adenines to the shallow grooves of G=C pairs constitute a model for the recognition between the A site and the anticodon-codon helix in the ribosome.

Structure
656

Beyond the problem of the intricate and ever-evolving resistance mechanism, a close analysis of the contacts and of the relations between them together with affinity measurements of different antibiotics on different A site models [36] reveal ways to design alternative compounds that will target RNA with efficiency.

Experimental Procedures

RNA Synthesis, Purification, and Crystallization

Various sequences were designed to incorporate the nucleotides of the *E. coli* A site necessary for the interaction with the aminoglycosides [13]. The asymmetrical loop of the A site (13 nucleotides) was inserted between Watson-Crick pairs in sequences designed to fold as double helices and not as hairpin structures. These RNA sequences containing different lengths and ends were checked for alternative two-dimensional foldings using the program MFOLD [50]. These sequences were synthesized via the standard phosphoramidite chemistry [51] on an automated DNA/RNA synthesiser (Applied Biosystems 392) or ordered from Dharmacon Research (Boulder, CO).

Oligomers were purified to crystallization quality by denaturing gel electrophoresis (20% acrylamide:bisacrylamide [19:1] and 8 M urea) with TBE buffer (9 mM Tris borate [pH 8.3] and 0.2 mM EDTA) at 50°C–55°C. RNA oligomers were recovered by the “crush and soak” method at 4°C in 10 mM Tris (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 0.5 mM Na EDTA during 48 hr with one buffer exchange followed by ethanol precipitation. The pellets were washed with ethanol 95%, evaporated to dryness, and resuspended in milliQ water. Prior to crystallization experiments, paromomycin (Paromomycin sulfate, Fluka) was dissolved at 70 mM in 50 mM Na cacodylate buffer (pH 6.4), and the RNA was annealed by heating at 85°C for 2 min followed by slow cooling (2 hr 30 min) to 37°C. Addition of paromomycin (2:1 ratio with RNA) occurred at 37°C (5 min). Slow cooling then proceeded to 21°C. Hanging drops of 2 μ l containing 1 volume of crystallization solution (1.5%–5% MPD [Fluka], 1%–2% glycerol, 2 mM paromomycin, 100–250 mM NaCl, 0–10 mM MgSO₄, and 50 mM Na cacodylate [pH 6.4]) plus 1 volume of annealing solution (1 mM RNA, 2 mM paromomycin, 12.5 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, and 75 mM Na cacodylate [pH 6.4]) were equilibrated against 500 μ l 40%–60% MPD. Plates too thin to be analyzed on a conventional diffractometer crystallized in 2–3 days. The optimization of the crystallization conditions led to larger plates.

MALDI-TOF Experiments

Experiments were pursued according to standard protocol for oligonucleotide analysis by means of MALDI-TOF technique [52] at the Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (CNRS, Strasbourg, France). Crystals were previously dissolved, then washed in antibiotic-free crystallization solutions. Spectra (data not shown) indicated the presence of both the paromomycin (PM = 615.6 g/mol) and the RNA molecule (PM = 7031.3 g/mol).

Data Collection and Processing

Crystals equilibrated at 21°C and transferred to cryoprotecting solutions containing all the components present in the crystallization solution (but with 50%–60% MPD) were equilibrated for 2–15 min and flash-cooled in liquid ethane or propane (110 K). Data collection occurred at beamline ID14-1 of the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) up to a resolution of 2.5 Å (Table 1). Reflection files were indexed, scaled, and converted using Denzo [53] and the CCP4 suite [54]. An A site model was built using the program Manip [55] to contain the A site (G¹⁴⁰⁵–G¹⁴¹⁰ / C¹⁴⁰⁹–C¹⁴⁰⁹) as observed in the recent crystallographic structure of the ribosomal 30S particle (without the paromomycin) inserted between four Watson-Crick G=C pairs. After seeking twice for the model, the molecular replacement program AMoRe [56] found a correct solution ($F_{\text{cor}} = 48\%$ and R factor = 46.7%) in the resolution range 11–2.8 Å. Refinement of the structure could start with CNS [57] version 0.4 when a high weight was given to the observed data ($w_a = 75$) on a resolution range of 8.0–2.5 Å (R = 34.6% and $R_{\text{free}} = 45.6\%$). After rigid body refinement, R and R_{free} factors were lowered to 34.3% and 35.7%, respectively, by torsion simulated annealing refinement

(starting at 3500 K–2500 K and slow cooling at 50 K/min) and manual rebuilding in the calculated σ_A -weighted $3F_o - 2F_c$ and $F_o - F_c$ electron density maps. Occupancy factors were fixed to 1.0, while temperature B factors were set to 30.0 Å² and then refined isotropically on a 6–2.5 Å resolution range. The maps did not show any density for the cytosine overhang on the 5' but showed clearly the density for the paromomycin in the two sites. The structure was refined (with CNS version 1.0) with neamine (containing only rings I and II of paromomycin), then ribostamycin (containing rings I–III), and finally the full paromomycin molecule (with parameter and topology files calculated on the XDICT server [58]). Subtle rearrangements of the substitutive groups on the antibiotic (especially the O6' position) and at particular places on the RNA (the AA bulge or the UoU pair) could help to properly place the molecule in the density. Refinement was then carefully pursued with the energy minimization protocol (8–2.5 Å / 4 cycles of 200 steps) after water molecule addition to reach final R = 20.6% and $R_{\text{free}} = 24.7\%$. The final model contains 900 RNA atoms, 84 paromomycin atoms, and 54 water molecules.

Acknowledgments

We are grateful to Vincent Mikol and Jean-Pierre Guilloteau at Aventis for encouragement and support. We thank Philippe Wolff for the synthesis of the oligoribonucleotides, Andreas Werner for the assistance with the optimization protocols, Nüket Cavusoglu and Alain van Dorsselaer from the Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (UMR 7509, CNRS, Strasbourg, France) for the MALDI-TOF experiments, and Pascal Auffinger and Venki Ramakrishnan for discussions and careful reading of the manuscript. We gratefully acknowledge the help of Philippe Dumas, Eric Ennifar, Benoit Masquida, and the people of beamline ID14-1 at European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) with data collection and refinement. Q.V. is supported by a Bourse Docteur-Ingénieur Aventis/CNRS.

Received: February 26, 2001

Revised: June 25, 2001

Accepted: June 27, 2001

References

- Westhof, E., Masquida, B., and Jaeger, L. (1996). RNA tectonics: Towards RNA design. *Fold. Des.* 1, R78–R88.
- Moore, P.B. (1999). Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 287–300.
- Batey, R.T., Rambo, R.P., and Doudna, J.A. (1999). Tertiary motifs in RNA structure and folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 2327–2343.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905–920.
- Hermann, T. (2000). Strategies for the design of drugs targeting RNA and RNA-protein complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39, 1890–1905.
- Wilson, W.D., and Li, K. (2000). Targeting RNA with small molecules. *Curr. Med. Chem.* 7, 73–98.
- Wright, G.D., Berghuis, A.M., and Mobashery, S. (1998). Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. In *Resolving the Antibiotic Paradox: Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics*, B.P. Rosen and S.Mobashery, eds. (New York: Plenum Press), pp. 27–69.
- Walter, F., Vicens, Q., and Westhof, E. (1999). Aminoglycoside-RNA interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 694–704.
- Forge, A., and Schacht, J. (2000). Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neurootol.* 5, 3–22.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327, 389–394.
- Purohit, P., and Stern, S. (1994). Interactions of a small RNA with antibiotics and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature* 370, 659–662.

Complex between Paromomycin and Bacterial A Site
657

12. Miyaguchi, H., Narita, H., Sakamoto, K., and Yokoyama, S. (1996). An antibiotic-binding motif of an RNA fragment derived from the A-site related region of *Escherichia coli* 16S RNA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3700–3706.
13. Recht, M.I., Fourmy, D., Blanchard, S.C., Dahlquist, K.D., and Puglisi, J.D. (1996). RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* **262**, 421–436.
14. Blanchard, S.C., Fourmy, D., Eason, R.G., and Puglisi, J.D. (1998). rRNA chemical groups required for aminoglycoside binding. *Biochemistry* **37**, 7716–7724.
15. Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C., and Puglisi, J.D. (1996). Structure of the A-site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* **274**, 1367–1371.
16. Fourmy, D., Yoshizawa, S., and Puglisi, J.D. (1998). Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **277**, 333–345.
17. Fourmy, D., Recht, M.I., and Puglisi, J.D. (1998). Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **277**, 347–362.
18. Yoshizawa, S., Fourmy, D., and Puglisi, J.D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.* **17**, 6437–6448.
19. Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340–348.
20. Arnez, J.G., and Steitz, T.A. (1996). Crystal structures of three misacylating mutants of *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP. *Biochemistry* **35**, 14725–14733.
21. Price, S.R., Evens, P.R., and Nagai, K. (1998). Crystal structure of the spliceosomal U2B'-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature* **394**, 645–650.
22. Leontis, N.B., and Westhof, E. (1998). Conserved geometrical base-pairing patterns in RNA. *Q. Rev. Biophys.* **31**, 399–455.
23. Westhof, E., and Fritsch, V. (2000). RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. *Structure* **8**, R55–R65.
24. Correll, C.C., Freeborn, B., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (1997). Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell* **91**, 705–712.
25. Botto, R.E., and Coxon, B. (1983). Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy of neomycin B and related aminoglycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 1021–1028.
26. Hermann, T., and Westhof, E. (1998). Aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme: A general model for the interaction of cationic antibiotics with RNA. *J. Mol. Biol.* **276**, 903–912.
27. Hermann, T., and Westhof, E. (1999). Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds. *J. Med. Chem.* **42**, 1250–1261.
28. Ennifar, E., et al., and Dumas, P. (1999). The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure* **7**, 1439–1449.
29. Schindelin, H., Zhang, M., Bald, R., Fürste, J.P., Erdmann, V.A., and Heinemann, U. (1995). Crystal structure of an RNA dodecamer containing the *E. coli* Shine-Dalgarno sequence. *J. Mol. Biol.* **249**, 595–603.
30. Pan, B.C., Mitra, S.N., and Sundaralingam, M. (1998). Structure of a 16-mer RNA duplex r(GCAGACUUAAAUCUGC)₂ with wobble C.A⁺ mismatches. *J. Mol. Biol.* **283**, 977–984.
31. Auffinger, P., and Westhof, E. (2000). Water and ion binding around RNA and DNA (C,G) oligomers. *J. Mol. Biol.* **300**, 1113–1131.
32. Treger, M., and Westhof, E. (2001). Statistical analysis of atomic contacts at RNA-protein interfaces. *J. Mol. Recognit.* **14**, 1–16.
33. Westhof, E., Dumas, P., and Moras, D. (1988). Hydration of transfer RNA molecules: A crystallographic study. *Biochimie* **70**, 145–165.
34. Wimberly, B.T., et al., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327–339.
35. Carter, A.P., et al., and Ramakrishnan, V. (2001). Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* **291**, 498–501.
36. Recht, M.I., Douthwaite, S., and Puglisi, J.D. (1999). Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* **18**, 3133–3138.
37. Beauclerk, A.A., and Cundliffe, E. (1987). Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J. Mol. Biol.* **193**, 661–671.
38. Wong, C.-H., Hendrix, M., Priestley, E.S., and Greenberg, W.A. (1998). Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chem. Biol.* **5**, 397–406.
39. Davies, J., and Wright, G.D. (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* **5**, 234–240.
40. Doherty, E.A., Batey, R.T., Masquida, B., and Doudna, J.A. (2000). A universal mode of helix packing in RNA. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 339–343.
41. Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4899–4903.
42. Michel, F., and Westhof, E. (1990). Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **216**, 585–610.
43. Pley, H.W., Flaherty, K.M., and McKay, D.B. (1994). Model for an RNA tertiary interaction from the structure of an intermolecular complex between a GAAA tetraloop and an RNA helix. *Nature* **372**, 111–113.
44. Davies, J., and Davis, B.D. (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem.* **243**, 3312–3316.
45. Stern, S. (1996). Ribosomal RNA, decoding and ribozymes. In *Ribosomal RNA and Group I Introns*, R. Green and R. Schroeder, eds. (Georgetown, Maryland: R.G. Landes, Co.), pp. 55–68.
46. VanLoock, M.S., Easterwood, T.R., and Harvey, S.C. (1999). Major groove binding of the tRNA/mRNA complex to the 16S ribosomal RNA decoding site. *J. Mol. Biol.* **285**, 2069–2078.
47. Yoshizawa, S., Fourmy, D., and Puglisi, J.D. (1999). Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science* **285**, 1722–1725.
48. Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 104–107.
49. Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Tarry, M.J., Carter, A.P., and Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**, 897–902.
50. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* **288**, 911–940.
51. Wincott, F., et al., and Usman, N. (1995). Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. *Nucleic Ac. Res.* **23**, 2677–2684.
52. Lecchi, P., Le, H.M.T., and Pannell, L.K. (1995). 6-Aza-2-thiothymine: A matrix for MALDI spectra oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1276–1277.
53. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1996). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods Enzymol.*, volume 276, C.W.J. Carter and R.M. Sweet, eds. (Academic Press).
54. CCP4 (Collaborative Computational Project 4) (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**, 760–763.
55. Massire, C., and Westhof, E. (1998). MANIP: An interactive tool for modelling RNA. *J. Mol. Graph. Model.* **16**, 197–205, 255–257.
56. Navaza, J. (1994). AMoRe: An automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A* **50**, 157–163.
57. Brünger, A.T., et al., and Warren, G.L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* **54**, 905–921.
58. Kleywegt, G.J., and Jones, T.A. (1997). Model-building and refinement practice. In *Methods Enzymol.* (Carter Jr, C.W. & Sweet, R.M., eds.), vol. 277, 208–230, Academic Press.
59. Kleywegt, G.J., and Jones, T.A. (1995). Where freedom is given, liberties are taken. *Structure* **3**, 535–540.

Structure
658

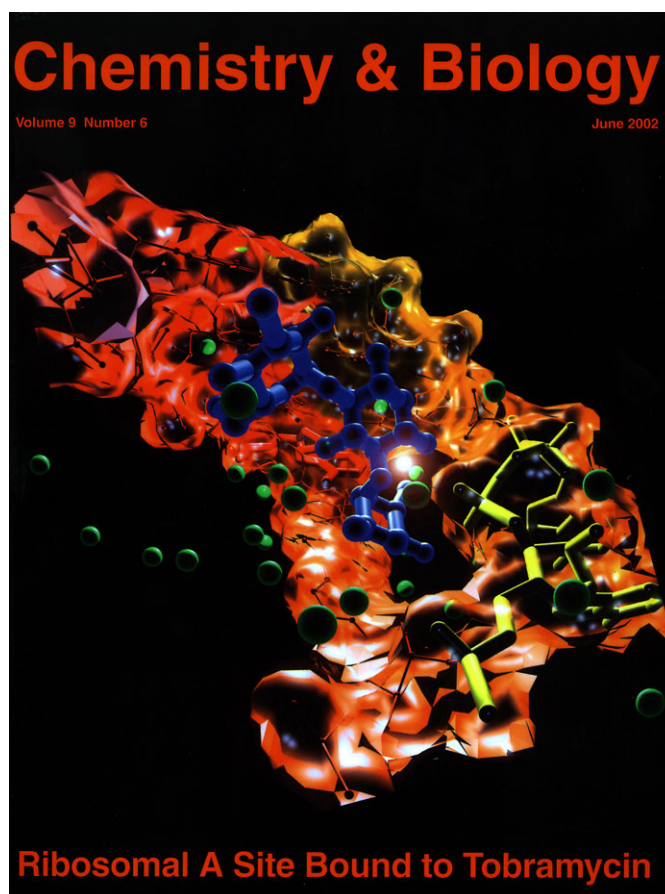
60. Massire, C., Gaspin, C., and Westhof, E. (1994). DRAWNA: A program for drawing schematic views of nucleic acids. *J. Mol. Graph.* *12*, 201–206.
61. Evans, S.V. (1993). SETOR: Hardware-lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules. *J. Mol. Graph.* *11*, 134–138.
62. Jiang, L., Suri, A.K., Fiala, R., and Patel, D.J. (1997). Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex. *Chem. Biol.* *4*, 35–50.

Accession Numbers

This structure has been entered in the Protein Data Bank with ID number 1J7T.

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

Fin février 2001, un jeu complet a été enregistré sur la ligne ID14-EH2 à l'ESRF (Grenoble) pour le complexe fragment A3.4/tobramycine. La résolution atteinte est de 2,55 Å. Le phasage de la structure a été effectué par remplacement moléculaire à partir de la structure du complexe fragment A3/paromomycine. L'affinement s'est poursuivi par dynamique moléculaire (recuit simulé) et corrections manuelles à l'écran graphique. La publication parue dans l'édition de juin 2002 de la revue *Chemistry & Biology* sous le titre « Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A site » présente l'analyse de la structure du complexe.¹ La structure du complexe site A/tobramycine est comparée à celle du complexe site A/paromomycine résolue précédemment (Publication n°1) et à celle du complexe site A/gentamicine C1a résolue par RMN à l'aide du modèle ASR-27. Des explications moléculaires à certains mécanismes de résistances spécifiques au sous-groupe des 4,6-2-DOS sont également proposées.²



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

² Les références citées dans la publication mais non mentionnées dans le corps de la thèse ne sont pas reprises en fin de manuscrit.

Crystal Structure of a Complex between the Aminoglycoside Tobramycin and an Oligonucleotide Containing the Ribosomal Decoding A Site

Quentin Vicens and Eric Westhof¹

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Centre
National de la Recherche Scientifique
Modélisation et Simulations des Acides Nucléiques,
UPR 9002
Université Louis Pasteur
15 Rue René Descartes
67084 Strasbourg Cedex
France

Summary

Aminoglycoside antibiotics target the decoding aminoacyl site (A site) on the 16S ribosomal RNA and induce miscoding during translation. Here, we present the crystal structure, at 2.54 Å resolution, of an RNA oligonucleotide containing the A site sequence complexed to the 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine aminoglycoside tobramycin. The three aminosugar rings making up tobramycin interact with the deep-groove atoms directly or via water molecules and stabilize a fully bulged-out conformation of adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³. The comparison between this structure and the one previously solved in the presence of paromomycin confirms the importance of the functional groups on the common neamine part of these two antibiotics for binding to RNA. Furthermore, the analysis of the present structure provides a molecular explanation to some of the resistance mechanisms that have spread among bacteria and rendered aminoglycoside antibiotics inefficient.

Introduction

RNA molecules constitute attractive targets for drug design because of their complex three-dimensional architectures and their essential cellular roles [1–3]. Several low-molecular-weight inhibitors are already known to bind with high affinities to different structural RNA motifs [4, 5]. Among these, aminoglycosides constitute a family of water-soluble weak bases that have similar chemical structures (Figure 1). Most of them contain a 2-deoxystreptamine part substituted at different positions by aminosugar rings, which results in polycationic derivatives at physiological pH. Whereas substitution at position 5 of the 2-deoxystreptamine ring leads to the 4,5-disubstituted subclass containing derivatives such as neomycin and paromomycin (Figure 1A), substitution at position 6 leads to the 4,6-disubstituted subclass containing antibiotics such as kanamycin, tobramycin (Figure 1B), and gentamicin (Figure 1C).

One of the main steps in protein synthesis is the recognition between messenger RNA (mRNA) and the transfer RNA (tRNA) containing the amino acid to be incorporated. In bacteria, the recognition occurs inside the ribo-

some at the level of the decoding aminoacyl site (A site) on the 16S ribosomal RNA (16S rRNA) [6]. The aminoglycoside antibiotics disrupt the bacterial membrane and induce miscoding during the protein synthesis [7] by binding to the A site (Figure 2A), eventually provoking the death of the bacterial cell [8]. Previous experiments have identified the footprint of the aminoglycosides on the 16S rRNA of *Escherichia coli* [9]. Further experiments have shown that the same footprint could be observed on shorter RNA constructs containing the A site [10–13] and that aminoglycosides bind to the A site with micromolar affinity [12, 14–16]. Key binding features have been observed by NMR with a 27 nucleotide-long RNA fragment [13, 17–19] and, more recently, at 3.05 Å resolution by crystallography of the bacterial ribosomal 30S subunit complexed to paromomycin [20].

We recently solved by X-ray crystallography the structure of a complex between an RNA construct containing two bacterial A sites and two molecules of the 4,5-disubstituted paromomycin [21]. We have now solved the structure of a complex containing the aminoglycoside tobramycin. This aminoglycoside, together with gentamicin and amikacin, is one of the most commonly used in medicine because of its low cost and reliable activity [22]. This work presents the first crystal structure of the A site complexed to an aminoglycoside belonging to the 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine subclass. The final resolution (2.54 Å) is close enough to the resolution of the complex containing paromomycin (2.5 Å) to allow a comparison of the direct and water-bridged hydrogen bonds involving the antibiotics and the RNA. In both complexes, rings I and II, constituting the common core for the 4,5- and 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine aminoglycosides, bind to the A site pocket in the same way. The different recognition modes, due to the intrinsic difference in the chemical structures of the compound, help us to draw the chemical and stereochemical features important for specific binding to the A site. It is of a particular interest to notice that direct hydrogen bonds involving ring III and aminoglycoside atoms in one complex are replaced by contacts mediated via water molecules in the other complex. Therefore, the number of final contacts is roughly the same, whether ring III is attached on position 5 or 6 of ring II. These results provide an explanation for the close-to-micromolar affinity exhibited by the structurally different paromomycin and tobramycin antibiotics toward the A site. Moreover, the structure of the present complex provides molecular explanations for the resistance toward aminoglycosides that is observed in organisms having base mutations on the A site and/or enzymes chemically modifying the antibiotic.

Results and Discussion

Description of the Structure of the Complex

Crystals of complexes between oligoribonucleotides incorporating the sequence of the A site of *Escherichia coli*

¹Correspondence: e.westhof@ibmc.u-strasbg.fr

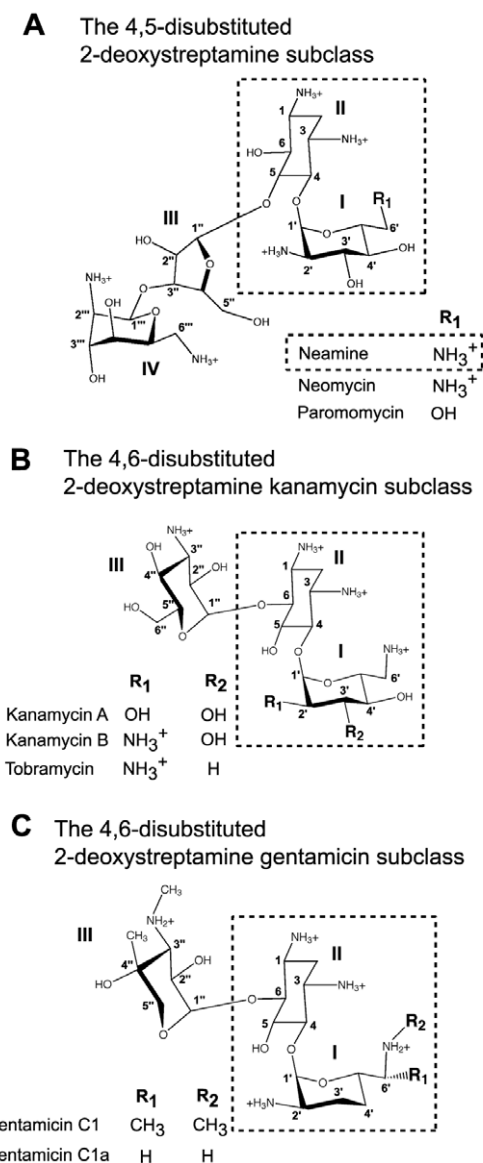


Figure 1. Chemical Structures of the Aminoglycosides

and the aminoglycoside tobramycin have been solved at 2.54 Å resolution (Table 1). Suitable crystals could be obtained only with a sequence possessing two 5' dangling uracils, instead of the 5' cytosines that were present in the previous structure [21]. Crystals, belonging to spacegroup P2₁, grow as long thin plates in similar crystallizing solutions containing tobramycin. The RNA fragment consists of a double helix incorporating the A site sequence twice (Figure 2B). Because of packing contacts similar to those observed in the paromomycin complex [21], one of the two sites (site 1) is better ordered. The two bulged adenines of site 1 make hydrogen bonds to the shallow groove of the central G=C pairs of a symmetry-related molecule. However, in site 2, the two adenines are almost perpendicular to the facing G=C and C=G pairs at the end of a symmetrical complex. The B factors observed in the latter region of the

structure are high (100–120 Å²), and the density is poorly defined for the atoms of the two bulging adenine bases.

Inside the A site pocket, the bulging conformation of the two adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ is stabilized by hydrogen bonds between phosphate oxygens and exocyclic atoms of the invariant neamine part of the aminoglycosides (Figures 3A and 3B). Rings I and II, which constitute the common neamine core for the 4,5- and 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine aminoglycosides (Figure 1A), bind to the two A site pockets in a homologous fashion (Figures 3 and 4). Ring I intercalates in the RNA helix and thereby stacks against base G¹⁴⁹¹ and forms a pseudo base pair with A¹⁴⁰⁸ (Figures 3F and 3G). The pseudo base pair between ring I and A¹⁴⁰⁸ involves two hydrogen bonds, one between the ring oxygen and the atom N6 of A¹⁴⁰⁸ and a second one between the donor at position 6' on ring I (an ammonium in tobramycin and a hydroxyl in paromomycin) and the ring nitrogen N1 of A¹⁴⁰⁸ (Figure 3F). The hydroxyl group O4' forms a direct H bond to the anionic O2P oxygen atom of the bulging A¹⁴⁹³, and the ammonium N2' is at the center of a tetrahedron formed by atom C2' and three water ligands (Figure 3B). The central role of the ammonium N2' is apparent from its coordination, although the contacts made are via water molecules. One water molecule is responsible for both bridging N2' intramolecularly to the hydroxyl O5' of ring II and forming a H bond to N7(G¹⁴⁹¹), and it thus plays the same role as the hydroxyl O5'' of ring III in paromomycin (Figure 3B). A second water molecule forms the same bridge to O1P(A¹⁴⁹³) as in the paromomycin complex. A third water molecule forms a water bridge to O2P(A¹⁴⁹²) and thereby replaces the direct contacts formed by the hydroxyl O3' to the same anionic phosphate oxygen in the paromomycin complex. Thus, the bulging conformation of the two adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ is stabilized by the same number of homologous hydrogen bonds among phosphate oxygens, water molecules, and exocyclic atoms of ring I in the neamine moiety. In ring II, the ammonium N3 makes contacts to N7(G¹⁴⁹⁴), O2P(G¹⁴⁹⁴), and O1P(A¹⁴⁹³) that are identical to those seen in the paromomycin complex (Figures 3A–3E). The ammonium N1 makes an identical contact to the oxygen O4 of U¹⁴⁹⁵ of the U¹⁴⁹⁵oU¹⁴⁰⁶ pair and a homologous contact to N4(C¹⁴⁹⁶) mediated by one water molecule (instead of two as in the paromomycin complex) (Figures 3C and 3D). Ring II participates in two intramolecular H bonds to ring III; one involves the atoms N1 and O2'', and the second involves hydroxyl O5 and the ring oxygen O5'' (Figure 3B).

The third ring, linked to position 6 of ring II in tobramycin (instead of position 5 as in paromomycin), directly contacts the Hoogsteen sites of G¹⁴⁰⁵ in the G¹⁴⁰⁵=C¹⁴⁹⁶ pair via the hydroxyl O2'' and the ammonium N3'' (Figure 3C), as already observed by probing and structural data for other compounds of the 4,6-linked subclass [11, 19]. The other two hydroxyl groups of ring III do not make any contact to the RNA.

Comparison of the Paromomycin and Tobramycin Complexes

Both paromomycin and tobramycin bind to RNA constructs containing the A site with dissociation constants

Crystal Structure of the A Site Complexed to Tobramycin
749

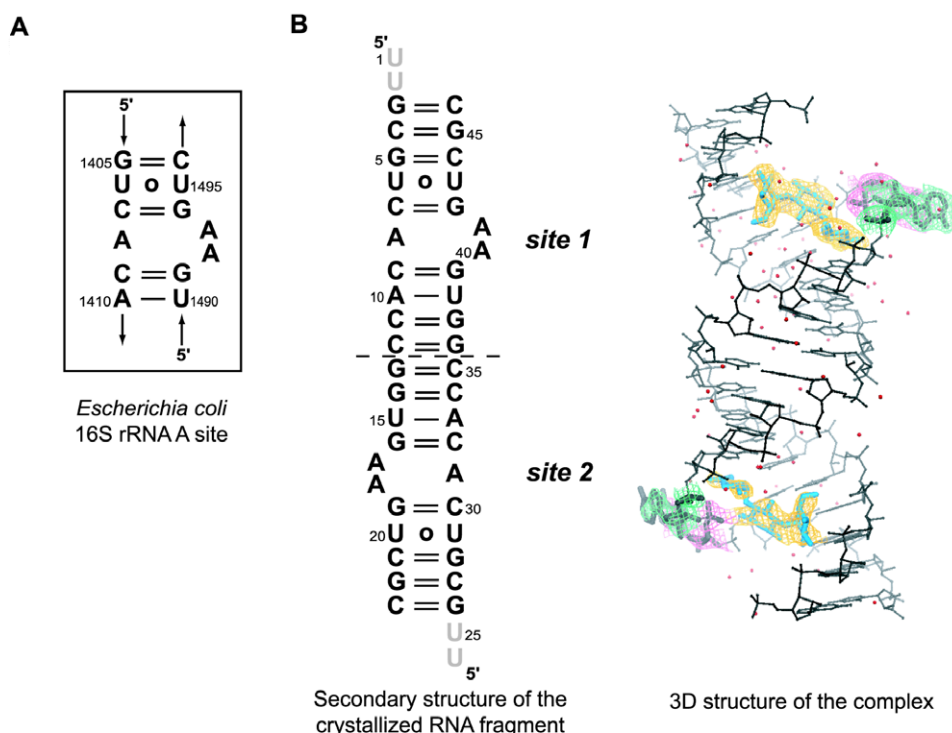


Figure 2. Secondary and Tertiary Structures of the Crystallized RNA

(A) Secondary structure of the A site of the *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. The standard *E. coli* numbering is specified.
 (B) Secondary structure of the crystallized RNA helix. The 5'-dangling UU not observed in the density maps are shaded. The 3D structure of the crystallized complex is shown. The two tobramycin molecules (cyan) and the bulged adenines (gray) are in bold, with the $1.3\sigma - 3F_o - 2F_c$ electron density map shown in orange for the tobramycin molecules and in green and magenta for the adenines corresponding respectively to A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³. The 76 water molecules are shown as red spheres.

of approximately 1.5 μM [16]. As listed in Table 2, the number of contacts in the two complexes is roughly the same (13 direct H bonds for the tobramycin complex as opposed to 15 for the paromomycin complex, a slight difference associated with the reduced number of hydroxyl groups). The main binding ligands are, as ex-

pected, the ammonium and hydroxyl groups (Table 2). The roles of the ring oxygen atoms are more subtle because these atoms participate in specific and direct H bonds but also in intramolecular H bonds within the antibiotic molecules. On the other hand, rather than making any hydrogen bond to the RNA, the ether oxygen

Table 1. Data Collection and Structure Determination

Space group	P2 ₁
Unit cell parameters (Å)	a = 46.9; b = 32.8; c = 52.0 β = 107.9°
Wavelength (Å)	0.933
Resolution range used for refinement (Å) ^a	10–2.54 (2.64–2.54)
Number of unique reflections used in refinement	4899
Redundancy	4.8
Average I/σ^a	19.5 (9.2)
Completeness (%) ^a	95.9 (98.4)
R_{sym} (%) ^{ab}	5.9 (13.3)
RMS deviation for bonds (Å)	0.006
RMS deviation for angles (°)	1.0
Average B factor (Å ²)	61.4
Minimum B factor (Å ²)	17.8
Maximum B factor (Å ²)	119.1
R factor (%) ^c	21.4
R_{free} (%) ^d	26.4

^a Values for the last shell are given between parentheses.

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

^c R factor = $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$.

^d R factor calculated with 7.5% of the reflections omitted from the refinement.

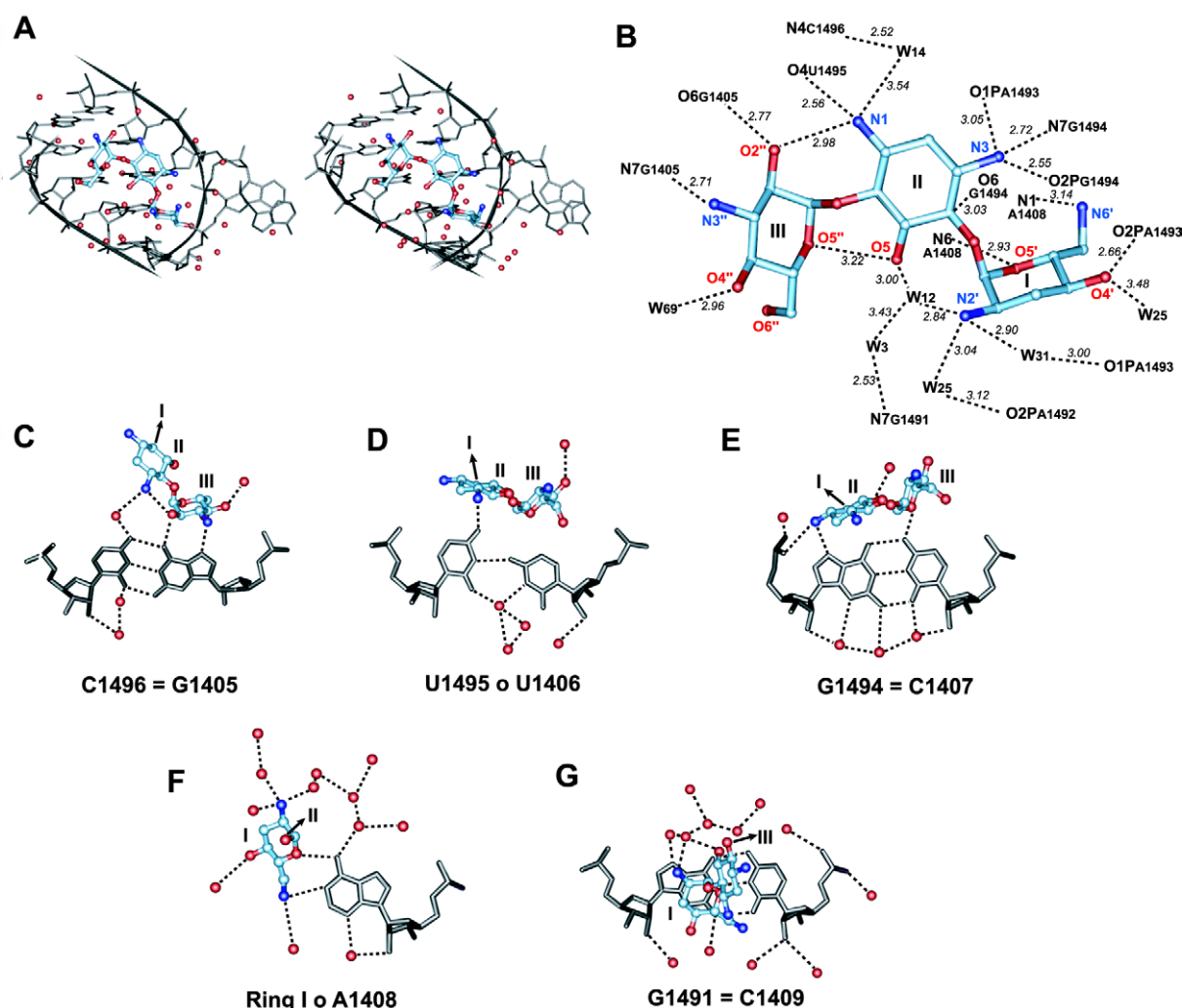


Figure 3. Close-Up of the Binding Site and Details of the Contacts

(A) Stereo view of the tobramycin in site 1. The view is toward the deep groove, with the bulged adenines on the right. Tobramycin is shown in cyan, with functional groups colored according to the atom type. Water molecules are shown as red spheres.

(B) Tobramycin close-up showing all the hydrogen bonds involving the functional groups of tobramycin. The view has the same orientation as in (A). Ring numbers and atom names are specified. The *E. coli* numbering is used for the RNA atoms, and "W" stands for a water molecule. H bonds are shown as dashed lines, with their corresponding distances in italic.

(C–G) Atomic details of the contacts involving each base pair interacting with the tobramycin inside the A site. The color code is as in (A). The name of each base pair is specified according to the *E. coli* numbering. Only a part of the tobramycin is shown at a time, with arrows pointing to the other rings.

atoms form van der Waals contacts. This is especially observed with oxygen O1', which is in the vicinity of O1P(A¹⁴⁹³) and a water molecule (Figure 3A). However, with the oxygen atoms present as hydroxyl groups instead of ether groups (e.g., alternatively O6 and O5 on ring II of paromomycin and tobramycin), the comparison between the crystal structures containing either a 4,5-linked or a 4,6-linked aminoglycoside shows that these oxygen atoms are surrounded by water molecules (Figure 4). In the tobramycin complex, direct hydrogen bonds are observed between atoms O2'' and N3'' of ring III and the G¹⁴⁰⁵=C¹⁴⁹⁶ pair (Figure 4). In the paromomycin complex, these direct contacts are replaced by water-mediated hydrogen bonds involving ring II functional groups. In the same way, the direct hydrogen bond

pointing to N7(G¹⁴⁹¹) in the paromomycin complex is replaced by a water-mediated hydrogen bond involving O5 of ring II and two water molecules (Figure 4). Interestingly, the binding mode of the neamine moiety can therefore be visualized. It is probable that the two rings bind in the same manner, with water-mediated hydrogen bonds replacing contacts involving the additional rings in the 4,5- and 4,6- subclasses. This would explain the lower affinity of neamine for the A site.

We can also note from the comparison between the two aminoglycoside subclasses that the intramolecular bonds play an important role in proper positioning of the rings. In the paromomycin complex, ring III is maintained in the vicinity of ring I through two intramolecular direct hydrogen bonds [21]. In the tobramycin complex,

Crystal Structure of the A Site Complexed to Tobramycin
751

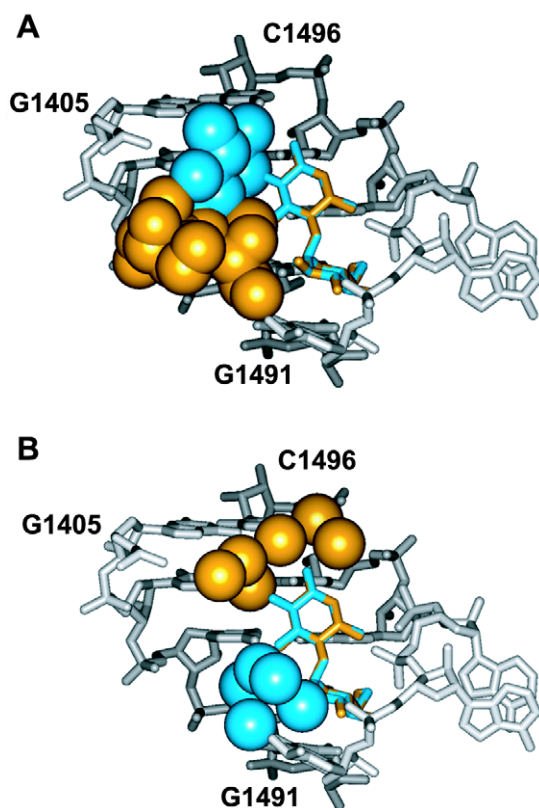


Figure 4. Superimposition of Paromomycin and Tobramycin inside the A Site in the Crystal Structures

(A) View of the A site as in Figure 3A. Paromomycin and tobramycin atoms are colored in orange and cyan, respectively. The superimposition has been done with rings I and II in the software Lsqman [46]. The common neamine part is shown as sticks, whereas the additional rings, at either position O5 (for paromomycin) or O6 (for tobramycin) of ring II, are shown as van der Waals spheres.

(B) Same view as in (A), showing only the neamine common part of the antibiotics (sticks). The water molecules replacing ring III of tobramycin in the paromomycin complex (upper part) and ring III of paromomycin in the tobramycin complex (lower part) are depicted as orange and cyan van der Waals spheres, respectively.

one water-bridged and two direct hydrogen bonds are intramolecular and seem to reinforce a conformation that enables tobramycin to bind tightly to its target (Figure 3B). Each one of these intramolecular contacts would be lost for the neamine molecule. It is noteworthy that the conformations and orientations of rings I and II of tobramycin are the same in the two completely different binding sites of RNA aptamers specific for tobramycin [23, 24]. The positions of ring III and of the exocyclic 6' and 6'' functional groups are changed due to the different RNA environment surrounding the antibiotic, but the direct intramolecular hydrogen bonds within the antibiotic are maintained.

As concluded from several biochemical experiments [14, 25–27] and theoretical approaches [28], a key driving force in the binding of aminoglycosides to RNA is of electrostatic origin; ammonium groups of the positively charged aminoglycoside displace cations normally attracted to the negatively charged RNA. However, the number of contacts seen in these two crystalline com-

plexes is much higher than the six hydrogen bonds seen either in the complex between neomycin and tRNA^{Phe} [29] or in the modeled complex between tobramycin and poly(rI-C) [26]. It is conceivable that the latter binding modes reflect nonspecific binding of polycations to negatively charged RNA molecules [a possibility reflected by the binding constants in the upper μM range for the neomycin/tRNA^{Phe} complex and in the upper mM range for the tobramycin/poly(rI-C) complex].

Comparisons with Other 4,6-Linked Aminoglycosides

Both crystal structures help understand the binding modes of the other 4,6-linked aminoglycosides (the kanamycins and the gentamicins, Figures 1B and 1C). Kanamycin B, whose affinity for the A site is very similar to that of tobramycin [16], differs from tobramycin by the presence of a hydroxyl group at the C3' position; this hydroxyl group is also present in paromomycin. As noted above, in paromomycin, the O3' hydroxyl forms a direct H bond with the anionic phosphate oxygen O2P(A¹⁴⁹²) and, in tobramycin, the contact with the O2P(A¹⁴⁹³) occurs via a water molecule and involves the neighboring amino group N2' (Figure 3B). Thus, in kanamycin B, one expects a contact of the O3' hydroxyl as in paromomycin. Kanamycin A possesses two hydroxyl groups at positions 2' (replacing the N2') and 3' of ring I. Therefore, with one amino group less than tobramycin, it presents a 10-fold reduction in binding affinity [14], but the contacts to the RNA should be very similar to those formed in tobramycin (for N2') and paromomycin (for O3').

In the gentamicin family (Figure 1C), the amino groups N6' of ring I and N3'' of ring III, each one forming a single contact to the RNA, are methylated (e.g., in gentamicin C1). After the structure of gentamicin antibiotics was superimposed on the crystal structure of tobramycin and the missing methyl groups were modeled, it appeared that the same direct hydrogen bonds involving ammonium groups N6' and N3'' can occur between gentamicins and the RNA, even with gentamicin C1, which contains one methyl group on N6' of ring I (our unpublished data). The root-mean-square deviation (rmsd) between the present X-ray structure and a single representative NMR structure of the A site complexed to the 4,6-linked gentamicin C1a [19] is 2.4 Å for all the atoms of the A site. After the superimposition of the ring atoms of the neamine part (the rmsd is 0.3 Å for the ring atoms), the other atoms constituting the A site present an rmsd of 3.6 Å between the two structures. The comparison shows that (1) in the NMR structure ring I does not intercalate into the A site pocket; (2) ring I does not form a pseudo base pair with A¹⁴⁰⁸; (3) adenines A¹⁴⁹² and A¹⁴⁹³ do not bulge out of the helix; and (4) conserved positions in the neamine moiety do not interact with the phosphate oxygens of the bulging adenines (Figure 5). Although the pioneering NMR work [17, 19] correctly outlined the binding pocket of aminoglycosides in the A site, several conserved contacts and RNA conformations were missed. The precise knowledge of the specific contacts occurring in the binding pocket is a prerequisite not only for understanding the biological action of the antibiotic but also for the development of alternative compounds acting in an analogous fashion.

Chemistry & Biology
752

Table 2. Identical and Similar Contacts Formed by Hydrophilic Groups between the Aminoglycosides Tobramycin and Paromomycin and the RNA

Tobramycin	Paromomycin
Ammonium Groups (5)	Ammonium Groups (5)
Direct	Direct
N1...O4(U¹⁴⁹⁵): 2.56	N1...O4(U¹⁴⁹⁵): 2.82
N3...O1P(A¹⁴⁹³): 3.05	N3...O1P(A¹⁴⁹³): 3.13
N3...N7(G¹⁴⁹⁴): 2.72	N3...N7(G¹⁴⁹⁴): 2.78
N3...O2P(G¹⁴⁹⁴): 2.55	N3...O2P(G¹⁴⁹⁴): 3.12
N6'...N1(A¹⁴⁰⁸): 3.14	—
N3'...N7(G¹⁴⁰⁸): 2.71	N2''...O2P(G¹⁴⁰⁸): 2.96
Water-mediated	Water-mediated
N1...W...N4(C¹⁴⁹⁹): 3.54/2.52	N1...W...W...N4(C¹⁴⁹⁹): 2.68/2.71/2.51
N2'...W...O2P(G¹⁴⁹¹): 2.90/3.48	N2'...W...O2P(G¹⁴⁹¹): 3.47/3.24
N2'...W...O1P(A¹⁴⁹³): 3.04/3.12	N2'...W...O1P(A¹⁴⁹³): 3.27/2.89
N2'...W...O2P(A¹⁴⁹³): 2.90/3.00	
Intramolecular	Intramolecular
N1...O2': 2.98	N2'...O5'': 3.12
N2'...W...O5: 2.84/3.00	N2'...O4'': 3.21
No contact to RNA	No contact to RNA
None	N6'''
Total to RNA: 10	Total to RNA: 8
Hydroxyl Groups (5)	Hydroxyl Groups (8)
Direct	Direct
—	O3'...O2P(A¹⁴⁹³): 2.90
O4'...O2P(A¹⁴⁹³): 2.66	O4'...O2P(A¹⁴⁹³): 2.54
—	O6'...N1(A¹⁴⁰⁸): 2.53
O2''...O6(G¹⁴⁰⁵): 2.77	O2''...N4(C¹⁴⁰⁷): 2.73
—	O4'''...O1P(G¹⁴⁰⁵): 3.77
—	O5'''...N7(G¹⁴⁹¹): 2.71
Water-mediated	Water-mediated
O5...W...W...N7(G¹⁴⁹¹): 3.00/3.43/2.53	O6...W...O4(U¹⁴⁹⁹): 2.62/2.98
	O6...W...O6(G¹⁴⁰⁵): 3.21/3.19
Intramolecular	Intramolecular
O5...O5'': 3.22	O5''...N2': 3.12
No contact to RNA	No contact to RNA
O5	O6
O4''	O3''
O6''	—
Total to RNA: 3	Total to RNA: 8
Ring Oxygen (2)	Ring Oxygen (3)
Direct	Direct
O5'...N6(A¹⁴⁰⁸): 2.93	O5'...N6(A¹⁴⁰⁸): 3.16
Intramolecular	Intramolecular
O5''...O5: 3.22	O4''...N2': 3.21
Total to RNA: 1	Total to RNA: 1
Linkage Oxygen (2)	Linkage Oxygen (3)
No contact	No contact

Identical contacts are in bold; similar contacts are in bold italics. Distances are given in Å.

Relations between the Structure of the Complex and Bacterial Resistance

Resistance in bacteria can result from different mechanisms, involving base mutations, base methylations, or enzymatic modifications of the antibiotic [30]. The role of the A1408G mutation has already been emphasized [21]. A guanine at position 1408 disfavors the binding of the aminoglycoside by presenting Watson-Crick groups not able to form the necessary direct hydrogen bonds with atoms O5' and N6' of ring I. Although the A1408G mutation confers resistance to aminoglycosides in eubacteria [31], it does not prevent the binding of 4,6-linked aminoglycosides to the eukaryotic A site [16], which presents a G at the equivalent position 1408, as

well as an A1491 instead of a G1491 and a reversed A¹⁴¹⁰-U¹⁴⁹⁰ base pair. Antibiotics belonging to the 4,6-linked subclass might therefore bind in a slightly different manner to the eukaryotic A site in order to be active despite the base changes.

Methylation of the N7 of G¹⁴⁰⁵ confers resistance to the 4,6-linked 2-deoxystreptamine aminoglycosides such as tobramycin but not to the 4,5-linked aminoglycosides such as paromomycin [32]. Indeed, whereas ring III of tobramycin interacts directly with N7(G¹⁴⁰⁵) (Figures 3A–3C), paromomycin does not reach directly to that base [21]. The mutation U1406A has also been reported to prevent the binding of aminoglycosides belonging to the 4,6-linked subclass in a selective manner

Crystal Structure of the A Site Complexed to Tobramycin
753

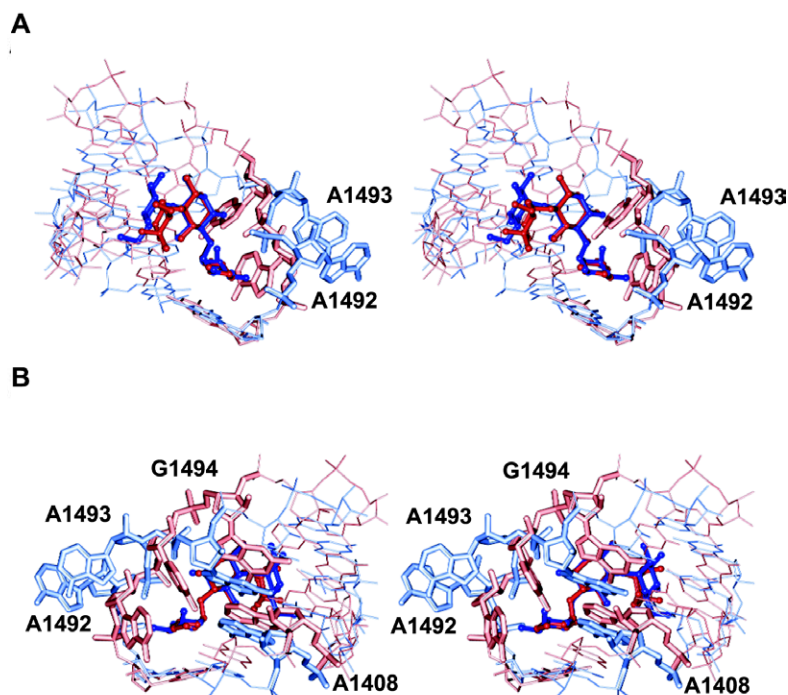


Figure 5. Superimposition of the Crystal Structure of the Tobramycin/A Site Complex and the NMR Structure of the Gentamicin C1a/A Site Complex

(A) Stereo view down the deep groove of the A site. The tobramycin/A site complex (present work) and the gentamicin C1a/A site complex (single representative structure from [19]) are colored in blue and red shades, respectively. The superimposition has been done with atoms belonging to the neamine part in the software Lsqman [46]. The adenines 1492 and 1493 are shown in bold for both complexes.

(B) Stereo view of the A site at 180° from (A). Residues A¹⁴⁰⁸, A¹⁴⁹², A¹⁴⁹³, and G¹⁴⁹⁴ are shown in bold for both complexes.

[33, 34]. In our previous structure containing paromomycin (a 4,5-linked aminoglycoside), a water molecule bridges the hydroxyl group O6 of ring II to O4 of U¹⁴⁰⁶. It can therefore be suspected that in the case of a U1406A mutation, a direct hydrogen bond could form between O6 of ring II and N6 of A¹⁴⁰⁶ for 4,5-linked aminoglycosides. The involvement of O6 in the linkage with ring III in tobramycin (a 4,6-linked aminoglycoside) prevents the formation of this water-mediated hydrogen bond to O4(U¹⁴⁰⁶), and no other functional group of tobramycin is in a proper orientation to interact with U¹⁴⁰⁶. Thus, instead of preventing a direct interaction between tobramycin and the residue at position 1406, the mutation U1406A would more likely cause a steric clash between N6(A¹⁴⁰⁶) and ring III of tobramycin. Tobramycin and the other 4,6-linked aminoglycosides are therefore probably unable to accommodate the U1406A mutation.

Enzymatic modifications, such as adenylation and acetylation, of the aminoglycosides are mainly aimed at the neamine part functional groups (e.g., O4', N3, and N6') [8, 35] that are involved in critical H bonds between the aminoglycoside and the RNA. It can be inferred from the present crystal structure that adding chemical groups on these positions would prevent the formation of conserved and specific hydrogen bonds between the antibiotic and its target.

Implications for Drug Design

The comparison of the paromomycin and tobramycin complexes provides some insights for drug design. It would be indeed interesting to investigate the binding of a molecule possessing both rings in positions 5 and 6 of ring II, instead of only one. Such a strategy would maximize the number of direct H bonds to the RNA. In addition, the structure of a dimeric kanamycin A nucleotidyl transferase, which catalyzes the addition of any

nucleotidyl group on position O4' of several aminoglycosides, has been solved by X-ray crystallography while it was complexed to two kanamycin A molecules [36]. It is noteworthy that the three rings of this 4,6-disubstituted antibiotic, close in chemical structure to tobramycin, keep the same chair conformations inside the modifying enzyme, whereas their orientations to one another, possibly because of rotations around the ether linkage, are different when compared to the conformation they adopt inside the A site pocket. It could be valuable to seek the antibiotic activity of a neamine derivative having a closed ring between N2' of ring I and O5 of ring II. Such a structure would prevent the rotations of the rings around the ether linkages. These modifications would also replace water-mediated intramolecular H bonds by covalent bonds and direct hydrogen bonds.

Significance

Small molecules binding to RNA targets have recently gained pharmaceutical interest [4, 37, 38]. Interaction of aminoglycoside antibiotics with the prokaryotic ribosomal A site is thought to be one of the sources of their bactericidal effect [8]. We have solved the structure of a complex formed by two tobramycin molecules and a construct containing two A sites. To our knowledge, this is the first X-ray crystal structure showing the interaction of a clinically used 4,6-linked aminoglycoside with the A site. Beyond the understanding of the molecular recognition and the specific resistance patterns observed in compounds belonging to this subclass, the analysis of the contacts and the comparison between this structure and the one solved with a 4,5-linked aminoglycoside paromomycin [21]

opens new directions for the development of alternative compounds with similar biological activities.

Experimental Procedures

RNA Synthesis, Purification, and Crystallization

The asymmetrical loop of the *Escherichia coli* A site (13 nucleotides) was inserted between Watson-Crick pairs in sequences designed to fold as double helices. These RNA sequences containing different lengths and ends were first checked for alternative 2D foldings with the program MFOLD [39] and then ordered from Dharmakon Research. (Boulder, CO).

Deprotected RNA oligonucleotides were purified to crystallization quality by denaturing gel electrophoresis (20% acrylamide:bisacrylamide [19:1]; 8 M urea) with TBE buffer (9 mM Tris borate [pH 8.3], 0.2 mM EDTA) at 50°C–55°C. The oligonucleotides were recovered by the "crush-and-soak" method at 4°C in 10 mM Tris (pH 7.5); 200 mM NaCl; and 0.5 mM Na EDTA for 48 hr with one buffer exchange, followed by ethanol precipitation. The pellets were washed with 95% ethanol, evaporated to dryness, and resuspended in milliQ water. Prior to crystallization experiments, tobramycin sulfate (Fluka, reference 89549) was dissolved at 28 mM in 50 mM Na cacodylate buffer (pH 6.4), and the RNA was annealed by heating at 85°C for 2 min followed by slow cooling (2 hr 30) to 37°C. Addition of tobramycin (at a final concentration of 2.2–2.3 mM) occurred at 37°C (5 min). Slow cooling then proceeded to 21°C. Hanging drops of 2 μ l were made under crystallization conditions similar to the conditions that enable the formation of complexes with paromomycin [21]. One volume of crystallization solution (1.5%–4% MPD [Fluka, reference 68338]; 1%–2% glycerol; 2.2–2.3 mM tobramycin; 100–250 mM NaCl or KCl; 50 mM Na cacodylate [pH 6.4]) plus 1 volume of annealing solution (1–1.1 mM RNA; 2.2–2.3 mM tobramycin; 12.5 mM NaCl; 5 mM MgSO₄; 75 mM Na cacodylate [pH 6.4]) were equilibrated against 500 μ l 40% MPD. Thin crystals or spherulites were obtained after 2–3 days for most of the sequences tested, but only one sequence, containing a 5'-UU overhang, lead to plates of approximately 600 \times 100 \times 10 μ m.

Data Collection and Processing

Crystals were equilibrated for 10 min in cryo-protecting solutions containing all the components present in the crystallization solution (but with 60%–70% MPD and 10%–20% glycerol) before being flash-cooled in liquid ethane (110 K). Data collection occurred at beamline ID14-2 of ESRF (Grenoble, France) up to a resolution of 2.54 Å (Table 1). Reflection files were indexed, scaled, and converted with Denzo [40] and the CCP4 suite [41]. The molecular replacement program AmoRe [42] found a correct solution ($F_{\text{corr}} = 49.3\%$ and R factor = 50.0%) in the resolution range 12.0–3.0 Å by using the structure of the complex containing paromomycin. The structure was refined with CNS version 1.0 [43], and the parameter and topology files for the antibiotics were calculated on the XDICT server [44]. One run of rigid-body refinement with neamine (containing only rings I and II of tobramycin) gave R and R_{free} factors of 37.1% and 37.7%, respectively. Occupancy factors were fixed to 1.0, and temperature B factors were set to 30.0 Å² and then refined isotropically on a 6–2.5 Å resolution range by torsion simulated annealing refinement (starting at 2500 K and cooling slowly at 50 K/min) and manual rebuilding in the calculated σ_A -weighted $3F_o - 2F_c$ and $F_o - F_c$ electron density maps.

The maps did not show any density for the 5'-UU overhang but showed clearly the density for the tobramycin in the two sites. However, as already observed in the structure with paromomycin, site 2 is less well defined than site 1. The density of the bulged adenines A17 and A18 is poorly defined, except for the phosphates and some of the sugar atoms. The algorithm of the software Buster [45] managed to calculate a better-defined density for the two bulged adenines, although the density of the base A18 remains poor. The refinement was pursued (in CNS) by the energy minimization protocol (8–2.54 Å/four cycles of 200 steps). After rearrangements of the substitutive groups on the antibiotic and careful addition of water molecules, the duplex was refined to reach a final R = 21.4% and an $R_{\text{free}} = 26.4\%$. The final model contains 900 RNA atoms, 64 tobramycin atoms, and 76 water molecules.

Acknowledgments

We are grateful to Vincent Mikol and Jean-Pierre Guilloteau at Aventis for encouragement and support. We gratefully thank Philippe Dumas, Eric Ennifar, Magali Mathieu, Benoît Masquida, and the people of beamline ID14-2 at ESRF (Grenoble, France) for their help with the data collection and refinement. We thank Pascal Auffinger and Frank Walter for helpful discussions. Q.V. is supported by a Bourse Docteur-Ingénieur from the Centre National de la Recherche Scientifique/Aventis.

Received: March 6, 2002

Revised: April 10, 2002

Accepted: April 15, 2002

References

- Hermann, T., and Westhof, E. (1998). RNA as a drug target: chemical, modelling, and evolutionary tools. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 66–73.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905–920.
- Sucheck, S.J., and Wong, C.H. (2000). RNA as a target for small molecules. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 678–686.
- Hermann, T. (2000). Strategies for the design of drugs targeting RNA and RNA-protein complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 1890–1905.
- Wilson, W.D., and Li, K. (2000). Targeting RNA with small molecules. *Curr. Med. Chem.* 7, 73–98.
- Ramakrishnan, V., and Moore, P.B. (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 144–154.
- Davies, J., and Davis, B.D. (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem.* 243, 3312–3316.
- Wright, G.D., Berghuis, A.M., and Mobashery, S. (1998). Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. In *Resolving the Antibiotic Paradox: Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics*. B.P. Rosen and S. Mobashery, eds. (New York: Plenum Press), pp. 27–69.
- Moazed, D., and Noller, H.F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327, 389–394.
- Purohit, P., and Stern, S. (1994). Interactions of a small RNA with antibiotics and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature* 370, 659–662.
- Miyaguchi, H., Narita, H., Sakamoto, K., and Yokoyama, S. (1996). An antibiotic-binding motif of an RNA fragment derived from the A-site related region of *Escherichia coli* 16S RNA. *Nucleic Acid Res.* 24, 3700–3706.
- Recht, M.I., Fourmy, D., Blanchard, S.C., Dahlquist, K.D., and Puglisi, J.D. (1996). RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* 262, 421–436.
- Blanchard, S.C., Fourmy, D., Eason, R.G., and Puglisi, J.D. (1998). rRNA chemical groups required for aminoglycoside binding. *Biochemistry* 37, 7716–7724.
- Wong, C.-H., Hendrix, M., Priestley, E.S., and Greenberg, W.A. (1998). Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chem. Biol.* 5, 397–406.
- Griffey, R.H., Hofstadler, S.A., Sannes-Lowery, K.A., Ecker, D.J., and Crooke, S.T. (1999). Determinants of aminoglycoside-binding specificity for rRNA by using mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10129–10133.
- Hyun Ryu, D., and Rando, R.R. (2001). Aminoglycoside binding to human and bacterial A-Site rRNA decoding region constructs. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 2601–2608.
- Fourmy, D., Recht, M.I., Blanchard, S.C., and Puglisi, J.D. (1996). Structure of the A-site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* 274, 1367–1371.
- Fourmy, D., Recht, M.I., and Puglisi, J.D. (1998). Binding of

Crystal Structure of the A Site Complexed to Tobramycin
755

- neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **277**, 347–362.
19. Yoshizawa, S., Fourmy, D., and Puglisi, J.D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.* **17**, 6437–6448.
 20. Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340–348.
 21. Vicens, Q., and Westhof, E. (2001). Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure* **9**, 647–658.
 22. Gonzalez, L.S.I., and Spencer, J.P. (1998). Aminoglycosides: a practical review. *American Family Physician*, www.aafp.org/afp/981115ap/gonzalez.html.
 23. Jiang, L., Suri, A.K., Fiala, R., and Patel, D.J. (1997). Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex. *Chem. Biol.* **4**, 35–50.
 24. Jiang, L.C., and Patel, D.J. (1998). Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 769–774.
 25. Wang, H., and Tor, Y. (1998). RNA-aminoglycoside interactions: design, synthesis and binding of "amino-aminoglycosides" to RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 109–111.
 26. Jin, E., Katritch, V., Olson, W.K., Kharatisvili, M., Abagyan, R., and Pilch, D.S. (2000). Aminoglycoside binding in the major groove of duplex RNA: the thermodynamic and electrostatic forces that govern recognition. *J. Mol. Biol.* **298**, 95–110.
 27. Wang, H., and Tor, Y. (1997). Electrostatic interactions in RNA aminoglycosides binding. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8734–8735.
 28. Hermann, T., and Westhof, E. (1999). Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds. *J. Med. Chem.* **42**, 1250–1261.
 29. Mikkelsen, N.E., Johansson, K., Virtanen, A., and Kirsebom, L.A. (2001). Aminoglycoside binding displaces a divalent metal ion in a tRNA-neomycin B complex. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 510–514.
 30. Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**, 775–781.
 31. Recht, M.I., Douthwaite, S., and Puglisi, J.D. (1999). Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* **18**, 3133–3138.
 32. Beauclerk, A.A., and Cundliffe, E. (1987). Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J. Mol. Biol.* **193**, 661–671.
 33. Taniguchi, H., Chang, B., Abe, C., Nikaido, Y., Mizuguchi, Y., and Yoshida, S.I. (1997). Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J. Bacteriol.* **179**, 4795–4801.
 34. Recht, M.I., and Puglisi, J.D. (2001). Aminoglycoside resistance with homogeneous and heterogeneous populations of antibiotic-resistant ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2414–2419.
 35. Azucena, E., and Mobashery, S. (2001). Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug. Resist. Updat.* **4**, 106–117.
 36. Pedersen, L.C., Benning, M.M., and Holden, H.M. (1995). Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase. *Biochemistry* **34**, 13305–13311.
 37. Xavier, K.A., Eder, P.S., and Giordano, T. (2000). RNA as a drug target: methods for biophysical characterization and screening. *Trends Biotechnol.* **18**, 349–356.
 38. Gallego, J., and Varani, G. (2001). Targeting RNA with small-molecule drugs: therapeutic promise and chemical challenges. *Acc. Chem. Res.* **34**, 836–843.
 39. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* **288**, 911–940.
 40. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1996). Processing of X-Ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods Enzymol.* C.W. Carter, Jr. and R.M. Sweet, eds. (New York: Academic Press).
 41. CCP4 (Collaborative Computational Project 4) (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**, 760–763.
 42. Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A* **50**, 157–163.
 43. Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* **54**, 905–921.
 44. Kleywegt, G.J., and Jones, T.A. (1997). Model-building and refinement practice. In *Methods Enzymol.* C.W. Carter, Jr and R.M. Sweet, eds. (New York: Academic Press), pp. 208–230.
 45. Bricogne, G. (1993). Direct phase determination by entropy maximization and likelihood ranking: status report and perspectives. *Acta Crystallogr. D* **49**, 37–60.
 46. Kleywegt, G.J. (1996). Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement. *Acta Crystallogr. D* **52**, 842–857.

Accession Numbers

The structure has been entered in the Protein Data Bank with ID code 1LC4.

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

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

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

² Les références citées dans la publication mais non mentionnées dans le corps de la thèse ne sont pas reprises en fin de manuscrit.

JMBAvailable online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®



Crystal Structure of Geneticin Bound to a Bacterial 16 S Ribosomal RNA A Site Oligonucleotide

Quentin Vicens and Eric Westhof*

*Institut de Biologie Moléculaire
et Cellulaire du CNRS
Modélisation et simulations
des Acides Nucléiques
UPR 9002, Université Louis
Pasteur, 15 rue René Descartes
67084 Strasbourg Cedex
France*

Aminoglycosides are antibacterial molecules that decrease translation accuracy by binding to the decoding aminoacyl-tRNA site (A site) on 16 S ribosomal RNA. We have solved the crystal structure of an RNA fragment containing the A site bound to geneticin at 2.40 Å resolution. Geneticin, also known as G418, is a gentamicin-related aminoglycoside: it contains three rings that are functionalized by hydroxyl, ammonium and methyl groups. The detailed comparison of the distinctive behaviour of geneticin (binding to pro- and eukaryotic A sites) with the crystallographic, biochemical and microbiological results obtained so far for aminoglycoside-A site complexes offers new insights on the system. The two sugar rings constituting the neamine part common to most of the aminoglycosides bind to the A site, as already observed in the crystal structures solved previously with paromomycin and tobramycin. The essential hydrogen bonds involving ring I (to A1408) and ring II (to the phosphate oxygen atoms of the bulged adenine bases 1492 and 1493 and to G1494) are conserved and additional contacts are observed from ring III (to phosphate oxygen atoms of G1405 and U1406). The present work illustrates a molecular basis of the range in sensitiveness exhibited by geneticin towards common point A site mutations associated to resistance phenotypes. In addition, analysis and comparisons of the structures cast light on the role played by the conserved U1406-U1495 pair in the recognition of the A site by aminoglycosides.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

Keywords: aminoglycoside–RNA interactions; antibiotic toxicity; geneticin; ribosomal A site; X-ray crystal structure

*Corresponding author

Introduction

In recent years, an escalating number of three-dimensional NMR and X-ray structures of RNA–ligand complexes displaying atomic details of natural and artificial RNA targets bound to antibiotics (macrolides,^{1,2} tetracyclines,^{3,4} aminoglycosides,^{3,5–9}) and newly designed molecules¹⁰ has been published. The goal of these efforts is to understand the physico-chemical rules controlling the specific binding modes of these inhibitors to RNA with the hope of designing new compounds that could help circumvent the antibiotic resistance crisis.

Aminoglycosides are positively charged sugar derivatives that possess several ammonium and hydroxyl functionalities.^{11,12} On the basis of their

chemical structures, the aminoglycosides can be split into two main sub-classes: one that incorporates 2-deoxystreptamine (2-DOS) derivatives and one that does not. The first group can be subdivided into three sub-classes depending on the substitution pattern of the 2-DOS ring. The 2-DOS ring can be functionalized at different positions: at position 4 (e.g. for apramycin), at positions 4 and 5 (e.g. for paromomycin and neomycin) or at positions 4 and 6 (e.g. for tobramycin and geneticin) by sugar rings bearing different ammonium and methyl groups.¹³ In addition to the 2-DOS ring (ring II), the 4,5- and 4,6-disubstituted aminoglycosides have ring I in common. These two rings constitute the neamine moiety (Figure 1).

Aminoglycosides interfere with protein synthesis¹⁴ by binding to different regions of the 30 S ribosomal particle depending on their chemical structure.⁷ The 4-substituted, the 4,5- and the 4,6-disubstituted aminoglycosides are micromolar ligands of the eubacterial ribosomal decoding aminoacyl-tRNA site (A site).^{15–17} Among them, the 4,6-disubstituted geneticin, also known as

Abbreviations used: 2-DOS, 2-deoxystreptamine; MIC, minimal inhibitory concentration; PDB, Protein Data Bank; MPD, 2,4-methyl pentane diol.

E-mail address of the corresponding author: e.westhof@ibmc.u-strasbg.fr

1176

Geneticin Bound to the Eubacterial Ribosomal A Site

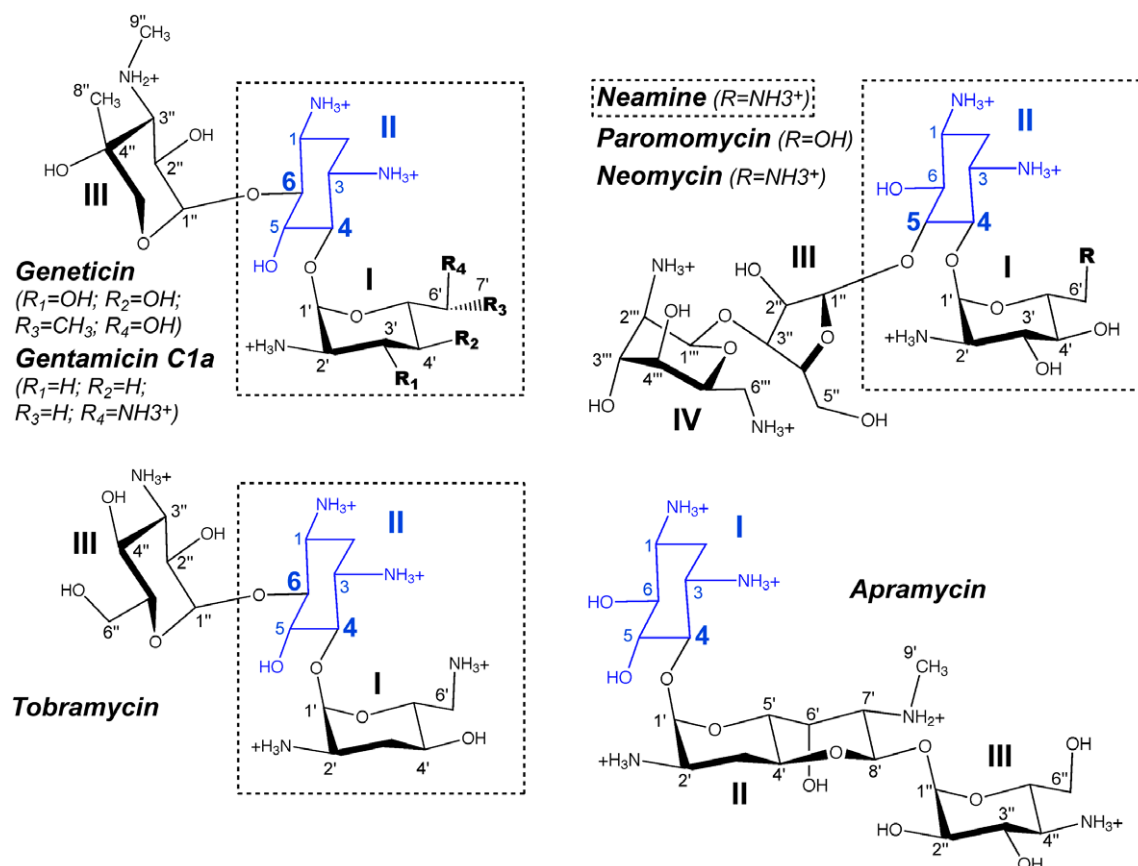


Figure 1. Chemical structures of aminoglycosides that bind to the A site. The common 2-deoxystreptamine ring is shown in blue.

gentamicin G or G418, has been shown to be toxic (like paromomycin in some instances) to eukaryotic organisms such as unicellulars, protozoans, worms,^{18–21} yeasts²² and mammals²³ by binding to the 80 S ribosome.²⁴ Although with some limitations due to its toxicity to human ear and kidney cells,^{25,26} geneticin is used in medicine as an anti-parasitic agent. Some medical efforts are being pursued in the cure of infections by parasites fatal to people suffering from AIDS.²⁷ Moreover, administration of geneticin²⁸ or related gentamicins²⁹ has proven helpful in the treatment of patients suffering from genetic disorders.³⁰ In molecular biology, geneticin is routinely employed as a selection marker in eukaryotic cells transfected with a gene coding for an enzyme that inactivates the aminoglycoside.^{22,23,31,32} These various applications illustrate that geneticin retains a high biological and pharmaceutical interest despite the wide-spread aminoglycoside resistance and toxicity^{25,26} phenomenon.^{33,†}

In the 1970s, the differences in the aminoglycoside activity on protein synthesis were shown to be related to the number and location of the functional groups on the neamine moiety.³⁴ The first molecular insights into the aminoglycoside binding mode were obtained in the late 1990s by nuclear magnetic resonance (NMR) of paromomycin³⁵ and gentamicin C1a³⁶ bound to a 27 nucleotide stem-loop containing the A site. In the last two years, X-ray crystal structures were solved for paromomycin bound to the 30 S ribosomal particle, in the absence^{7,37} and in the presence³⁷ of cognate tRNA and mRNA. We have obtained, at 2.50 Å and 2.54 Å resolution, respectively, the crystal structures of paromomycin and tobramycin bound to 40 nucleotide RNA constructs containing the A site.^{8,9} The fact that the aminoglycosides bind similarly to the deep groove of the A site in the crystal structures of the complexes with the 30 S particle and with the small RNA fragment demonstrates that the results of our crystallographic studies are biologically relevant. Besides, the neamine moiety interacts with the conserved nucleotides of the A site in the same way for the 4,5- and 4,6-disubstituted compounds.

Here we report the structure of geneticin (Figure 1) bound to the eubacterial ribosomal

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

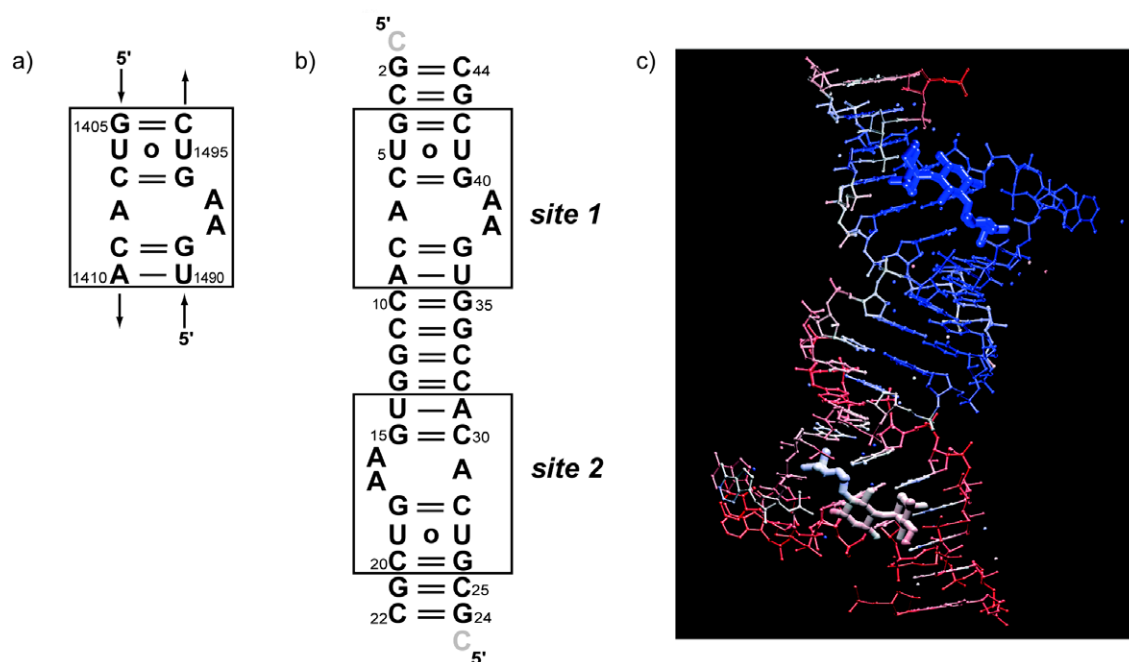


Figure 2. Secondary and 3D structures of the geneticin complex. (a) Secondary structure of the A site from the *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. (b) Secondary structure of the crystallized RNA fragment. The two A sites are boxed and the 5'-cytosine overhangs not observed in the electron density are shaded. (c) Crystal structure of the RNA fragment bound to geneticin. The structure is colored according to the B -factor values, from blue ($\approx 30 \text{ \AA}^2$) to red ($\approx 90 \text{ \AA}^2$) through white ($\approx 60 \text{ \AA}^2$).

decoding A site at 2.40 \AA resolution. Whereas the common neamine moiety binds similarly to the A site in the paromomycin, tobramycin and geneticin complexes (referred to as P/A, T/A and G/A complexes, respectively, in the following), contacts specific to geneticin are observed for ring III. The comparisons of the precise interactions involving the aminoglycoside functional groups and the A site in the several crystal structures of the different complexes help to unravel the contribution of each interaction to the binding. Furthermore, the combination of microbiological data, phylogenetic analysis and investigation of the present crystal structure supplies molecular details into the origin of the geneticin-induced toxicity. The rationalization of these results indirectly offers new clues for the design of active compounds.

Results

Overall structure of the G/A complex

RNA fragments incorporating the eubacterial A site proved to be successful in the crystallization of the P/A and T/A complexes.^{8,9} For the G/A complex, narrow plates suitable for X-ray data collection were obtained using the sequence containing a 5'-cytosine overhang⁸ (Figure 2(a) and (b)). The space group is $P2_1$ (compared to $P2_12_12_1$ for the P/A complex and $P2_1$ for the T/A complex)

and the cell parameters are similar to the parameters of the T/A structure (Tables 1 and 2). This structure was therefore chosen to solve the structure of the G/A complex by molecular replacement at 2.40 \AA resolution. The final R and R_{free} values are 22.4% and 25.0%, respectively (Table 1).

As in the P/A and T/A structures, the RNA oligonucleotides of the G/A complex form a double helix containing 16 Watson-Crick pairs, two U-U pairs, two unpaired and four bulged adenine bases (Figure 2(c)). The neamine moiety (rings I and II) binds similarly to the two A sites of the RNA fragment (Figures 3 and 4). The superimposition based on the atoms common to tobramycin and geneticin gives a root-mean-square (RMS) deviation of 0.2 \AA . The binding of the neamine moiety compels adenine bases 1492 and 1493 of each site to swing away from the helix allowing them to form base-triples with G-C pairs of symmetry-related complexes. These packing contacts are analogous in the three complexes solved. As noticed previously,^{8,9} one of the two sites (site 1) is better defined than the other one (site 2) (Figure 3). However, unexpectedly, the electron density is not as poor in site 2 of the G/A complex as in site 2 of the T/A and P/A complexes, so that alternate conformations (referred to as conformers 1 and 2) could be refined for residues 1492–1494 (Figure 3(b)). As a result, the B -factors, which were above 100 \AA^2 in site 2 at the beginning of the refinement, decreased to

Table 1. Crystallographic statistics

A. Data collection		
Resolution range (Å) ^a	25.0–2.40 (2.49–2.40)	
Beamlines	ID14-EH1/EH4	
Wavelength (Å)	0.934	
Space group	P2 ₁	
Unit cell parameters (Å)	$a = 46.2; b = 33.2; c = 51.8 \beta = 104.1^\circ$	
Number of observations	24,145	
Number of unique reflections ^a	5466 (566)	
Redundancy	4.8	
Completeness (%) ^a	88.8 (92.8)	
Average I/σ^a	39.3 (6.7)	
R_{sym} (%) ^{a,b}	6.2 (21.1)	
B. Refinement		
Resolution range (Å) ^a	25.0–2.40 (2.49–2.40)	
Number of reflections used in refinement	5334	
Reflections excluded for cross-validation (%)	5	
RMS deviation for bonds (Å)	0.007	
RMS deviation for angles (deg.)	1.2	
	Site 1-containing part (residues 2–11 and 34–44)	Site 2-containing part (residues 11–22 and 24–33)
$\langle B\text{-factor}_{\text{overall}} \rangle$ (Å ²)	46.7	67.0
$\langle B\text{-factor}_{\text{RNA}} \rangle$ (Å ²)	47.4	68.1
$\langle B\text{-factor}_{\text{geneticin}} \rangle$ (Å ²)	38.2	59.7
$\langle B\text{-factor}_{\text{solvent}} \rangle$ (Å ²)	50.1	53.7
Minimum B -factor (Å ²)	28.3	31.6
Maximum B -factor (Å ²)	90.1	103.6
R factor (%) ^c	22.4	
R_{free} (%)	25.0	

^a Values for last shell are given in parentheses.
^b $R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, where I is the measured intensity of each reflection and $\langle I \rangle$ is the intensity averaged from multiple observations of symmetry-related reflections.
^c $R\text{-factor} = \sum |F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$.

60–80 Å², values higher than those in site 1 (30–55 Å²; Figure 2(c)). The 5' cytosine overhangs are disordered and account for the highest B -factors of the structure observed for the guanine bases of the terminal base-pairs (90–104 Å²).

Detailed interactions between geneticin and the A site

A subset of the hydrogen bonds observed from the functional groups common to the three antibiotics to the A site RNA are identical (Supplementary Material). In site 1 and site 2 (conformer 1), geneticin makes 14 direct hydrogen bonds to base atoms and phosphate oxygen atoms of the A site (Figure 5). Ring I intercalates inside the helix by flipping out adenine bases 1492 and 1493 and by

stacking against G1491 (Figure 5(f)). Two hydroxyl groups make hydrogen bonds to the phosphate oxygen atoms of the bulged adenine bases whereas the two other hydroxyl groups contact the Watson–Crick sites of the unpaired adenine 1408 (Figure 5(e)). In comparison to tobramycin and paromomycin, the exocyclic C6' is chiral for geneticin (Figure 1). It is nevertheless oriented as in the P/A complex with O6' contacting N1 of A1408. The additional methyl group C7' points to the middle of the G1491–C1409 pair and induces a higher rise and a smaller propeller-twist angle of that base-pair (–12° compared to –23° and –19° for the T/A and P/A complexes) (Figures 4(c), 5(e) and (f)). As in the T/A and P/A complexes, the central ring II makes intramolecular hydrogen bonds to the other rings and ammonium N3 is

Table 2. Characteristics of the three complexes

	G/A complex (present work)	T/A complex ⁹	P/A complex ⁸
Resolution (Å)	2.40	2.54	2.50
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell parameters (Å)	$a = 46.2, b = 33.2, c = 51.8,$ $\beta = 104.1^\circ$	$a = 46.9, b = 32.8, c = 52.0,$ $\beta = 107.9^\circ$	$a = 33.0, b = 45.9,$ $c = 95.3$
R/R_{free} (%)	22.4/25.0	21.4/26.4	20.6/24.7
Nature of the 5' overhang	C	UpU	C
2-DOS sub-class	4,6-Disubstituted	4,6-Disubstituted	4,5-Disubstituted
Number of positive charges of the antibiotic around neutral pH values ^{8,9,68,69}	4	5	5

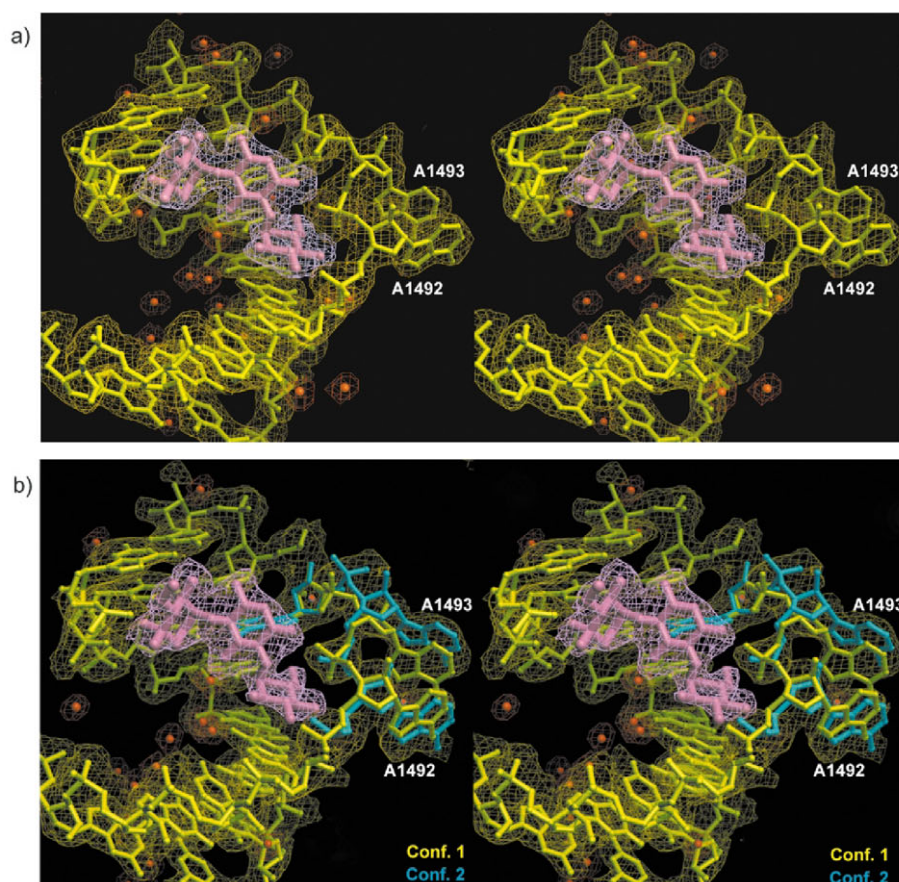


Figure 3. Stereo views of the experimental electron density maps corresponding to the deep grooves of site 1 (a) and site 2 (b). The RNA (yellow), the geneticin (magenta) and the solvent molecules (red) are superimposed on a $3F_o - 2F_c$ composite annealed omit map contoured at 1.2σ (6% of the model omitted for the calculation). The alternate conformation of residues 1492–1494 is colored in cyan.

fully dehydrated. A direct contact from ring II to O4 of U1495 stabilizes the U1406-U1495 pair in a shifted form. In addition, the shifted geometry is maintained by a supplementary contact from O4'' to O2P of U1406 (Figure 5(c)). This additional contact provokes a 0.8 Å shortening of the C1'–C1' distance (from 10.6–10.5 Å in the T/A and P/A complexes to 9.8 Å in the G/A complex) that is likely responsible for the absence of the water molecule observed in the other structures between N3 of U1406 and O2 of U1495 (Figure 4(d)).

The differences in chemical groups between geneticin and the related 4,6-linked tobramycin are essentially located on ring III. The hydroxyl group O2'' and the ammonium group N3'' are conserved and make similar contacts to the Hoogsteen sites of G1405 (Figure 5(b)). In addition, N3'' makes one hydrogen bond to the O2P of the same guanine. Geneticin and tobramycin are epimeric for hydroxyl O4''. Therefore, whereas O4'' is not in a position to make any contact to RNA in the T/A complex, it makes a hydrogen bond to the O2P of U1406 in the G/A complex (Figure 5(c)). Ring III

bears also two methyl groups that point away from the RNA. Finally, ring III of geneticin does not contain the hydroxyl O6'' present in tobramycin (interestingly, in the tobramycin complex, O6'' was not involved in any contact).

In site 2, the alternate conformer 2 shows displacements of the phosphate oxygen atoms and of the bases that modify the interactions between rings I and II of geneticin and the phosphate groups of residues 1492–1494 (Figures 3(b) and 6). The major displacement is observed for adenine 1493. The hydrogen bond from O4' of ring I to O2P (A1493) is replaced by a hydrogen bond to the O1P of the same nucleotide. The direct hydrogen bond observed from N3 of ring II to O1P (A1493) is replaced by a contact to a water molecule (Figure 6).

Despite the slightly higher resolution obtained for the G/A complex (2.40 Å) (Table 2), fewer solvent molecules were refined in the final model (40 against 54 and 76 for the P/A and T/A complexes, respectively). Consequently, some of the water-mediated contacts that were observed from ring I

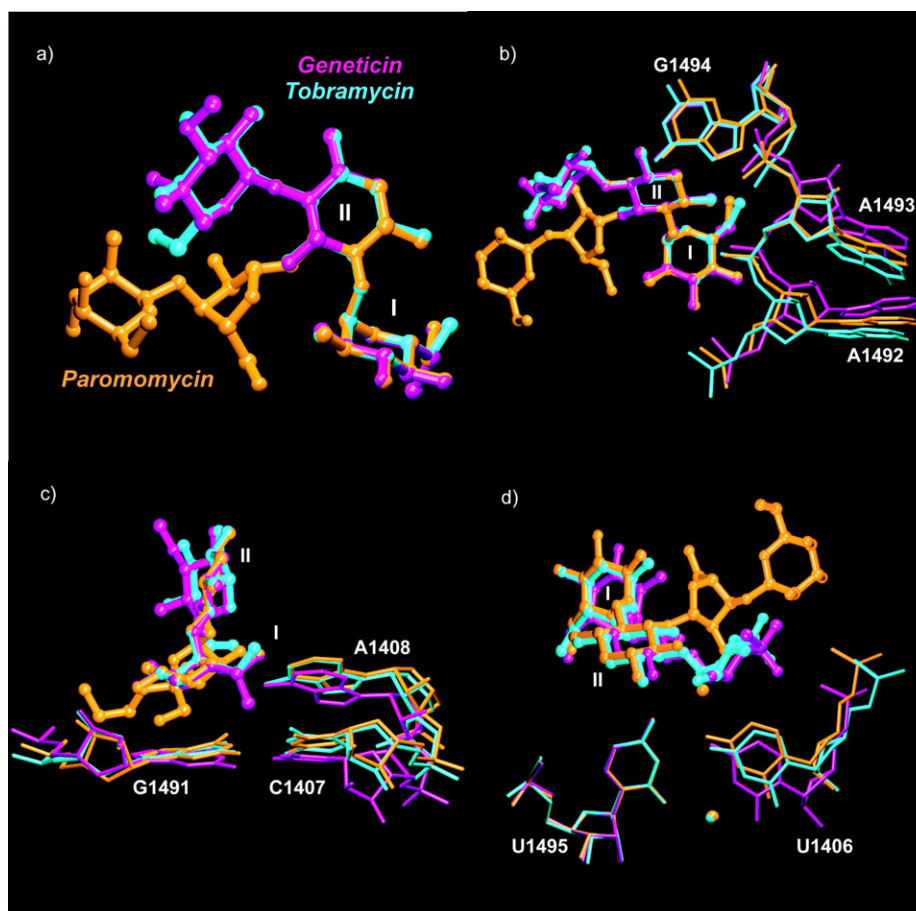


Figure 4. Superimposition of aminoglycosides bound to the A site. (a) Superimposition of geneticin (magenta), tobramycin (cyan) and paromomycin (gold) in the conformations they adopt when bound to site 1. The superimposition is based on ring atoms of rings I and II. The orientation is the same as in Figure 3. (b)–(d) Detailed views of the conformations of the A site residues bound to the three different antibiotics. The superimposition is based on rings I and II of the antibiotics in views (b) and (c), and on uracil 1495 in view (d). The RNA nucleotides are colored according to the bound antibiotic.

in the T/A complex are not observed in the present structure. However, the water molecule mediating the intramolecular hydrogen bond between rings I and II is observed in the two sites, as in the T/A complex. In addition, N1 on ring II binds to a water molecule (in site 1 only). The methyl groups that point away from the RNA might be responsible for a local disturbance of the hydration shell that is observed in the other complexes, therefore accounting for the global decrease of observed solvent molecules bound to the complex.

Crystal packing

The crystal packing contacts involve side-by-side interactions and head-to-tail stacking of helices along the X and Y axis as well as hydrogen bonds involving the bulged adenine bases of each site along the Z axis (Figure 7). The twist angle between the base-pairs at the head-to-tail interface of stacked helices is approximately 90°. Therefore, in this type of pseudo-infinite helix, the adenine

bases of site 1 point in the same direction and the adenine bases of site 2 in the opposite direction along the Z axis. Adenine bases 1492 and 1493 of site 1 form, respectively, type II (sugar–sugar *cis*) and type I (sugar–sugar *trans*) base interactions^{38,39} by making direct hydrogen bonds to the shallow groove of two stacked G=C pairs located in the middle of a symmetry-related molecule (Supplementary Material). In site 2, A1492 forms a type II interaction to a C=G pair, whereas the tight type I interaction observed with A1493 in site 1 is replaced by H-bonds involving only N1 and N6 of the adenine in the shallow groove of a G=C pair (Supplementary Material). Consequently, the A-minor motif does not occur in site 2 and the intermolecular interactions involving the bulged adenine bases of site 2 are weaker than those involving adenine bases of site 1. This is further sustained by the two conformations that were refined for residues 1492–1494 in site 2. As a result, by relying only on these interactions, the growth of the crystal along the Z direction is likely to be slow,

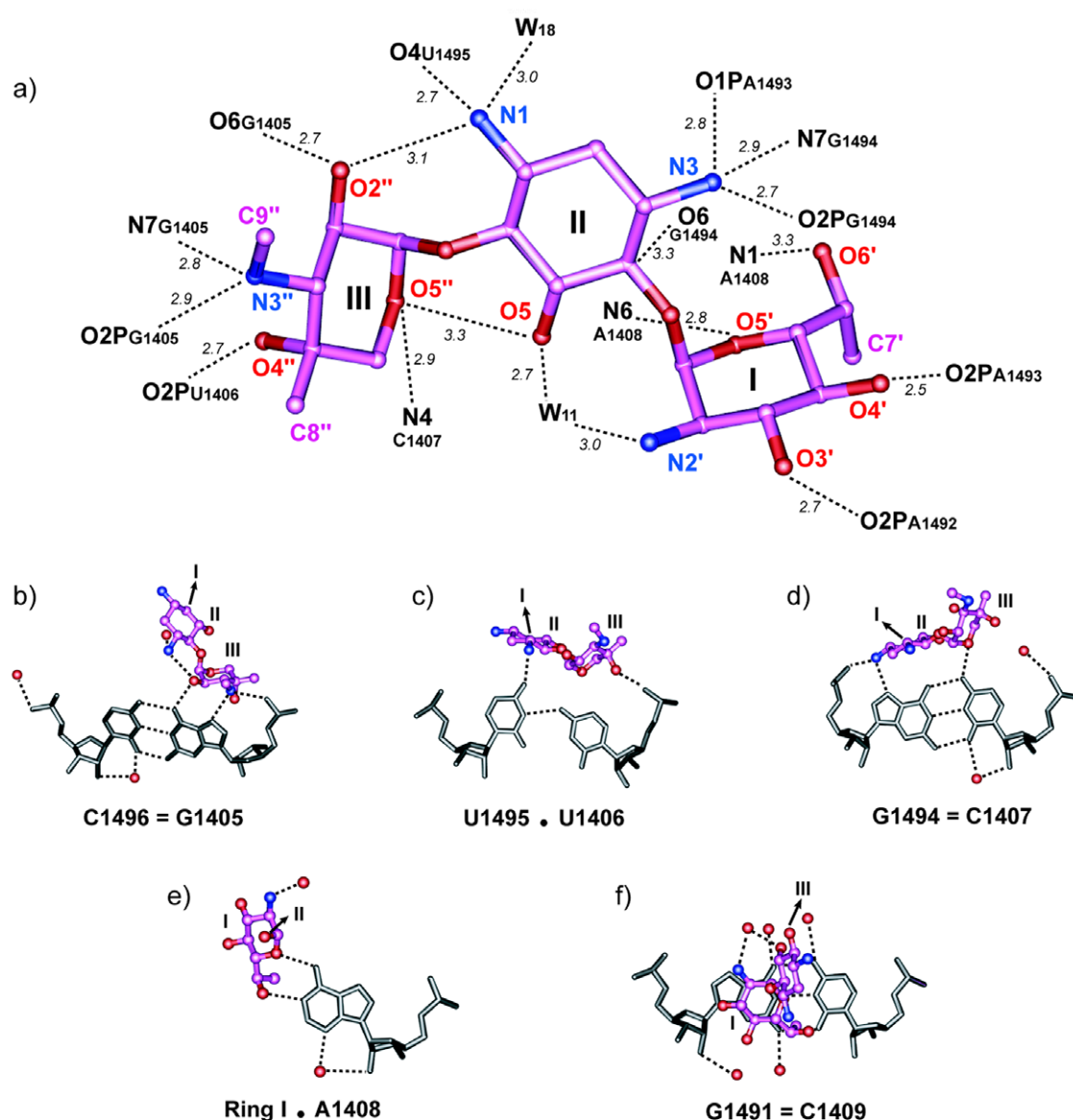


Figure 5. Detailed interactions of geneticin with the RNA in the A site. (a) Close up showing the hydrogen bonds established between geneticin, the A site residues and the solvent molecules in site 1. Geneticin is oriented as for Figure 3. (b)–(f) Atomic details of the interactions involving each nucleotide of the A site and geneticin. Geneticin is colored as in (a) (for the purpose of clarity, interacting rings only are shown in each subset, a black arrow points to the missing rings). The RNA and solvent molecules are shown as grey sticks and red spheres, respectively.

which may account for the thinness of the crystals observed in that direction (10 μm).

Discussion

Compatibility with the 30 S particle structures

We developed a system that proved to be successful in the crystallization of three aminoglycosides belonging to distinct sub-groups: paromomycin (a 4,5-2-DOS derivative),⁸ tobramycin

(a 4,6-2-DOS derivative of the kanamycin sub-group),⁹ and geneticin (a 4,6-2-DOS derivative of the gentamicin sub-group). As already observed for the T/A and P/A complexes, the structure of the A site inside the G/A complex is close to the conformation of the A site bound to paromomycin in the 30 S particle.³⁷ The binding of geneticin therefore induces a similar bulged out conformation for adenine bases 1492 and 1493 (Figure 4(a) and (b); Supplementary Material). Alignment of the sugar-phosphate backbones of the nucleotides forming the A site (RMS deviation = 0.7 Å)

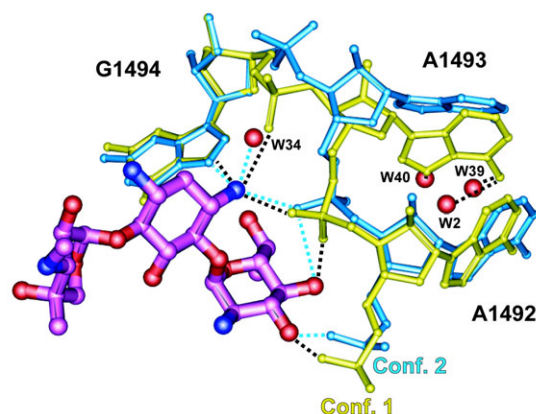


Figure 6. Detailed interactions between geneticin and the alternate conformations in site 2. The orientation is similar to the view shown in Figure 3. Conformers 1 and 2 are drawn in yellow and cyan, respectively. Associated solvent molecules are shown in red.

results in RMS differences of 2.4 Å and 1.3 Å between the bulged adenine bases in sites 1 and 2, respectively, of the present structure and those inside the 30S particle in complex with paromomycin, mRNA and tRNA (Supplementary Material).³⁷ In addition, the crystal structure of the G/A complex shows various types of base-triple interactions involving A1492, A1493 and the

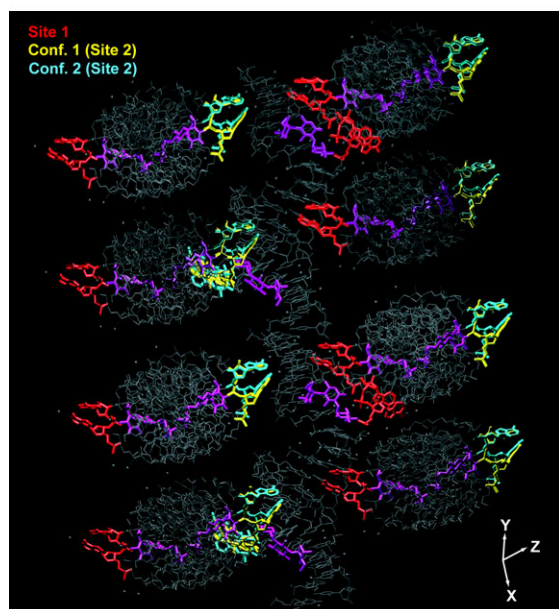


Figure 7. Crystal packing. Eight symmetry-related molecules are drawn around two reference molecules packed head-to-tail and oriented as shown in Figure 2(c). The geneticin molecules are shown in magenta. The bulged adenine bases are shown in red (site 1), yellow (conformer 1, site 2) and cyan (conformer 2, site 2). The orientation of the unit cell axis is shown at the bottom right.

shallow groove of Watson–Crick pairs belonging to symmetry-related fragments. Adenine bases 1492 and 1493 are mobile inside the free ribosome⁴⁰ and bulge out in order to bind and recognize the four types of the Watson–Crick pairs formed by the cognate mRNA (codon)–tRNA (anticodon) helix.³⁷ By binding to the A site, the aminoglycoside paromomycin stabilizes these particular interactions involving the rRNA, tRNA and mRNA, thereby leading to a loss of discrimination between cognate and near-cognate codons. The A-minor motif^{38,39} observed in site 1 of the G/A complex mimics the decoding as it has been inferred from the structure of the 30S particle bound to paromomycin, tRNA and mRNA.³⁷ The structure of the G/A complex therefore supports the effective binding mode of the aminoglycosides and the presently accepted model^{37,41} for the role of the universally conserved adenine bases in the decoding mechanism.

Comparison with the gentamicin C1a/A site complex solved by NMR

The only other structural information available for aminoglycosides of the gentamicin group binding to the A site comes from an NMR structure of gentamicin C1a complexed to a 27 nucleotide stem-loop containing the A site (PDB identifier: 1BYJ).³⁶ Compared to geneticin (a 4,6-2-DOS aminoglycoside containing a 6'-OH), gentamicin C1a (a 4,6-2-DOS aminoglycoside containing a 6'-NH₃⁺) lacks hydroxyl groups O3' and O4', as well as methyl group C7' on ring I (Figure 1). Rings II and III are therefore homologous in the two antibiotics. The conformation of geneticin in the G/A complex is roughly similar to the conformation of gentamicin C1a in the NMR structure (RMS difference based on the ring atoms common to both antibiotics = 0.7 Å) (Supplementary Material). However, the RNA conformations display differences, which cause dissimilarity in the number and type of hydrogen bonds involving the antibiotic and the RNA. In the gentamicin C1a complex, adenine bases 1492 and 1493 do not bulge out from the helix and the U1406-U1495 pair is roughly symmetrical (<distance (N3–N3) > ≈ 4.1 Å and <distance (O4–O4) > ≈ 2.8 Å in the 38 deposited NMR structures). Consequently, RMS deviations between each set of the two bulged adenine bases observed in the G/A complex and the adenine bases of a single representative structure of the gentamicin C1a complex are between 5.4–6.0 Å (Supplementary Material). In addition, whereas ring I stacks against G1491 in the NMR structure as well, it does not bind to A1408 as observed in the G/A complex. Furthermore, the ammonium N3 on ring II is not fully dehydrated in the gentamicin C1a complex. The four direct hydrogen bonds observed between ring III of geneticin and residues 1405 and 1406 are shorter (2.7–2.9 Å) than the similar contacts observed in the gentamicin C1a complex

(3.3–4.0 Å). The NMR structure of the gentamicin C1a complex delineated the binding site properly, but by being in agreement with the 30 S particle structures,^{7,37} the crystal structure of the G/A complex provides a more detailed and accurate description of the binding mode of a gentamicin compound to the eubacterial A site.

Compatibility with results from biochemistry and microbiology

Aminoglycosides bind to the prokaryotic A site with dissociation constants (K_d) in the 1–2 μM range.^{42,43} Neomycin seems to exhibit more affinity to the A site ($K_d \approx 0.05 \mu\text{M}$), probably because of its additional positive charge (Figure 1 and Table 2). Even if no binding data has been obtained for geneticin to date, it can be inferred from the binding measurements previously performed on several closely related aminoglycosides that geneticin would bind with similar affinity to the A site. In addition, the conserved binding mode of the aminoglycosides (more than half of the hydrogen bonds observed in the G/A, T/A and P/A complexes are identical) is consistent with a dissociation constant for geneticin in the micromolar range.

The present work is consistent with the minimal inhibitory concentrations (MICs) measured *in vivo* for wild-type bacteria and for resistant bacteria bearing mutated A sites.^{44–48} The MIC values for the wild-type A site are 5, 2.5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for geneticin, tobramycin and paromomycin, respectively.^{47,48} The MIC value for paromomycin increases to 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for a mutant possessing an A1408G mutation in the 16 S ribosomal RNA, whereas it remains unchanged for geneticin.^{47,48} The A1408G mutation also causes severe resistance against tobramycin.^{44,45} This mutation is the only mutation to be found in pathogens having acquired resistance *in vivo*.^{44–46} As discussed previously,⁸ a mutation of A to G would likely disturb the formation of the pseudo-base-pair between ring I of the aminoglycoside and residue 1408. This disruption has a less strong effect on some 4,6-disubstituted aminoglycosides,⁴³ probably because their binding to the A site can rely on the several direct hydrogen bonds made to G1405 located three base-pairs away from residue 1408.⁹ In addition, the MIC value measured for several different aminoglycosides^{45,47,48} show that this mutation essentially affects the antibiotics having an ammonium group at the 6' position (100–200 fold increases in MIC for tobramycin, neomycin, kanamycin A and gentamicin C). The presence of an ammonium group at the 6' position had been shown to be sufficient to prevent the binding to the eukaryotic A site.^{34,47} Remarkably, the A1408G mutation reveals a less strong effect for paromomycin (a 4,5-2-DOS aminoglycoside containing a 6'-OH group) and no effect on geneticin (a 4,6-2-DOS aminoglycoside containing a 6'-OH group).⁴⁷ These results support the idea that

the presence of a hydroxyl at position 6' is a more important feature for the binding to the mutated A site than the substitution type of the 2-DOS (4,5- or 4,6-disubstitution).⁴⁷ A hydroxyl group at position 6' would avoid repulsion with the N1 and N2 atoms of guanine 1408 and would be able to make hydrogen bonds equally to a donor or an acceptor Watson–Crick site.

Another previously reported mutation, U1406A, has been shown to present a phenotype opposite to those of the A1408G mutation. It selectively prevents the binding of 4,6-disubstituted antibiotics, regardless of the nature of the substituent at the 6' position.⁴⁸ Noteworthy, the 4,6-disubstituted compounds are less affected by this mutation than the 4,5-disubstituted antibiotics by the A1408G mutation. N1 of ring II of the 4,5-disubstituted paromomycin makes a direct hydrogen bond to O4 of U1495 and O6 of ring II makes a water-mediated hydrogen bond to O4 of U1406 (Figure 4(d)). As previously mentioned,⁹ the mutation of the U1406-U1495 pair to an A1406-U1495 pair (canonical or not) would probably replace the water-bridged hydrogen bond to O4 of U1406 by a direct hydrogen bond to N6 of A1406. In the 4,6-disubstituted aminoglycosides, O6 is involved in the covalent linkage to ring III and the mutation would cause a clash between adenine 1406 and ring III. Remarkably, in addition to the conserved hydrogen bond to O4 of U1495, geneticin makes a direct hydrogen bond from O4'' to O2P of U1406 (Figures 4(d) and 5(c)). Geneticin seems to be slightly more affected by the mutation, probably because the formation of the A1406-U1495 pair would move O2P of residue 1406 too far away to interact with O4'' of ring III. As previously suggested on the basis of microbiological data,^{44,46–48} the present analysis sustains that resistance is produced in the mutated strains by a decreased affinity of the aminoglycoside to the A site.

Insights into human toxicity

Aminoglycosides are highly toxic to mammals, through kidney and ear-associated illnesses.^{25,26,49} This toxicity, whose origin is still controversial, probably results from a combination of different mechanisms, depending on the number of positive charges on the antibiotic, on the antibiotic concentration in the cell and on the organ where the toxicity develops. Known mechanisms include: production of hydroxyl radicals by geneticin/metal ion complexes^{49–51} and disturbance of membrane functionalities by interaction with phospholipids and inhibition of the activity of the phospholipases.²⁶ Geneticin has four positive charges around neutral pH values, compared to five for paromomycin and tobramycin (Table 2). Its electrostatic interactions with the acidic phospholipids might therefore be different from that of aminoglycosides bearing five charges (review²⁶) but its transport through the

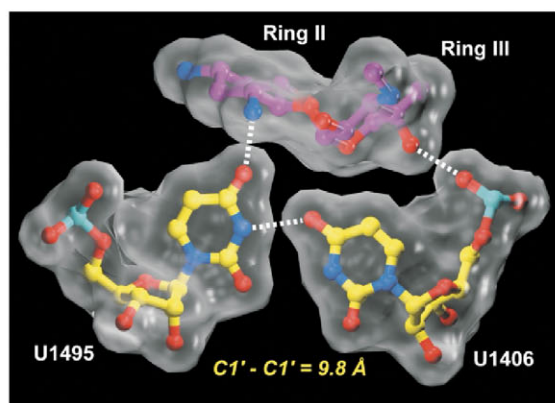


Figure 8. Geneticin bound to the shallow groove of the U1495-U1406 pair. The view is similar to that shown in Figure 5(c). The interaction is shown in surface representation. Ring I of geneticin is omitted for clarity.

hydrophobic core of the membrane could be facilitated. The binding of some aminoglycosides like paromomycin and more remarkably geneticin to the eukaryotic A site has also been considered as a possible source of toxicity.^{24,52} Phylogenetic analysis reveals that sequence differences in the A site between prokaryotic and eukaryotic organisms are observed for three nucleotides (rRNA sequences from the Ribosomal Database Project II server⁵³). Whereas prokaryotes universally have an adenine at position 1408, eukaryotes always have a guanine. The 1409–1491 base pair is a C=G for 80% of the prokaryotes (the remaining 20% have an A-U pair), and for 40% of the eukaryotes (the remaining 60% have a C-A pair). In addition to binding to the wild-type prokaryotic A site, geneticin has been shown to bind to the A site of a wide variety of protozoa and parasites.^{20,21,27} Since all these eukaryotic organisms have a G1408 and a C1409=G1491 pair, their A site is similar to the A1408G naturally mutated prokaryotic A site. Therefore, apart from the differences that might occur in the cell uptake and in the antibiotic concentrations inside the cell, we can expect that geneticin is able to interfere with the protein synthesis in these eukaryotic organisms by binding to the A site and producing a similar conformational change.

Interestingly, geneticin also binds to yeast²² and higher eukaryotes, which have a G1408 but a C1409-A1491 pair, and to prokaryotes having an A1409-U1491 pair (E. C. Böttger, personal communication). Hence, geneticin seems to be able to accommodate three different types of base-pairs at position 1409–1491 (G=C, C-A, A-U). Whereas paromomycin makes a direct hydrogen bond to N7 of G1491, tobramycin only forms a water-mediated hydrogen bond and no contacts are observed for geneticin. This would imply that different base-pair geometries can be accommodated by geneticin (and less easily or not at all by the

other aminoglycosides), as long as these pairs allow stacking against ring I. Stacking of six-membered rings in the chair conformation against aromatic rings has been observed for small molecules.⁵⁴ The type of interaction also occurs in proteins as a hydrophobic patch of the axial C-H bonds of the chair rings to the π -electrons of the carbon atoms forming the aromatic rings of tryptophan or tyrosine residues.^{55,56} The planes of the chair and the aromatic rings are roughly parallel and do not necessarily stagger completely. Therefore, the various arrangements^{57,58} that the different residues at positions 1409 and 1491 could display should not prevent any stacking of ring I. Furthermore, from the observation of the two conformations refined for residues 1492–1494 in site 2 (Figure 6), it appears that the phosphate groups of the bulged adenine bases have enough flexibility to accommodate the slightly different C1'–C1' distances that could result from different 1409–1491 base-pair types while maintaining the binding to geneticin. The origin of the toxicity of geneticin for a wide range of organisms can thus be partly attributed to its possible binding by a hydrogen bonding pattern allowing the stacking of ring I to any kind of Watson–Crick or non-Watson–Crick pair at position 1409–1491.

Strategies for drug design: taking into account the U-U pair

Besides the importance of the flexibility of the bulge formed by residues 1408, 1492 and 1493 in the A site,³⁷ a major role in the function of the ribosome must be played by the highly conserved U1406-U1495 pair inserted between two G=C pairs. The U·U pair displays a particular combination of features like a strong electro-negative deep groove (two O4 atoms), a shorter C1'–C1' distance and some flexibility in the spatial arrangement of the two pyrimidine rings (Figure 8). It is noteworthy that no other base-pair is either strictly isosteric or has the same electrostatic pattern than the U-U pair, a fact which may account for its conservation. In the G/A complex as in all the crystal structures containing the A site solved to date,^{7–9,37,40} the U·U pair adopts a conformation where O4 of U1406 makes a direct hydrogen bond to N3 of U1495. The conformation is stabilized in the T/A⁹ and P/A⁸ complexes by a direct hydrogen bond from O4 of U1495 to N1 of ring II and by a water-mediated hydrogen bond from N3 of U1406 to O2 of U1495 (Figure 4(d)). The water-mediated hydrogen bond is not observed in the G/A complex, but a direct contact is observed to O2P of U1406. Comparisons with other structures show that *cis* Watson–Crick/Watson–Crick U-U pairs present two main base-to-base geometries either symmetric^{59,60} or bifurcated.^{61,62} This flexibility allows a close binding of 4,6-disubstituted antibiotics to nucleotides that are located on both sides of the U·U pair (residues 1408 and 1405), as shown from the crystal structures and the mutation

data. Furthermore, the various types of U·U pairs present different C1'–C1' distances (between 9.8 Å and 10.6 Å) that can lead to additional accommodation and contacts that stabilize the conformation of the A site bound to the aminoglycoside, as shown with geneticin.

One design approach should be aimed at compounds that would both stabilize the shifted conformation of the U1406·U1495 pair while interacting with residues on both sides and induce similar conformations for residues 1408, 1492 and 1493. The structure of the G/A complex shows that binding to any kind of A site relies on the combination of two particular hydroxyl functions strategically positioned at two opposite poles on the geneticin molecule. Hydroxyl group O6' on ring I anchors to A1408 on one side of the U1406·U1495 pair whereas hydroxyl group O4'' on ring III binds to U1406 and stabilizes the binding of its neighboring functional groups O2'' and N3'' to G1405. In addition, geneticin seems to be able to accommodate different base-pairs at position 1409–1491. The particular polyvalent character exhibited by geneticin could therefore be of help for the design of compounds that bind to the prokaryotic A site, regardless of the nature of the nucleotides at positions 1408, 1409 and 1491.

Conclusion

The neamine part of the aminoglycoside geneticin binds to the A site as observed for related aminoglycosides complexed with the 30 S particle or with an RNA model fragment containing the decoding A site. Compared to the other aminoglycosides of the 4,6-DOS sub-class still prescribed today for strong infections (tobramycin, amikacin and the gentamicins), geneticin possesses distinctively positioned functional groups that offer the ability to accommodate several point mutations associated to resistance or to phylogenetic variations. Therefore, by being remarkably not selective for prokaryotes, geneticin is a good model to study the toxicity associated with aminoglycosides at the ribosomal level. The comparison of the present structure with the complexes of the 30 S particle and of the eubacterial A site bound to paromomycin and tobramycin reveals the important role played by the conserved U1406·U1495 pair in addition to adenine bases 1408, 1492 and 1493. Thus, the non-Watson–Crick U·U pair should be taken into consideration in the design of new antibacterial molecules.

Material and Methods

RNA purification and crystallization

The oligoribonucleotides used previously to crystallize other aminoglycoside/A site complexes^{8,9} were ordered from Dharmacon Research, Inc. (Boulder, CO, USA). Deprotected RNA oligonucleotides were purified

to crystallization quality by denaturing gel electrophoresis (20%(w/v) acrylamide/bisacrylamide (19:1), 8 M urea) using TBE buffer (9 mM Tris-borate (pH 8.3), 0.2 mM EDTA) at 50–55 °C. The oligoribonucleotides were recovered by the “crush and soak” method at 4 °C in 10 mM Tris (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.5 mM Na EDTA during 48 hours with one buffer exchange, followed by ethanol precipitation. The pellets were washed with 95%(v/v) ethanol, evaporated to dryness and resuspended in MilliQ water.

A 2 mM RNA solution containing 25 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ in 100 mM sodium cacodylate buffer (pH 6.4) was first heated at 85 °C for two minutes then slow cooled for two hours 30 minutes to 37 °C. One volume of a 4 mM geneticin disulfate (Fluka, reference 48753) solution (in 25 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM sodium cacodylate buffer (pH 6.4)) was added to an equal volume of the RNA solution at 37 °C. Slow cooling then proceeded to 21 °C. Then 1 µl of RNA/geneticin solution plus 1 µl of crystallization solution (1.5%–3.5% MPD, 1.0–2.0%(v/v) glycerol, 2 mM geneticin, 150 mM KCl, 50 mM sodium cacodylate (pH 6.4)) were equilibrated against 500 µl of 40% MPD by vapor diffusion using the hanging drop method. Thin long and narrow plates (700 µm × 100 µm × 10 µm) organized in clusters appeared after three days at 37 °C for the sequence containing a 5' C overhang.

Data collection, structure determination and refinement

Crystals were equilibrated for 20 minutes in cryo-protecting solutions containing all the components present in the crystallization solution (but with 60–70% MPD and 10% glycerol) before being flash-cooled in liquid ethane (110 K). Data collection occurred on the Joint Structural Biology Beamline ID14-EH4 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF; Grenoble, France). A 95.5% complete but of poor quality data set (resolution, 2.55 Å; $R_{\text{sym}} = 9.5\%$ ($R_{\text{sym}}(2.64–2.55 \text{ Å}) = 32.0\%$), $\langle I/\sigma \rangle = 8.0$) was obtained by adding 185° collected on one crystal (set 1) to 65° and 28° collected on two other crystals. The reflections were indexed, scaled and converted using the software programs DENZO, SCALEPACK⁶³ and the CCP4 suite.⁶⁴ A correct solution ($F_{\text{corr}} = 40.3\%$ and $R\text{-factor} = 54.3\%$) was found by the molecular replacement program AMoRe⁶⁵ in the resolution range 12.0–3.0 Å, using the coordinates of the RNA from.⁹ One round of torsion simulated annealing (starting at 1500 K and slow cooling at 50 K/minute; $w_a = 5.7$) in the resolution range 10–2.55 Å in CNS⁶⁶ version 1.0 refined the molecular replacement solution from $R = 43.0\%/R_{\text{free}} = 44.7\%$ to $R = 34.8\%/R_{\text{free}} = 38.8\%$ (7% of the reflections were set aside for the R_{free} calculations). 85° of data set 1 collected on beamline ID14-EH4 were added to 100° collected later on another crystal on beamline ID14-EH1 at the ESRF. After data processing, the resolution and the parameters were improved, while the completeness got lower (Table 1). A total of 5% of the reflections were used for the R_{free} calculations in CNS version 1.1. The parameter and topology files for the geneticin molecules were obtained on the XDICT server.⁶⁷ Occupancy and B -factors were fixed to 1.0 Å and 20.0 Å, respectively. After one run of torsion simulated annealing (starting at 2000 K and slow cooling at 25 K/minute; $w_a = 2.8$) on the resolution range 25.0–2.4 Å (cutoff for the rejection of reflections, 1.5) followed by group B -factor refinement

on a 6.0–2.4 Å resolution range, R and R_{free} decreased to 32.8% and 33.8%, respectively. Alternating the crystallographic refinement task files in CNS (anneal, refine, minimize, bindividual, water_pick, optimize_wa) using base planarity and Watson–Crick base-pairing restraints, and the manual rebuilding of the structure in the calculated σA -weighted $3F_o - 2F_c$ and $F_o - F_c$ electron density maps using O⁶³ version 8.0.5 improved the model to $R = 23.1\%/R_{\text{free}} = 26.0\%$. From this stage, the statistics obtained from the task file model_stats were regularly checked to improve the model.

As in the paromomycin complex, the density is missing for the 5' overhang cytosine. The density in site 1 is better defined than the density in site 2, as observed in the two previous structures.^{8,9} The experimental electron density map in site 2 could be fit by refining two alternate conformations for the bulged adenine bases A16 and A17, guanine G18 and water molecule W2. After addition of seven water molecules, the model was refined by minimization procedures and Cartesian simulated annealing (starting at 1000 K and slow cooling at 25 K/minute; wa = 4.2; all residues fixed except for A16–G18 and solvent molecule W2) to reach $R = 22.5\%/R_{\text{free}} = 25.3\%$. The next improvements consisted in increasing the weight on the constraints for the planarity of the bases forming the U–U pair in site 2 and refining the occupancy factors of water molecules W8 and W21 using the individual task file. Group occupancy refinement was checked for the residues in alternate conformations using the qgroup task file, but the resulting q factors lying between 0.43 and 0.58 led us to leave them unchanged at 0.5. The alternate conformations observed for W2 were replaced by two distinct water molecules having occupancies of 0.50 (W2 and W40). In addition, the occupancy factors of W34 and W39 were set to 0.5. Finally, multiple rounds of occupancy and B -factor refinement were performed only with solvent molecules W2, W34, W39 and W40. The final structure has $R = 22.4\%/R_{\text{free}} = 25.0\%$ and contains 965 RNA atoms, 68 antibiotic atoms and 40 solvent molecules.

Data Bank Accession codes

Coordinates and structure factors were deposited in the Nucleic Acid Database (NDB code DR0008) and the RCSB Protein Data Bank (ID code 1MWL).

Acknowledgements

We gratefully thank Philippe Dumas for the help with the data collection; Erik Böttger for providing us with geneticin MIC measurements on various prokaryotes prior to publication and for helpful discussions; and Pascal Auffinger for careful reading of the manuscript. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities and we thank Dominique Bourgeois and Germaine Sainz-Mariaggi for assistance in using beamlines ID14-EH1 and ID14-EH4. Q.V. is supported by a fellowship from the Association Nationale pour la Recherche sur le Cancer.

References

- 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. *Mol. Cell*, **10**, 117–128.
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R. *et al.* (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, **413**, 814–821.
- Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr, 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 30 S ribosomal subunit. *Cell*, **103**, 1143–1154.
- Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M., Avila, H. *et al.* (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* **20**, 1829–1839.
- Jiang, L. C. & Patel, D. J. (1998). Solution structure of the tobramycin–RNA aptamer complex. *Nature Struct. Biol.* **5**, 769–774.
- Jiang, L. C., Majumdar, A., Hu, W. D., Jaishree, T. J., Xu, W. K. & Patel, D. J. (1999). Saccharide–RNA recognition in a complex formed between neomycin B and an RNA aptamer. *Struct. Fold. Des.* **7**, 817–827.
- 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 30 S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**, 340–348.
- Vicens, Q. & Westhof, E. (2001). Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure*, **9**, 647–658.
- Vicens, Q. & Westhof, E. (2002). Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding A-site. *Chem. Biol.* **9**, 747–755.
- Du, Z., Lind, K. E. & James, T. L. (2002). Structure of TAR RNA complexed with a Tat–TAR interaction nanomolar inhibitor that was identified by computational screening. *Chem. Biol.* **9**, 707–712.
- Wright, G. D., Berghuis, A. M. & Mobashery, S. (1998). Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. In *Resolving the antibiotic paradox: progress in understanding drug resistance and development of new antibiotics* (Rosen, B. P. & Mobashery, S., eds), pp. 27–69, Plenum Press, New York.
- Walter, F., Vicens, Q. & Westhof, E. (1999). Aminoglycoside–RNA interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 694–704.
- Rinehart, K. L., Jr (1969). Comparative chemistry of the aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics. *J. Infect. Dis.* **119**, 345–350.
- Davies, J., Gorini, L. & Davis, B. D. (1965). Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.* **1**, 93–106.
- Moazed, D. & Noller, H. F. (1987). Interaction of antibiotics with functional sites in 16 S ribosomal RNA. *Nature*, **327**, 389–394.
- 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. *J. Mol. Biol.* **262**, 421–436.

17. Ryu, H. D., Litovchick, A. & Rando, R. R. (2002). Stereospecificity of aminoglycoside-ribosomal interactions. *Biochemistry*, **41**, 10499–10509.
18. Waitz, J. A., Sabatelli, F., Menzel, F. & Moss, E. L., Jr (1974). Biological activity of antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**, 579–581.
19. Wagman, G. H., Testa, R. T., Marquez, J. A. & Weinstein, M. J. (1974). Antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: fermentation, isolation, and preliminary characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**, 144–149.
20. Loebenberg, D., Counelis, M. & Waitz, J. A. (1975). Antibiotic G418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: antiparasitic activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**, 811–815.
21. Eustice, D. C. & Wilhelm, J. M. (1984). Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in eukaryotic protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**, 53–60.
22. Jimenez, A. & Davies, J. (1980). Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, **287**, 869–871.
23. Colbère-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P. & Garapin, A. C. (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* **150**, 1–14.
24. Bar-Nun, S., Shneyour, Y. & Beckmann, J. S. (1983). G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **741**, 123–127.
25. Hutchin, T. & Cortopassi, G. (1994). Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2517–2520.
26. Mingot-Leclercq, M. P. & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1003–1012.
27. Griffiths, J. K., Balakrishnan, R., Widmer, G. & Tzipori, S. (1998). Paromomycin and geneticin inhibit intracellular *Cryptosporidium parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implications for drug delivery. *Infect. Immun.* **66**, 3874–3883.
28. Howard, M. T., Shirts, B. H., Petros, L. M., Flanigan, K. M., Gesteland, R. F. & Atkins, J. F. (2000). Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **48**, 164–169.
29. Stephenson, J. (2001). Antibiotics show promise as therapy for genetic disorders. *JAMA*, **285**, 2067–2068.
30. Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E. & Sweeney, H. L. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 375–381.
31. Xu, M. Z. & Stavnezer, J. (1992). Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line $\gamma 1$ RNA: analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J.* **11**, 145–155.
32. Moritz, O. L., Biddle, K. E. & Tam, B. M. (2002). Selection of transgenic *Xenopus laevis* using antibiotic resistance. *Transgenic Res.* **11**, 315–319.
33. Mingot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 727–737.
34. Benveniste, R. & Davies, J. (1973). Structure-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics: role of hydroxyl and amino groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**, 402–409.
35. Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C. & Puglisi, J. D. (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, **274**, 1367–1371.
36. Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J. D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.* **17**, 6437–6448.
37. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr, Tarry, M. J., Carter, A. P. & Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30 S ribosomal subunit. *Science*, **292**, 897–902.
38. Doherty, E. A., Batey, R. T., Masquida, B. & Doudna, J. A. (2000). A universal mode of helix packing in RNA. *Nature Struct. Biol.* **8**, 339–343.
39. Nissen, P., Ippolito, J. A., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 4899–4903.
40. Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr, Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonrhein, C. *et al.* (2000). Structure of the 30 S ribosomal subunit. *Nature*, **407**, 327–339.
41. Ramakrishnan, V. & Moore, P. B. (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 144–154.
42. Hyun Ryu, D., Litovchick, A. & Rando, R. R. (2002). Stereospecificity of aminoglycoside-ribosomal interactions. *Biochemistry*, **41**, 10499–10509.
43. Hyun Ryu, D. & Rando, R. R. (2001). Aminoglycoside binding to human and bacterial A-site rRNA decoding region constructs. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 2601–2608.
44. Sander, P., Prammananan, T. & Böttger, E. C. (1996). Introducing mutations into a chromosomal rRNA gene using a genetically modified eubacterial host with a single rRNA operon. *Mol. Microbiol.* **22**, 841–848.
45. Prammananan, T., Sander, P., Brown, B. A., Frischkorn, K., Onyi, G. O., Zhang, Y. *et al.* (1998). A single 16 S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J. Infect. Dis.* **177**, 1573–1581.
46. Böttger, E. C., Springer, B., Prammananan, T., Kidan, Y. & Sander, P. (2001). Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO Rep.* **2**, 318–323.
47. Recht, M. I., Douthwaite, S. & Puglisi, J. D. (1999). Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* **18**, 3133–3138.
48. Recht, M. I. & Puglisi, J. D. (2001). Aminoglycoside resistance with homogeneous and heterogeneous populations of antibiotic-resistant ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2414–2419.
49. Forge, A. & Schacht, J. (2000). Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neurootol.* **5**, 3–22.
50. Jezowska-Bojczuk, M., Karaczyn, A. & Kozłowski, H. (1998). Copper (II) binding to tobramycin: potentiometric and spectroscopic studies. *Carbohydr. Res.* **313**, 265–269.
51. Ali, B. H. (1995). Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen. Pharmacol.* **26**, 1477–1487.

52. Lynch, S. R. & Puglisi, J. D. (2001). Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J. Mol. Biol.* **306**, 1037–1058.
53. Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Jr, Saxman, P. R., Farris, R. J. *et al.* (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucl. Acids Res.* **29**, 173–174.
54. Nishio, M., Hirota, M. & Umezawa, Y. (1998). *The CH/ π interaction. Evidence, nature and consequences. Methods in stereochemical analysis* (Marchand, A. P., ed.), Wiley-VCH, New York.
55. Szabó, L., Jamal, S., Xie, H., Charnock, S. J., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. & Davies, G. J. (2001). Structure of a family 15 carbohydrate-binding module in complex with xylopentaose. Evidence that xylan binds in an approximate 3-fold helical conformation. *J. Biol. Chem.* **276**, 49061–49065.
56. Quijcho, F. A. & Vyas, N. K. (1984). Novel stereospecificity of the L-arabinose-binding protein. *Nature*, **310**, 381–386.
57. Leontis, N. B., Stombaugh, J. & Westhof, E. (2002). The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucl. Acids Res.* **30**, 3497–3531.
58. Leontis, N. B. & Westhof, E. (1998). Conserved geometrical base-pairing patterns in RNA. *Q. Rev. Biophys.* **31**, 399–455.
59. Baeyens, K. J., De Bondt, H. L. & Holbrook, S. R. (1995). Structure of an RNA double helix including uracil-uracil base pairs in an internal loop. *Nature Struct. Biol.* **2**, 56–62.
60. Westhof, E., Dumas, P. & Moras, D. (1985). Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA. *J. Mol. Biol.* **184**, 119–145.
61. Price, S. R., Evens, P. R. & Nagai, K. (1998). Crystal structure of the spliceosomal U2B'-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature*, **394**, 645–650.
62. Arnez, J. G. & Steitz, T. A. (1996). Crystal structures of three misacylating mutants of *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP. *Biochemistry*, **35**, 14725–14733.
63. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in Enzymology* (Carter, C. W. J. & Sweet, R. M., eds), vol. 276, pp. 307–326, Academic Press, London.
64. CCP4 (Collaborative Computational Project 4) (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta. Crystallog. sect., D*, **50**, 760–763.
65. Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta. Crystallog. sect., A*, **50**, 157–163.
66. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta. Crystallog. sect., D*, **54**, 905–921.
67. Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1997). Model-building and refinement practice. In *Methods in Enzymology* (Carter, C. W. Jr & Sweet, R. M., eds), vol. 277, pp. 208–230, Academic Press, London.
68. Botto, R. E. & Coxon, B. (1983). Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy of neomycin B and related aminoglycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 1021–1028.
69. Kaul, M. & Pilch, D. S. (2002). Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition: the binding of neomycin-class aminoglycosides to the A site of 16 S rRNA. *Biochemistry*, **41**, 7695–7706.

Edited by J. Karn

(Received 4 October 2002; received in revised form 6 December 2002; accepted 8 December 2002)

SCIENCE @ DIRECT®
www.sciencedirect.com

Supplementary Material comprising one Table and three Figures is available on Science Direct

Supplementary material

Table SI: Hydrogen bond distances observed in the three complexes.
 The values are given in Å. A slash separates the distances observed for water-mediated H-bonds.
 n. o.=contact not observed; n. r.=contact not relevant.

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

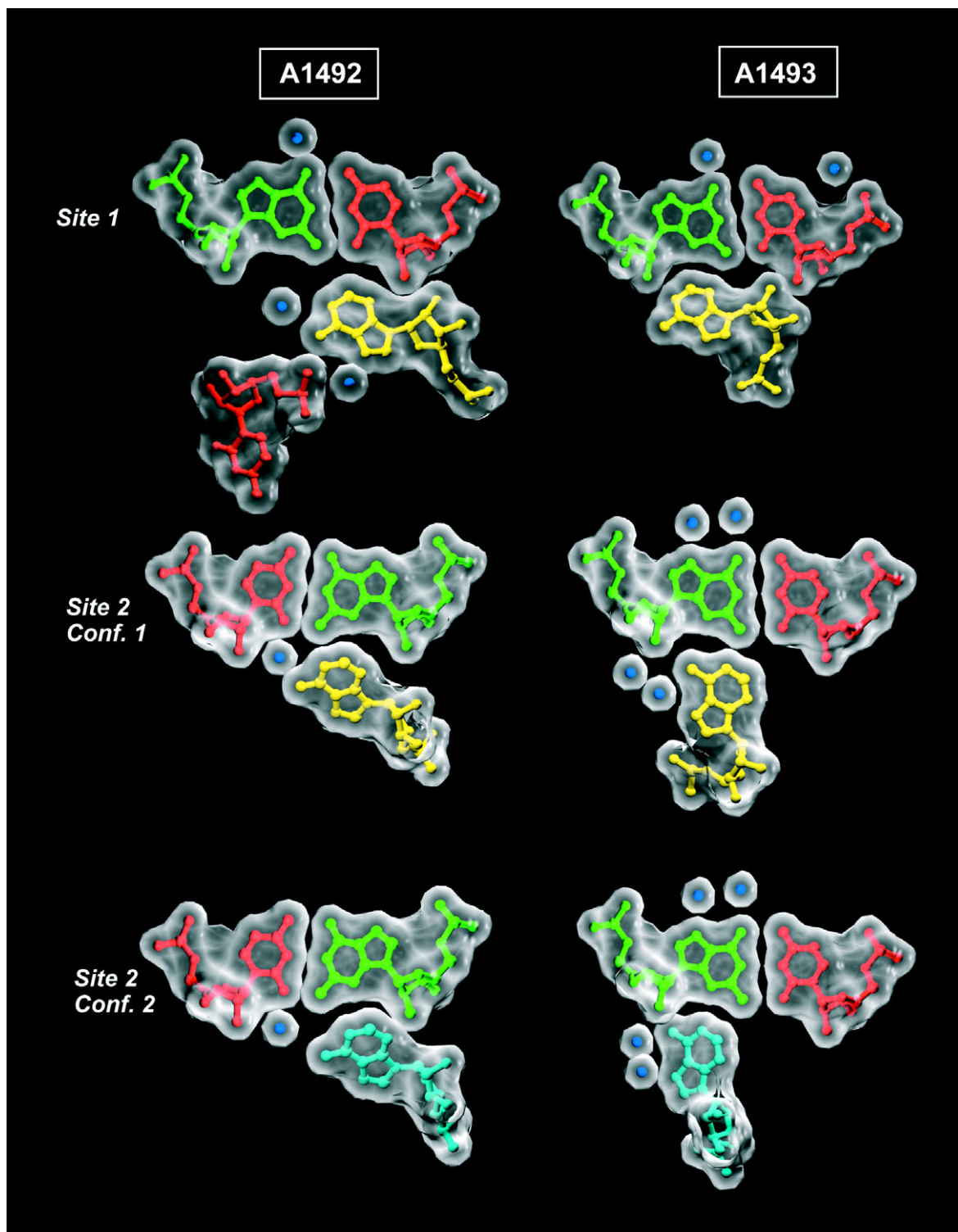


Figure S1: Packing interactions implicating the bulged adenines and G=C pairs.
The interactions are shown in surface representation with guanines in green, cytosines in red, adenines in yellow (site 1 & conf. 1 in site 2) or in cyan (conf. 2 in site 2) and water molecules in blue.

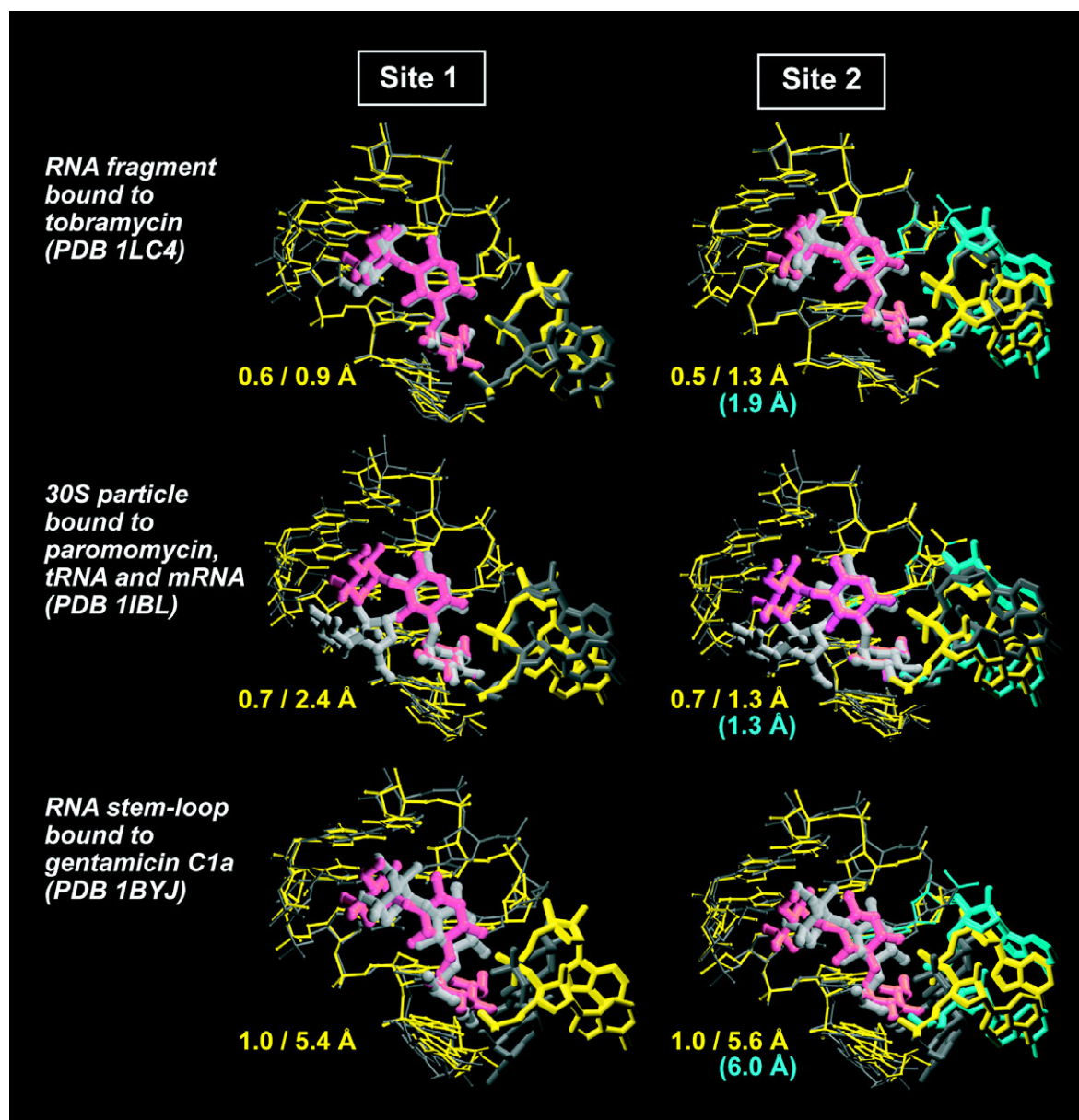


Figure S2: Superimposition of the A site bound to gentamicin on previous structures.

The superimposition is based on the sugar-phosphate atoms. The A site is oriented as in figure 3. Each subset shows the A site bound to gentamicin (color code as in figure 3) superimposed on the A site (dark grey) bound to tobramycin,⁹ paromomycin³⁸ or gentamicin³⁷ (light grey). The RMS deviations are given below (the number after the dash corresponds to the RMS difference of the bulged adenines based on all the atoms).

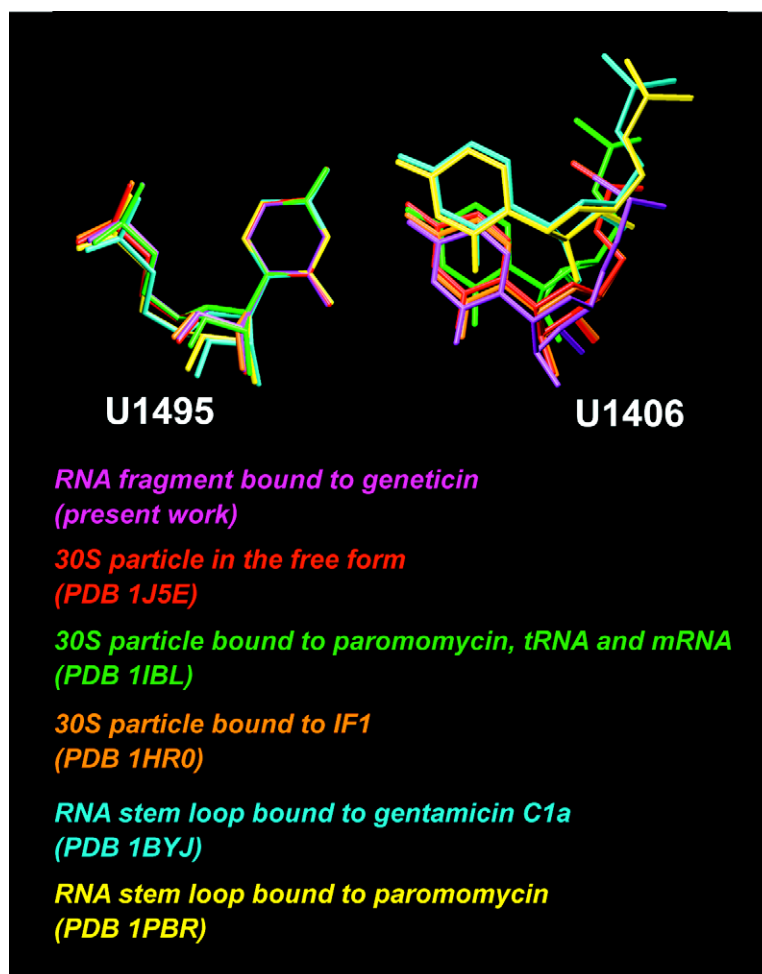
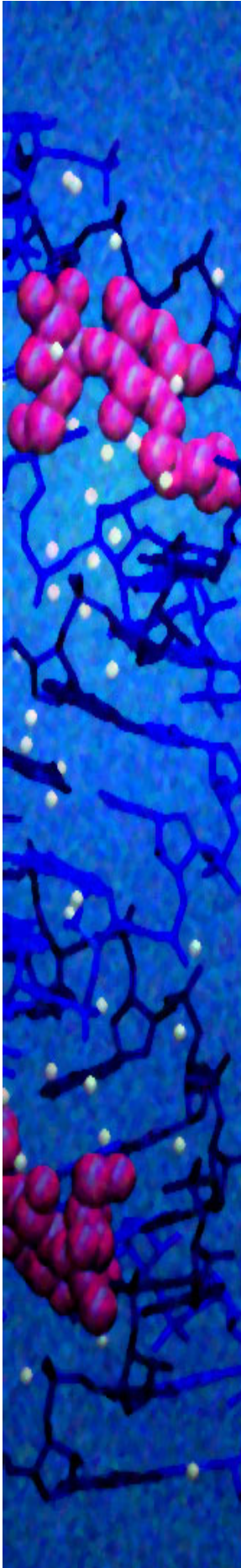


Figure S3: Superimposition of U1495•U1406 pairs from different structures containing the A site.

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



Chapitre 3

Différents aspects de la reconnaissance moléculaire des aminoglycosides

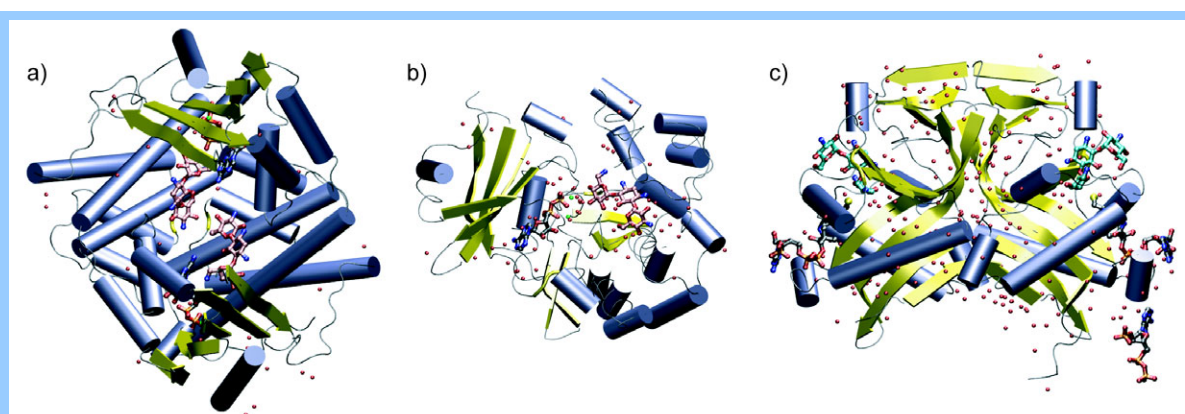
I. Comparaison avec les aminoglycosides liés aux enzymes de résistance

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

Tableau 3.1 : Enzymes de résistance complexées à des aminoglycosides résolues par cristallographie aux rayons X.

Nom de l'enzyme	Origine	Nombre d'acides aminés	Amino-glycoside complexé	Résolution (Å)	R/R _{free} (%)	N° d'identification dans la PDB	Référence
ANT(4'/4'')	<i>Staphylococcus aureus</i>	2x253 (dimère)	Kanamycine A	2,5	16,8/-	1KNY	Pedersen <i>et al.</i> 1995
APH(3')	<i>Enterococcus faecalis</i>	264	Kanamycine A	2,4	23,4/29,1	1L8T	Fong <i>et al.</i> 2001
			Néomycine	2,7	23,0/30,8	1L8U	
AAC(2')	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2x181 (dimère)	Kanamycine A	1,5	17,9/20,2	1M4I	Vetting <i>et al.</i> 2002
			Tobramycine	1,8	17,4/21,1	1M4D	
			Ribostamycine	1,8	16,5/20,2	1M4G	

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

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

Les hélices α sont indiquées en bleu, les brins β en jaune, les molécules d'eau en rouge. Les différents ligands (aminoglycosides et : un analogue de l'ATP (a), ADP (b), coenzyme A (c)) sont indiqués en vue tout-atomes.

A. Analyse conformationnelle des aminoglycosides

Tableau 3.2 : Valeurs des angles dièdres entre les cycles des différents aminoglycosides complexés au site A et aux enzymes de résistance.

		$\phi 1^a$ (°)	$\phi 2^a$ (°)	$\phi 3^b$ (°)	$\phi 4^b$ (°)
Site A					
Paromomycine	Site 1	-155	-159	-83	158
	Site 2	-147	-156	-75	152
Tobramycine	Site 1	-155	-160	112	-142
	Site 2	-151	-163	114	-156
Généticine	Site 1	-159	-152	113	-146
	Site 2	-158	-150	109	-147
ANT(4'/4'')					
Kanamycine A	Site 1	25	-123	122	-146
	Site 2	41	-139	125	-115
APH(3')					
Kanamycine A		-153	-146	147	-135
Néomycine		-156	-152	-103	127
AAC(2')					
Kanamycine A	Site 1	-172	166	118	-149
	Site 2	-173	170	109	-144
Tobramycine	Site 1	-165	165	109	-150
	Site 2	-168	169	105	-144
Ribostamycine	Site 1	-179	173	66	161
	Site 2	180	-179	63	164

^a $\phi 1=(C3-C4-O1'-C1')$ et $\phi 2=(C4-O1'-C1'-C2')$ pour tous les aminoglycosides

^b $\phi 3=(C6-C5-O5-C1'')$ et $\phi 4=(C5-O5-C1''-C2'')$ pour les dérivés 4,5-2-DOS et $\phi 3=(C1-C6-O6-C1'')$ et $\phi 4=(C6-O6-C1''-C2'')$ pour les dérivés 4,6-2-DOS.

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

complexée au site A de 1,1 Å pour la kanamycine A complexée à APH(3') et de 2,0 Å pour la kanamycine A complexée à ANT(4'/4'') (Tableau 3.2). De manière remarquable, les cycles I et II constituant la néamine gardent une orientation similaire dans les aminoglycosides 4,5- et 4,6-2-DOS, aussi bien dans les complexes avec l'ARN que dans ceux avec les enzymes (Figure 3.2a-b), sauf dans le cas de l'ANT(4'/4'') (Figure 3.2c). Ce résultat est cohérent avec les études de RMN menées sur une enzyme ANT(2'') complexée à l'isépamicine (famille de la kanamycine A) (Ekman, *et al.* 2001) et sur une AAC(3) complexée à la kanamycine A ou à la ribostamycine (Owston et Serpersu 2002). Tandis que les orientations entre les cycles II et III des dérivés 4,6-2-DOS sont également remarquablement conservées dans toutes les structures (présence de deux liaisons hydrogène intramoléculaires entre les deux cycles—Tableau 3.3), celles des cycles II et III des dérivés 4,5-2-DOS montrent certaines disparités. Par exemple, le cycle III de la ribostamycine comp-

lexée à l'AAC(2') est retourné par rapport au cycle III de la paromomycine fixée au site A (Figure 3.2a). Une analyse par RMN montre même un dérivé de ribostamycine possédant des cycles I et III empilés (Cox, *et al.* 1996). Ces analyses indiquent que les conformations et les orientations des cycles sont globalement similaires dans différents contextes (ARN ou protéine), en particulier pour le sous-groupe des composés 4,6-2-DOS. Ainsi, la géométrie de l'orientation des cycles I et II semble déterminante pour la reconnaissance autant par les nucléotides du site A (Publications n°1-3) (Carter, *et al.* 2000 ;

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

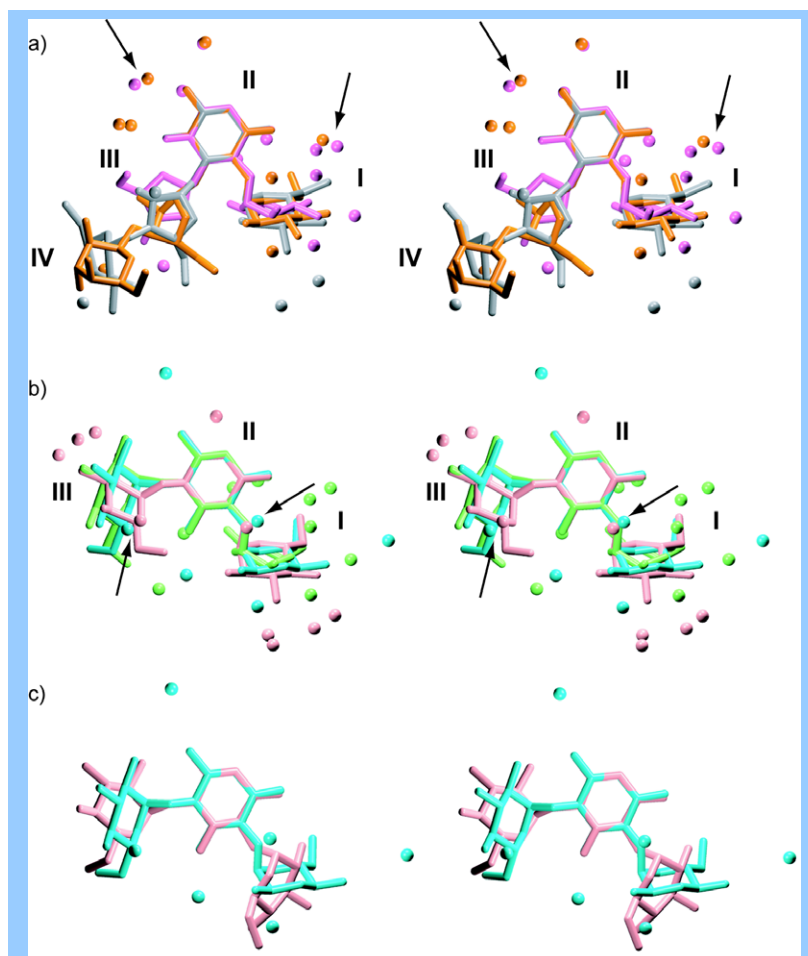


Figure 3.2 : Superposition de la paromomycine complexée au site A (orange), de la ribostamycine complexée à l'AAC(2') (magenta) et de la néomycine complexée à l'APH(3') (gris) (a) ; superposition de la tobramycine complexée au site A (cyan), de la tobramycine complexée à l'AAC(2') (vert) et de la kanamycine A complexée à l'APH(3') (rose) (b) ; superposition de la tobramycine complexée au site A (cyan) et de la kanamycine A complexée à ANT(4'/4'') (rose) (c) ;

Les superpositions sont basées sur les atomes du cycle 2-DOS (cycle II). Les molécules d'eau formant des liaisons hydrogène avec l'aminoglycoside sont indiquées par des sphères de couleur correspondant à la structure à laquelle elles appartiennent. Celles retrouvées à des positions similaires dans différentes structures sont indiquées par des flèches.

B. Structures tridimensionnelles des sites de fixation

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

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

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

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

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

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

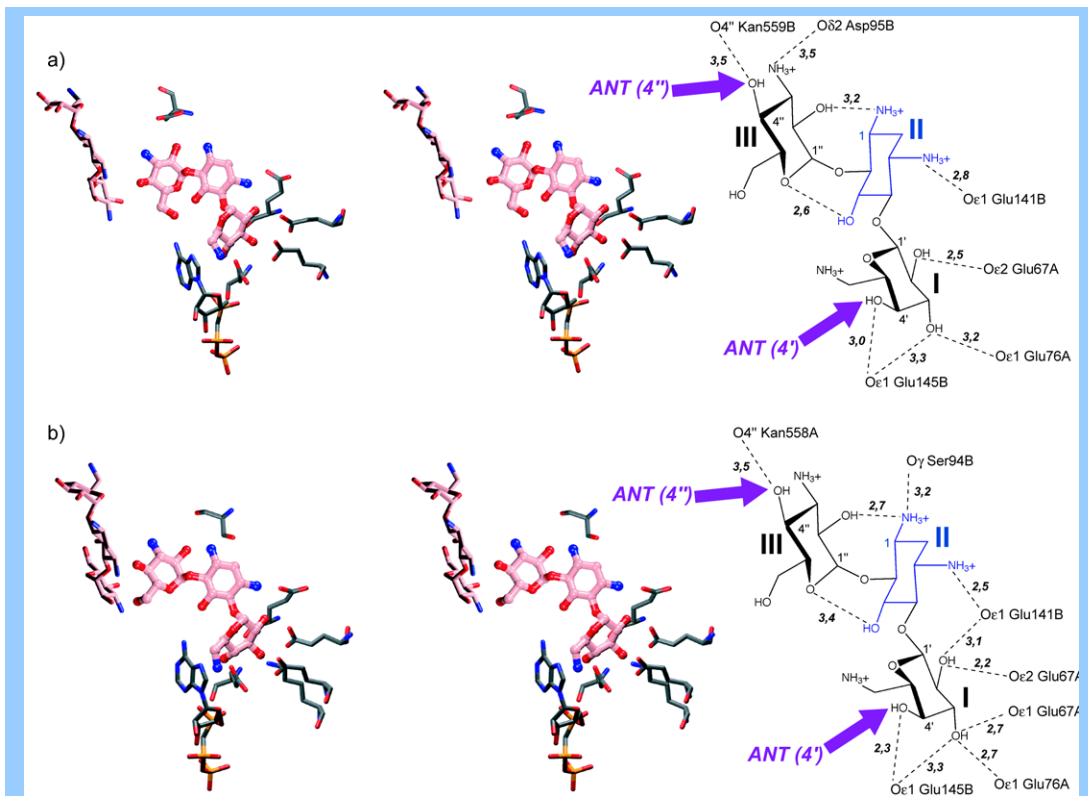


Figure 3.3 : Vues stéréo des sites 1 (a) et 2 (b) de l'enzyme ANT(4'/4'') complexés à la kanamycine A et à un analogue de l'ATP, et représentation schématique des contacts correspondants.

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

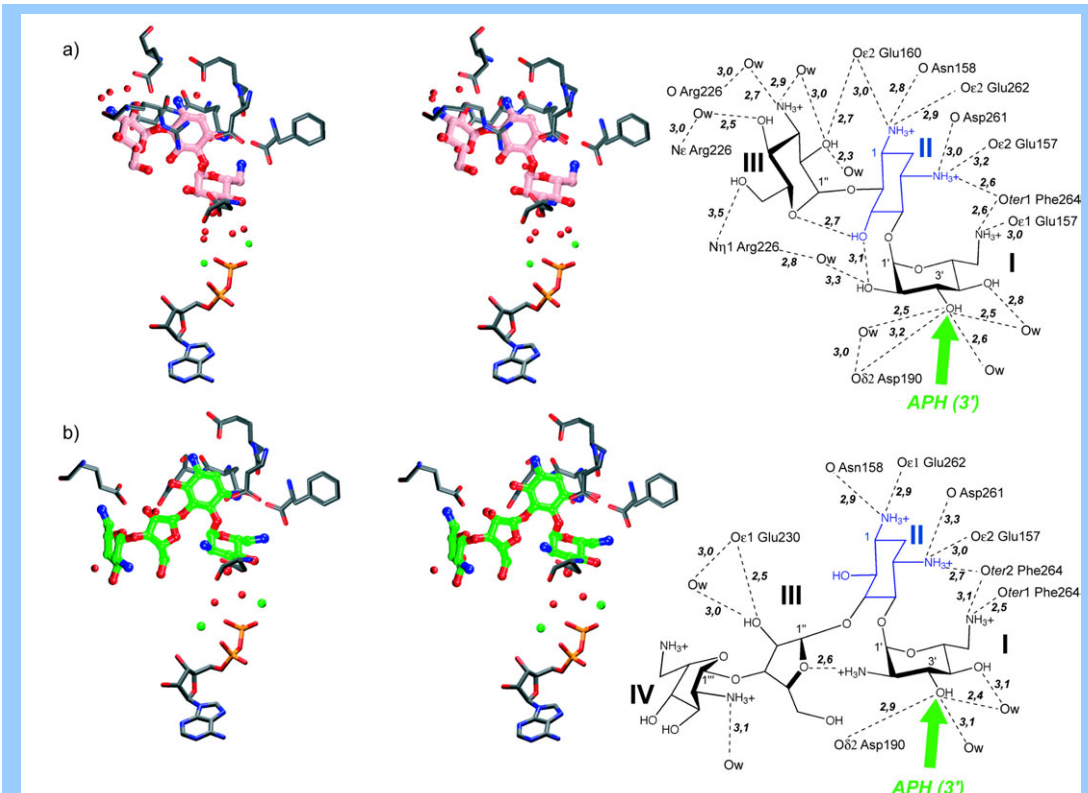
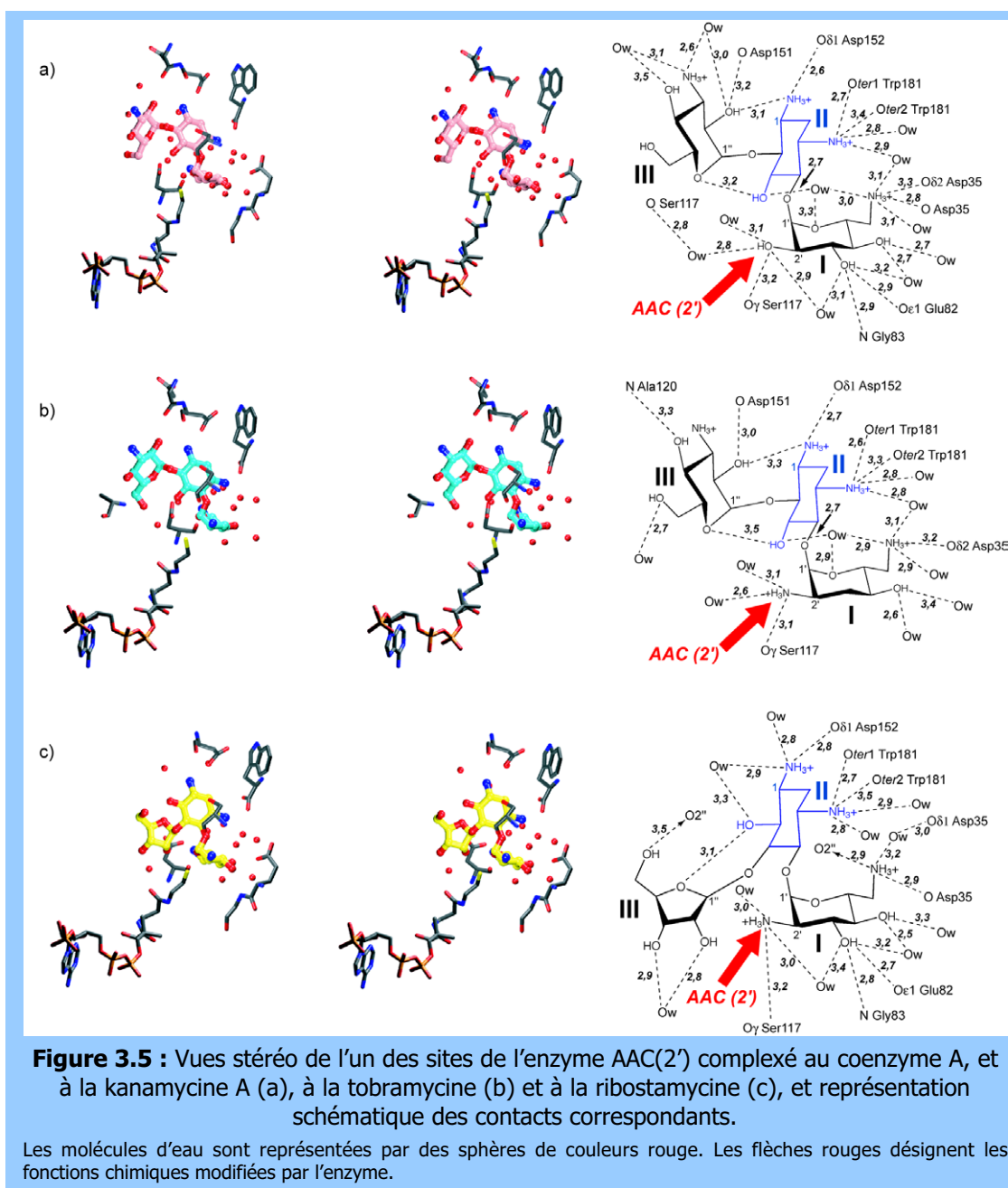


Figure 3.4 : Vues stéréo du site de l'enzyme APH(3') complexé à l'ADP, et à la kanamycine A (a) et à la néomycine (b), et représentation schématique des contacts correspondants.

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



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

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

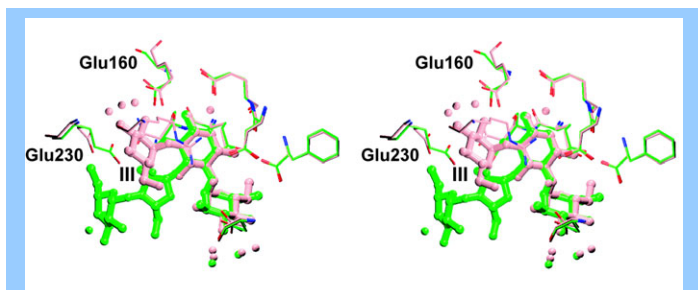


Figure 3.6 : Superposition de la kanamycine A (rose) et de la néomycine (vert) fixées par l'APH(3').

Les atomes de carbone des acides aminés et les molécules d'eau représentés et sont colorés en fonction de la structure à laquelle ils appartiennent.
(Numéros d'identification respectifs dans la PDB : 1L8T et 1L8U).

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

d'eau n'est observée dans le complexe ANT(4'/4'') résolu à 2,50 Å (cinq sont directes), tandis que cinq liaisons directes et six pontées par des molécules d'eau sont observées dans les complexes AAC(2')/aminoglycosides (résolutions de 1,50-1,80 Å). Dans la structure du complexe AAC(2')/tobramycine, des molécules d'eau occupent l'espace utilisé par le cycle III de la ribostamycine dans la structure du complexe AAC(2')/ribostamycine (Figure 3.7). Deux molécules d'eau sont retrouvées à des positions similaires dans les structures de la paromomycine liée au site A et de la ribostamycine liée à l'AAC(2') (Figure 3.2a). Deux molécules d'eau sont également retrouvées à des positions analogues dans les structures de la tobramycine liée au site A et de la kanamycine A liée à APH(3') (Figure 3.2b). Ainsi, la modulation des propriétés structurales des sites de fixation d'aminoglycosides est aussi importante pour la reconnaissance des différents aminoglycosides par la même molécule d'ARN (le site A) que par le même site de fixation d'une protéine. Les structures à haute résolution à présent disponibles à la fois pour le site A (Publications n° 1-3) et pour des enzymes de résistance (Fong et Berghuis 2002 ; Pedersen, *et al.* 1995 ; Vetting, *et al.* 2002) complexes à différents aminoglycosides permettent de considérer certaines de ces molécules d'eau dans les stratégies de conception de nouvelles molécules.

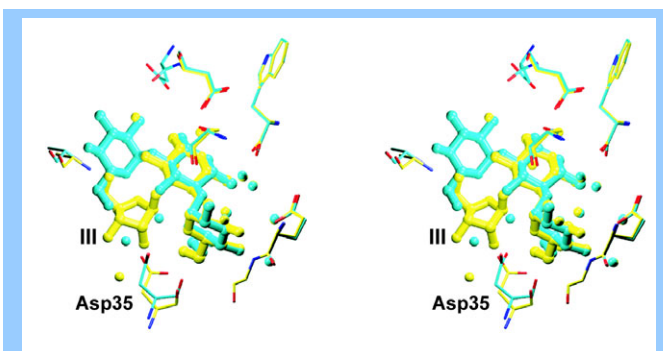


Figure 3.7 : Superposition de la tobramycine (cyan) et de la ribostamycine (jaune) fixées par l'AAC(2').

Les atomes de carbone des acides aminés et les molécules d'eau représentés et sont colorés en fonction de la structure à laquelle ils appartiennent.
(Numéros d'identification respectifs dans la PDB : 1M4D et 1M4G).

D. Vers la conception de nouveaux inhibiteurs

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

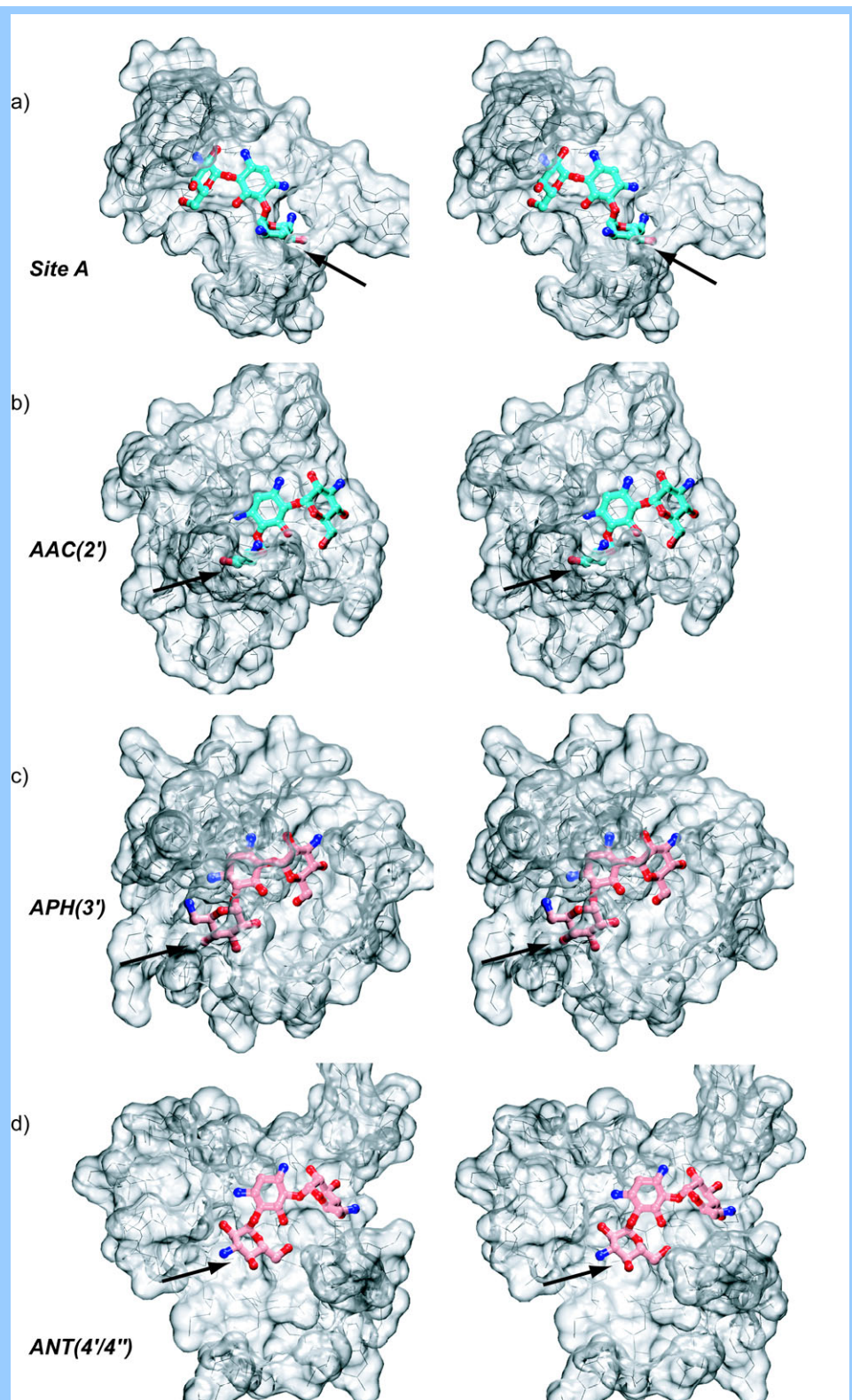


Figure 3.8 : Comparaison de la fixation des dérivés 4,6-2-DOS (tobramycine en cyan, kanamycine A en rose) au site A (a) et aux trois types d'enzymes de résistance (b-d).

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

II. Comparaison avec des oligosaccharides fixés par des protéines

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

A. Vues générales des structures tridimensionnelles de quelques complexes

Une des familles de protéines fixant des saccharides les mieux caractérisées est celle des lectines. Ces protéines, distinctes des immunoglobulines, interagissent avec des saccharides sans effectuer sur eux de catalyse enzymatique. Les structures d'un grand nombre de lectines d'origines animale et végétale ont été résolues par cristallographie aux rayons X complexées à différents oligosaccharides (Delbaere, *et al.* 1993 ; Feinberg, *et al.* 2001 ; Hamelryck, *et al.* 1999 ; Loris 2002 ; Naismith et Field 1996 ; Saul, *et al.* 2000) (Figure 3.9). En outre, d'autres structures cristallographiques ont révélé par exemple les modes de fixation d'oligosaccharides à des transporteurs périplasmiques bactériens (Quiocho et Vyas 1984 ; Quiocho, *et al.* 1989 ; Vyas, *et al.* 1988), à un transporteur du fer (Ferguson, *et al.* 1998), à des anticorps (Bundle, *et al.* 1994 ; Villeneuve, *et al.* 2000), à des porines (Forst, *et al.* 1998), à des enzymes dégradant la paroi des cellules végétales (Szábó, *et al.* 2001), à des toxines (Swaminathan et Eswaramoorthy 2000 ; Williams et Davies 2001), (Figure 3.9) ... Toutes ces protéines sont constituées d'une ou plusieurs sous-unités. Les sites de fixation des oligosaccharides (un ou plusieurs par protéine) sont situés soit au cœur de la protéine, soit sur la face externe.

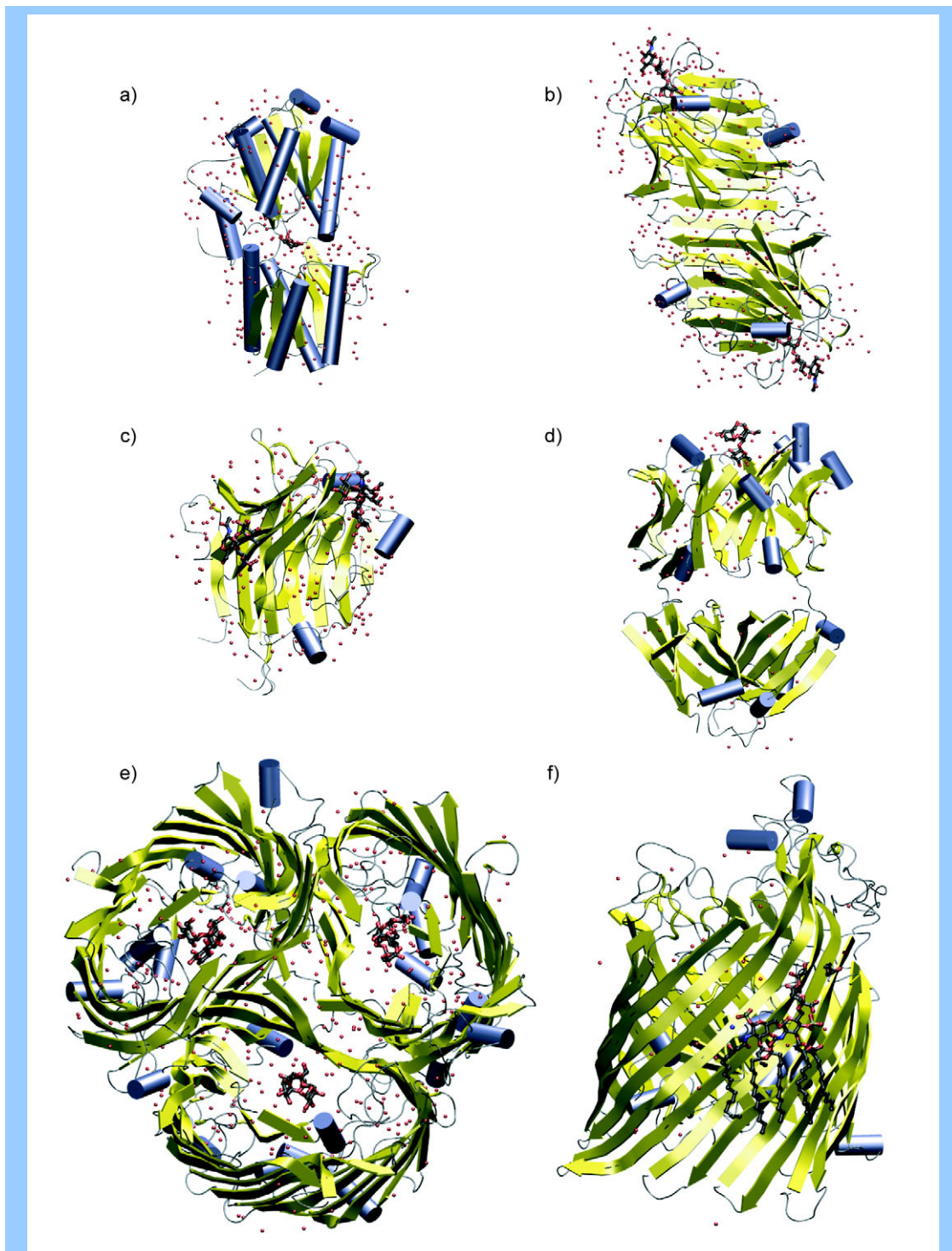


Figure 3.9 : Exemples de structures cristallographiques de protéines complexées à des oligosaccharides.

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

Les hélices α sont indiquées en bleu, les brins β en jaune, les molécules d'eau en rouge. Les différents ligands sont indiqués en vue tout-atomes.

B. Analyse structurale des sites de fixation

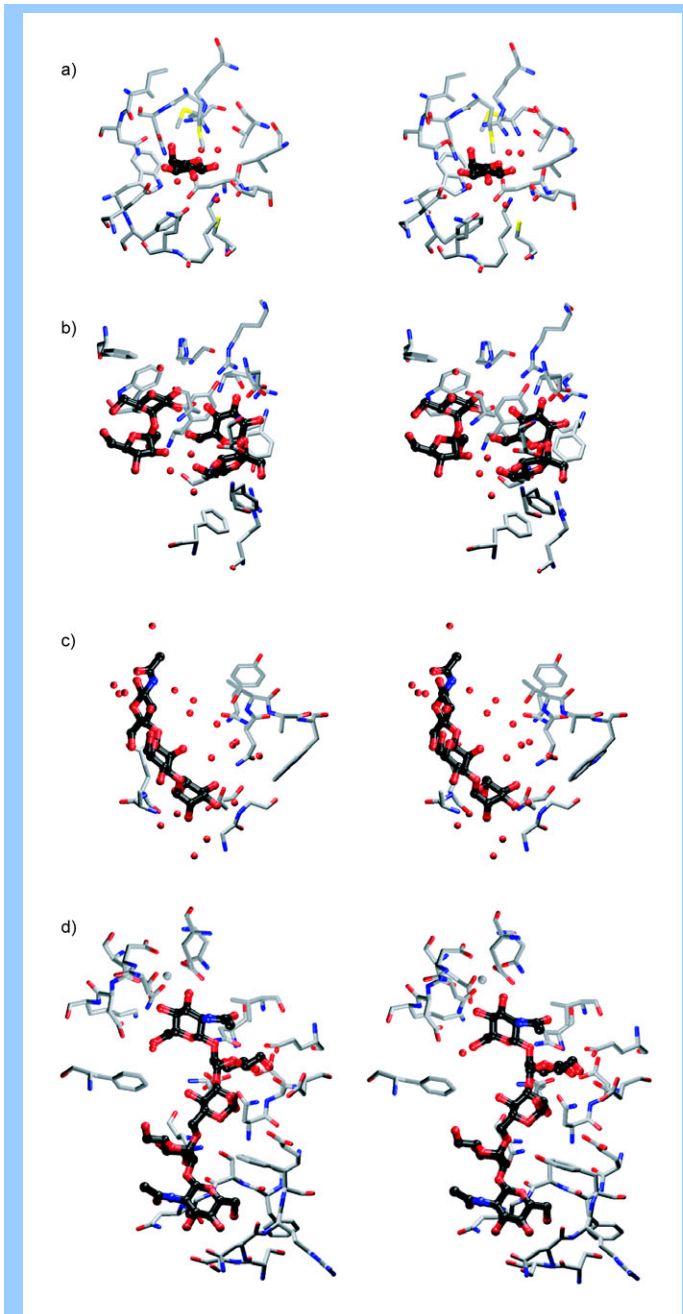


Figure 3.10 : Quelques exemples de sites de fixation d'oligosaccharides.

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

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

Lorsqu'ils sont complexés à ces différents types de protéines, les cycles des oligosaccharides adoptent une conformation de type « chaise », avec les divers groupes fonctionnels (essentiellement hydroxyles) rayonnant du cycle en positions équatoriales ou axiales selon la nature du saccharide et de l'environnement. Les groupements de ces différents cycles modulent la reconnaissance moléculaire (Lemieux 1996). Les oligosaccharides interagissent partiellement ou totalement avec la protéine, par des liaisons hydrogène et des interactions de van der Waals, dans des poches formées principalement d'acides aminés chargés et polaires (Figure 3.10). Des molécules d'eau, partiellement ou totalement enfouies dans les sites de fixation, permettent d'optimiser le nombre de liaisons hydrogène potentiel de chaque cycle saccharidique (Bourne et Cambillau 1993). Certains saccharides n'interagissent avec la protéine que par l'intermédiaire de molécules d'eau (Bourne, *et al.* 1990) (Figure 3.10c). Les sites de

fixation contiennent également un grand nombre de résidus aromatiques qui s'empilent ou non sur un ou plusieurs cycles saccharidiques (Figures 3.11 et 3.12). En diminuant la constante diélectrique locale, ces interactions d'empilement favorisent la formation de nombreuses liaisons hydrogène (Lemieux 1996). Ces interactions d'empilement sont similaires à celles observées entre le cycle I des aminoglycosides et la guanine 1491 dans les différents complexes formés entre les aminoglycosides et le site A (Figure 3.13). La reconnaissance moléculaire spécifique de saccharides semble ainsi dépendre d'une combinaison particulière bien définie d'interactions d'empilements et de liaisons hydrogène. Cependant, il est à noter qu'aucune interaction d'empilement n'a été observée dans les structures des aminoglycosides liés aux enzymes de résistance résolues à ce jour.

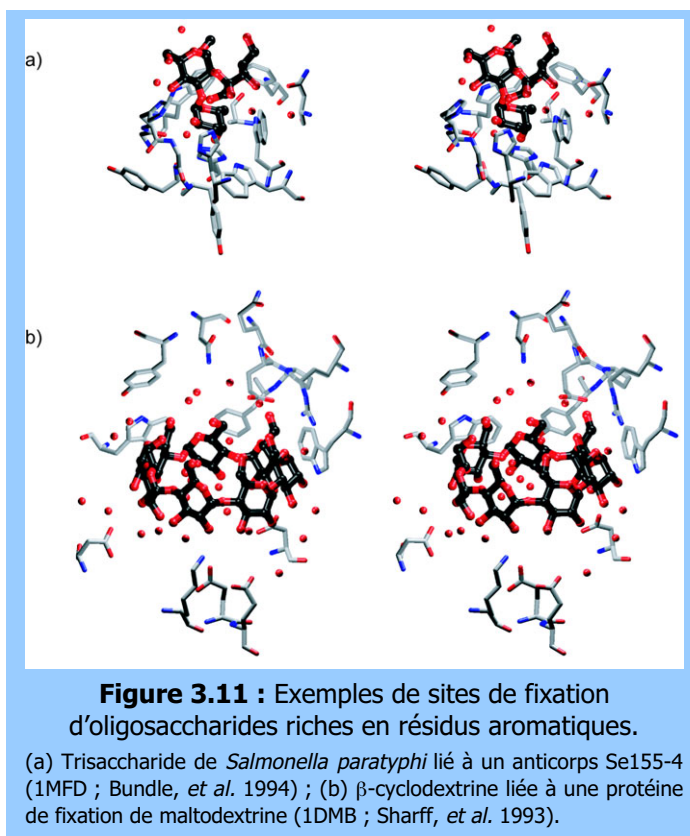
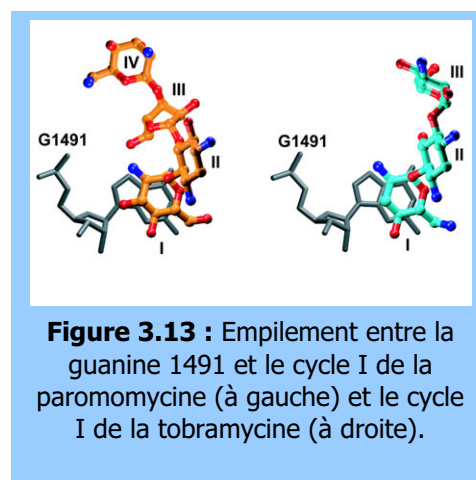
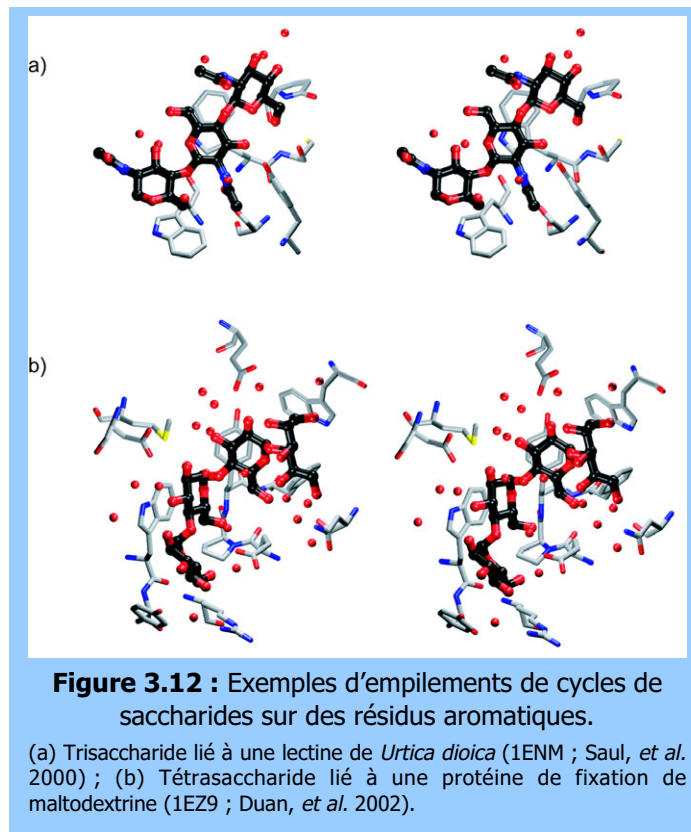


Figure 3.11 : Exemples de sites de fixation d'oligosaccharides riches en résidus aromatiques.

(a) Trisaccharide de *Salmonella paratyphi* lié à un anticorps Se155-4 (1MFD ; Bundle, *et al.* 1994) ; (b) β -cyclodextrine liée à une protéine de fixation de maltodextrine (1DMB ; Sharff, *et al.* 1993).



III. Rôle des molécules d'eau dans la reconnaissance

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

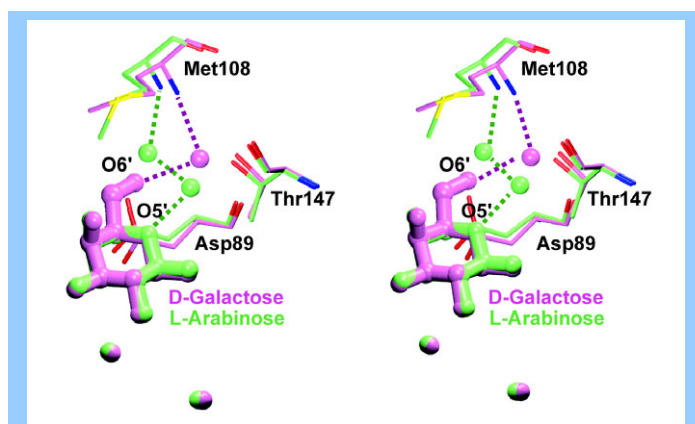


Figure 3.14 : Superposition du L-arabinose (vert) et du D-galactose (magenta) liés à la protéine de fixation du L-arabinose.

Les atomes de carbone des acides aminés et les molécules d'eau représentés sont colorés en fonction de la structure à laquelle ils appartiennent.

(Numéros d'identification respectifs dans la PDB : 1ABE et 5ABP).

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

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

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

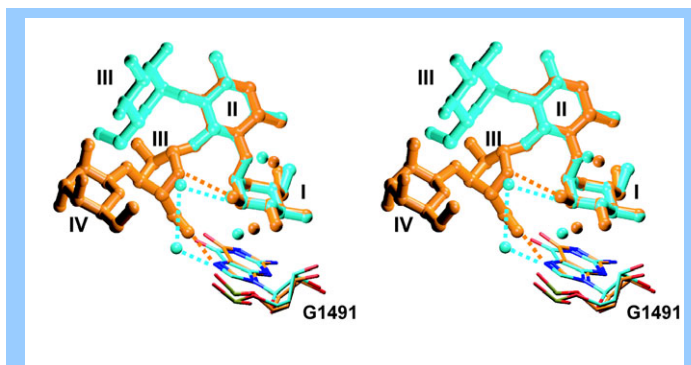


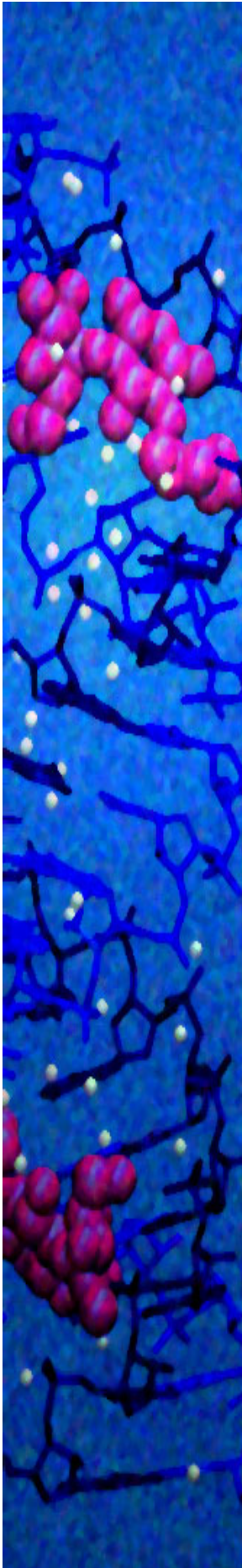
Figure 3.15 : Superposition de la paromomycine (orange) et de la tobramycine (cyan) liés au site A.

Les atomes de carbone de la G1491 et les molécules d'eau représentés sont colorés en fonction de la structure à laquelle ils appartiennent.

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

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

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



Chapitre 4

Conclusions

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

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

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

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

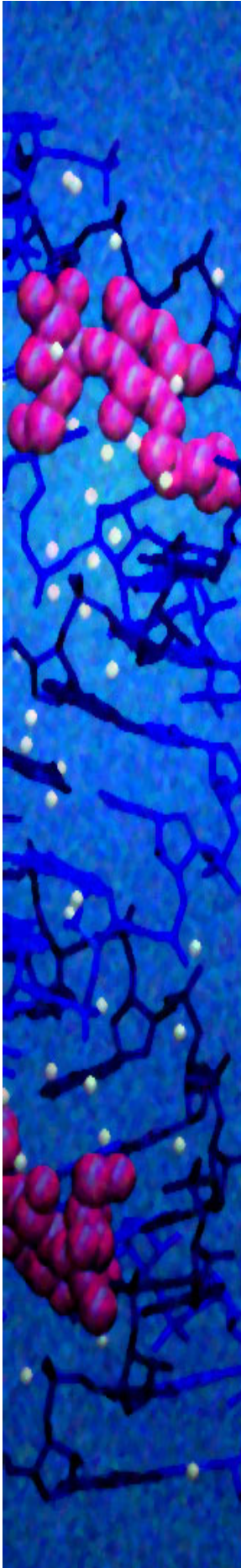
Les analyses comparatives des structures obtenues pour la paromomycine, la tobramycine et la généticine permettent de rationaliser l'ensemble des données de cartographie en solution, de mesures de constantes de dissociation et de résultats de microbiologie obtenu pour différents types d'aminoglycosides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

Le système développé pour l'étude cristallographique du site A reproduisant fidèlement la situation biologique, il est possible d'étudier une grande variété de composés mais aussi

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

De manière générale, les résultats de cette étude illustrent le caractère modulaire particulier des molécules d'ARN : les ARN naturels fonctionnels sont formés de l'assemblages de plusieurs motifs structuraux. Un motif indépendant possédant une structure autonome peut être extrait de son contexte biologique afin d'être étudié en détail inséré dans un système simplifié. Cette méthode comporte plusieurs écueils : le nombre

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



Chapitre 5

Protocoles expérimentaux

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

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

II. Synthèse chimique d'ARN en phase solide

A. Cycle de synthèse chimique

Les précurseurs utilisés pour la synthèse (Glen Research®) sont sous forme de phosphoramidites : les oxygènes O5', O2' et le phosphore lié à l'oxygène O3' sont protégés respectivement par des groupements diméthoxytrityl (DMT), tertibutyldiméthylsilyl

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

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

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

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

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

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

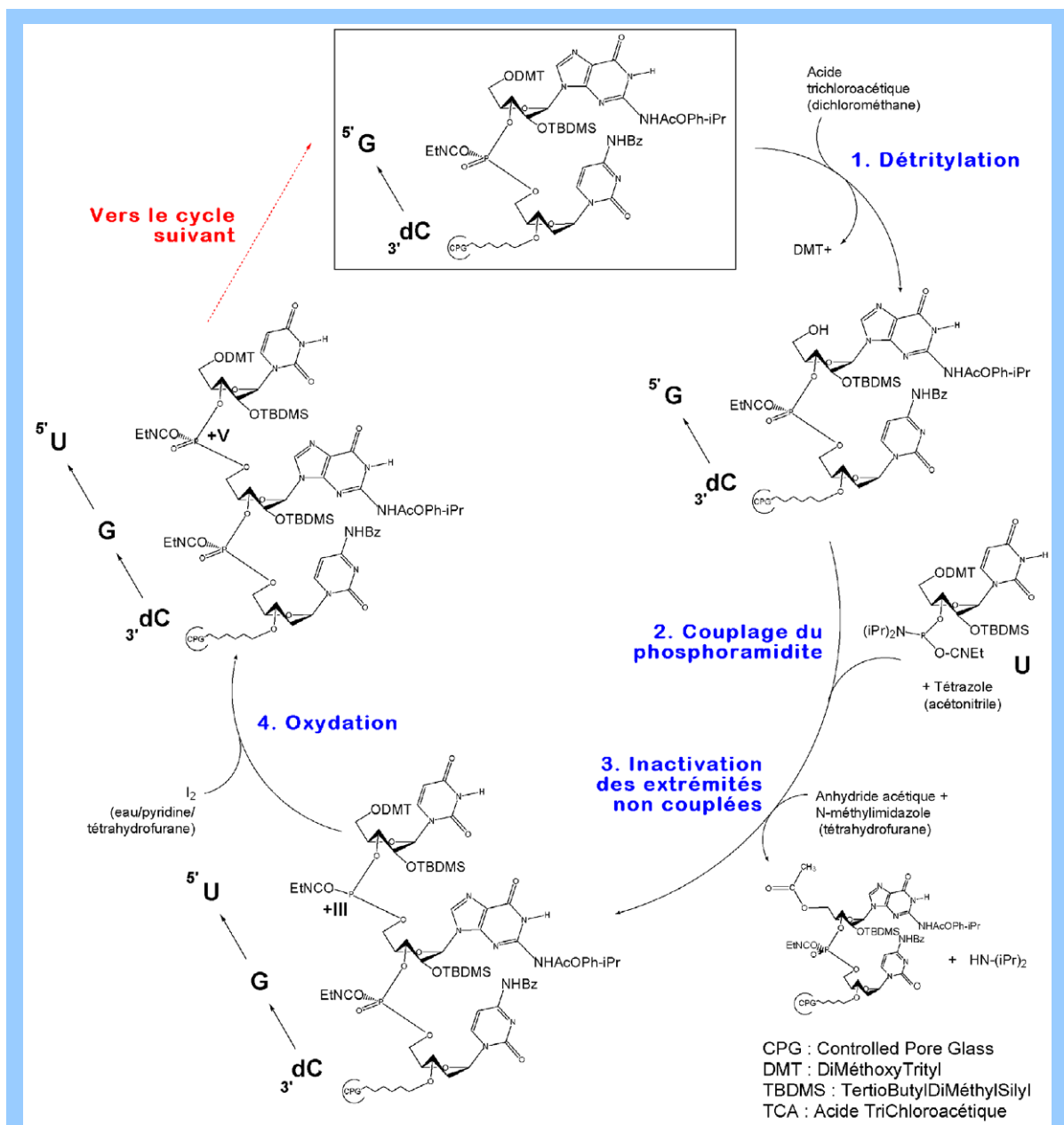


Figure 5.1 : Cycle de synthèse chimique sur support solide.

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

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

B. Déprotection des oligoribonucléotides

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

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

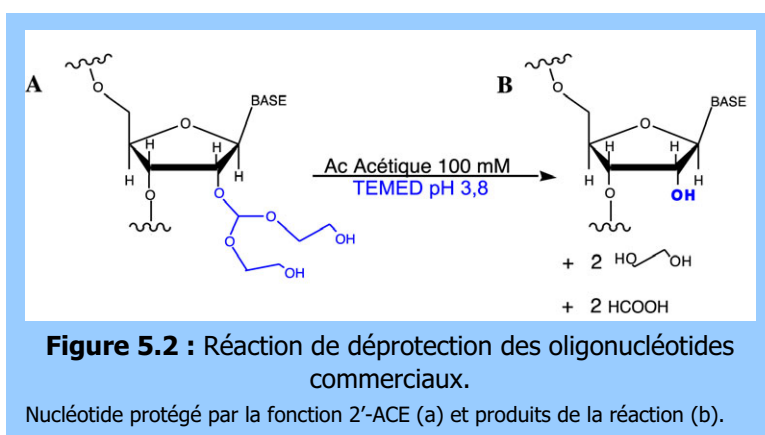
Tableau 5.1 : Déprotections successives des oligoribonucléotides.

Opération réalisée	Réactifs utilisés	Commentaires
décrochage de l'ARN et déprotection des bases puis évaporation à sec de l'ammoniaque sous vide	solution ammoniacale/méthanol (3/1)	1,5 ml/ μ mole est injecté régulièrement à l'aide d'une seringue par volume de 0,3 ml/ μ mole dans la colonne pendant 24 heures
déprotection des oxygènes O2'	solution méthanol/eau distillée (1/1)	50 μ l
	fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) 1 M (dans le tétrahydrofurane)	1,5 ml/ μ mole (24 h à l'obscurité)
précipitation des ARN au n-butanol et séchage	200 μ l eau distillée 700 μ l acétate de sodium 3 M (pH 5,8) qsp 20 ml n-butanol	<ul style="list-style-type: none"> séparation de l'ARN des molécules silylées par partage entre les phases aqueuse et organique
		<ul style="list-style-type: none"> précipitation des ARN (4 heures à -20°C) centrifugation à 4000 rpm pendant 30 minutes à 4°C séchage sous vide durant quelques heures L'ARN est alors sous forme de « pastille ».

C. Calcul du rendement de synthèse

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

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



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

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

III. Purification et analyse des fragments d'ARN

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

A. Chromatographie échangeuse d'ions

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

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

La solution contenant l'ARN (phase mobile) passe à travers une résine (phase stationnaire) constituée de microbilles de métacrylate, sur lesquelles sont greffées électrostatiquement des amines quaternaires. Dans un deuxième temps, une chromatographie préparative réalisée pour l'ensemble de la synthèse permet la séparation de l'ARN voulu des fragments plus courts accumulés lors de la synthèse. Une saturation de la colonne se produisant au-delà de 150 UA_{260} , il est nécessaire d'effectuer une série de quelques HPLC préparatives pour chaque synthèse de 1 μmole . Une élution optimale est réalisée par un gradient de perchlorate de sodium (NaClO_4) entre

Tableau 5.2 : Gradient utilisé pour l'élution des molécules d'ARN lors de la purification par HPLC.

Temps (min)	Débit (ml/min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	1	85	15
2	1	85	15
50	1	30	70
55	1	10	90
58	1	10	90
60	1	85	15
70	0,2	85	15

60 mM et 280 mM, avec les solutions **A** (1 mM NaClO_4 /20 mM MES pH 6,2/4 M urée) et **B** (400 mM NaClO_4 /20 mM MES pH 6,2/4 M urée) en 48 minutes, à 75°C (Tableau 5.2). Les fractions rassemblées sont dessalées par gel-filtration sur une colonne Sephadex® NAP-G25 (Pharmacia). Ces fractions (environ 2,5 ml au total) sont évaporées à sec sous pression réduite (environ 4 heures au concentrateur Speed Vac®). L'oligoribonucléotide est finalement dissous à une concentration d'environ 30-40 mg/ml dans l'eau milliQ.

B. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

1) PAGE analytique

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

2) PAGE préparative

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

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

C. Dosage de l'ARN

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

D. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

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

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

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

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

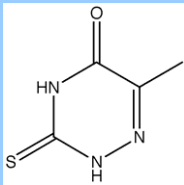


Figure 5.3 :
Structure du 6-
aza-2-
thiothymine.

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

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

A. Températures de fusion

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

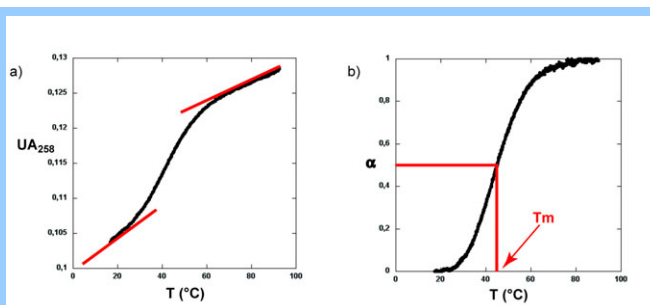


Figure 5.4 : Exemples de définition des tangentes pour une courbe de fusion (a) et de détermination du T_m à partir de la courbe correspondant à la fraction de molécules dépliées en fonction de la température (b).

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

ces lignes de bases, il est possible de déterminer la valeur de la fraction de molécules dans l'état déplié $\alpha = (c_{1-T} - c_{2-T}) / (A_{258} - c_{2-T})$, c_{1-T} et c_{2-T} correspondant respectivement aux valeurs des lignes de bases des formes repliée et dépliée (Marky et Breslauer 1987 ; Mergny et Lacroix 2002 ; Puglisi et Tinoco Jr. 1989). Ainsi, $\alpha=1$ pour l'ensemble de la population à

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

Dans cette étude, les mesures de températures de fusion sont réalisées avec 500 μl de solution contenant $\approx 0,4 \mu\text{M}$ de fragment F3 ($0,1 < A_{258} < 0,2$)/ $0,1 \mu\text{M}$ – $3,0 \text{ mM}$ néomycine/ $0,1 \text{ mM}$ – 15 mM MgCl_2 / 5 mM NaCl / 50 mM Na cacodylate pH 6,0. L'eau milliQ® utilisée pour la préparation des échantillons est dégazée par agitation sous vide pendant quelques minutes. L'appareil utilisé pour les mesures est un spectrophotomètre UV modèle 941 (Uvikon®) comportant un bain-marie externe. La solution est déposée dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm, puis recouverte d'une mince couche d'huile de paraffine. La cuve est fermée par un bouchon. La sonde de mesure de température de l'appareil est placée dans une cuve séparée contenant uniquement de l'eau. L' A_{258} est mesurée régulièrement au cours du chauffage progressif de l'échantillon, programmé de 15 à 90-95°C ($\approx 0,5^\circ\text{C}/\text{min}$), puis du refroidissement ($\approx 1,3^\circ\text{C}/\text{min}$). Préalablement à l'expérience de dénaturation thermique, les molécules d'ARN ont été renaturées soit par chauffage pendant 2 min à 80°C en bain-marie puis retour lent à température ambiante pendant $\approx 16\text{h}$, soit un premier cycle de dénaturation-renaturation effectué à vide dans le spectrophotomètre. L'ensemble des mesures est traité à l'aide du logiciel KALEIDAGRAPH® (Synergy Software).

B. Antibiogrammes

Un tapis bactérien est obtenu par étalement d'une solution de bactéries DH5 α (souche *E. coli* déficiente pour la recombinaison et utilisée pour la croissance de plasmides et cosmides) sur boîte de Petri contenant du milieu 2YT (1,6 % (p/v) bacto-tryptone/1,0 % (p/v) extrait bacto-levure/85 mM NaCl). Au centre de la boîte est déposée une goutte de 2 μl de solution de néomycine. Plusieurs concentrations de néomycine sont testées. Le système est incubé durant la nuit à 37°C. La sensibilité à l'antibiotique se traduit par une inhibition de croissance de la souche bactérienne matérialisée par un halo (« plage de lyse »). La taille de la plage de lyse est proportionnelle à la concentration en néomycine. La concentration de 0,6 mM en néomycine est choisie pour les tests. Une expérience est effectuée dans des conditions similaires pour une solution de renaturation comprenant 0,6 mM fragment F3/0,6 mM néomycine/0,1 mM MgCl_2 /50 mM Na cacodylate pH 6,0. Cette solution est portée à la température de 95°C dans un bloc chauffant ($\approx 30 \text{ min}$), maintenue à

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

C. Etude par PAGE

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

V. Cristallogénèse et cristallisation

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

VI. Cristallographie aux rayons X

A. Résolution des structures tridimensionnelles

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

B. Validation des structures tridimensionnelles

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

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

Bibliographie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Brünger A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson and G. L. Warren (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst*, **D54**:905-921.

Budavari S., M. J. O'Neil, A. Smith and P. E. Heckelman (1989). The Merck index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, *11th ed.* Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., U.S.A.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Crick F. H. (1966). Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol*, **19**:548-555.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Ennifar E., P. Walter, B. Ehresmann, C. Ehresmann and P. Dumas** (2001). Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol*, **8**:1064-1068.
- Faber C., H. Sticht, K. Schweimer and P. Rösch** (2000). Structural rearrangements of HIV-1 Tat-responsive RNA upon binding of neomycin B. *J Biol Chem*, **275**:20660-20666.
- Famulok M. and A. Hüttenhofer** (1996). *In vitro* selection analysis of neomycin binding RNAs with a mutagenized pool of variants of the rRNA decoding region. *Biochemistry*, **35**:4265-4270.
- Fan P., A. K. Suri, R. Fiala, D. Live and D. J. Patel** (1996). Molecular recognition in the FMN-RNA aptamer complex. *J Mol Biol*, **258**:480-500.
- Feinberg H., D. A. Mitchell, K. Drickamer and W. I. Weis** (2001). Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science*, **294**:2163-2166.
- Ferguson A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs and W. Welte** (1998). Siderophore-mediated iron transport : crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science*, **282**:2215-2220.
- Ferré-D'Amaré A. R. and J. A. Doudna** (1999). RNA FOLDS: insights from recent crystal structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **28**:57-73.
- Fisher-Wilson J.** (2002). Renewing the fight against bacteria. *The Scientist*, **16**:22-23.
- Fong D. H. and A. M. Berghuis** (2002). Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry. *EMBO J*, **21**:2323-2331.
- Forge A. and J. Schacht** (2000). Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol*, **5**:3-22.
- Forst D., W. Welte, T. Wacker and K. Diederichs** (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat Struct Biol*, **5**:37-46.
- Fourmy D., M. I. Recht, S. C. Blanchard and J. D. Puglisi** (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, **274**:1367-1371.
- Fourmy D., M. I. Recht and J. D. Puglisi** (1998a). Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A site of 16S rRNA. *J Mol Biol*, **277**:347-362.
- Fourmy D., S. Yoshizawa and J. D. Puglisi** (1998b). Paromomycin binding induces a local conformational change in the A site of 16S rRNA. *J Mol Biol*, **277**:333-345.
- Gale E. F., E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond and M. J. Waring** (1981). The molecular basis of antibiotic action, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., London.
- Gallego J. and G. Varani** (2001). Targeting RNA with small-molecule drugs: therapeutic

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Hermann T. and E. Westhof** (1998). Aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme: a general model for the interaction of cationic antibiotics with RNA. *J Mol Biol*, **276**:903-912.
- Hermann T. and E. Westhof** (1999a). Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds. *J Med Chem*, **42**:1250-1261.
- Hermann T. and E. Westhof** (2000). Rational drug design and high-throughput techniques for RNA targets. *Comb Chem High Throughput Screen*, **3**:219-234.
- Hermann T. and E. Westhof** (1999b). Saccharide-RNA recognition. *Biopolymers*, **48**:155-165.
- Hirose K., D. M. Hockenbery and E. W. Rubel** (1997). Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure *in vitro*. *Hear Res*, **104**:1-14.
- Hogrefe R. I., A. P. McCaffrey, L. U. Borozdina, E. S. McCampbell and M. M. Vaghefi** (1993). Effect of excess water on the desilylation of oligoribonucleotides using tetrabutylammonium fluoride. *Nucleic Acids Res*, **21**:4739-4741.
- Holbrook S. R., C. Cheong, I. Tinoco and S. H. Kim** (1991). Crystal structure of an RNA double-helix incorporating a track of non-Watson-Crick base pairs. *Nature*, **353**:579-581.
- Holbrook S. R., E. L. Holbrook and H. E. Walukiewicz** (2001). Crystallization of RNA. *Cell Mol Life Sci*, **58**:234-243.
- Holbrook S. R. and S. H. Kim** (1997). RNA crystallography. *Biopolymers*, **44**:3-21.
- Hutchin T. and G. Cortopassi** (1994). Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*, **38**:2517-2520.
- Hutchin T., I. Haworth, K. Higashi, N. Fischel-Ghodsian, M. Stoneking, N. Saha, C. Arnos and G. Cortopassi** (1993). A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res*, **21**:4174-4179.
- Hyun Ryu D., A. Litovchick and R. R. Rando** (2002). Stereospecificity of aminoglycoside-ribosomal interactions. *Biochemistry*, **41**:10499-10509.
- Hyun Ryu D. and R. R. Rando** (2001). Aminoglycoside binding to human and bacterial A-site rRNA decoding region constructs. *Bioorg Med Chem*, **9**:2601-2608.
- Hyun Ryu D. and R. R. Rando** (2002). Decoding region bubble size and aminoglycoside antibiotic binding. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**:2241-2244.
- Ida T., R. Okamoto, M. Nonoyama, K. Irinoda, M. Kurazono and M. Inoue** (2002). Antagonism between aminoglycosides and β -Lactams in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate involves induction of an aminoglycoside-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**:1516-1521.

- Jezowska-Bojczuk M., A. Karaczyn and H. Kozlowski** (1998). Copper(II) binding to tobramycin: potentiometric and spectroscopic studies. *Carbohydr Res*, **313**:265-269.
- Jiang F., R. Ajay Kumar, R. A. Jones and D. J. Patel** (1996). Structural basis of RNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex. *Nature*, **382**:183-186.
- Jiang L., A. K. Suri, R. Fiala and D. J. Patel** (1997). Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex. *Chem Biol*, **4**:35-50.
- Jiang L. C., A. Majumdar, W. D. Hu, T. J. Jaishree, W. K. Xu and D. J. Patel** (1999). Saccharide-RNA recognition in a complex formed between neomycin B and an RNA aptamer. *Structure Fold Des*, **7**:817-827.
- Jiang L. C. and D. J. Patel** (1998). Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex. *Nature Struct Biol*, **5**:769-774.
- Jossinet F. and E. Westhof** (2001). How to fold RNA. *Angew Chem Int Ed*, **39**:1139-1139.
- Joynson J. A., B. Forbes and R. J. W. Lambert** (2002). Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. *J Appl Microbiol*, **93**:96-107.
- Kaul M. and D. S. Pilch** (2002). Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition: the binding of neomycin-class aminoglycosides to the A site of 16S rRNA. *Biochemistry*, **41**:7695-7706.
- Kawaguchi H., T. Naito, S. Nakagawa and K. I. Fujisawa** (1972). BB-K8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot*, **25**:695-708.
- Kawahara S., T. Wada and M. Sekine** (1995). A new method for removal of the 2'-TBDMS group under acidic conditions in chemical synthesis of RNA. *Nucleic Acids Symp Series*, **34**:29-30.
- Kondo S. and K. Hotta** (1999). Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: development and enzymatic modifications. *J Infect Chemother*, **5**:1-9.
- Kondo S., K. Iinuma, H. Yamamoto, K. Maeda and H. Umezawa** (1973). Syntheses of 1-n-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl)-kanamycin B and -3', 4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J Antibiot*, **26**:412-415.
- Kopka M. L., C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura and R. E. Dickerson** (1985a). Binding of an antitumor drug to DNA, Netropsin and CGCGAATT^{Br}CGCG. *J Mol Biol*, **183**:553-563.
- Kopka M. L., C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura and R. E. Dickerson** (1985b). The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**:1376-1380.
- Kotra L. P., J. Haddad and S. Mobashery** (2000). Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob*

Agents Chemother, **44**:3249-3256.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Curr Opin Chem Biol, **6**:289-296.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Nissen P., J. A. Ippolito, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz** (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**:4899-4903.
- Noah J. W. and P. Wollenzien** (1998). Dependence of the 16S rRNA decoding region structure on Mg²⁺, subunit association, and temperature. *Biochemistry*, **37**:15442-15448.
- Noller H. F.** (1991). Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem*, **60**:191-227.
- Ogle J. M., D. E. Brodersen, W. M. Clemons Jr, M. J. Tarry, A. P. Carter and V. Ramakrishnan** (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, **292**:897-902.
- Otwinowski Z. and W. Minor.** (1996). Processing of X-Ray diffraction data collected in oscillation mode. *Dans Methods in Enzymology*. C. W. J. Carter and R. M. Sweet (ed.), vol. 276. Academic Press.
- Oubridge C., A. Kuglstatter, L. Jovine and K. Nagai** (2002). Crystal structure of SRP19 in complex with the S domain of SRP RNA and its implication for the assembly of the signal recognition particle. *Mol Cell*, **9**:1251-1261.
- Owston M. A. and E. H. Serpersu** (2002). Cloning, overexpression, and purification of aminoglycoside antibiotic 3-acetyltransferase-IIIb: conformational studies with bound substrates. *Biochemistry*, **41**:10764-10770.
- Pace N. R.** (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**:734-740.
- Pape T., W. Wintermeyer and M. V. Rodnina** (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol*, **7**:104-107.
- Pedersen L. C., M. M. Benning and H. M. Holden** (1995). Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase. *Biochemistry*, **34**:13305-13311.
- Pelt J. M.** (2001). Quel avenir pour les antibiotiques ?, p. 35-57. *Dans Les remèdes naturels*. Librairie A. Fayard, Paris.
- Perz J. F., A. S. Craig, C. S. Coffey, D. M. Jorgensen, E. Mitchel, S. Hall, W. Schaffner and M. R. Griffin** (2002). Changes in antibiotic prescribing for children after a community-wide campaign. *JAMA*, **287**:3103-3109.
- Pjura P. E., K. Grzeskowiak and R. E. Dickerson** (1987). Binding of Hoechst 33258 to the minor groove of B-DNA. *J Mol Biol*, **197**:257-271.
- Prammananan T., P. Sander, B. A. Brown, K. Frischkorn, G. O. Onyi, Y. Zhang, E. C. Böttger and R. J. Wallace, Jr.** (1998). A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Infect Dis*, **177**:1573-1581.

- Prater B. D., S. C. Tuller and L. J. Wilson** (1999). Simplex optimization of protein crystallization conditions. *J Cryst Growth*, **196**:674-684.
- Price K. E.** (1986). Aminoglycoside research 1975-1985: prospects for development of improved agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **29**:543-548.
- Price K. E. and J. C. Godfrey** (1974). Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. *Adv Appl Microbiol*, **18**:191-307.
- Price S. R., P. R. Evens and K. Nagai** (1998). Crystal structure of the spliceosomal U2B''-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature*, **394**:645-650.
- Priuska E. M., K. Clark-Baldwin, V. L. Pecoraro and J. Schacht** (1998). NMR studies of iron-gentamicin complexes and the implications for aminoglycoside toxicity. *Inorganica Chimica Acta*, **273**:85-91.
- Puglisi J. D. and I. Tinoco Jr.** (1989). Absorbance melting curves of RNA, p. 304-325. *Dans Methods in enzymology*, vol. 180. Academic Press, London.
- Purohit P. and S. Stern** (1994). Interactions of a small RNA with antibiotics and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature*, **370**:659-662.
- Quintana J. R., A. A. Lipanov and R. E. Dickerson** (1991). Low-temperature crystallographic analyses of the binding of Hoechst 33258 to the double-helical DNA dodecamer CGCGAATTCGCG. *Biochemistry*, **30**:10294-10306.
- Quiocho F. A. and N. K. Vyas** (1984). Novel stereospecificity of the L-arabinose-binding protein. *Nature*, **310**:381-386.
- Quiocho F. A., D. K. Wilson and N. K. Vyas** (1989). Substrate specificity and affinity of a protein modulated by bound water molecules. *Nature*, **340**:404-407.
- Ramakrishnan V.** (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, **108**:557-572.
- Ramakrishnan V. and P. B. Moore** (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol*, **11**:144-154.
- Rather P. N.** (1998). Origins of the aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Discov Today*, **1**:285-291.
- Recht M. I., S. Douthwaite and J. D. Puglisi** (1999). Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*, **18**:3133-3138.
- Recht M. I., D. Fourmy, S. C. Blanchard, K. D. Dahlquist and J. D. Puglisi** (1996). RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J Mol Biol*, **262**:421-436.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Schroeder R., C. Waldsich and H. Wank** (2000). Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*, **19**:1-9.
- Schuch R., D. Nelson and V. A. Fischetti** (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, **418**:884-889.
- Sciotti R. J., M. Pliushchev, P. E. Wiedeman, D. Balli, R. Flamm, A. M. Nilius, K. Marsh, D. Stolarik, R. Jolly, R. Ulrich and S. W. Djuric** (2002). The synthesis and biological evaluation of a novel series of antimicrobials of the oxazolidinone class. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**:2121-2123.
- Sears P. and C. H. Wong** (1996). Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**:12086-12093.
- Sears P. and C. H. Wong** (1998). Mechanism-based inhibition of carbohydrate-mediated biological recognitions. *Chem Commun*, 1161-1169.
- Sharff A. J., L. E. Rodseth and F. A. Quijcho** (1993). Refined 1.8 Å structure reveals the mode of binding of beta-cyclodextrin to the maltodextrin binding protein. *Biochemistry*, **32**:10553-10559.
- Shaw K. J., P. N. Rather, R. S. Hare and G. H. Miller** (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*, **57**:138-163.
- Shieh H.-S., H. M. Berman, S. Neidle, G. Taylor and M. Sanderson** (1982). The structure of a hydrated 1:2 complex of adenylyl(3'-5')adenosine-proflavine hemisulphate. *Acta Cryst*, **B38**:523-531.
- Sievert D. M., M. L. Boulton, G. Stoltman, D. Johnson, M. G. Stobierski, F. P. Downes, P. A. Somsel, J. T. Rudrik, W. Brown, W. Hafeez, T. Lundstrom, E. Flanagan, R. Johnson, J. Mitchell and S. Chang** (2002). *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin - United States, 2002. *MMWR*, **51**:565-567.
- Slee A. M., M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory and M. Forbes** (1987). Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: *in vitro* and *in vivo* activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agents Chemother*, **31**:1791-1797.
- Smith D. L., A. D. Harris, J. A. Johnson, E. K. Silbergeld and J. G. Morris, Jr.** (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:6434-6439.
- Soukup J. K., N. Minakawa, A. Matsuda and S. A. Strobel** (2002). Identification of A-minor tertiary interactions within a bacterial group I intron active site by 3-deazaadenosine interference mapping. *Biochemistry*, **41**:10426-10438.
- Spickler C., M.-N. Brunelle and L. Brakier-Gingras** (1997). Streptomycin binds to the decoding center of 16S ribosomal RNA. *J Mol Biol*, **273**:586-599.

- Stage T. K., K. J. Hertel and O. C. Uhlenbeck** (1995). Inhibition of the hammerhead ribozyme by neomycin. *RNA*, **1**:95-101.
- Stahl G., G. P. McCarty and P. J. Farabaugh** (2002). Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends Biochem Sci*, **27**:178-183.
- Sucheck S. J. and Y. K. Shue** (2001). Combinatorial synthesis of aminoglycoside libraries. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **4**:462-470.
- Sucheck S. J., A. L. Wong, K. M. Koeller, D. D. Boehr, K. Draker, P. S. Sears, G. D. Wright and C. H. Wong** (2000). Design of bifunctional antibiotics that target bacterial rRNA and inhibit resistance-causing enzymes. *J Am Chem Soc*, **122**:5230 - 5231.
- Sullivan J. M., J. Goodisman and J. C. Dabrowiak** (2002). Absorption studies on aminoglycoside binding to the packaging region of human immunodeficiency virus type-1. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**:615-618.
- Swaminathan P., E. Westhof and M. Sundaralingam** (1982). Structure of a 1:2 sandwich complex of proflavine and adenosine with an unusual puckering disorder and a site shared by sulfate and water molecules. *Acta Cryst*, **B38**:515-522.
- Swaminathan S. and S. Eswaramoorthy** (2000). Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol*, **7**:693-699.
- Swaney S. M., H. Aoki, M. C. Ganoza and D. L. Shinabarger** (1998). The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**:3251-3255.
- Szábó L., S. Jamal, H. Xie, S. J. Charnock, D. N. Bolam, H. J. Gilbert and G. J. Davies** (2001). Structure of a family 15 carbohydrate-binding module in complex with xylopentaose. Evidence that xylan binds in an approximate 3-fold helical conformation. *J Biol Chem*, **276**:49061-49065.
- Takumida M. and M. Anniko** (2001). Nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells following gentamicin exposure *in vitro*. *Acta Otolaryngol*, **121**:346-350.
- Tan Y. T., D. J. Tillett and I. A. McKay** (2000). Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol Med Today*, **6**:309-314.
- Taniguchi H., B. Chang, C. Abe, Y. Nikaido, Y. Mizuguchi and S. I. Yoshida** (1997). Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J Bacteriol*, **179**:4795-4801.
- Tok J. B.-H., J. H. Cho and R. R. Rando** (1999). Aminoglycoside antibiotics are able to specifically bind the 5'-untranslated region of thymidylate synthase messenger RNA. *Biochemistry*, **38**:199-206.
- Tuerk C., P. Gauss, C. Thermes, D. R. Groebe, M. Gayle, N. Guild, G. Stormo, Y. d'Aubenton-Carafa, O. C. Uhlenbeck, I. Tinoco, Jr. and et al.** (1988). CUUCGG

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

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

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

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

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

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

Voet D. and J. G. Voet (1998). Biochimie, 2^e ed. De Boek Université.

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

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

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

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

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

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

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

- Wang A. H., G. Ughetto, G. J. Quigley and A. Rich** (1987). Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2 Å resolution. *Biochemistry*, **26**:1152-1163.
- Wang A. H., G. Ughetto, G. J. Quigley and A. Rich** (1986). Interactions of quinoxaline antibiotic and DNA: the molecular structure of a triostin A-d(GCGTACGC) complex. *J Biomol Struct Dyn*, **4**:319-342.
- Wang S., P. W. Huber, M. Cui, A. W. Czarnik and H.-Y. Mei** (1998). Binding of neomycin to the TAR element of HIV-1 RNA induces dissociation of Tat protein by an allosteric mechanism. *Biochemistry*, **37**:5549-5557.
- Wang Y., K. Hamasaki and R. R. Rando** (1997). Specificity of aminoglycoside binding to RNA constructs derived from the 16S rRNA decoding region and the HIV-RRE activator region. *Biochemistry*, **36**:768-779.
- Wang Y., J. Killian, K. Hamasaki and R. R. Rando** (1996). RNA molecules that specifically and stoichiometrically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities. *Biochemistry*, **35**:12338-12346.
- Wang Y. and R. R. Rando** (1995). Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA. *Chem Biol*, **2**:281-290.
- Westhof E.** (1999). Chemical diversity in RNA cleavage. *Science*, **286**:61-62.
- Westman E. and R. Strömberg** (1994). Removal of *t*-butyldimethylsilyl protection in RNA-synthesis. Triethylamine trihydrofluoride (TEA, 3HF) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride (TBAF). *Nucleic Acids Res*, **22**:2430-2431.
- Wijkmans J. C. and R. P. Beckett** (2002). Combinatorial chemistry in anti-infectives research. *Drug Discov Today*, **7**:126-132.
- Williams S. J. and G. J. Davies** (2001). Protein-carbohydrate interactions: learning lessons from nature. *Trends Biotechnol*, **19**:356-362.
- Wimberly B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch and V. Ramakrishnan** (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, **407**:327-339.
- Woese C. R., S. Winker and R. R. Gutell** (1990). Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**:8467-8471.
- Wong C.-H., M. Hendrix, E. S. Priestley and W. A. Greenberg** (1998). Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chem Biol*, **5**:397-406.
- Woodcock J., D. Moazed, M. Cannon, J. Davies and H. F. Noller** (1991). Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA. *EMBO J*, **10**:3099-3103.

- Wright G. D., A. M. Berghuis and S. Mobashery.** (1998). Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance, p. 27-69. *Dans Resolving the antibiotic paradox: progress in understanding drug resistance and development of new antibiotics.* B. P. Rosen and S. Mobashery (ed.). Plenum Press, New York.
- Wu W. J., S. H. Sha and J. Schacht** (2002). Recent advances in understanding aminoglycoside ototoxicity and its prevention. *Audiol Neurotol*, **7**:171-174.
- Yang Y., M. Kochoyan, P. Burgstaller, E. Westhof and M. Famulok** (1996). Structural basis of ligand discrimination by two related RNA aptamers resolved by NMR spectroscopy. *Science*, **272**:1343-1347.
- Yoshida M., T. Shintani, M. Hirao, T. Himi, A. Yamaguchi and K. Kikuchi** (2001). Aminoglycoside-induced hearing loss in a patient with the 961 mutation in mitochondrial DNA. *ORL*, **64**:219-222.
- Yoshizawa S., D. Fourmy and J. D. Puglisi** (1999). Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science*, **285**:1722-1725.
- Yoshizawa S., D. Fourmy and J. D. Puglisi** (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J*, **17**:6437-6448.
- Zapp M. L., S. Stern and M. R. Green** (1993). Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production. *Cell*, **74**:969-978.
- Zhang L. and J. A. Doudna** (2002). Structural insights into group II intron catalysis and branch-site selection. *Science*, **295**:2084-2088.
- Zhu C. B., A. Sunada, J. Ishikawa, Y. Ikeda, S. Kondo and K. Hotta** (1999). Role of aminoglycoside 6'-acetyltransferase in a novel multiple aminoglycoside resistance of an actinomycete strain #8: inactivation of aminoglycosides with 6'-amino group except arbekacin and neomycin. *J Antibiot*, **52**:889-894.
- Zimmermann G. R., R. D. Jenison, C. L. Wick, J.-P. Simorre and A. Pardi** (1997). Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA. *Nature Struct Biol*, **4**:644-649.
- Zuker M.** (2000). Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr Opin Struct Biol*, **10**:303-310.

Erratum

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

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